



Analyse fonctionnelle du variant d'histone H2A.J impliqué dans le développement d'un phénotype pro-inflammatoire en sénescence induite par des dommages à l'ADN

Adèle Mangelinck

► To cite this version:

Adèle Mangelinck. Analyse fonctionnelle du variant d'histone H2A.J impliqué dans le développement d'un phénotype pro-inflammatoire en sénescence induite par des dommages à l'ADN. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UP-ASL063 . tel-03917122

HAL Id: tel-03917122

<https://theses.hal.science/tel-03917122>

Submitted on 1 Jan 2023

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.

Analyse fonctionnelle du variant d'histone H2A.J impliqué dans le développement d'un phénotype pro-inflammatoire en sénescence induite par des dommages à l'ADN

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n° 577

Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative
Biology of the Cell (I2BC), 91198 Gif-sur-Yvette, France

Référent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette,
le 21 décembre 2020, par**

Adèle MANGELINCK

Composition du Jury

Claire FRANCASTEL

Directrice de recherche, Université Paris
7 Diderot

Rapporteure, Présidente du jury

Saadi KHOCHBIN

Directeur de recherche, IAB

Rapporteur

Geneviève ALMOUZNI

Directrice de recherche, Institut Curie

Examinatrice

Estelle NICOLAS

Chargée de recherche, CBI

Examinatrice

Sébastien BLOYER

Professeur, Université Paris-Saclay

Examineur

Carl MANN

Directeur de recherche, CEA-Saclay

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse, Dr. Carl MANN. Il y a des chefs qui peuvent transcender cette simple position hiérarchique et devenir bien plus. Carl est de ces personnes. Ta gentillesse, ta disponibilité, ton savoir et ta passion ont fait de ces trois années de thèse une aventure exceptionnelle. Je ne saurais combien te remercier pour m'avoir fait confiance et acceptée dans ton équipe.

J'aimerais remercier l'ensemble des membres du Jury pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail : Claire Francastel, Saadi Khochbin, Geneviève Almouzni, Estelle Nicolas et Sébastien Bloyer.

Je souhaite aussi remercier les membres des différents Comités de Suivi de Thèse ayant jalonné ces trois années : Sophie Polo qui a également été ma tutrice, Ali Hamiche, François Fenaille, Matthieu Gérard et Christian Muchardt. Les échanges que nous avons eus ont été très enrichissants et la pertinence de vos remarques ont contribué à l'amélioration de ce travail.

Je souhaite remercier l'ensemble des collaborateurs de ce projet pour leurs nombreux apports. Merci aux membres de l'animalerie, Jean-Charles, Sylvain, Anne-Sophie et Patrick, pour votre aide précieuse. Merci à ceux de la plateforme de séquençage de l'I2BC, Yan, Erwin, ainsi que celle de spectrométrie de masse pour vos conseils et votre disponibilité. Merci à François Fenaille pour ton expertise précieuse en spectrométrie de masse ainsi qu'à Daniel Lewandowski et l'équipe de Geneviève Derumeaux - Maria, Hao, Maïssa et Thaïs - pour votre aide incroyable lors des études sur les souris.

Je tiens particulièrement à remercier les membres de mon laboratoire et les personnes qui ont partagé mon quotidien pendant cette thèse. Vous avez été pour moi une source de bonheur et m'avez permis de canaliser le stress et la pression engendrés par l'envie de bien faire.

Merci Jean-Yves pour tes conseils avisés, ton soutien et ta bonne humeur.

Merci Régis pour ton aide quotidienne et ta gentillesse sans limite. Tu auras véritablement été ma bouée de sauvetage tant sur les plans scientifiques et techniques que humains. En quelques mots donc : Régis, t'es le plus fort, t'es le meilleur et on t'adore !

Merci à Valentin, ta passion communicative aura été un véritable booster. Merci aux étudiants que j'ai eu le plaisir d'avoir à mes côtés, Mathieu et Jorge. J'espère que vos stages auront été des expériences riches et mémorables. Et merci à tous les doctorants et post-doctorants du bâtiment : Célia, Victoire, Sigrid, Xavier, Marina, Sylvain et les autres. Nous avons vécu ensemble des moments d'orgies alimentaires et de rires qui resteront gravés dans ma mémoire. Je vous souhaite à tous beaucoup de réussite dans vos projets professionnels et personnels.

Merci à mes autres collègues : Gwen et Agnès, Michel, Benoît, Matthieu, Hélène, Jean-Christophe, Stéphane, Jean, Gilles et les Chauvat. Merci à vous pour vos conseils et votre bonne humeur. Merci notamment à tous les coureurs (Célia, Régis et Jean-Yves compris) avec qui j'ai passé de très bons moments. Vous avez contribué à ma bonne santé physique et mentale !

Merci à toi aussi Emilie. Sans ton aide, je me serais complètement perdue dans les tréfonds de la bioinformatique. Grâce à toi, je pense avoir acquis une vision assez précise de l'analyse de données de ChIP-seq et de RNA-seq. Merci infiniment ! Merci également à l'ensemble des encadrants de l'école de bioinformatique AVIESAN-IFB pour leur expertise et leur bonne humeur. En particulier, je tiens à remercier Olivier Kirsh pour son investissement dans le projet tutoré.

Enfin, merci Catherine pour ta disponibilité et ta bonne humeur. Avec toi, l'administratif prend des couleurs de soleil. Et merci aussi aux personnes de la laverie pour votre travail impeccable et votre sourire.

J'aimerais également remercier les professeurs que j'ai pu avoir tout au long de ma scolarité. C'est indéniablement grâce à eux que se sont développées mon envie d'apprendre et ma passion pour la science. Ils sont les architectes de l'ombre de cette thèse.

Je souhaite remercier ma famille et mes amis qui ont, chacun à leur façon, joué un rôle dans cette aventure. Papa, maman, Elie, vous avez toujours été là. C'est grâce à vous que je suis devenue qui je suis aujourd'hui. Clara, Jeanne, Marie-Laure, Stéphane, et tous les autres, nous avons pris des chemins différents mais, malgré la distance, vous restez des personnes chères à mon cœur et je sais que je pourrai toujours compter sur vous. Christophe, Guillaume, Noémie, je suis heureuse de pouvoir vous compter parmi mes amis. Vous êtes des personnes formidables.

Pour conclure, je tiens à remercier du fond du cœur celui qui a traversé cette période de thèse à mes côtés et qui a dû en supporter les hauts et les bas. Tu es ce que j'ai de plus précieux en ce monde Etienne et j'espère que nous pourrons partager une vie longue et bien remplie ensemble.

Et merci à vous de lire ce travail. Bien qu'imparfait, j'espère que sa qualité sera à la hauteur de vos attentes. Bonne lecture !

Success consists of going from failure to failure
without loss of enthusiasm.

Winston Churchill

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	7
Table des figures et tableaux	11
Table des abréviations	13
Avant-propos	17
Etat de l'art.....	19
Chapitre 1 : La sénescence	19
I. Induction de la sénescence	19
A. Sénescence répllicative.....	19
B. Sénescence prématurée.....	21
1. Stress de culture in vitro	21
2. Dommages à l'ADN.....	22
3. Sénescence induite par des oncogènes	23
4. Sénescence induite par la perte de suppresseurs de tumeurs	24
5. Autres facteurs d'induction possibles.....	24
II. Principales voies de signalisation de la sénescence	25
A. Voies associées à la sénescence répllicative.....	25
B. Voie p53/p21CIP	26
C. Voie p16INK4A/pRb.....	26
D. Maintien de la sénescence	27
III. Caractéristiques des cellules sénescents	28
A. Arrêt prolifératif.....	28
B. Changements morphologiques.....	28
C. Augmentation de l'activité β -galactosidase	29
D. Résistance à l'apoptose	29
E. Formation de foyers d'hétérochromatine	30
F. Modification de l'expression génique	30
G. Autres marqueurs de la sénescence.....	31
IV. SASP	32
A. Composition du SASP.....	32
1. Cytokines et chimiokines.....	33
2. Facteurs de croissance	33
3. Protéases.....	34
4. Molécules insolubles et non-protéiques.....	34

B. Voies de signalisation du SASP.....	34
1. Le DDR.....	35
2. La voie p38MAPK.....	36
3. La voie cGAS-STING	36
4. La voie interféron	37
5. Les facteurs précoces du SASP	38
6. La voie mTOR	38
C. Effets autocrines et paracrines du SASP	39
V. Rôles de la sénescence in vivo	40
A. Homéostasie et développement	40
B. Réparation des tissus.....	41
C. Vieillesse et pathologies liées à l'âge	41
D. Cancer	42
E. Applications en clinique	43
Chapitre 2 : L'information épigénétique	47
I. Organisation structurale et dynamique de la chromatine.....	47
A. Structure de l'ADN.....	47
B. Structure du nucléosome	48
C. Dynamique du nucléosome	49
1. Assemblage et désassemblage des nucléosomes	49
2. Remodelage de la chromatine	52
II. Organisation structurale du génome : les structures d'ordres supérieurs de la chromatine.....	54
A. Le chromosome mitotique.....	54
B. Euchromatine et hétérochromatine	55
C. Domaines chromatiniens et territoires chromosomiques	56
III. Facteurs épigénétiques et régulation des processus liés à l'ADN	57
A. Modifications post-traductionnelles des histones	57
1. Types de modifications post-traductionnelles des histones.....	57
2. Code histone	58
3. Communication croisée des modifications d'histones.....	61
4. Domaines d'interaction avec des histones modifiées	61
B. Histones canoniques et variants.....	64
1. Les variants de l'histone H2A	66
2. Les variants de l'histone H2B.....	68
3. Les variants de l'histone H3.....	68
4. Les variants de l'histone de liaison H1.....	69
Chapitre 3 : L'information épigénétique associée à la sénescence cellulaire	73
I. Epigénome de la sénescence.....	73

A. Modifications épigénétiques en sénescence.....	73
1. Marques épigénétiques associées aux SAHFs.....	73
2. Modification des domaines chromatiniens et territoires chromosomiques en sénescence	73
3. Modifications épigénétiques et expression des gènes en sénescence	75
B. Variants d'histones et sénescence.....	76
II. Le variant H2A.J	76
A. Variant H2A.J et sénescence.....	76
B. Spécificités du variant H2A.J.....	79
C. Le variant H2A.J dans d'autres contextes	80
Projet de doctorat.....	83
Description générale	83
Sujet 1 : Les variants d'histones dans le vieillissement, la sénescence cellulaire et le cancer	85
I. Introduction.....	85
II. Stratégies de recherche des données et d'écriture.....	85
Publication : Histone Variants in Aging and Cancer.....	87
Sujet 2 : Mécanisme d'action du variant H2A.J dans la régulation de l'expression du SASP en sénescence.....	89
I. Introduction.....	89
II. Stratégies d'analyses.....	89
A. Identification des partenaires protéiques de H2A.J.....	89
1. Fixer ou ne pas fixer les interactions.....	89
2. La co-immunoprécipitation comme technique de base	90
3. La tandem affinity purification comme technique de criblage	91
4. La chromatographie d'exclusion stérique pour séparer les complexes	91
5. Un peu d'intracellulaire pour compléter ?.....	92
B. Immunoprécipitations de chromatine et analyses transcriptomiques.....	93
1. Principe du ChIP-seq	94
2. Principe du RNA-seq	95
3. Analyses bioinformatiques	95
Publication : The H2A.J histone variant contributes to Interferon-Stimulated Gene expression in senescence by its weak interaction with H1 and the derepression of repeated DNA sequences	97
Sujet 3 : Fonctions physiologiques et organe/tissu/cellule-spécifiques du variant H2A.J	99
I. Introduction.....	99
II. Le modèle de souris H2AFJ-KO.....	99
III. Stratégies d'analyses	103
A. Spécificités de localisation de H2A.J	103

B. H2A.J et sénescence/vieillissement/inflammation	103
1. Etude de longévité	103
2. Régime high fat.....	103
C. Autres fonctions de H2A.J	104
IV. Résultats et discussions	104
A. Spécificités de localisation de H2A.J	104
B. Etudes physiologiques.....	111
1. Etude de longévité	111
2. Etude de l'obésité	111
3. Etude de l'érythropoïèse	121
Conclusion et perspectives	125
Mécanisme d'action de H2A.J pendant la sénescence	125
H2A.J et les phénotypes sécrétoires in vivo.....	127
H2A.J et sénescence/vieillissement/inflammation in vivo	128
H2A.J et l'érythropoïèse	128
Références bibliographiques.....	131
Annexes.....	161

Table des figures et tableaux

Figure 1 : La structure des télomères humains et leurs facteurs protecteurs.	20
Figure 2 : Les ondes électromagnétiques : spectre et relation énergie-longueur d'onde.	22
Figure 3 : Les voies de signalisation d'induction de la sénescence.	25
Figure 4 : Rôles de p16 et p21 dans l'induction de la sénescence.	27
Figure 5 : Morphologie de fibroblastes WI-38 en prolifération, quiescence et sénescence.	29
Figure 6 : Activité β -galactosidase dans des fibroblastes WI-38 en prolifération, quiescence et sénescence.	29
Figure 7 : Organisation spatiale de la chromatine dans des fibroblastes WI-38 en prolifération, quiescence et sénescence.	30
Figure 8 : Caractéristiques des cellules sénescences.	32
Figure 9 : Mécanisme d'action de NFkB.	35
Figure 10 : Principales voies de signalisation d'expression du SASP.	39
Figure 11 : Effets autocrines et paracrines du SASP.	40
Figure 12 : Structure de l'ADN et des nucléotides.	48
Figure 13 : Structure du nucléosome et des hétérodimères d'histones.	49
Figure 14 : Dynamique de la chromatine.	51
Figure 15 : Classification fonctionnelle des remodeleurs de la chromatine.	53
Figure 16 : Modèle de condensation de l'ADN en chromosome mitotique basé sur une organisation en fractales.	55
Figure 17 : Structures d'ordres supérieurs de la chromatine.	57
Figure 18 : Modifications post-traductionnelles des acides aminés.	58
Figure 19 : Les différents niveaux de contrôle des modifications d'histones.	61
Figure 20 : Structure tri-dimensionnelle d'un bromodomaine.	62
Figure 21 : Structures tri-dimensionnelles des domaines d'interaction avec des résidus méthylés.	64
Figure 22 : Structures tri-dimensionnelles des domaines d'interaction avec des résidus phosphorylés.	64
Figure 23 : Organisation génomique, transcription et séquences protéiques des histones.	71
Figure 24 : Changements d'organisation spatiale globaux associés à la sénescence.	74
Figure 25 : Changements de modifications d'histones en sénescence.	75
Figure 26 : Schéma du protocole expérimental de K. Contrepolis.	76
Figure 27 : Accumulation du variant d'histone H2A.J en sénescence induite avec des dommages à l'ADN dans des fibroblastes humains.	77
Figure 28 : Importance de l'accumulation de H2A.J pour une expression normale du SASP en sénescence.	77
Figure 29 : ChIP H2A.J ciblé sur le gène du SASP IL1B et le gène de ménage GAPDH.	78
Figure 30 : Accumulation de H2A.J avec l'âge dans l'épiderme murin (A) et humain (B).	78
Figure 31 : Quantification de l'ARN messager de H2A.J et de diverses H2A en prolifération, sénescence et quiescence.	79
Figure 32 : Alignement de séquence protéique de H2A.J avec H2A1, H2A2 et H2A.X.	80
Figure 33 : Schéma descriptif du principe de la co-immunoprécipitation.	90
Figure 34 : Schéma descriptif du principe du double hybride.	91
Figure 35 : Schéma descriptif du principe de la tandem affinity purification.	91
Figure 36 : Schéma descriptif de la séparation de complexes par chromatographie d'exclusion stérique.	92

Figure 37 : Schéma descriptif du principe du Proximity Ligation Assay.	93
Figure 38 : Protocole d'induction de la sénescence en 7 jours.	93
Figure 39 : Etapes du ChIP-seq.	95
Figure 40 : Stratégies d'analyses de données de ChIP-seq (A) et RNA-seq (B).	95
Figure 41 : Séquence du gène H2AFJ et caractéristiques exploitées.	100
Figure 42 : Rétrocroisements et proximités génétiques théoriques.	101
Figure 43 : Exemples de données de génotypage (A) et de séquençage (B) des souris.	102
Figure 44 : Expression de H2A.J dans les testicules.	105
Figure 45 : Localisation tissulaire de H2A.J chez l'homme et la souris par immunohistochimie.	106
Figure 46 : Expression tissulaire du gène H2AFJ.	107
Figure 47 : Expression de H2A.J dans des lignées luminales et basales de cancer du sein et de la prostate par immunofluorescence et Western Blot.	108
Figure 48 : Graphiques d'analyse GSEA dans les T47D parentales vs H2A.J-KO.	109
Figure 49 : Heat map des données transcriptomiques des WI38, HFPM168 et HFPM170 en prolifération et en sénescence concernant les facteurs du SASP.	109
Figure 50 : Evaluation de l'arrêt prolifératif (A) et de l'expression de H2A.J (B) dans des WI38 et HFPM168 en prolifération et en sénescence induite par irradiation à 20 Gy - 10 jours.	110
Figure 51 : Courbes de suivi de poids des souris de la cohorte de longévité.	111
Figure 52 : Courbes de suivi de poids des souris des cohortes high fat.	112
Figure 53 : Test de tolérance à l'insuline.	113
Figure 54 : Test de tolérance au glucose.	114
Figure 55 : Poids des organes des souris des cohortes high fat 1 & 2.	116
Figure 56 : Echographie cardiaque chez les souris mâles des cohortes high fat 1 & 2.	117
Figure 57 : Poids de différents tissus adipeux des souris des cohortes high fat 1 & 2.	119
Figure 58 : Formulation sanguine des souris des cohortes high fat 1 & 2 : données concernant les populations de leucocytes.	120
Figure 59 : Formulation sanguine des souris des cohortes high fat 1 & 2 : données concernant les populations de thrombocytes (A-C) et d'érythrocytes (D-G).	122
Figure 60 : Formulation sanguine des souris de l'étude de l'érythropoïèse.	123
Figure 61 : Test de réponse à la phénylhydrazine.	124
 Tableau 1 : Conditions cellulaires expérimentales.	 93
Tableau 2 : Proximité des souris issues du 5 ^{ème} rétrocroisement C57BL/6J avec les fonds génétiques de départ.	102
Tableau 3 : Nombre de souris par groupe dans les cohortes 1 & 2 pour lesquelles une stéatose hépatique a pu être observée visuellement.	118

Table des abréviations

3'-UTR 3'-UnTranslated Region	DNA-PK DNA-dependent Protein Kinase
3C Chromosome Conformation Capture	DNase2 DeoxyriboNuclease 2
4-HT 4-Hydroxy-Tamoxifène	E2F E2 factor
53BP1 p53-Binding Protein 1	EdU 5-Ethynyl-2'-deoxyUridine
ADN Acide DésoxyriboNucléique	ELISA Enzyme Linked ImmonuSorbent Assay
ALT Alternative Lengthening of Telomeres	EPO Erythropoïétine
APC/C^{Cdh1} Anaphase Promoting Complex/Cyclosome	ER Estrogen Receptor
ARF ADP-Ribosylation Factor	ERK Extracellular signal-Regulated Kinase
ARNm Acide RiboNucléique messenger	ETS E26
ASF1 AntiSilencing Function protein 1	E/GWAT Epididymal/Gonadal White Adipose Tissue
ATM Ataxia Telangiectasia Mutated	EZH2 Enhancer of Zeste Homolog 2
ATP/ADP Adenosine TriPhosphate or Diphosphate	FACT FACilitates Chromatin Transcription
ATR Ataxia Telangiectasia and Rad3-related	FRAP Fluorescence Recovery After Photobleaching
AUC Area Under Curve	GFP Green Fluorescent Protein
BAT Brown Adipose Tissue	GNAT Gcn5-related N-AcetylTransferases
Bcl-2 B-Cell Lymphoma 2	GRO-α/β GROwth-regulated α/β protein
BMI-1 B-cell lymphoma Mo-MLV Insertion region 1	GSEA Gene Set Enrichment Analysis
BRCT BRCA1 (BREast Cancer susceptibility protein-1) C-Terminal	GTT Glucose Tolerance Test
BrdU 5-Bromo-2'-deoxyUridine	HAT Histone AcetylTransferase
CAF1 Chromatin Assembly Factor 1	HDAC Histone DeACetylase
CENP-A CENtromere Protein A	HDM Histone DeMethylase
CBP CREB (cAMP Response Element-Binding protein)-Binding Protein	HFD Histone Fold Domain
CBX7 ChromoBoX protein homolog 7	HGF Hepatocyte Growth Factor
CCF Cytoplasmic Chromatin Fragment	HIRA HIstone cell cycle Regulator A
CCL chemokine C-C motif Ligand	HJURP Holliday JUncion Recognition Protein
CDC25 Cell-Division Cycle 25	HKMT Histone lysine (K) MethylTransferase
CDKI Cyclin Dependent Kinase Inhibitor	HP1 Heterochromatin Protein 1
cFOS human homolog of vFOS (Finkel-Biskis-Jenkins murine Osteogenic Sarcoma virus)	HSC70 Heat ShoCk 70
cGAMP cyclic GMP-AMP	HSP90 Heat Shock Protein 90
cGAS cyclic GMP-AMP Synthase	hTERT human TELomerase Reverse Transcriptase
CHD Chromodomain Helicase DNA-binding	HUS1 HydroxyUrea-Sensitive 1
ChIP Chromatin ImmunoPrecipitation	IFIT InterFeron-Induced protein with TetraTricopeptide repeats
CHK1/2 CHeckpoint Kinase $\frac{1}{2}$	IFITM InterFeron-Induced TransMembrane protein
CTCF CCCTC-binding Factor	IFN InterFeroN
CTGF Connective Tissue Growth Factor	IGF Insulin Growth Factor
CXCL chemokine C-X-C motif Ligand	IGFBP Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins
DAPI 4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole	IkB Inhibitor of kappa B
DDR DNA Damage Response	

IL InterLeukin
INO80 INOsitol requiring 80
IPO4/9 ImPOrtin 4/9
IRAK Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase
IRF3/9 Interferon Regulatory Factor 3/9
ISG Interferon-Stimulated Gene
ISGF3 Interferon-Stimulated Gene Factor 3
ISRE Interferon-Stimulated Response Element
ISWI Imitation SWItch
ITT Insulin Tolerance Test
IWAT Inguinal White Adipose Tissue
JAK1 JAnus Kinase 1
JMJD2A JuMonJi Domain containing 2A
Ki-67 dérivé de la ville Kiel (Allemagne) et du puit de plaque 96 puits du clone ayant permis sa découverte
LAD Lamina-Associated Domain
MAPK Mitogen-Activated Protein Kinase
MBT Malignant Brain Tumor
MCM2 MiniChromosome Maintenance complex component 2
MDC1 Mediator of DNA-damage Checkpoint 1
MEF Mouse Embryonic Fibroblast
MEK MAPK/ERK Kinase
MMP Matrix MetalloProteinase
MOS MOloney Sarcoma
MPT Modifications Post-Traductionnelles
MRE11 Meiotic Recombination 11 homolog
MRN MRE11-RAD50-NBS1
MSK1/2 Mitogen- and Stress-activated protein Kinase 1/2
MST1 Macrophage-STimulating 1
mTOR mammalian Target Of Rapamycin
MYST MOZ-Ybf2-Sas2-TIP60
NAP1 Nucleosome Assembly Protein 1
NASP Nuclear Autoantigenic Sperm Protein
NBS1 Nijmegen Breakage Syndrome 1
NF1 NeuroFibromin 1
NFkB Nuclear Factor kappa B
NPM2 NucleoPhosMin/NucleoPlasMin 2
OIS Oncogene-Induced Senescence
PAI1/2 Plasminogen Activator Inhibitor 1/2
PAR Poly-ADP-Ribose
PCNA Proliferating Cell Nuclear Antigen
PHD Plant HomeoDomain
POLE DNA POLYmerase Epsilon

POT1 Protection Of Telomeres 1
PRMT Protein Arginine (R) MethylTransferase
PRWAT Peri-Renal White Adipose Tissue
PTEN Phosphatase and TENsin homolog
RAC1 RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAD RADiation-sensitive mutation
RAF-BRAF-CRAF RA† Fibrosarcoma
RAP1 Repressor/Activator Protein 1
RAS-HRAS RA† Sarcoma
Rb Retinoblastoma protein
ROS Reactive Oxygen Species
RPA Replication Protein A
SAHFs Senescence-Associated Heterochromatin Foci
SAM S-AdenosylMethionine
SASP Senescence-Associated Secretory Phenotype
SAXS Small Angle X-rays Scattering
SH2 Src Homology region 2
SIPS Stress-Induced Premature Senescence
SMS Senescence-Messaging Secretome
SNP Single Nucleotide Polymorphism
STAT1/2 Signal Transducer and Activator of Transcription 1 and 2
STING STimulator of INterferon Genes
SUV420H2 SUPpressor of Variegation 420 homolog 2
SWI/SNF SWItch/Sucrose Non-Fermentable
TAD Topologically Associated Domains
TFIID Transcription Factor II D
TGF Transforming Growth Factor
TIN2 TRF1- and TRF2-Interacting Nuclear protein 2
TIS Therapy-Induced Senescence
TLR Toll-Like Receptor
TOPBP1 TOPoisomerase-II-Binding Protein 1
TPP1 (aussi appelée TINT1, PTOP et PIP1) TriPeptidyl-Peptidase 1
TREX1 3' Repair EXonuclease 1
TRF1/2 Telomeric Repeat binding Factor 1/2
TSS Transcription Start Site
TYK2 TYrosine Kinase 2
UHPLC-MS Ultra High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry

uPA/tPA urokinase/tissue-type Plasminogen
Activator
UV UltraViolet
VEGF Vascular Endothelial Growth Factor
VHL Von Hippel-Lindau

WNT Wingless-type MMTV iNTegration
site family
WT Wild Type
ZFP36 Zing Finger Protein 36

Avant-propos

Viellir et mourir est le destin inéluctable de chacun. Cette perspective est bien souvent source d'angoisse à cause du mystère qui l'entoure et l'urgence de vivre pleinement qu'elle inspire. Néanmoins, le vieillissement n'est pas seulement une affaire individuelle. Il représente également un enjeu social et économique majeur. L'augmentation continue de l'espérance de vie depuis la fin du XVIII^{ème} siècle suscite depuis quelques décennies la crainte du vieillissement de la population. Sur un plan médical, l'âge représente le principal facteur de risque d'apparition de nombreuses pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, la plupart des cancers, les maladies respiratoires chroniques, le diabète, les maladies neurologiques et psychiatriques, etc. Ainsi, le vieillissement soulève la question épineuse du financement du nombre grandissant de pensions de retraite et de l'augmentation des frais médicaux.

Dans ce contexte, il est intéressant de constater à quel point l'étude de la mortalité et de la survie a dominé la recherche sur le vieillissement pendant très longtemps avant de laisser davantage place à l'étude de l'apparition des pathologies associées.

La sénescence cellulaire est une réponse permettant le blocage de la prolifération des cellules endommagées ou dysfonctionnelles. Elle revêt donc d'une grande importance pour le maintien de l'intégrité fonctionnelle cellulaire et tissulaire avec l'âge et s'impose comme un obstacle majeur face à la progression tumorale. Néanmoins, le sécrétome des cellules sénescents contribue à l'établissement d'une inflammation qui peut devenir chronique avec l'âge puisqu'il est accompagné d'une accumulation de ces cellules.

Par ailleurs, le protocole thérapeutique classique en cancérologie vise généralement à l'induction de dommages à l'ADN dans les cellules tumorales par chimio ou radiothérapie (et une résection par chirurgie). Ces traitements, bien qu'efficaces, ont des répercussions néfastes sur les cellules environnantes. Ces cellules peuvent devenir sénescents et sécréter des facteurs inflammatoires favorisant le développement tumoral.

Ce projet de doctorat s'inscrit dans l'optique d'une meilleure compréhension des mécanismes d'expression du sécrétome inflammatoire des cellules induites en sénescence par des dommages à l'ADN. Je me suis plus particulièrement intéressée au variant d'histone H2A.J s'accumulant spécifiquement lors de la sénescence cellulaire induite par des dommages à l'ADN et favorisant la dérégulation des gènes d'inflammation. J'ai pu élucider un mécanisme d'action de H2A.J expliquant son rôle dans l'expression des gènes d'inflammation lors de la sénescence cellulaire induite par des dommages à l'ADN. J'ai également développé et étudié un modèle de souris KO-H2AFJ, ce qui a permis de mettre en évidence l'importance du variant H2A.J dans un contexte physiologique.

Etat de l'art

Chapitre 1 : La sénescence

La sénescence est une réponse aux stress des cellules caractérisée par un arrêt irréversible du cycle cellulaire. Les cellules sénescents maintiennent néanmoins une activité métabolique ce qui se traduit par l'apparition de nombreuses caractéristiques phénotypiques. Lors de sa découverte et des premières années de recherche, il a été supposé que la sénescence était liée au vieillissement et à la suppression des tumeurs. De nombreuses données confirment aujourd'hui que la sénescence contribue au vieillissement et à la suppression des tumeurs mais aussi à la tumorigénèse ainsi qu'à la réparation des tissus.

Ce premier chapitre a pour but de décrire l'état actuel des connaissances concernant les différents inducteurs de la sénescence, les voies de signalisation intervenant dans l'initiation et le maintien de la sénescence ainsi que les caractéristiques des cellules sénescents. Je m'attarderai plus particulièrement sur le sécrétome des cellules sénescents et son implication dans les différents rôles que peuvent jouer les cellules sénescents *in vivo*.

I. Induction de la sénescence

A. Sénescence répliative

La sénescence cellulaire a été mise en évidence pour la première fois en 1961 par Hayflick et Moorhead (Hayflick & Moorhead, 1961) grâce à l'observation d'une perte de la capacité proliférative de fibroblastes humains *in vitro* au cours du temps. Chez les mammifères, l'extrémité des chromosomes, appelée télomère, est constituée d'une séquence répétitive 5'-TTAGGG-3' (Moyzis et al., 1988). Ces extrémités physiques devraient normalement être perçues comme des cassures double brin de l'ADN mais la structure particulière des télomères et la présence de facteurs associés préviennent l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR : DNA Damage Response).

Le brin riche en guanine des télomères, appelé brin G, est plus long que le brin C de 50 à 500 nucléotides chez les mammifères, formant ce qu'on appelle le 3' overhang (Wright et al., 1997). Cette séquence simple brin vient alors s'apparier avec une séquence plus en amont du brin C, formant ainsi une boucle double brin appelée T-loop et une boucle simple brin appelée D-loop. Des facteurs reconnaissant la séquence répétitive TTAGGG s'associent avec les T-loop et D-loop des télomères et répriment l'activation du DDR : TRF1 et TRF2 (Telomeric Repeat binding Factor 1 and 2) reconnaissent la T-loop tandis que POT1 (Protection Of Telomeres 1) reconnaît le simple brin de la D-loop. Ces dernières

recrutent ensuite les autres protéines du complexe protégeant les télomères : TIN2 (TRF1- and TRF2-Interacting Nuclear protein 2), RAP1 (Repressor/Activator Protein 1) et TPP1 (TriPeptidyl-Peptidase 1, aussi appelée TINT1, PTOP et PIP1) (Palm & de Lange, 2008).

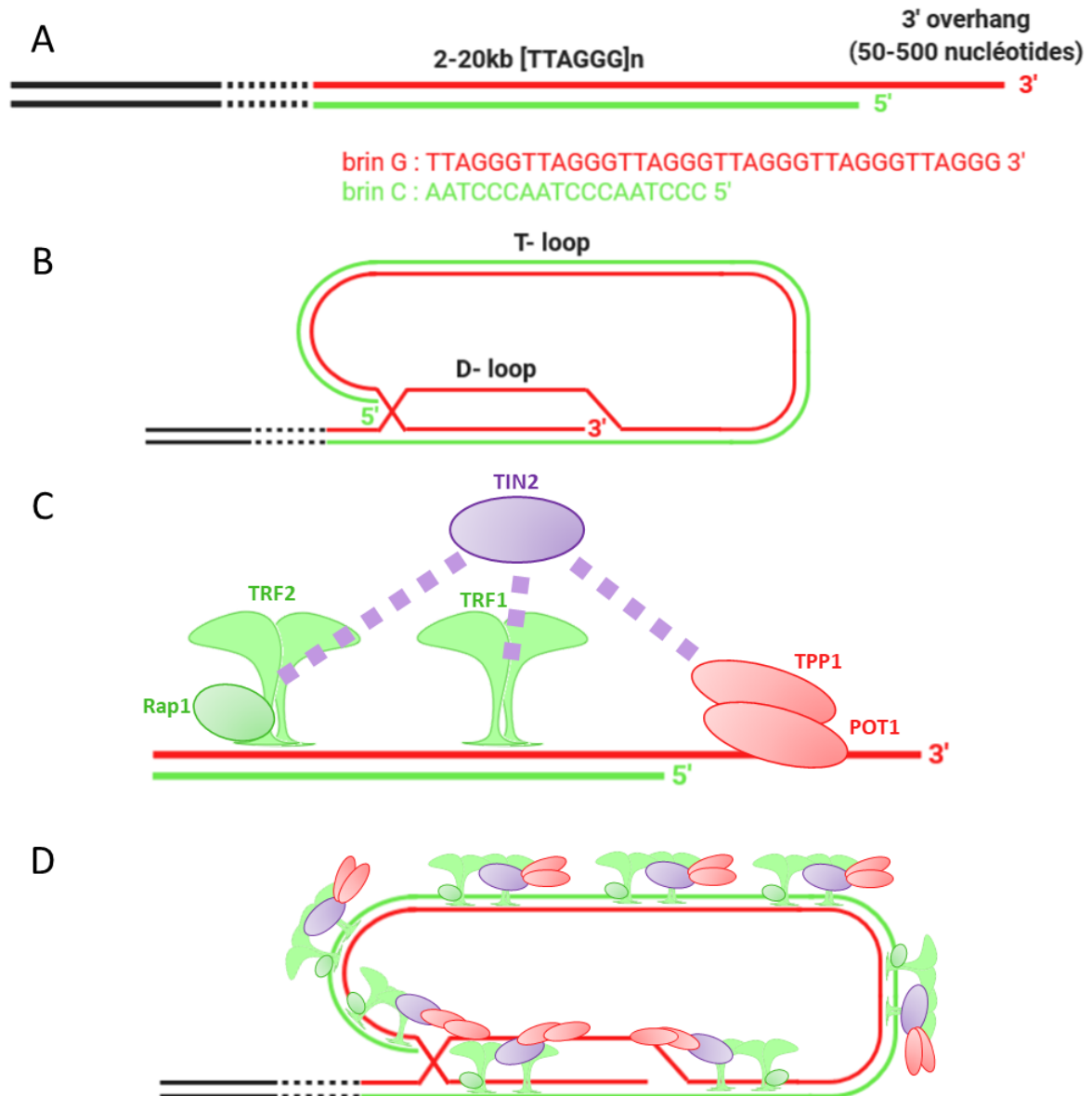


Figure 1 : La structure des télomères humains et leurs facteurs protecteurs.
 (A) Structure primaire des télomères humains. (B) Repliement des télomères en T-loop et D-loop.
 (C) Les six facteurs protecteurs des télomères et leurs interactions. (D) Représentation schématique générale. Adapté de (Palm & de Lange, 2008).

Bien qu'elle assure une protection contre l'activation du DDR, cette organisation spatiale des télomères empêche l'ADN polymérase de copier correctement les derniers nucléotides lors de la réplication. Par conséquent, les télomères raccourcissent à chaque phase S (Harley et al., 1990). Lorsqu'ils atteignent une taille minimale critique, le DDR est activé. Il n'existe pas à ce jour de longueur consensuelle déterminant la taille minimale critique. L'hypothèse privilégiée pour expliquer l'activation soudaine du DDR est que le

nombre de facteurs protecteurs devient insuffisant pour empêcher les interactions de senseurs de dommages à l'ADN avec les extrémités des chromosomes alors reconnues comme des cassures double brin (d'Adda di Fagagna, 2008; Palm & de Lange, 2008).

En temps normal, l'arrêt prolifératif induit par l'activation du DDR permet à la cellule de réparer les cassures d'ADN avant de recommencer à se diviser. Toutefois, dans le cas de la sénescence répllicative, les dommages ne sont pas réparables. Afin de préserver l'intégrité du génome, la prolifération ne reprend donc pas dans ces cellules (Fumagalli et al., 2012).

La sénescence répllicative peut être évitée en exprimant l'holoenzyme hTERT (human TElomerase Reverse Transcriptase). Cette holoenzyme ajoute des séquences télomériques répétitives directement aux extrémités des chromosomes ce qui rallonge indéfiniment la durée de vie des cellules *in vitro* en absence de stress exogènes (Bodnar et al., 1998). La plupart des cellules normales n'expriment pas hTERT. En revanche, de nombreuses cellules cancéreuses l'expriment (Shay & Bacchetti, 1997) ou utilisent un système alternatif ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) permettant de rallonger les télomères par recombinaison homologue (Cesare & Reddel, 2010; Henson & Reddel, 2010).

B. Sénescence prématurée

1. Stress de culture *in vitro*

Le microenvironnement est capable de modifier le comportement des cellules. Notamment, lorsque des cellules sont extraites d'un organisme pour être mises en culture *in vitro*, elles doivent s'adapter à un environnement artificiel caractérisé par l'absence de diversité cellulaire environnante et de composants de la matrice cellulaire mais aussi par des concentrations anormales de nutriments, de facteurs de croissance et de dioxygène. L'une ou plusieurs de ces conditions peuvent induire une sénescence (Coppé et al., 2010; Parrinello et al., 2003) alors appelée sénescence induite par des stress de culture (SIPS : Stress-Induced Premature Senescence) (Toussaint et al., 2000). Ce type d'arrêt du cycle cellulaire est indépendant de la longueur des télomères. En effet, il est inductible notamment dans les cellules de souris qui, contrairement à la plupart des cellules humaines, expriment la télomérase (Prowse & Greider, 1995) et possèdent de longs télomères (Kipling & Cooke, 1990).

La culture de cellules épithéliales mammaires humaines sur un tapis de fibroblastes ou dans un milieu spécifique permet d'augmenter le nombre de divisions possibles (Herbert et al., 2002; Ramirez et al., 2001). De même, en réduisant le taux de dioxygène jusqu'à un niveau physiologique de 3%, il est possible de retarder l'entrée en sénescence de fibroblastes d'embryons de souris (MEF : Mouse Embryonic Fibroblast) et de fibroblastes humains (Packer & Fuehr, 1977; Parrinello et al., 2003).

2. Dommages à l'ADN

La réponse aux dommages à l'ADN peut être activée avant l'apparition de la sénescence répllicative par l'utilisation d'agents génotoxiques (Roninson, 2003) ou bien par irradiation γ (Di Leonardo et al., 1994), X (Suzuki et al., 2001) ou UV (Lewis et al., 2008).

Les rayons γ , X et UV sont différents types de rayonnements électromagnétiques. L'énergie des rayons UV peut être absorbée par l'ADN et provoquer la dimérisation des pyrimidines ainsi que la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species). De même, les rayons γ et X sont capables de générer des ROS et ce plus efficacement que les rayons UV car ils ont une plus haute énergie. Les rayons γ et X résultent tous les deux du rayonnement électromagnétique d'un photon à haute fréquence mais diffèrent par l'origine de ce photon : les rayons X sont émis par des électrons en-dehors du noyau tandis que les rayons γ sont émis par le noyau lui-même. Ils se caractérisent également par des longueurs d'ondes et énergies différentes : les rayons γ possèdent une plus petite longueur d'onde et une plus haute énergie.

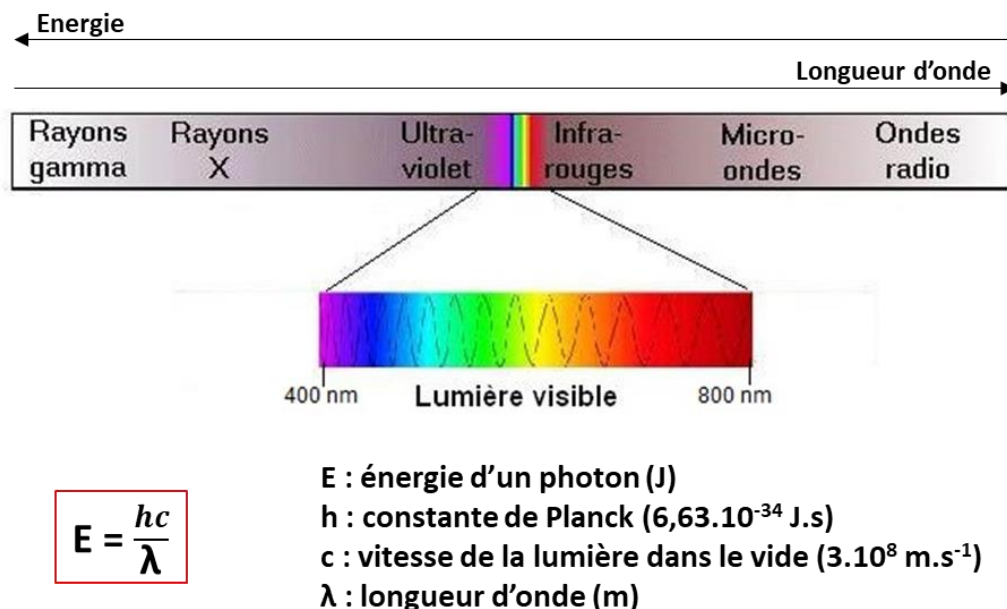


Figure 2 : Les ondes électromagnétiques : spectre et relation énergie-longueur d'onde.

Parmi les agents génotoxiques, on peut notamment citer l'étoposide, un composé de chimiothérapie faisant souvent partie du protocole standard de traitement pour de nombreux types de cancer. Il s'agit d'un inhibiteur de la topoisomérase-II normalement chargée de la re-ligation des brins d'ADN (Minocha & Long, 1984). L'étoposide contribue donc au maintien des cassures double brin habituellement transitoires créées lors de la réplication et de la transcription. L'induction de la sénescence à la fois dans des cellules normales mais aussi tumorales par ce type d'inducteur est connue sous le nom de sénescence induite par thérapie (TIS : Therapy-Induced Senescence) (Roninson, 2003).

3. Sénescence induite par des oncogènes

Les oncogènes sont des versions mutées de gènes qui, lorsque combinées, ont le potentiel de rendre les cellules malignes. Les cellules normales répondent à l'activation d'un oncogène en entrant en sénescence. C'est ce que l'on appelle la sénescence induite par des oncogènes (OIS : Oncogene-Induced Senescence). Ce phénomène a été observé pour la première fois lorsqu'un mutant d'activation permanente de HRAS, HRAS^{V12}, a été introduit par infection rétrovirale dans des cellules primaires et une lignée immortalisée hTERT. L'activation de cet oncogène engendre alors un phénotype semblable à celui des cellules sénescents : arrêt prolifératif, changements morphologiques, activation des voies suppresseurs de tumeurs p53 et p16, augmentation de l'activité β -galactosidase (Serrano et al., 1997). Par la suite, d'autres membres de la voie de signalisation RAS tels que BRAF (Michaloglou et al., 2005), CRAF (Zhu et al., 1998), MEK (Lin et al., 1998), RAC1 (Debidda et al., 2006) et MOS (Bartkova et al., 2006) capables d'induire ce type de sénescence ont été identifiés.

Afin de faciliter l'étude de ce modèle d'entrée en sénescence, une alternative à l'infection rétrovirale a été développée : une protéine chimérique composée du domaine catalytique activé de l'oncogène CRAF, du récepteur d'œstrogènes (ER : Estrogen Receptor) et de la GFP (Green Fluorescent Protein). Lorsque du 4-HT (4-Hydroxy-Tamoxifène) est ajouté dans le milieu de culture, il se fixe au récepteur d'œstrogènes et permet l'activation de l'oncogène. La sénescence est alors induite de manière rapide et homogène (Zhu et al., 1998). D'autres systèmes d'inductions conditionnelles comprenant RAS activé (Sarkisian et al., 2007; Tarutani et al., 2003) et MEK1 activé (Treinies et al., 1999) ont aussi été développés avec succès.

A la base, l'activation d'un oncogène stimule la prolifération cellulaire. Cette prolifération excessive constitue un risque de transformation maligne pour la cellule. L'entrée en sénescence s'impose alors comme une réponse protectrice. Cette idée est étayée par le fait que des cellules murines cultivées dans du milieu sans sérum (limitant ainsi leur prolifération) résistent à une induction de la sénescence par activation de RAS (Woo & Poon, 2004). On peut noter que la sénescence induite par des oncogènes s'accompagne généralement d'une activation de la réponse aux dommages à l'ADN (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Mallette et al., 2007). La phase hyperproliférative étant de courte durée, la longueur des télomères ne s'en trouve pas fortement réduite (Michaloglou et al., 2005). Néanmoins, elle provoque la formation de nombreuses fourches de réplication dont la progression peut être défectueuse (Di Micco et al., 2006). Cela pourrait expliquer l'activation du DDR. Un autre élément en faveur de cette hypothèse est que le moment où cette activation du DDR est observée coïncide avec la fin de la phase hyperproliférative et l'entrée en sénescence (Di Micco et al., 2006). De plus, l'inactivation de certaines de ses protéines clés empêche l'entrée en sénescence, permet le maintien de la prolifération et prédispose les cellules à une transformation maligne (Di Micco et al., 2006).

In vitro, l'OIS semble donc constituer un puissant mécanisme de protection contre la

tumorigénèse. Ce phénomène a également été étudié dans des contextes physiologiques. Chez la souris, l'activation de RAS provoque l'apparition d'une lésion bénigne dans laquelle se trouvent des cellules sénescents (Collado et al., 2005). De même, les naevi (lésions bénignes de la peau) contiennent des cellules sénescents exprimant l'oncogène BRAF (Michaloglou et al., 2005). Cette entrée en sénescence suite à l'activation d'un oncogène dépend de l'intensité du signal oncogénique. En effet, il a été montré dans des tissus mammaires qu'une faible induction de RAS stimule la prolifération cellulaire et mène finalement à un développement tumoral tandis qu'une forte induction de RAS active les voies de suppression des tumeurs et mène finalement à une entrée en sénescence des cellules (Sarkisian et al., 2007).

4. Sénescence induite par la perte de suppresseurs de tumeurs

La perte ou l'inactivation de suppresseurs de tumeurs tels que PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), NF1 (NeuroFibromin 1) et VHL (Von Hippel-Lindau) peut également induire une sénescence prématurée (Z. Chen et al., 2005; Courtois-Cox et al., 2006; Young et al., 2008). La perte de PTEN entraîne l'activation de p53 via les voies mTOR et ARF (ADP-Ribosylation Factor) ainsi que l'activation de p16 via le désassemblage du complexe APC/C^{Cdh1} entraînant l'accumulation de ETS2 (Nardella et al., 2011). Dans le cas de NF1, l'induction de la sénescence passe par une augmentation de l'activité RAS (Courtois-Cox et al., 2006). Quant à VHL, la perte de son expression induit la sénescence via une perte de p400 qui entraîne l'accumulation de p27 puis l'activation de pRb (Retinoblastoma protein) (Young et al., 2008).

5. Autres facteurs d'induction possibles

L'utilisation d'inhibiteurs d'histones désacétylases (HDAC) comme le butyrate de sodium ou la trichostatine A favorisant la formation d'euchromatine, induit l'apparition d'un phénotype sénescents dans des fibroblastes humains (Munro et al., 2004; Ogryzko et al., 1996). Il est intéressant de noter que l'inhibition de l'histone acétyl transférase CBP/p300 favorisant la formation d'hétérochromatine, induit également l'apparition d'un phénotype sénescents dans des mélanocytes (Bandyopadhyay et al., 2002). On ne sait pas à ce jour comment la sénescence peut découler de ces deux phénomènes chromatiniens antagonistes mais ces résultats soulignent l'importance des modifications de la chromatine lors de la sénescence.

Par ailleurs, certains facteurs sécrétés par des cellules sénescents comme IL6, IL8, IGFBP7 (Acosta et al., 2008; Wajapeyee et al., 2008) ou des cytokines anti-prolifératives comme IFN- β (Moiseeva et al., 2006) ou TGF- β (Katakura et al., 1999) peuvent renforcer un phénotype sénescents de manière autocrine et provoquer l'entrée en sénescence de cellules voisines de manière paracrine.

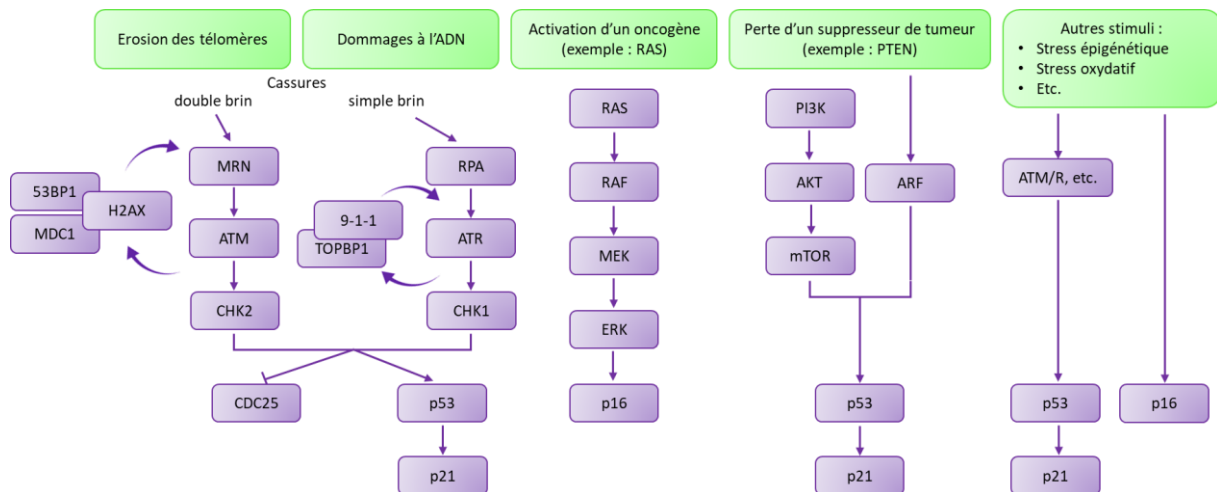


Figure 3 : Les voies de signalisation d'induction de la sénescence.

II. Principales voies de signalisation de la sénescence

L'induction et le maintien de la sénescence sont principalement contrôlés par deux voies de signalisation, la première impliquant p53 et p21, la seconde impliquant p16 et pRb. Généralement, ces deux voies interagissent pour renforcer le signal sénescence mais elles peuvent également stopper le cycle cellulaire de manière indépendante. Le choix entre l'une ou l'autre de ces voies dépend alors du stimulus d'induction, du type cellulaire et de l'espèce (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Il existe néanmoins quelques cas pour lesquels la sénescence est induite indépendamment de ces deux voies de signalisation (Olsen et al., 2002).

A. Voies associées à la sénescence répllicative

La sénescence répllicative est induite suite à la reconnaissance des télomères raccourcis par des senseurs de dommages à l'ADN. Il existe deux voies de signalisation détectant les cassures d'ADN et activant un arrêt du cycle cellulaire. L'une est impliquée en réponse à des cassures double brin tandis que l'autre signale les cassures simple brin.

Les cassures double brin sont détectées par le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1). Le domaine C-terminal de NBS1 recrute la protéine kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated). ATM s'autophosphoryle et phosphoryle ensuite le variant d'histone H2AX. γ H2AX (la forme phosphorylée de H2AX), aidé des médiateurs MDC1 (Mediator of DNA-damage Checkpoint 1) et 53BP1 (p53-Binding Protein 1), recrute à son tour des complexes MRN ce qui augmente l'activité locale d'ATM et provoque la propagation de γ H2AX sur plusieurs centaines de kilobases le long de la chromatine, formant un large foyer. CHK2 (CHeckpoint Kinase 2) est activé par phosphorylation par ATM et diffuse dans le nucléoplasme ce qui lui permet de propager la réponse aux dommages à l'ADN dans l'ensemble du noyau.

Une autre voie de réponse aux dommages à l'ADN est activée par la liaison de RPA (Replication Protein A) à l'ADN simple brin. Cela provoque le recrutement d'ATR (Ataxia

Telangiectasia and Rad3-related). L'activité d'ATR est augmentée par le complexe hétérotrimérique 9-1-1 (composé de RAD9, RAD1 et HUS1), un trimère structurellement proche de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et TOPBP1 (TOPoisomerase-II-Binding Protein 1). De même que pour des cassures double brin, CHK1 (CHeckpoint Kinase 1) est activé par phosphorylation par ATR avec l'aide de Claspin et diffuse dans le nucléoplasme ce qui lui permet de propager la réponse aux dommages à l'ADN dans l'ensemble du noyau.

A la fin, les deux cascades de signalisation convergent vers l'activation de p53 et l'inhibition de CDC25 (Cell-Division Cycle 25). L'inactivation de CDC25 provoque un arrêt rapide du cycle cellulaire. L'induction plus lente de p53 induit la transcription de p21 qui stabilise l'arrêt du cycle cellulaire (d'Adda di Fagagna, 2008).

B. Voie p53/p21CIP

Comme nous venons de le voir, la protéine p53 est l'inducteur privilégié dans le cas d'une sénescence induite par des dommages à l'ADN, que ce soit dans le cas d'une attrition télomérique ou d'un stress génotoxique. Elle joue le rôle crucial de liaison entre le signalement des dommages à l'ADN et les protéines de régulation du cycle cellulaire. Une fois activée par phosphorylation, p53 induit l'expression de p21^{CIP1}, un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines (CDKI : Cyclin Dependent Kinase Inhibitor) (Atadja et al., 1995; Vaziri et al., 1997). p21^{CIP1} se lie majoritairement aux complexes CDK2-cyclines A, D1 et E via CDK2 ce qui empêche leur activation (Harper et al., 1993; Stein et al., 1999) et entraîne l'accumulation de la protéine Rb (Retinoblastoma protein) sous sa forme hypophosphorylée. pRb réprime alors la transcription des gènes cibles de E2F impliqués dans la progression du cycle cellulaire (Narita et al., 2003; K. Ohtani et al., 1995; Sherr & McCormick, 2002) ce qui provoque un arrêt prolifératif, le plus souvent en phase G1 (Di Leonardo et al., 1994). Une fois l'entrée en sénescence accomplie, le niveau d'expression de p21^{CIP1} diminue rapidement (Stein et al., 1999). Il arrive parfois que les cellules soient arrêtées en phase G2 via le maintien du complexe cycline B-CDK1 dans un état inactif (Lossaint et al., 2011).

L'importance de cette voie a été mise en évidence par la possibilité d'éviter l'entrée en sénescence ou de la réverser en inhibant p53, p21^{CIP1} et différentes protéines des voies ATM/ATR (Beauséjour et al., 2003; Brown et al., 1997; d'Adda di Fagagna et al., 2003; Dirac & Bernards, 2003; Gire et al., 2004; Herbig et al., 2004; Jeanblanc et al., 2012).

C. Voie p16INK4A/pRb

En plus de p21^{CIP1}, un autre CDKI, p16^{INK4A}, joue un rôle important dans l'induction de la sénescence. Après l'entrée en sénescence des cellules, la diminution d'expression de p21^{CIP1} est relayée par une forte augmentation du niveau de p16^{INK4A} (Stein et al., 1999). Ainsi, cette protéine serait responsable de l'arrêt prolifératif à long terme. Néanmoins, certaines cellules sous certains stimuli d'induction de la sénescence passent principalement par la voie p16^{INK4A}/pRb (Beauséjour et al., 2003). Contrairement à p21^{CIP1}, p16^{INK4A} n'est pas sous le contrôle de p53 mais est régulé par la voie RAS-RAF-MEK-ERK

ainsi que d'autres voies encore méconnues (Lin et al., 1998; Serrano et al., 1997). L'oncogène RAS induit l'expression de p16^{INK4A} en activant les facteurs de transcription ETS (N. Ohtani et al., 2001). Pour ce qui est des voies autres que RAS-RAF-MEK-ERK, un mécanisme possible serait la réduction de l'expression des répresseurs Polycomb de p16^{INK4A} (Jacobs et al., 1999). Cette hypothèse est rendue plausible par l'augmentation du potentiel réplcatif de fibroblastes humains et murins lors d'une surexpression des protéines Polycomb BMI-1 (B-cell lymphoma Mo-MLV Insertion region 1) ou CBX7 (ChromoBoX protein homolog 7) (Gil et al., 2004; Itahana et al., 2003).

p16^{INK4A} interagit avec CDK4 et CDK6 ce qui entraîne l'accumulation de la protéine Rb (Retinoblastoma protein) sous sa forme hypophosphorylée (Serrano et al., 1993). pRb réprime alors la transcription des gènes cibles de E2F impliqués dans la progression du cycle cellulaire tels que ceux codant pour les cyclines A, D1 et E (Narita et al., 2003; K. Ohtani et al., 1995; Sherr & McCormick, 2002).

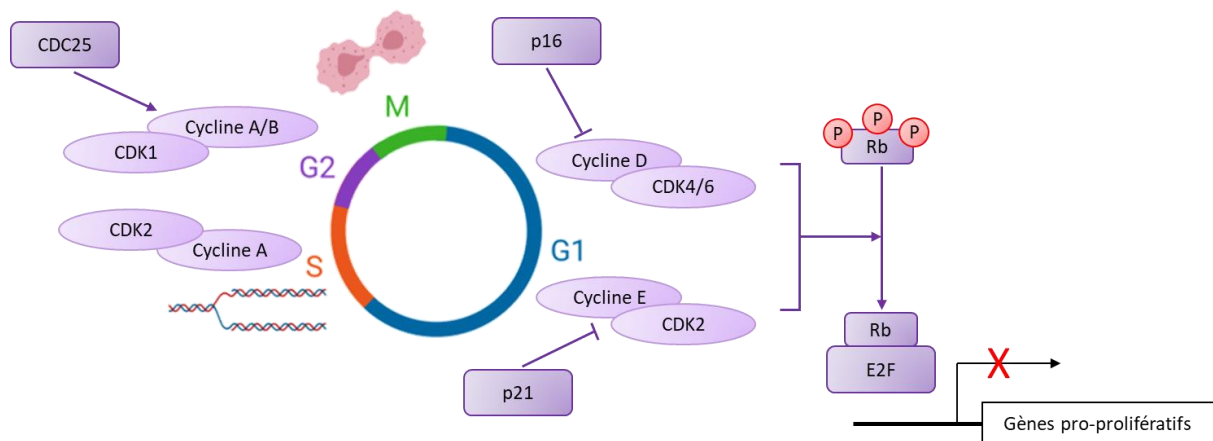


Figure 4 : Rôles de p16 et p21 dans l'induction de la sénescence.

D. Maintien de la sénescence

Les études préliminaires sur p16^{INK4A} et BRAF suggéraient que la sénescence cellulaire était irréversible (D. Kato et al., 1998; Zhu et al., 1998). Cependant, il a ensuite été montré l'existence de certains scénarios permettant d'échapper à la sénescence.

Tout d'abord, un arrêt prolifératif uniquement dû à l'activation de p21/p53 peut être réversé suite à l'inactivation de cette voie (Beauséjour et al., 2003; Herbig et al., 2004). Cependant, bien que des cellules avec une prolifération limitée à cause de l'activation de l'oncogène RAS puissent avoir une reprise de la progression du cycle cellulaire (Di Micco et al., 2006), les cellules qui sont complètement engagées dans la voie p16/pRB depuis plusieurs jours ne peuvent généralement pas échapper à la sénescence, même après une inactivation de p53, pRb ou p16 (Beauséjour et al., 2003). Néanmoins, il n'y a, à ce jour, pas de preuve que l'inactivation spontanée de ces protéines se produise dans les cellules sénescents *in vitro* ou *in vivo*, bien qu'un tel événement semble probable lors de l'évolution vers une tumeur maligne.

Par ailleurs, il est également possible d'observer une réversion de la sénescence en bloquant la sécrétion de certaines interleukines du phénotype sécrétoire nommé SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) (Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008). Certains composants du SASP tels que IL6, IL8, WNT16B et GRO- α (CXCL1) seraient en mesure de renforcer l'arrêt prolifératif de manière autocrine (Binet et al., 2009; Kuilman et al., 2008; G. Yang et al., 2006).

III. Caractéristiques des cellules sénescentes

Bien que la sénescence cellulaire puisse être déclenchée par de nombreux stimuli, les cellules sénescentes partagent un certain nombre de caractéristiques qui permettent leur identification *in vitro* et *in vivo*. Cependant, ces marqueurs ne peuvent être utilisés seuls car aucun n'est spécifique, ni même universel pour la plupart d'entre eux. De plus, la sénescence est une réponse et donc un processus qui évolue au cours du temps. Par conséquent, les caractéristiques des cellules sénescentes sont également changeantes ce qui renforce la nécessité d'une utilisation combinée des marqueurs connus.

A. Arrêt prolifératif

La principale caractéristique des cellules sénescentes est l'arrêt de la prolifération. Il s'agit d'une caractéristique nécessaire mais non suffisante à l'identification de la sénescence. En effet, des cellules en quiescence (en phase G0) ou en différenciation terminale présentent également un arrêt de la prolifération. Cette absence de réplication de l'ADN peut être détectée via la perte de marques de prolifération tels que l'incorporation de BrdU (5-Bromo-2'-deoxyUridine), EdU (5-Ethynyl-2'-deoxyUridine) ou ^3H -thymidine, ou encore un immunomarquage de Ki-67.

En général, les cellules sénescentes sont arrêtées en phase G1 (Di Leonardo et al., 1994; Herbig et al., 2004; Ogryzko et al., 1996; Serrano et al., 1997). Un arrêt en phase G2 est néanmoins possible dans certaines conditions : l'activation de certains oncogènes ou en réponse à un agent génotoxique (Gire & Dulić, 2015).

Contrairement aux cellules quiescentes, l'arrêt prolifératif des cellules sénescentes est considéré comme permanent car il n'est pas possible de relancer la prolifération en rétablissant des conditions de culture physiologiques. Il est cependant possible de dépasser cet arrêt prolifératif par des manipulations génétiques (Beauséjour et al., 2003; Dirac & Bernards, 2003; Jeanblanc et al., 2012) ou la déplétion de protéines de signalisation (Kuilman & Peeper, 2009).

B. Changements morphologiques

En entrant en sénescence, les cellules subissent d'importants changements de morphologie. Leur volume augmente et leur forme est modifiée : elles s'aplanissent, s'allongent et s'élargissent. Il est également possible d'observer la vacuolisation de leur réticulum endoplasmique et l'augmentation de leur masse lysosomale.

Curieusement, ces changements morphologiques diffèrent selon le stimulus d'induction. Un aplatissement s'observe dans les cellules induites en sénescence par l'activation de HRAS (Denoyelle et al., 2006; Serrano et al., 1997), par un stress de culture (Parrinello et al., 2003), par l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN (Di Leonardo et al., 1994; Roninson, 2003). Au contraire, les cellules induites en sénescence par l'activation de BRAF se caractérisent par une morphologie très allongée avec de longs prolongements cytoplasmiques (Denoyelle et al., 2006).

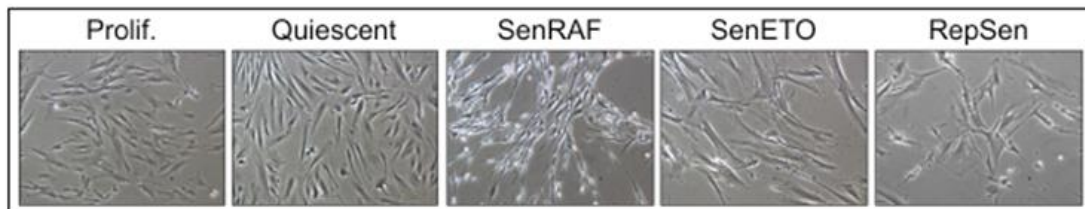


Figure 5 : Morphologie de fibroblastes WI-38 en prolifération, quiescence et sénescence.

Prolif. : prolifération ; *Quiescent* : quiescence 5 jours ; *SenRAF* : sénescence induite par l'activation de RAF 5 jours ; *SenETO* : sénescence induite par traitement étoposide 5 jours ; *RepSen* : sénescence répllicative. Images en contraste de phase réalisées par Kévin Contrepois.

C. Augmentation de l'activité β -galactosidase

Le marqueur le plus couramment utilisé pour l'identification des cellules sénescentes est l'activité de la β -galactosidase (Dimri et al., 1995). La forte activité lysosomale des cellules sénescentes induit l'accumulation de la β -galactosidase et permet donc sa détection aisée par marquage histochimique à la fois *in vitro* et *in vivo*. Néanmoins, ce marqueur n'est pas spécifique de la sénescence car une activité β -galactosidase est détectable dans les cellules quiescentes (N.-C. Yang & Hu, 2005).

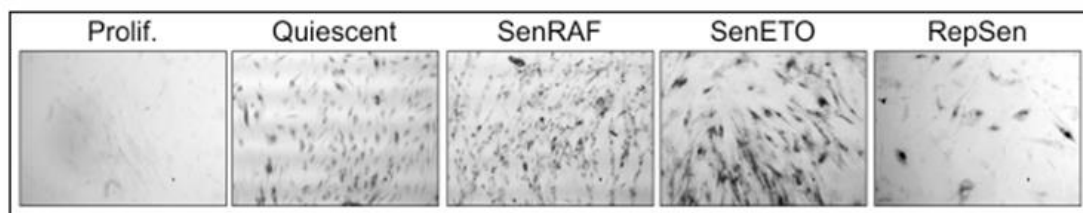


Figure 6 : Activité β -galactosidase dans des fibroblastes WI-38 en prolifération, quiescence et sénescence.

Prolif. : prolifération ; *Quiescent* : quiescence 5 jours ; *SenRAF* : sénescence induite par l'activation de RAF 5 jours ; *SenETO* : sénescence induite par traitement étoposide 5 jours ; *RepSen* : sénescence répllicative. Images en noir et blanc réalisées par Kévin Contrepois.

D. Résistance à l'apoptose

L'apoptose est le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction par fragmentation en corps apoptotiques qui sont ensuite phagocytés sans provoquer de réaction inflammatoire. Les facteurs orientant le choix d'une cellule vers la sénescence ou l'apoptose sont encore peu connus. Le type cellulaire semble déterminant puisque les fibroblastes et les cellules épithéliales entre préférentiellement en sénescence tandis

que les lymphocytes s'orientent plutôt vers l'apoptose. La nature et l'intensité du stress semblent aussi importantes (Rebbaa et al., 2003). De plus, la plupart des cellules sénescents acquièrent une résistance à certains signaux apoptotiques. Cette caractéristique a été rapportée pour la première fois par Wang (E. Wang, 1995) qui a observé que des fibroblastes proches de la sénescence répliquative sont plus résistants à une déplétion du sérum dans le milieu de culture que des fibroblastes s'étant encore peu doublés. Ce phénotype de résistance à l'apoptose a été lié au maintien d'un niveau élevé de Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2) dans les cellules. Par la suite, des études ont étendu ce phénotype de résistance à des traitements UV et avec des agents chimiotoxiques et l'ont relié à une faible expression de caspase-3 (Marcotte et al., 2004; Ryu et al., 2007). Une perte de stabilité de p53 pourrait également jouer un rôle (Seluanov et al., 2001).

E. Formation de foyers d'hétérochromatine

Une particularité des cellules sénescents est la formation de foyers de chromatine condensée appelés SAHFs (Senescence-Associated Heterochromatin Foci). Ces foyers peuvent être aisément détectés par coloration DAPI ou Hoechst. Les SAHFs sont enrichis en protéines d'hétérochromatine telles que HP1 (Heterochromatin Protein 1), en macroH2A qui est un variant transcriptionnellement répressif de H2A ainsi qu'en marques d'histones répressives telles que H3K9Me3 (Narita et al., 2003; R. Zhang et al., 2005). La formation de ces foyers d'hétérochromatine semble jouer un rôle dans la répression des gènes cibles de E2F, normalement impliqués dans la prolifération cellulaire (Narita et al., 2003). Ceci laisserait supposer un rôle des SAHFs dans l'entrée et le maintien de la sénescence mais des études plus récentes ont montré qu'empêcher la formation de ces foyers ne perturbe ni l'entrée en sénescence, ni sa stabilité (Contrepolis et al., 2012).

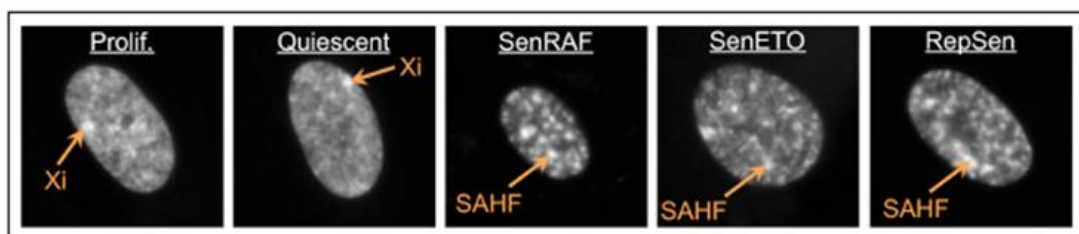


Figure 7 : Organisation spatiale de la chromatine dans des fibroblastes WI-38 en prolifération, quiescence et sénescence.

Prolif. : prolifération ; *Quiescent* : quiescence 5 jours ; *SenRAF* : sénescence induite par l'activation de RAF 5 jours ; *SenETO* : sénescence induite par traitement étoposide 5 jours ; *RepSen* : sénescence répliquative ; *Xi* : chromosome X inactif. Coloration DAPI de l'ADN réalisées par Kévin Contrepolis.

F. Modification de l'expression génique

Les cellules sénescents présentent un profil d'expression génique fortement altéré, en particulier au niveau des activateurs et inhibiteurs du cycle cellulaire. Deux inhibiteurs du cycle cellulaire souvent exprimés dans les cellules sénescents sont les CDKIs p21 et p16, respectivement aussi nommés CDKn1a, p21Cip1, waf1 ou SDI1 et CDKn2a ou p16InK4a (Di Leonardo et al., 1994; Mason et al., 2004; Zhu et al., 1998). Ces CDKIs participent

respectivement aux voies de suppression des tumeurs p53 et pRb, toutes deux capables d'établir et de maintenir l'arrêt prolifératif typique de la sénescence (Beauséjour et al., 2003; Campisi, 2003; Dirac & Bernards, 2003; Jeanblanc et al., 2012; Shelton et al., 1999). Au contraire, des gènes codant pour des protéines stimulant la progression du cycle cellulaire tels que des cyclines, cFOS, PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) sont réprimés (Mason et al., 2004). Néanmoins, de nombreux changements d'expression génique ne concernent pas la prolifération cellulaire. C'est notamment le cas des gènes déterminant la morphologie des cellules mais également ceux codant pour les protéines du SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) : des protéines sécrétées par les cellules sénescents et capables de modifier le microenvironnement (Contrepois et al., 2017; Shelton et al., 1999).

G. Autres marqueurs de la sénescence

Plusieurs marqueurs de dommages à l'ADN comme la présence de foyers γ H2AX ou 53BP1 sont communément utilisés comme marqueurs de sénescence (Lawless et al., 2010; von Zglinicki et al., 2005). Bien entendu, la présence de dommages à l'ADN dans une cellule n'est ni suffisante ni nécessaire pour caractériser la sénescence. L'utilisation de ces marqueurs reste donc complémentaire.

Par ailleurs, en réponse à l'activation d'un oncogène, une phase d'hyperprolifération précède l'entrée en sénescence. Afin de répondre aux besoins de la phase d'hyperprolifération, la quantité d'énergie requise est importante et induit une augmentation du métabolisme mitochondrial. Cela conduit à une augmentation de la production de ROS (Reactive Oxygen Species). Avec le temps et l'entrée en sénescence, les changements mitochondriaux entraînent une dysfonction sévère caractérisée par une surproduction encore plus importante de ROS (Moiseeva et al., 2009). L'augmentation des ROS intracellulaires participerait alors au maintien du phénotype sénescence en générant davantage de dommages cellulaires. Il est néanmoins important de préciser qu'une production à un niveau basal de ROS est nécessaire au fonctionnement normal des cellules (Liochev, 2013) et qu'un niveau élevé de ROS est aussi associé à la différenciation cellulaire (Paul et al., 2014).

Au cours de la sénescence, on observe également une perte de la lamine B1 (Freund et al., 2012; Shimi et al., 2011). Cette dernière est régulée à deux niveaux : une diminution d'ARNm (ARN messenger), et une dégradation autophagique de la protéine (Dou et al., 2015; Freund et al., 2012). Cela entraîne une déstabilisation de l'enveloppe nucléaire qui se traduit par l'apparition de protubérances à la surface du noyau et un relargage de fragments de chromatine dans le cytoplasme (CCFs : Cytoplasmic Chromatin Fragments). Cette perte de lamine B1 participe directement à l'arrêt prolifératif et provoque également une perturbation de l'organisation des territoires chromosomiques et des modifications d'histones associées à l'hétérochromatine (Camps et al., 2015).

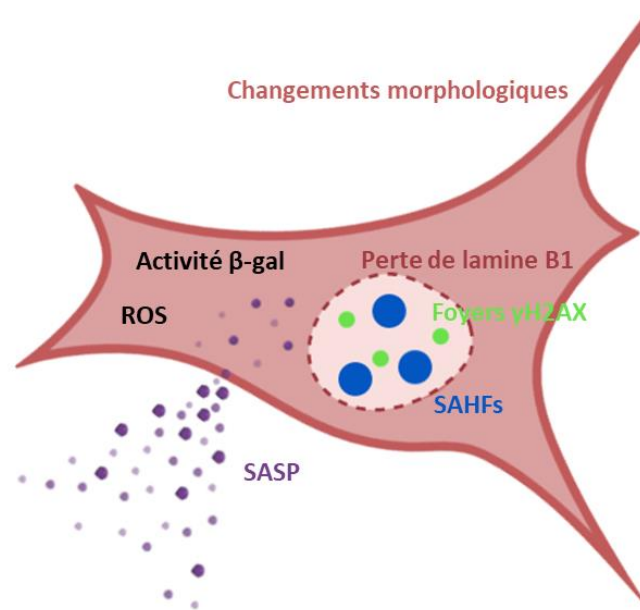


Figure 8 : Caractéristiques des cellules sénescences.

IV. SASP

L'analyse du surnageant de cellules sénescences montre la présence de nombreux facteurs sécrétés impliqués dans les processus de communication intercellulaire, l'inflammation et la dégradation de la matrice extracellulaire. C'est ce que l'on appelle le SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) ou SMS (Senescence-Messaging Secretome) (Kuilman & Peeper, 2009). Cette caractéristique des cellules sénescences est à la source d'un réseau de signalisation complexe et mérite d'être particulièrement détaillée dans le cadre de ce projet.

A. Composition du SASP

Les premières analyses transcriptomiques ont montré que le profil du sécrétome des cellules sénescence est semblable à celui observé lors de la réparation de tissus (Shelton et al., 1999). Une première étude protéomique particulièrement poussée a permis la comparaison de SASP produits par différents types cellulaires et induits en sénescence par plusieurs stimuli (Coppé et al., 2008). La méthode mise au point utilise un panel d'anticorps et permet une analyse à la fois qualitative et quantitative. Les résultats ont alors montré que la composition du SASP est, malgré quelques distinctions spécifiques, globalement conservée entre les différents types cellulaires, stimuli d'induction mais également espèces étudiées (Coppé et al., 2008, 2010). Beaucoup plus récemment, une nouvelle étude protéomique plus globale a été réalisée (Basisty et al., 2020). La méthodologie est alors basée sur une analyse par spectrométrie de masse d'un milieu sans sérum conditionné pendant 24h par divers types cellulaires induits en sénescence pendant différents temps et par différents stimuli. Cette étude propose également une différenciation entre le SASP soluble et le SASP contenu dans des exosomes ou vésicules

extracellulaires. Elle montre alors davantage d'hétérogénéité dans la composition du SASP en fonction des conditions.

1. Cytokines et chimiokines

La première catégorie de facteurs composants le SASP est celle des cytokines et chimiokines. Les cytokines sont des molécules impliquées dans la réalisation de fonctions biologiques diverses. Les chimiokines sont un type de cytokines dont la fonction est d'attirer des cellules sur un site d'inflammation. La cytokine la plus représentative est IL6. Elle est exprimée dans le SASP de sénescence induite par des dommages à l'ADN et par des oncogènes dans de nombreux types cellulaires humains et murins. Parmi ces types cellulaires, on peut citer les kératinocytes (Lu et al., 2006) les mélanocytes, les monocytes (Sarkar et al., 2004), les fibroblastes et les cellules épithéliales (Coppé et al., 2008; Kuilman et al., 2008). On trouve également la cytokine IL1 qui est surexprimée dans les cellules endothéliales (Garfinkel et al., 1994), les fibroblastes (Kumar et al., 1992) et les cellules épithéliales induites en sénescence par chimiothérapie (Coppé et al., 2008). La plupart des cellules sénescents surexpriment également des chimiokines de la famille des CXCL (chemokine C-X-C motif Ligand) et CCL (chemokine C-C motif Ligand) tels qu'IL8 (CXCL8), GRO- α et GRO- β (CXCL1 et CXCL2), ENA78 (CXCL5), GCP2 (CXCL6) et MCP1 (CCL2) (Basisty et al., 2020; Coppé et al., 2008, 2010).

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). Une fixation sur ce récepteur provoque l'activation de NF κ B, un facteur de transcription activant l'expression de gènes d'inflammation (O'Neill & Dinarello, 2000). De nombreuses cytokines du SASP peuvent également se fixer sur le récepteur CXCR2, activant de ce fait une voie renforçant la sénescence en amplifiant la sécrétion du SASP et en participant à l'arrêt prolifératif (Acosta et al., 2008).

2. Facteurs de croissance

Parmi les composants majoritaires du SASP se trouve la famille des IGFBPs (Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins). Les cellules endothéliales, épithéliales et les fibroblastes expriment fortement quasiment toutes les IGFBPs telles que IGFBP-1 à -7 ainsi que les protéines leur étant associées IGFBP-rP1 et -rP2 en sénescence (respectivement Mac25 et CTGF, Connective Tissue Growth Factor) (Basisty et al., 2020; Coppé et al., 2008; Kim, Kim, et al., 2007; Kim, Seu, et al., 2007; López-Bermejo et al., 2000; Wajapeyee et al., 2008). Le rôle principal de ces facteurs sécrétés est la séquestration des IGFs (Insulin Growth Factors) dans le milieu extracellulaire ce qui empêche leur fixation sur leurs récepteurs et inhibe donc leur activité mitogène (Hwa et al., 1999). On trouve également parmi les composants du SASP VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Coppé et al., 2006) ou HGF (Hepatocyte Growth Factor) (Coppé et al., 2008).

3. Protéases

Une dernière catégorie de facteurs extrêmement présents dans le SASP est celle des protéases. Les plus représentatives du SASP sont la stromelysine 1 et 2 (MMP3 et MMP10, Matrix MetalloProteinases 3 and 10) et la collagénase 1 (MMP1) qui sont capables de favoriser l'angiogenèse et la migration cellulaire en modifiant la structure de la matrice extracellulaire (Basisty et al., 2020; D. Liu & Hornsby, 2007; Millis et al., 1992; Parrinello et al., 2005; M. D. West et al., 1989; Zeng & Millis, 1996). Certaines MMPs sont également capables de réguler l'activité d'autres facteurs du SASP en les protéolysant. Par exemple, des membres de la famille des CXCL et des CCL sont potentiellement clivables par MMP1, MMP2, MMP3 ou MMP13 (McQuibban et al., 2002).

Une autre famille de protéases surexprimées dans le SASP est celle des sérine-protéases telles que uPA ou tPA (urokinase et tissue-type Plasminogen Activator) ainsi que leurs inhibiteurs PAI1 et PAI2 (Plasminogen Activator Inhibitor 1 and 2) (Basisty et al., 2020; M. D. West et al., 1996). A l'instar des MMPs, ces protéines ont pour effet de moduler la structure de la matrice extracellulaire. PAI1 semble également pouvoir renforcer la sénescence (Kortlever et al., 2006).

4. Molécules insolubles et non-protéiques

La fibronectine est une glycoprotéine fortement exprimée en sénescence capable d'interagir avec une grande variété de macromolécules telles que des récepteurs de surface cellulaire, des composants du cytosquelette et d'autres molécules de la matrice extracellulaire. Elle peut alors affecter l'adhérence, la survie, la prolifération et la migration cellulaire (Kumazaki et al., 1993).

Les changements métaboliques au sein des cellules sénescents induisent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) (A. C. Lee et al., 1999). Elles sont dues à une altération de l'activité des enzymes des voies de régulation du stress oxydant : nitric oxide synthases et superoxide dismutases (van der Loo et al., 2000). Les ROS peuvent augmenter l'agressivité de cellules cancéreuses ainsi que favoriser le vieillissement et les pathologies liées à l'âge (Finkel et al., 2007; Finkel & Holbrook, 2000).

Enfin, les micro-RNA (miRNA) sont de petits ARN non-codants d'environ 22 nucléotides qui se lient à la région 3'-UTR (3'-UnTranslated Region) d'ARN messagers cibles et entraînent leur dégradation ou l'inhibition de leur traduction en protéines. Un grand nombre de miRNA sont connus pour réguler la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie, le métabolisme, l'inflammation, l'invasion, l'angiogenèse et la sénescence (Gregory & Shiekhata, 2005; Kosik, 2010; D. Xu & Tahara, 2013).

B. Voies de signalisation du SASP

Les profils d'expression des gènes codant pour des protéines du SASP sont globalement en accord avec les profils d'expression de ces même protéines (Coppé et al., 2008). Le SASP est donc, au moins en partie, régulé au niveau transcriptionnel. Or, la structure de la chromatine est grandement modifiée en sénescence (Mehta et al., 2007; Narita, 2007).

La régulation transcriptionnelle de ce phénotype pourrait donc être due à cette organisation particulière de la chromatine favorisant potentiellement la fixation de facteurs de transcription spécifiques.

1. Le DDR

Plusieurs études ont montré que le SASP peut être induit dans des cellules rendues sénescents via toutes sortes de stress génotoxiques (raccourcissement des télomères, irradiation, traitement avec un composé génotoxique, activation d'un oncogène, stress oxydatif) (Coppé et al., 2008; Rodier et al., 2009). Un stress génotoxique peut provoquer différents types de lésions sur l'ADN mais un stress suffisamment important pour induire la sénescence génère la plupart du temps des cassures double brin de l'ADN ce qui active le DDR. La déplétion de protéines du DDR comme ATM, CHK2 et NBS1 est suffisante pour prévenir la sécrétion d'un large panel de facteurs du SASP tel que IL6 et IL8 (Rodier et al., 2009). Néanmoins, bien que le DDR soit important à la fois pour l'arrêt de la prolifération cellulaire et pour l'induction du SASP, ces deux processus sont régulés différemment. En effet, p53 impacterait plutôt négativement l'expression du SASP et un arrêt prolifératif par surexpression de p21 ou p16 sans DDR n'induit pas de SASP (Coppé et al., 2008, 2011; Rodier et al., 2009). Il a été montré que le développement du SASP via ATM passe par l'activation du facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor kappa B).

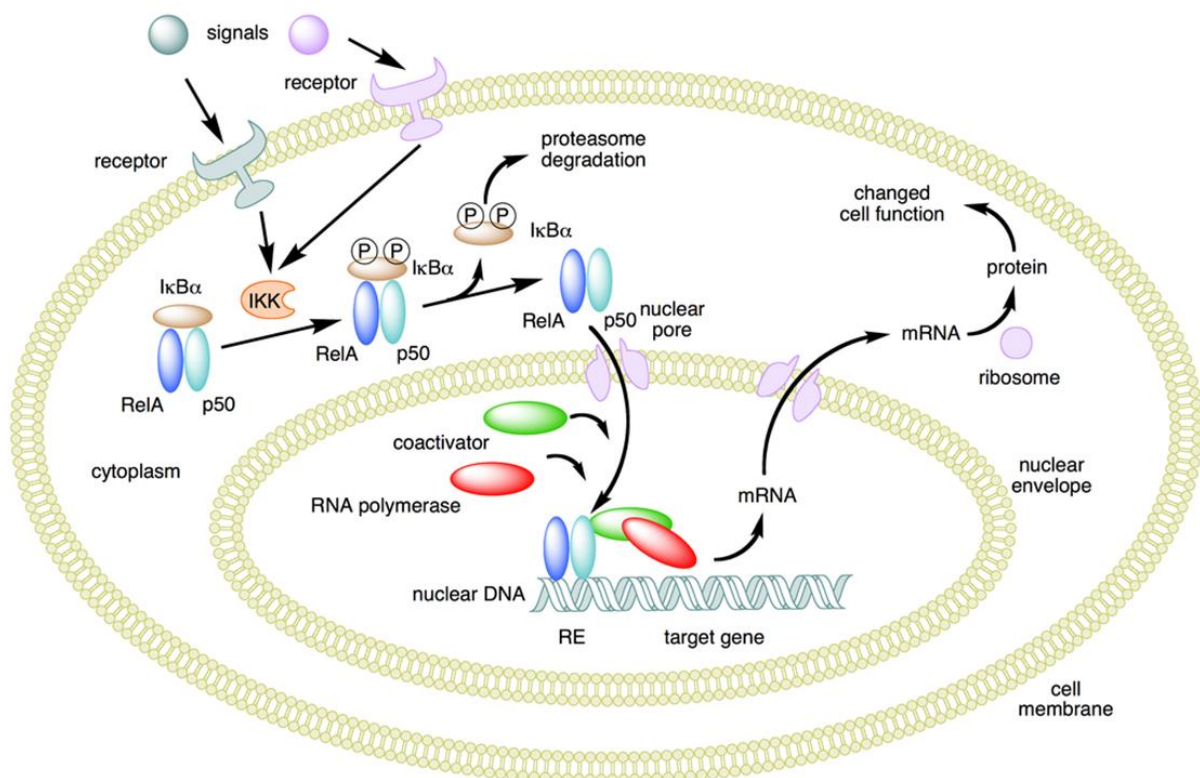


Figure 9 : Mécanisme d'action de NFκB.

Dans des conditions normales sans stress, NFkB est séquestré par IkB dans le cytoplasme. En réponse à un stress, IKK α/β (IkB Kinases) phosphorylent IkB ce qui permet la translocation de NFkB dans le noyau et son activation (Karin, 1999). Dans le cas du DDR, ATM forme un complexe avec NEMO qui transloque dans le cytoplasme et active IKK α/β (Miyamoto, 2011; Z.-H. Wu et al., 2006). Malgré cela, l'activation du DDR suite à des dommages à l'ADN est quasiment instantanée alors qu'un SASP mature ne se développe que sur une période de plusieurs jours voire semaines. Si l'activation du DDR seule était nécessaire et suffisante, le SASP serait détectable en quelques heures et non pas après plusieurs jours alors que le niveau en ATM phosphorylé est redevenu bas et localisé. D'autres voies complémentaires au DDR et plus lentes à s'établir doivent également être impliquées mais elles demeurent inconnues à ce jour.

2. La voie p38MAPK

La voie p38MAPK contribue également à l'activation de NFkB via MSK1 et MSK2 (Mitogen- and Stress-activated protein Kinase 1 and 2) qui phosphorylent la sous-unité activatrice p65 ou RelA de NFkB (Berghe et al., 1998; Kefaloyianni et al., 2006; L. Vermeulen et al., 2003). Par ailleurs, l'activité de p38MAPK contribue à l'activation des voies p53 et p16/pRb lors de l'arrêt prolifératif caractéristique de la sénescence (Kwong et al., 2009). Néanmoins, la voie p38MAPK agit en parallèle de la voie des DDR. En effet, ni ATM, ni CHK2 ne phosphoryle p38MAPK et réciproquement, l'activation de p38MAPK n'induit pas l'activation d'ATM ou CHK2 (Freund et al., 2011). Par ailleurs, l'inhibition chimique ou génétique de p38MAPK est suffisante pour empêcher la sécrétion de la plupart des cytokines et facteurs de croissance du SASP (Alspach et al., 2014; Freund et al., 2011). A l'inverse, l'activation seule de p38MAPK est suffisante pour induire le SASP (Freund et al., 2011). Ainsi, la voie p38MAPK semble être nécessaire et suffisante pour induire le SASP. De plus, la cinétique d'activation de p38MAPK est particulièrement proche de la cinétique de développement du SASP (Freund et al., 2011).

3. La voie cGAS-STING

Les dommages à l'ADN couplés à la perte de lamine B1 et les changements morphologiques en sénescence provoquent l'éjection de fragments de chromatine dans le cytosol appelés CCFs (Cytoplasmic Chromatin Fragments) (Glück et al., 2017; Ivanov et al., 2013; Mackenzie et al., 2017). De plus, les DNases DNase2 (DeoxyriboNuclease 2) et TREX1 (3' Repair EXonuclease 1) sont normalement capables d'éliminer rapidement des fragments d'ADN cytosolique simple brin et double brin mais leur expression diminue en sénescence ce qui lève cette barrière à leur accumulation (Takahashi et al., 2018).

cGAS (cyclic GMP-AMP Synthase) est le principal senseur d'ADN cytosolique. Plus, précisément, cGAS reconnaît l'ADN double brin indépendamment de sa séquence via une affinité avec les chaînes de sucre-phosphate (K. Kato et al., 2013). L'interaction de cGAS avec l'ADN double brin provoque un changement conformationnel permettant alors la production de cGAMP (cyclic GMP-AMP) activant STING (STimulator of INterferon Genes) (Sun et al., 2013). STING active ensuite les facteurs de transcription IRF3

(Interferon-Regulatory Factor 3) et NFkB responsables de l'expression d'interféron (IFN) de type I et de cytokines du SASP (Dou et al., 2017; Glück et al., 2017; Mackenzie et al., 2017; Sun et al., 2013; Takahashi et al., 2018; H. Yang et al., 2017). L'inhibition de cGAS ou STING est suffisante *in vitro* et *in vivo* pour prévenir l'expression du SASP et l'activation de la voie interféron (Dou et al., 2017; Glück et al., 2017; Takahashi et al., 2018).

4. La voie interféron

La voie cGAS-STING n'est pas l'unique voie pouvant induire l'activation de la voie interféron. En effet, cette dernière est une réponse commune à tous les types d'infections possibles et découle donc de la reconnaissance par de nombreux senseurs d'ADN simple brin ou double brin, d'ARN double brin ou d'hybrides ADN:ARN. Ce matériel reconnu peut être d'origine exogène ou endogène. Il a notamment été montré que la dérégulation de régions répétées du génome incluant des éléments transposables et des rétrovirus endogènes permet leur expression et translocation dans le cytoplasme ce qui induit l'activation de la voie interféron et l'établissement d'un phénotype inflammatoire (De Cecco et al., 2019; Izquierdo-Bouldstridge et al., 2017; M. Simon et al., 2019).

En général, la présence d'interféron de type I dans le milieu extracellulaire active JAK1 (JAnus Kinase 1) et TYK2 (TYrosine Kinase 2) fixées sur des récepteurs membranaires. Ces kinases phosphorylent et activent ainsi STAT1 et STAT2 (Signal Transducer and Activator of Transcription 1 and 2) ce qui favorise la formation d'hétérodimères STAT1-STAT2. Ces derniers s'associent ensuite avec IRF9 (IFN Regulatory Factor 9) pour former le complexe ISGF3 (IFN-Stimulated Gene Factor 3). Ce complexe transloque dans le noyau et interagit avec des séquences génomiques particulières appelées ISREs (IFN-Stimulated Response Elements). Ces séquences se trouvent au niveau des promoteurs des ISGs (IFN-Stimulated Genes) qui sont alors transcrits.

Il a été montré que l'ajout d'IFN de type I dans le milieu extracellulaire est suffisant pour induire des dommages à l'ADN et une entrée en sénescence de fibroblastes humains et murins (Glück et al., 2017; Moiseeva et al., 2006). Ce même traitement est également capable d'activer NFkB dans des fibroblastes humains et d'induire l'expression du SASP (Takahashi et al., 2018).

Une étude a également montré que des fibroblastes humains non immortalisés ont des niveaux d'expression d'ISG plus élevés en sénescence répliative. Pourtant, ce phénomène n'est pas accompagné d'une élévation de l'expression d'IFN de type I. De même, les protéines STAT1 et STAT2 ne sont pas phosphorylées et le knockdown de JAK1 n'impacte pas l'élévation d'expression d'ISG. En revanche, il a été observé dans ces conditions une augmentation de la quantité de STAT1 et STAT2 non-phosphorylés ainsi que la formation et activité normale du complexe ISGF3 (Yamagami et al., 2018). Cette voie interféron alternative a également été décrite dans un contexte d'infection virale (W. Wang et al., 2017).

Par ailleurs, les gènes directement exprimés en réponse à la voie interféron ne font globalement pas partie du SASP classique. Ces facteurs ne se retrouvent en effet pas dans le SASP soluble. Néanmoins, il a été montré récemment que de nombreuses IFITMs (InterFeron-Induced TransMembrane proteins) et IFITs (InterFeron-Induced proteins with Tetratricopeptide repeats) sont sécrétés dans des vésicules extracellulaires. De plus, IFITM3 en particulier, est un facteur clé d'induction paracrine de sénescence (Borghesan et al., 2019).

5. Les facteurs précoces du SASP

La cinétique de sécrétion varie d'un facteur du SASP à l'autre. Certains facteurs tels que les cytokines IL1 α et IL1 β sont sécrétés très rapidement et jouent un rôle critique dans l'expression d'autres facteurs plus tardifs. IL1 β est synthétisé sous forme de précurseur et ne devient mature qu'après protéolyse par le complexe inflammasome (Schroder & Tschopp, 2010). L'utilisation d'inhibiteurs de caspase-1 (un composant de l'inflammasome) ou de IL1R (IL1-Receptor) réduit l'expression du SASP (Acosta et al., 2013). IL1 α peut être actif à la fois sous sa forme précurseur et mature, de manière intracellulaire ou non. IL1 α induit l'expression de IL6 et IL8 via son récepteur IL1R, les protéines IRAK (Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase) et les facteurs de transcription NF κ B et C/EBP β (CCAAT/Enhancer Binding Protein β) (J. Huang et al., 1997; Orjalo et al., 2009).

6. La voie mTOR

Il a été montré que l'utilisation de la rapamycine, un inhibiteur de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), diminue de manière drastique la présence de certains facteurs du SASP dans des cellules rendues sénescents par irradiation ou induction de l'oncogène RAS (Herranz et al., 2015). D'un point de vue mécanistique, l'augmentation de l'activité de mTOR induit une plus forte expression de la kinase MAPKAPK2. Cette kinase inhibe alors ZFP36L1 (Zing Finger Protein 36-Like 1) qui dégrade les transcrits de nombreux facteurs du SASP en conditions normales (Herranz et al., 2015). mTOR est également capable d'induire l'expression du SASP au niveau transcriptionnel en favorisant la traduction de IL1 α (Laberge et al., 2015) qui active à son tour les facteurs de transcription NF κ B et C/EBP β .

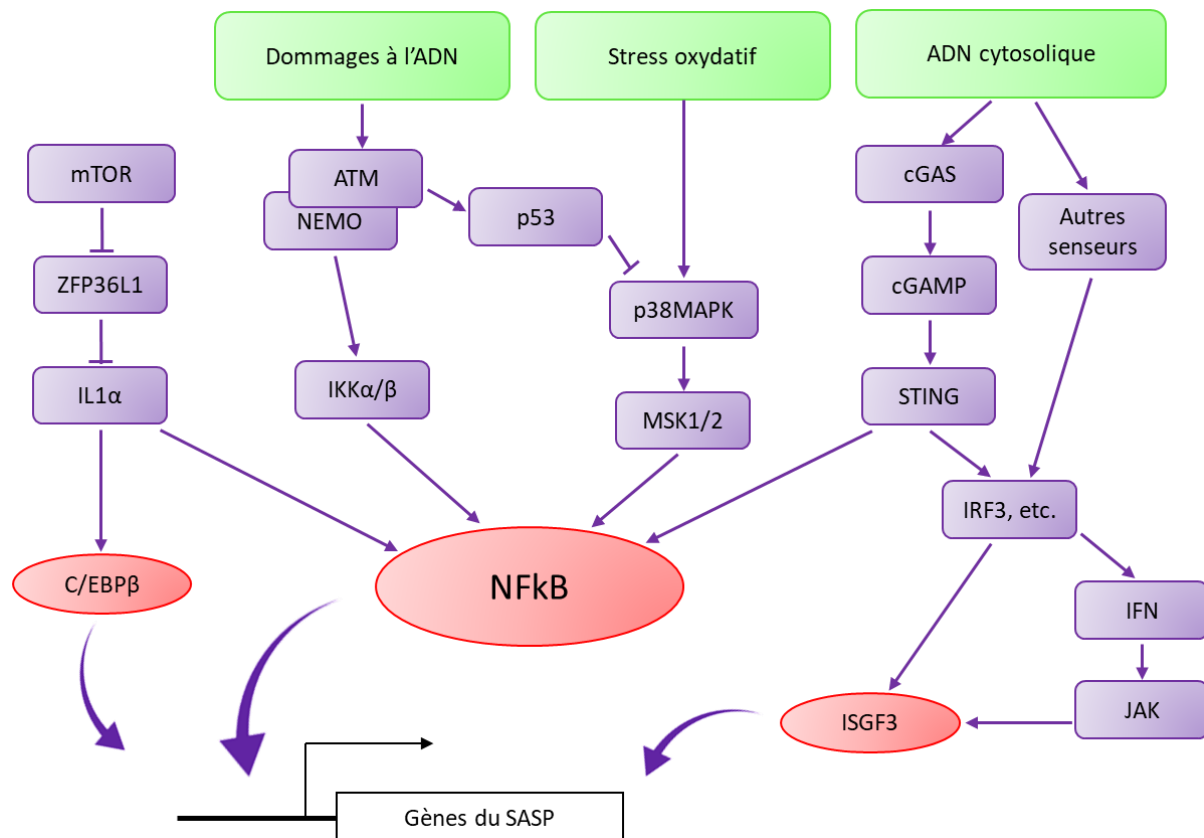


Figure 10 : Principales voies de signalisation d'expression du SASP.

C. Effets autocrines et paracrines du SASP

Les facteurs sécrétés du SASP peuvent affecter les cellules sénescents elles-mêmes de façon autocrine ou bien les cellules qui leur sont voisines de façon paracrine.

L'effet autocrine se produit via l'action par exemple des cytokines IL6 et IL8 (Acosta et al., 2008), de l'inhibiteur de protéase PAI1 (Kortlever et al., 2006) mais encore du facteur IGFBP7 (Wajapeyee et al., 2008). Il a pour conséquence le renforcement du phénotype sénescents en accroissant l'arrêt prolifératif et la production du SASP. Cet effet autocrine participe donc à l'établissement d'une boucle de rétroaction positive menant à un phénotype sénescents stable sur le long terme. Bloquer cette boucle permet d'ailleurs un échappement à la sénescence (Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008).

Les facteurs sécrétés du SASP ont également un effet paracrine en affectant le microenvironnement des cellules sénescents et donc leurs cellules voisines. Ces dernières peuvent être des cellules normales, des cellules non-différenciées, des cellules du système immunitaire ou bien même des cellules cancéreuses dans des cas pathologiques. Ces effets paracrines peuvent alors être bénéfiques ou bien délétères.

D'un côté, certaines protéines du SASP sont capables d'attirer et d'activer des cellules immunitaires telles que des macrophages, des neutrophiles et des cellules NK. Cela conduit à l'élimination des cellules sénescents ainsi que les éventuelles cellules dysfonctionnelles environnantes. En ce sens, le SASP stimule l'immunosurveillance et réduit la gravité de

certaines pathologies (fibroses, cancer) (Acosta et al., 2013; Krizhanovsky, Xue, et al., 2008; Krizhanovsky, Yon, et al., 2008; Xue et al., 2007).

D'un autre côté, certains facteurs du SASP ont des effets favorisant le développement et la progression tumorale. Par exemple, IL-6 et IL-8 peuvent promouvoir la tumorigenèse en coopération avec l'activation de certains oncogènes (Ancrile et al., 2007; Sparmann & Bar-Sagi, 2004; Yuan et al., 2005). De plus, les cellules sénescentes sécrètent VEGF stimulant l'angiogenèse (Coppé et al., 2006), des facteurs encore indéterminés contribuant à la transition épithélio-mésenchymateuse (Krtolica et al., 2001; Parrinello et al., 2005) et des MMP favorisant la migration cellulaire (D. Liu & Hornsby, 2007).

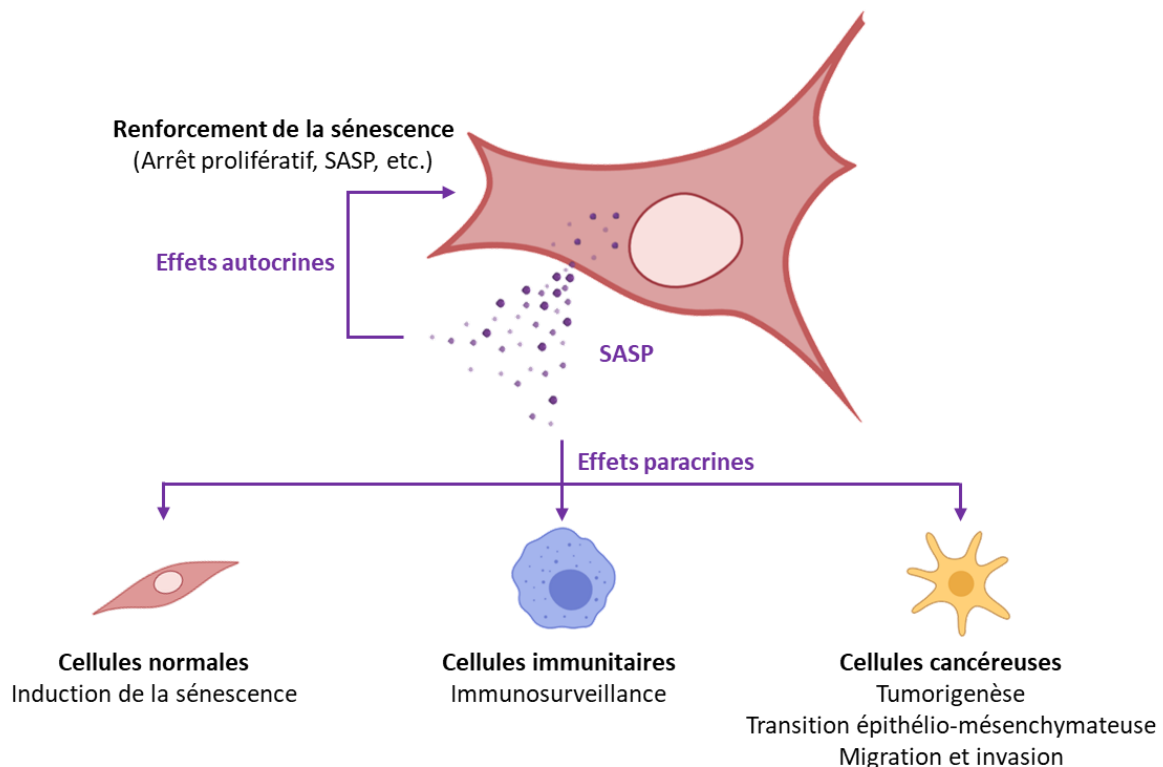


Figure 11 : Effets autocrines et paracrines du SASP.

V. Rôles de la sénescence *in vivo*

A. Homéostasie et développement

La sénescence est bien souvent décrite dans des contextes de dommages cellulaires ou de stress. Néanmoins, elle ne s'y cantonne pas puisqu'elle a été observée dans des tissus normaux et un grand nombre de structures embryonnaires (Muñoz-Espín et al., 2013; Muñoz-Espín & Serrano, 2014; Storer et al., 2013). Elle est alors initiée dans les deux cas par p21 sans activation du DDR, p16 ou p53. Elle s'intègre alors dans le programme de maturation naturel des cellules (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013). Les cellules embryonnaires sénescées acquièrent un phénotype légèrement différent de celui acquis par des cellules sénescées adultes. Elles conservent en effet leur capacité à entrer en

apoptose et le SASP qu'elles sécrètent est capable d'activer le système immunitaire mais ne contient pas de facteurs renforçant la sénescence tels que IL6 et IL8 (Storer et al., 2013). Sénescence et apoptose agissent alors de concert pour éliminer les structures éphémères lors de l'embryogénèse et des mécanismes de mutuelle compensation peuvent se mettre en place en cas de défaillance de l'une ou de l'autre (Muñoz-Espín et al., 2013).

B. Réparation des tissus

L'analyse histologique du processus de cicatrisation cutanée a permis de montrer que l'absence de sénescence entraîne un retard de cicatrisation et l'accumulation de tissu fibrotique ce qui se traduit par la présence d'une cicatrice plus visible (Demaria et al., 2014). Cette étude, ainsi que d'autres menées dans d'autres types tissulaires (Jun & Lau, 2010; Krizhanovsky, Yon, et al., 2008; Muñoz-Espín & Serrano, 2014), montrent que la sénescence ainsi que les facteurs du SASP sécrétés par les cellules sénescents revêtent d'une grande importance pour limiter la fibrose lors de la réparation des tissus. En effet, ces facteurs participent au recrutement des cellules immunitaires nécessaires pour l'élimination des pathogènes et des cellules endommagées ainsi qu'au remodelage et à la réparation des tissus en adaptant la matrice extracellulaire pour favoriser la survie, la prolifération, la migration cellulaire ainsi que la différenciation des cellules souches et progénitrices mobilisées (Demaria et al., 2014; Krizhanovsky, Xue, et al., 2008).

La réparation des tissus n'est parfaitement achevée qu'après l'élimination des cellules sénescents et donc la restauration du tissu dans son état avant dommage. Cependant, dans les situations pathologiques chroniques incluant le vieillissement, les cellules sénescents ne sont pas éliminées efficacement et les cellules restantes induisent des dommages continus pouvant aggraver le dysfonctionnement du tissu (Serrano, 2014).

C. Vieillissement et pathologies liées à l'âge

Suite aux premières expériences menées par Hayflick et Moorhead, l'association entre sénescence et vieillissement a été très tentante. Par la suite, il a été montré que les cellules sénescents s'accumulent au niveau des sites de pathologies liées à l'âge et que leur élimination génétique ou chimique aurait alors un impact bénéfique. Parmi ces pathologies, on peut citer la maladie d'Alzheimer (P. Zhang et al., 2019), la fibrose pulmonaire idiopathique (Schafer et al., 2017), l'athérosclérose (Childs et al., 2016), le diabète de type 2 (Aguayo-Mazzucato et al., 2019), les pathologies hépatiques (Ogrodnik et al., 2017) et l'arthrite osseuse (Jeon et al., 2017; Price et al., 2002). Plus généralement, les cellules sénescents s'accumulent avec l'âge dans les tissus de souris et de primates (Herbig et al., 2006; Zindy et al., 1997). Les marqueurs de dommages à l'ADN et de foyers d'hétérochromatine utilisés dans l'étude chez les primates (53BP1, γ H2AX, pS1981-ATM, HP1 β et HIRA : Histone cell cycle Regulator A) colocalisent avec les télomères et sont associés à une augmentation de l'expression de p16 (Herbig et al., 2006). Cela suggère que le dysfonctionnement des télomères induit de la sénescence *in vivo* au moins dans certains tissus. De plus, les cellules sénescents sont majoritairement détectées dans les tissus qui subissent un turnover rapide. Ceci est cohérent avec une induction de la sénescence

répliative par le raccourcissement progressif des télomères lors des cycles successifs de réplication. En particulier, l'expression de p16 augmente avec l'âge dans les cellules souches et progénitrices du cerveau, de la moelle osseuse et du pancréas chez la souris (Janzen et al., 2006; Krishnamurthy et al., 2006; Molofsky et al., 2006). Cela entraîne alors une diminution de croissance des cellules souches ainsi qu'un retard de régénération tissulaire qui pourraient expliquer le déclin des fonctions cérébrales et immunitaires ainsi que le développement de diabète de type 2 avec l'âge. Des souris modifiées pour supprimer les cellules exprimant p16 développent néanmoins davantage de cancers (Baker et al., 2008). A l'inverse, des souris transgéniques où p53 est hyperactivée sont exceptionnellement dépourvues de cancer, ce qui est cohérent avec le rôle suppresseur de tumeur de p53. Elles présentent cependant un vieillissement prématuré et une durée de vie plus courte (Maier et al., 2004; Tyner et al., 2002). De plus, les cellules de ces souris entrent en sénescence rapidement après leur mise en culture *in vitro*. Ces données suggèrent une forte corrélation entre sénescence excessive et vieillissement prématuré mais également suppression de tumeur.

Un second mécanisme par lequel les cellules sénescents pourraient contribuer au vieillissement provient du SASP qu'elles expriment. La surexpression des gènes codant pour des cytokines inflammatoires, des facteurs de croissance et des protéases de la matrice extracellulaire peut en effet affecter le comportement de cellules voisines dans les tissus (Campisi, 2005). En outre, l'injection intramusculaire de cellules sénescents chez la souris résulte en une augmentation des marques de sénescence à proximité de l'injection et un affinement des fibres musculaires avec des amplitudes similaires à celles que l'on peut observer entre des souris de 8 mois et de 32 mois (da Silva et al., 2019). Ainsi, les facteurs sécrétés du SASP peuvent perturber la structure et la fonction de tissus normaux. Ils peuvent également affecter la croissance et la migration cellulaire, l'angiogenèse et la différenciation. Par exemple, la MMP3 inhibe la différenciation morphologique et fonctionnelle de cellules épithéliales du sein (Parrinello et al., 2005). Par ailleurs, l'inflammation chronique à bas niveau qui peut potentiellement être causée par le SASP est un marqueur du vieillissement qui non seulement accélère ce vieillissement (Jurk et al., 2014) mais initie et promeut aussi la plupart si ce n'est toutes les pathologies liées à l'âge (Chung et al., 2009; M. Xu et al., 2017). De plus, certaines cellules immunitaires recrutées sécrètent des agents oxydants forts pouvant altérer et donc causer un dysfonctionnement de tissus et de cellules (notamment les cellules souches participant à la régénération) (X. Chen et al., 2016).

D. Cancer

Le cancer est un contexte pathologique dans lequel la sénescence est doublement impliquée de manière très particulière.

De manière tout à fait théorique, pour qu'une cellule devienne cancéreuse, elle doit accumuler plusieurs mutations indépendantes. Sachant que la fréquence d'apparition spontanée d'une mutation est de 1 pour 1 million de cellules, chaque mutation requière

entre 20 et 30 doublements. En limitant le nombre de divisions cellulaires à moins de 100, la sénescence permet de limiter l'accumulation de cellules pré-malignes. Bien sûr, la stratégie de prévention contre le cancer la plus efficace serait de ne rendre possible que très peu voire pas du tout de divisions mais cela serait clairement incompatible avec les besoins de maintien et de réparation des tissus chez les espèces vivant relativement longtemps. En ce sens, la sénescence cellulaire serait un mécanisme crucial pour prévenir la prolifération de cellules à potentiel néoplasique.

Les premières études *in vitro* sur l'OIS ont révélé que des mutants activés des oncogènes RAS et RAF ont un effet mitogène ou à l'inverse déclenchent la sénescence en fonction de leur niveau d'expression (Deng et al., 2004; Guerra et al., 2003; Sarkisian et al., 2007; Tuveson et al., 2004; Woods et al., 1997). Plus tard, il a été montré que les cellules sénescents s'accumulent dans les lésions pré-malignes puis ne sont plus présentes qu'à la périphérie des tumeurs (Acosta et al., 2013; Braig et al., 2005; Z. Chen et al., 2005; Collado et al., 2005; Contrepois et al., 2017; Michaloglou et al., 2005). De plus, l'inactivation de p53, l'altération la plus courante en cancérologie (Duffy et al., 2017), empêche l'entrée en sénescence et accélère fortement le développement de tumeurs (Z. Chen et al., 2005). A l'inverse, la restauration de la fonction de p53 permet une régression tumorale en favorisant l'entrée en sénescence des cellules *in vivo* (Ventura et al., 2007; Xue et al., 2007). Par ailleurs, il est intéressant de noter que, lorsque les cellules contournent la sénescence et deviennent malignes, l'expression de certains gènes associés à la sénescence est diminuée (Acosta et al., 2008; Z. Chen et al., 2005; Collado et al., 2005; Lazzerini Denchi et al., 2005). Néanmoins, certaines cellules tumorales conservent la capacité d'entrer en sénescence (Shay & Roninson, 2004) et peuvent déclencher ce programme en réponse à des thérapies anti-cancéreuses (Schmitt et al., 2002). Dans ce cas, l'induction de la sénescence est associée à une régression des tumeurs. Ces observations démontrent un rôle anti-tumoral clef de la sénescence *in vivo*.

A première vue, dire que la sénescence pourrait également jouer un rôle pro-tumoral semble paradoxal. Cependant, la co-injection de fibroblastes sénescents avec des cellules épithéliales pré-malignes favorise le développement tumoral chez la souris (Krtolica et al., 2001). De même, la co-injection de fibroblastes sénescents avec des cellules malignes accélère la formation de tumeurs chez la souris (Bartholomew et al., 2009; D. Liu & Hornsby, 2007). Ainsi, au moins dans des xénogreffes, les cellules sénescents peuvent promouvoir le développement et la progression de tumeurs *in vivo*. Cette activité dérive d'un mécanisme paracrine faisant intervenir des facteurs protéiques sécrétés du SASP. Ces facteurs stimulent alors différentes voies favorisant le développement tumoral tel que la prolifération cellulaire, la transition épithélio-mésenchymateuse, l'angiogénèse, la migration et l'invasion cellulaire (Coppé et al., 2006; Krtolica et al., 2001; D. Liu & Hornsby, 2007; Parrinello et al., 2005).

E. Applications en clinique

Le choix d'une cellule d'entrer en sénescence plutôt qu'en apoptose peut être optimal dans

certaines contextes puisque cela permet de préserver l'intégrité des tissus. Néanmoins, la durée de résidence des cellules sénescents dans les tissus semble être un facteur majeur de détermination entre un effet bénéfique ou délétère de la sénescence. En effet, la présence de cellules sénescents à court terme aurait un effet anti-tumoral (Braig et al., 2005; Collado et al., 2005; Michaloglou et al., 2005; Serrano et al., 1997) et favoriserait la réparation des tissus (Demaria et al., 2014; Jun & Lau, 2010; Krizhanovsky, Xue, et al., 2008). En revanche, l'accumulation des cellules sénescents sur le long terme, probablement due à une perte d'efficacité du système immunitaire avec l'âge (Weyand & Goronzy, 2016), participerait à l'émergence de pathologies pro-inflammatoires (Chung et al., 2009). D'ailleurs, l'altération de l'immunosurveillance par le knockout du gène codant pour la perforine (une protéine impliquée dans la cytotoxicité des cellules immunitaires effectrices) augmente l'accumulation de cellules sénescents et l'inflammation chronique chez la souris avec l'âge. Elles développent alors davantage de pathologies liées à l'âge et ont une espérance de vie réduite (Ovadya et al., 2018).

Si l'accumulation de cellules sénescents est caractéristique des lésions pré-cancéreuses, on comprend l'intérêt de mettre au point des outils de détection de ces cellules pour identifier les patients à risque. Néanmoins, les marqueurs existants actuellement ne sont pas spécifiques et seule la co-détection de ces marqueurs permet de conclure sur la présence de cellules sénescents. Ce projet de thèse s'inscrit dans cet objectif de recherche de marqueurs spécifiques de sénescence.

En plus d'un potentiel diagnostic et pronostic, la sénescence ouvre la porte à de nouvelles options thérapeutiques. Les traitements chimiothérapeutiques les plus courants en cancérologie ont pour objectif de stopper la prolifération cellulaire en induisant des dommages à l'ADN. C'est le cas des inhibiteurs de topoisomérase (doxorubicine, étoposide), des agents alkylants (cisplatine, ifosfamide), etc. Les dommages créés n'étant pas réparables, les cellules entrent majoritairement en apoptose mais certaines empruntent la voie de la sénescence. La première étude sur ce sujet a montré l'apparition d'une sous-population de cellules tumorales sénescents dans plusieurs lignées en réponse à un traitement chimiothérapeutique à faible dose (Chang et al., 2002). La même observation a ensuite été faite dans un modèle de souris transgéniques E μ -myc développant des lymphomes non-Hodgkiniens humains. Lorsque ces souris ont été traitées avec des cyclophosphamides, une proportion des cellules tumorales est entrée en sénescence (Schmitt et al., 2002). Chez l'homme, des traitements par carboplatine et taxol dans des cancers bronchiques (Roberson et al., 2005) ou par cyclophosphamides, doxorubicine et 5-fluorouracil dans le cancer du sein (te Poele et al., 2002) favorisent l'expression de marqueurs de la sénescence. Cependant, l'apparition de cellules tumorales sénescents pourrait avoir des effets secondaires néfastes. En effet, les cellules sénescents présentent une résistance aux signaux apoptotiques ce qui diminue leur sensibilité aux traitements chimiothérapeutiques (Marcotte et al., 2004). Dans les souris E μ -myc, certaines cellules finissent par échapper à la sénescence et recommencent à

proliférer tout en conservant cette résistance (Schmitt et al., 2002). Ainsi, les cellules tumorales sénescentes pourraient être à l'origine de rechutes avec le développement de tumeurs résistantes à la chimiothérapie.

Une autre perspective thérapeutique très étudiée actuellement est la possibilité de s'affranchir des effets délétères de la sénescence en éliminant périodiquement les cellules sénescentes. En effet, il a été montré qu'une élimination régulière des cellules sénescentes exprimant p16 retarde l'apparition de signes de vieillissement et augmente l'espérance de vie moyenne d'environ 30% chez la souris (Baker et al., 2016). Depuis, d'autres études ont montré que l'élimination périodique des cellules sénescentes de manière génétique ou chimique permet de restaurer des fonctions tissulaires et d'augmenter l'espérance de vie et l'espérance de vie en bonne santé (Baar et al., 2017; M. Xu et al., 2018). De plus, une étude récente a utilisé un système d'encapsulation de composés chimiotoxiques avec des galacto-oligosaccharides dans des modèles de souris. Ceci a permis d'améliorer la régression de xénogreffes par ciblage des cellules tumorales sénescentes ainsi que la régression de fibroses pulmonaires par réduction de la déposition de collagène et la restauration de la fonction pulmonaire (Muñoz-Espín et al., 2018). La recherche de molécules sénolytiques (éliminant les cellules sénescentes) représente donc un enjeu primordial et fait d'ailleurs partie des sujets d'étude du laboratoire.

Une alternative serait de ne cibler que les effets paracrines de la sénescence en ciblant les voies de régulation du SASP. En effet, l'inhibition pharmacologique ou génétique d'ATM (Rodier et al., 2009), p38MAPK (Alspach et al., 2014; Freund et al., 2011), mTOR (Herranz et al., 2015; Laberge et al., 2015) ou NFkB (Laberge et al., 2012) dans des cellules sénescentes pourrait être suffisante pour s'affranchir des effets délétères du SASP. Néanmoins, ces différentes cibles ne sont pas toutes équivalentes pour d'éventuelles applications cliniques. Par exemple, cibler ATM paraît peu judicieux *in vivo* étant donné l'importance du DDR mais des cibles plus en aval et plus spécifiques auraient un grand potentiel.

Chapitre 2 : L'information épigénétique

A l'exception des cellules germinales, toutes les cellules d'un organisme possèdent la même information génétique qui est héritée des parents et transmise ensuite au fil des divisions cellulaires. Comment alors expliquer que des cellules d'un même organisme puissent se différencier et acquérir des profils d'expression caractéristiques d'un tissu et d'une fonction ? Conrad Waddington a proposé en 1942 l'existence d'une information épigénétique non contenue dans le génome régissant les différents processus par lesquels le génome (l'ensemble des gènes) engendre le phénotype (les caractéristiques de l'organisme) (Waddington, 1942). L'information épigénétique est portée par des facteurs déterminant le destin cellulaire en régulant l'expression des gènes sans affecter la séquence de l'ADN. Ainsi, l'épigénétique joue un rôle essentiel dans un grand nombre de mécanismes fondamentaux tels que le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire et la réponse aux stress.

Dans ce deuxième chapitre, je présenterai la structure de la chromatine en commençant par ses constituants fondamentaux et en finissant par ses ordres supérieurs d'organisation avant de détailler les facteurs épigénétiques principaux ainsi que leurs modes d'actions.

I. Organisation structurale et dynamique de la chromatine

A. Structure de l'ADN

L'acide désoxyribonucléique ou ADN est une macromolécule contenant l'information génétique chez la plupart des organismes vivants. Sa structure tridimensionnelle en double hélice formée de deux brins complémentaires antiparallèles a été résolue en 1953 par Watson et Crick avec l'aide des travaux de Franklin (Watson & Crick, 1953). Cette structure particulière s'explique par la composition même de l'ADN. En effet, l'ADN est un polymère de nucléotides résultant de l'association d'une base azotée avec un sucre et un groupement phosphate. Les bases azotées sont au nombre de quatre : adénine, cytosine, guanine et thymine. La complémentarité des deux brins d'ADN réside dans l'appariement spécifique de ces bases azotées hydrophobes orientées vers l'intérieur de la double hélice : l'adénine d'une chaîne ne peut se lier qu'avec la thymine de l'autre via deux liaisons hydrogène et la cytosine qu'avec la guanine via trois liaisons hydrogène.

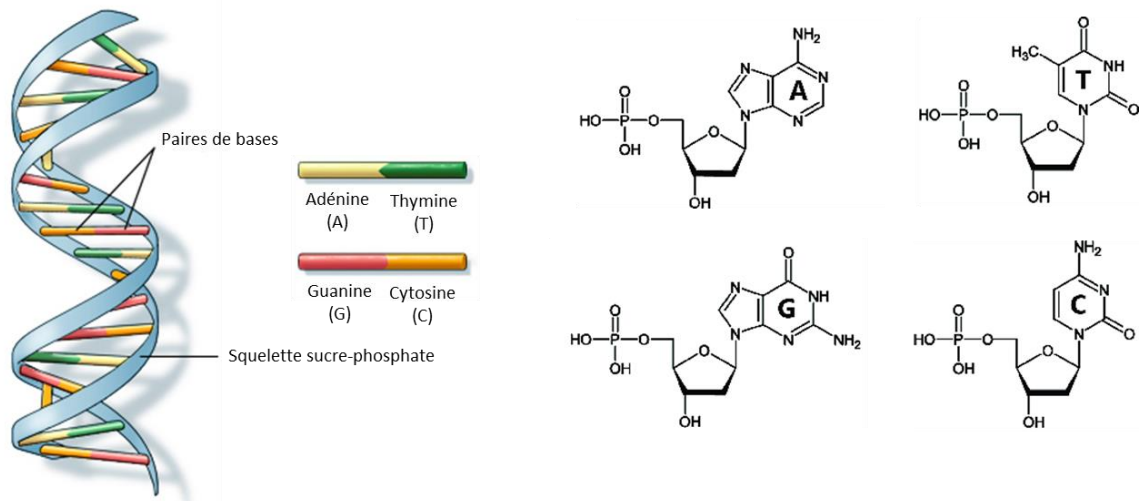


Figure 12 : Structure de l'ADN et des nucléotides.

Dans les cellules somatiques humaines, l'information génétique est contenue par approximativement six milliards de paires de bases d'ADN, ce qui correspond à une longueur théorique de deux mètres. L'intégralité de ce matériel peut être contenu dans le noyau dont le diamètre est d'environ 5 μm grâce à un système de compaction associant ADN et protéines et formant ainsi la chromatine.

B. Structure du nucléosome

L'unité fondamentale de la chromatine, appelée nucléosome, est composée d'environ 147 paires de bases d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones. Cet octamère, également appelé cœur du nucléosome, est formé d'un hétérotétramère central (H3-H4)₂ flanqué de deux hétérodimères H2A-H2B. La structure du nucléosome a été résolue par cristallographie aux rayons X à 2,8 Å (Luger et al., 1997) puis à 1,9 Å (Davey et al., 2002) ce qui a permis d'établir l'arrangement des histones entre elles ainsi que l'enroulement de l'ADN autour d'elles à l'échelle atomique.

Les histones sont de petites protéines de poids moléculaire compris entre 11 et 20kDa. Les analyses structurales chez différentes espèces ont révélé que la structure de base du nucléosome a été fortement conservée au cours de l'évolution. Chaque histone possède un domaine globulaire globalement conservé appelé HFD (Histone Fold Domain) formé de trois hélices α reliées par deux courtes boucles : $\alpha 1$ - L1 - $\alpha 2$ - L2 - $\alpha 3$. Il permet la formation des hétérodimères H2A-H2B et H3-H4 ainsi que les interactions histone-ADN. Les deux histones d'un hétérodimère interagissent via leur hélice $\alpha 2$ et présentent mutuellement leur hélice $\alpha 1$, portant les motifs de liaison à l'ADN, vers l'extérieur du cœur du nucléosome en juxtaposant la boucle L1 de l'une des histones avec la boucle L2 de l'autre. En conséquence, les hélices $\alpha 3$ se retrouvent orientées vers l'intérieur du cœur du nucléosome. L'ADN interagit fortement avec les histones via de nombreuses interactions électrostatiques entre les groupements phosphate chargés négativement de

l'ADN et la charge globalement positive des histones. Il en résulte un enroulement de l'ADN selon 1,7 tours autour des histones du cœur du nucléosome.

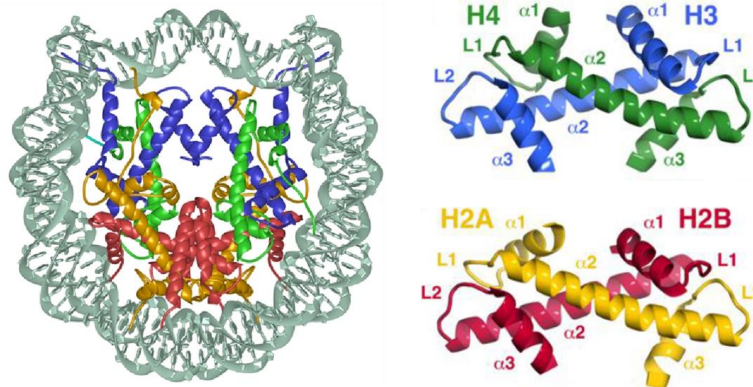


Figure 13 : Structure du nucléosome et des hétérodimères d'histones.

Adapté de (McGinty & Tan, 2015).

En plus de leur domaine globulaire, les histones possèdent des domaines carboxy- et amino-terminaux. Ces queues sont flexibles et ne présentent pas de structure secondaire. Elles s'étendent au-delà du cœur histone et interagissent avec l'ADN de liaison, les nucléosomes adjacents ou bien d'autres facteurs protéiques tels que l'histone H1. Ces queues sont essentielles à la dynamique des nucléosomes et de ce fait à la compaction du génome.

L'histone de liaison H1 s'insère au niveau du site d'entrée et de sortie de l'ADN sur le nucléosome et en stabilise ainsi la structure. H1 possède une structure sensiblement différente de celle des histones du cœur du nucléosome. Elle possède un domaine globulaire hydrophobe très conservé et composé de trois hélices α et d'un feuillet β en épingle à cheveux ainsi qu'un domaine carboxy-terminal peu conservé riche en charges positives permettant sa liaison avec l'ADN.

C. Dynamique du nucléosome

1. Assemblage et désassemblage des nucléosomes

Les histones peuvent interagir de manière stable avec un large panel de chaperons d'histones. Etant donnée la petite taille des histones, ces chaperons d'histones ne peuvent se lier en même temps à elles (Campos et al., 2010, 2015; Drané et al., 2010). Ils jouent néanmoins des rôles clés tout au long de l'existence des histones en se liant à elles dès leur synthèse, les escortant dans le noyau, évitant la formation d'agrégats toxiques pour la cellule et les aidant à s'associer et à se dissocier spécifiquement de l'ADN au cours de divers processus cellulaires. Il a été montré par analyse pulse-chase que des histones néosynthétisées sont incorporées dans la chromatine moins d'une minute après leur synthèse ce qui laisse présager de l'efficacité des processus impliqués (Bonner et al., 1988).

Les histones interagissent très rapidement après leur traduction avec des chaperons permettant leur bon repliement : HSC70 (Heat Shock 70) et HSP90 (Heat Shock Protein

90) pour H4 (Alvarez et al., 2011; Campos et al., 2010) mais seulement HSC70 pour H3 (Alvarez et al., 2011; Campos et al., 2010). L'import de H3 et H4 dans le noyau peut ensuite se faire selon deux voies. D'une part, H3 et H4 s'associent en dimères interagissant avec ASF1 (AntiSilencing Function protein 1) avant d'être importés par IPO4 (ImPortin 4) (Alvarez et al., 2011; Campos et al., 2010, 2015). D'autre part, les histones monomériques interagissent directement avec IPO4 et leur dimérisation se fait ensuite dans le noyau (Apta-Smith et al., 2018). Les histones H2A et H2B quant-à-elles sont importées dans le noyau sous forme de dimères en interaction avec NAP1 (Nucleosome Assembly Protein 1) et IPO9 (Mosammaparast et al., 2002). Dans le noyau, NASP (Nuclear Autoantigenic Sperm Protein) entre en compétition avec ASF1 et le remplace auprès de H3 sous forme monomérique mais interagit avec le dimère H3-H4 dans une conformation compatible avec la présence de ASF1 (Bowman et al., 2017). Ceci implique que NASP pourrait jouer un rôle dans la dimérisation de H3 avec H4. A l'heure actuelle, l'existence d'un chaperon d'histone spécifique de H4 sous forme monomérique n'a pas été démontrée. Les chaperons d'histones RbAp46 et HAT1 viennent néanmoins interagir avec H4 lorsque celui-ci est déjà associé à H3, ASF1 et NASP ce qui forme le complexe soluble majeur (Campos et al., 2010, 2015). L'incorporation des histones peut ensuite se faire dépendamment ou indépendamment de la réplication. ASF1 peut interagir avec un certain nombre de facteurs de déposition parmi lesquels on trouve CAF1 (Chromatin Assembly Factor 1, comprenant les trois sous-unités p150, p60 et RbAp48) (Mello et al., 2002), MCM2 (MiniChromosome Maintenance complex component 2) (Groth et al., 2007; H. Huang et al., 2015; Richet et al., 2015) et HIRA (HIstone cell cycle Regulator A) (Drané et al., 2010). Cela suggère que ASF1 jouerait le rôle de pont entre le stockage nucléosoluble et les phases d'incorporation des histones.

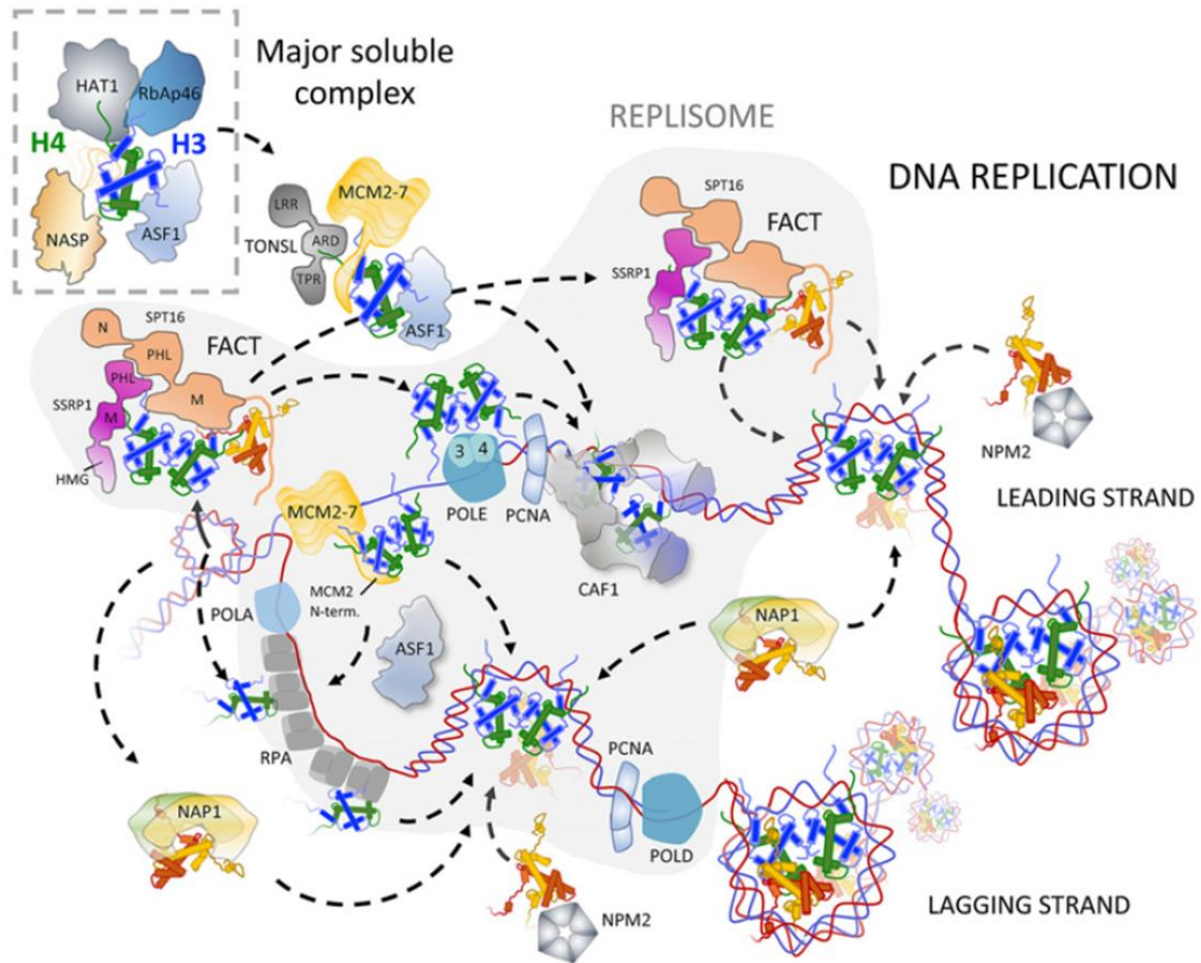


Figure 14 : Dynamique de la chromatine.
(Pardal et al., 2019)

Lors de la réplication, les processus régissant le désassemblage de la chromatine en amont de la fourche de réplication, la progression de cette fourche et l'assemblage en aval sont intimement liés. En effet, le complexe hélicase MCM2 sépare non seulement les deux brins d'ADN mais est également capable de se lier à la fois à un tétramère (H3-H4)₂ ou bien à ASF1 lui-même lié à un dimère H3-H4 (H. Huang et al., 2015; H. Wang et al., 2015) ce qui suggère un mécanisme de recyclage des tétramères (H3-H4)₂ (H. Huang et al., 2015; Richet et al., 2015). Suivent ensuite diverses ADN polymérases dont la liaison avec l'ADN simple brin est stabilisée par PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). Curieusement, les petites sous-unités POLE3 et POLE4 de la DNA polymérase ϵ (POLE) ont récemment été décrites comme pouvant jouer le rôle de chaperons de dimères H3-H4 à la fourche de réplication pour leur recyclage (Bellelli et al., 2018). Enfin, le complexe RPA (Replication Protein A), protégeant l'ADN simple brin sur le brin « retard », peut interagir avec des dimères H3-H4 et faciliter leur incorporation (S. Liu et al., 2017). D'autres complexes sont davantage spécialisés dans l'assemblage et le désassemblage des nucléosomes. Le complexe FACT (FACilitates Chromatin Transcription, composé des sous-unités SPT16 et SSRP1) peut interagir avec MCM2, des ADN polymérases et RPA (Foltman et al., 2013; VanDemark et al., 2006; Wittmeyer & Formosa, 1997). FACT joue alors un

rôle prépondérant dans le retrait (Kurat et al., 2017) et la déposition (Morillo-Huesca et al., 2010) des nucléosomes puisqu'il est le seul complexe connu à ce jour capable de se lier à la fois à un tétramère (H3-H4)₂ et à un dimère H2A-H2B (T. Wang et al., 2018). CAF1 quant-à-lui interagit avec ASF1 (Mello et al., 2002) et PCNA (Rolef Ben-Shahar et al., 2009) mais aussi avec des dimères H3-H4 (W. H. Liu et al., 2016). En se dimérisant, CAF1 permet la tétramérisation et l'incorporation de H3-H4 (W. H. Liu et al., 2016; Mattioli et al., 2017). Les dimères H2A-H2B peuvent ensuite être apportés par NAP1 (Aguilar-Gurrieri et al., 2016) ou NPM2 (NucleoPhosMin/NucleoPlasMin 2) (Platonova et al., 2011). Enfin, H1 serait déposé par NASP (Nuclear Autoantigenic Sperm Protein) (Finn et al., 2008).

La polyvalence des chaperons d'histones fait que des histones désassemblées de la chromatine parentales sont généralement réintégrées dans les deux doubles hélices filles. Ce recyclage se fait aléatoirement sur l'un ou l'autre des deux brins (Jackson et al., 1975). Néanmoins, les histones parentales et néosynthétisées ne sont pas mélangées avant d'être réassemblées (Prior et al., 1980). Ainsi, l'étape de réplication est réalisée de manière semi-conservative et l'information épigénétique est donc transmise aux cellules filles.

2. Remodelage de la chromatine

L'assemblage des nucléosomes se fait principalement lors de la réplication. Pour autant, la chromatine ne reste pas figée entre deux réplifications. La dynamique de la chromatine implique l'action de complexes ATP-dépendants de remodelage de la chromatine. Ces remodeleurs régissent la composition des nucléosomes ainsi que leur localisation sur l'ensemble du génome (Clapier et al., 2017; Ho & Crabtree, 2010). Des analyses phylogénétiques et fonctionnelles ont permis de classer les remodeleurs dans la superfamille des hélicases d'ADN et d'ARN ATP-dépendantes qui peut être subdivisée en quatre sous-familles d'enzymes : ISWI (Imitation SWItch), CHD (Chromodomain Helicase DNA-binding), SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) et INO80 (INOitol requiring 80) (Clapier & Cairns, 2009).

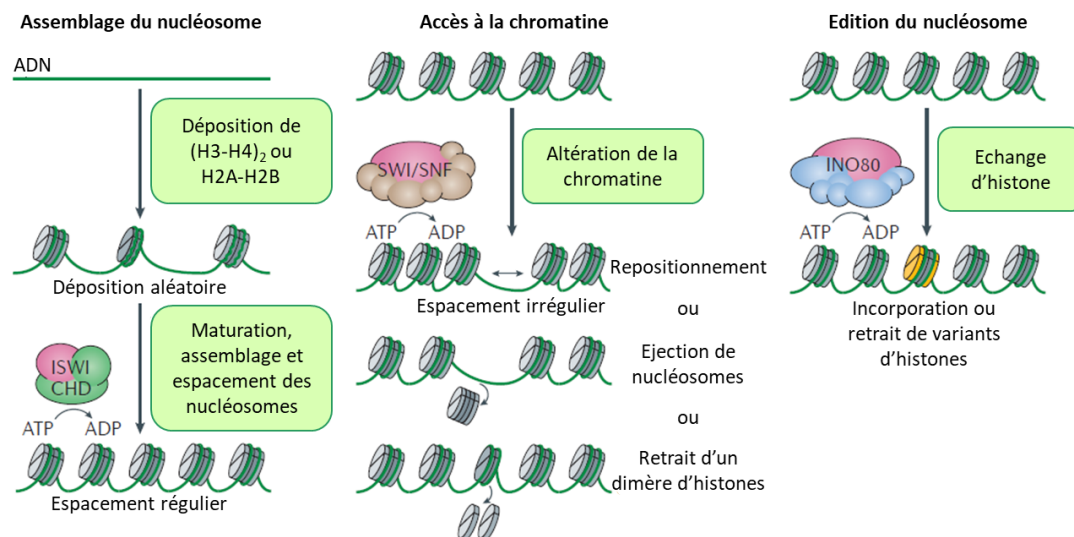


Figure 15 : Classification fonctionnelle des remodeleurs de la chromatine.

Adapté de (Clapier et al., 2017).

La plupart des remodeleurs sont spécialisés dans l'une des fonctions suivantes : l'assemblage et l'organisation des nucléosomes, la régulation de l'accessibilité à la chromatine ou la modification des nucléosomes (l'insertion et le retrait de variants d'histones).

Les remodeleurs des sous-familles ISWI et CHD peuvent être qualifiés de remodeleurs d'assemblage. Lors de la réplication, des chaperons d'histones délivrent des complexes d'histones (tétramères H3-H4 et dimères H2A-H2B) derrière le réplisome. Les remodeleurs d'assemblage aident alors à la maturation des complexes ADN-histones en nucléosomes octamériques (Fei et al., 2015; Torigoe et al., 2011) puis, grâce à leur activité ATPase, translatent les nucléosomes jusqu'à ce qu'ils se trouvent à une distance relativement fixe les uns des autres (Ito et al., 1997; Lusser et al., 2005; Varga-Weisz et al., 1997). Cette activité d'assemblage et d'espacement a également lieu après la transcription au cours de laquelle des nucléosomes sont éjectés.

Les remodeleurs de la sous-famille SWI/SNF peuvent être qualifiés de remodeleurs d'accès puisqu'ils éjectent des nucléosomes complets ou en partie (seulement des dimères H2A-H2B par exemple), rendant par cela même la chromatine plus accessible à des protéines et ARN (Boeger et al., 2004). Ainsi, à l'inverse des remodeleurs d'assemblage qui ont tendance à réprimer l'expression des gènes en créant un réseau dense de nucléosomes, les remodeleurs d'accès favorisent généralement l'expression des gènes en facilitant l'accès des facteurs de transcription à la chromatine.

Les remodeleurs de la sous-famille INO80 peuvent être qualifiés de remodeleurs d'édition. Ils sont en effets les artisans du retrait et du remplacements d'histones dans des nucléosomes indépendamment de la réplication (Goldberg et al., 2010; Mizuguchi et al., 2004; Ruhl et al., 2006). L'effet de l'insertion d'un variant à la place d'une histone canonique dépend du variant impliqué puisque leurs fonctions sont extrêmement variables.

Les caractéristiques des variants d'histones sont détaillées dans la partie III.B de ce chapitre.

II. Organisation structurale du génome : les structures d'ordres supérieurs de la chromatine

La condensation de la chromatine varie au cours du cycle cellulaire. Elle atteint son niveau de compaction le plus important lors de la mitose et de la méiose : le chromosome. L'organisation des chromosomes diffère énormément de l'état de la chromatine pendant l'interphase et leur structure demeure encore à ce jour sujet à débat.

A. Le chromosome mitotique

Nous avons déjà pu voir en détail la structure des nucléosomes. Ces unités de base de la chromatine sont espacées par un segment d'ADN d'une taille variable selon l'espèce et le type cellulaire, allant de 10 à 80 paires de bases appelée ADN de liaison (Widom, 1992). L'enchaînement des nucléosomes constitue une structure primaire en « collier de perles » d'un diamètre de 11 nm (Felsenfeld & Groudine, 2003). C'est le premier niveau de compactage de la chromatine. Des études *in vitro* sur des fragments de chromatine isolés ont montré que cette structure primaire peut se replier en présence de cations pour former une fibre d'environ 30 nm de diamètre (Tremethick, 2007). De nombreuses publications s'accordant sur la formation de cette structure en fibre de chromatine *in vitro*, il a été postulé qu'elle était nécessaire à la formation des chromosomes. Néanmoins, cette vision classique du chromosome mitotique a été ébranlée par des analyses *in vivo* plus récentes. Des structures d'environ 11 et 6 nm ont été mises en évidence dans des chromosomes mitotiques humains par diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS : Small Angle X-rays Scattering). Elles correspondent à des positionnements côte-à-côte ou face-à-face de nucléosomes. Des structures de 30 nm, correspondant à des fibres, n'ont alors pas été détectées. Elles ont néanmoins été observées dans des noyaux d'érythrocytes de poule lors de la même étude (Nishino et al., 2012). Il en découle qu'une structure en fibre de chromatine ne se forme que dans des conditions spécifiques et n'est pas nécessaire à la condensation de l'ADN en chromosome mitotique. Un nouveau modèle basé sur une organisation en fractale s'impose depuis (Bancaud et al., 2009; Lieberman-Aiden et al., 2009; Nishino et al., 2012).

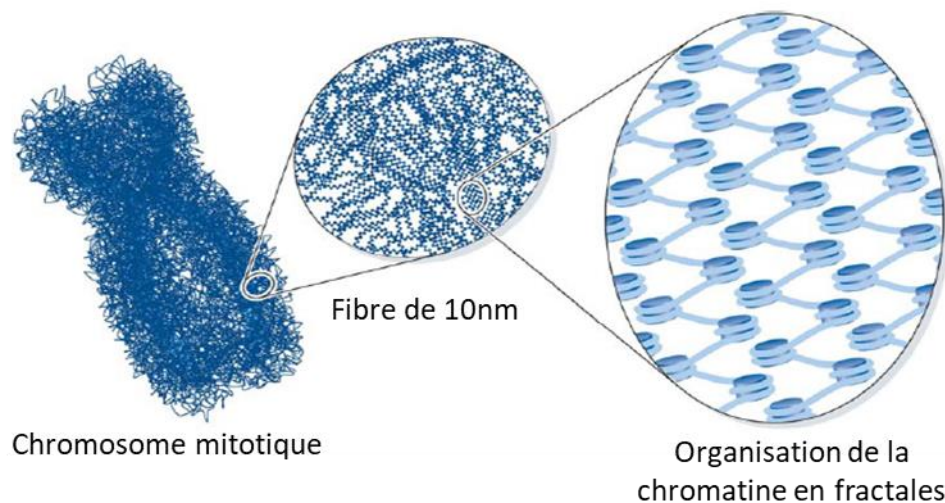


Figure 16 : Modèle de condensation de l'ADN en chromosome mitotique basé sur une organisation en fractales.

Adapté de (Hansen, 2012).

B. Euchromatine et hétérochromatine

En 1928, Emil Heitz a mis en évidence par coloration la présence de deux états organisationnels de la chromatine dans des noyaux eucaryotes en interphase : une forme relâchée appelée euchromatine correspondant à 20% du génome et une forme plus condensée nommée hétérochromatine (Heitz, 1928). Ces deux états ont dans un premier temps été associés à une chromatine activement transcrite pour l'euchromatine et réprimée pour l'hétérochromatine. Cependant, des études plus récentes ont révélé une plus grande complexité en identifiant au moins cinq états de chromatine avec des profils de modifications post-traductionnelles des histones et des compositions en protéines architecturales différents : deux types d'euchromatine et trois types d'hétérochromatine (Filion et al., 2010). Selon des critères temporels, il est également possible de distinguer deux types d'hétérochromatine : l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative (Grewal & Jia, 2007). L'hétérochromatine constitutive correspond à une chromatine silencieuse en permanence et dans toutes les cellules d'une espèce donnée. Elle est constituée des régions centromériques, péri-centromériques et télomériques qui sont riches en séquences satellites et en éléments transposables (Birchler et al., 2000). L'hétérochromatine facultative quant-à-elle correspond à des régions qui adoptent une conformation ouverte ou fermée en fonction de paramètres spatio-temporels (Trojer & Reinberg, 2007). Un exemple classique d'hétérochromatine facultative est l'inactivation d'un des deux chromosomes X chez la femme. En général, l'hétérochromatine joue un rôle dans la régulation des gènes mais également dans le maintien de l'intégrité du génome. Il a notamment été montré que ces régions condensées sont plus résistantes aux radiations ionisantes et aux agents génotoxiques (Falk et al., 2008; Takata et al., 2013). Bien qu'il soit clair que l'initiation d'une compaction d'ordre supérieur nécessite des interactions inter- et intranucléosomes, inter- et intrafibres et entre la chromatine et des protéines architecturales, l'organisation détaillée de ces

interactions dans le temps et l'espace reste largement incomprise. Des protéines spécifiques comme la cohésine (Hirano, 2006; Merkschlager & Nora, 2016), la condensine II (Hirano, 2006; Rosin et al., 2018), HP1 (Heterochromatin Protein 1) (Machida et al., 2018) et les lamines (Guelen et al., 2008) seraient impliquées.

C. Domaines chromatinien et territoires chromosomiques

L'interaction de la chromatine avec les lamines permet son attachement à la périphérie du noyau. L'aide de protéines d'échafaudage permet alors la formation d'un premier type de domaine chromatinien appelé LADs (Lamina-Associated Domains) (van Steensel & Belmont, 2017). Ce type d'organisation ne se limite pas à la périphérie du noyau. La récente technique de 3C (Chromosome Conformation Capture) et de ses variantes 4C, 5C et Hi-C permettent d'explorer la structure 3D de l'ADN via la détermination de l'ensemble des contacts inter- et intra-chromosomiques. Elles ont permis de mettre en évidence la présence de régions denses en chromatines appelées TADs (Topologically Associated Domains) (Nora et al., 2012). L'association de ces TADs constitue des compartiments eux-mêmes formant des territoires chromosomiques (Cremer et al., 2000; Cremer & Cremer, 2001). De nombreuses données indiquent des corrélations entre les compartiments chromosomiques et l'activation/répression de gènes (Misteli, 2007). Les mécanismes de régulation de ces structures restent à ce jour largement inconnus. On sait néanmoins que des barrières génétiques (tels que des isolateurs) directement inscrites dans le génome permettent l'interaction de protéines comme la cohésine, CTCF (CCCTC-binding Factor) et la condensine II régissant leur contrôle (Merkschlager & Nora, 2016; Rosin et al., 2018).

Il existe également des domaines chromosomiques particuliers comme les télomères (spécialisés dans la protection des extrémités des chromosomes et dans la stabilité génomique) et les centromères (spécialisés dans la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire). Ces derniers possèdent une signature moléculaire caractéristique comprenant une hypoacétylation des histones et la présence du variant d'H3 CENP-A (CENTromere Protein A) (McKinley & Cheeseman, 2016).

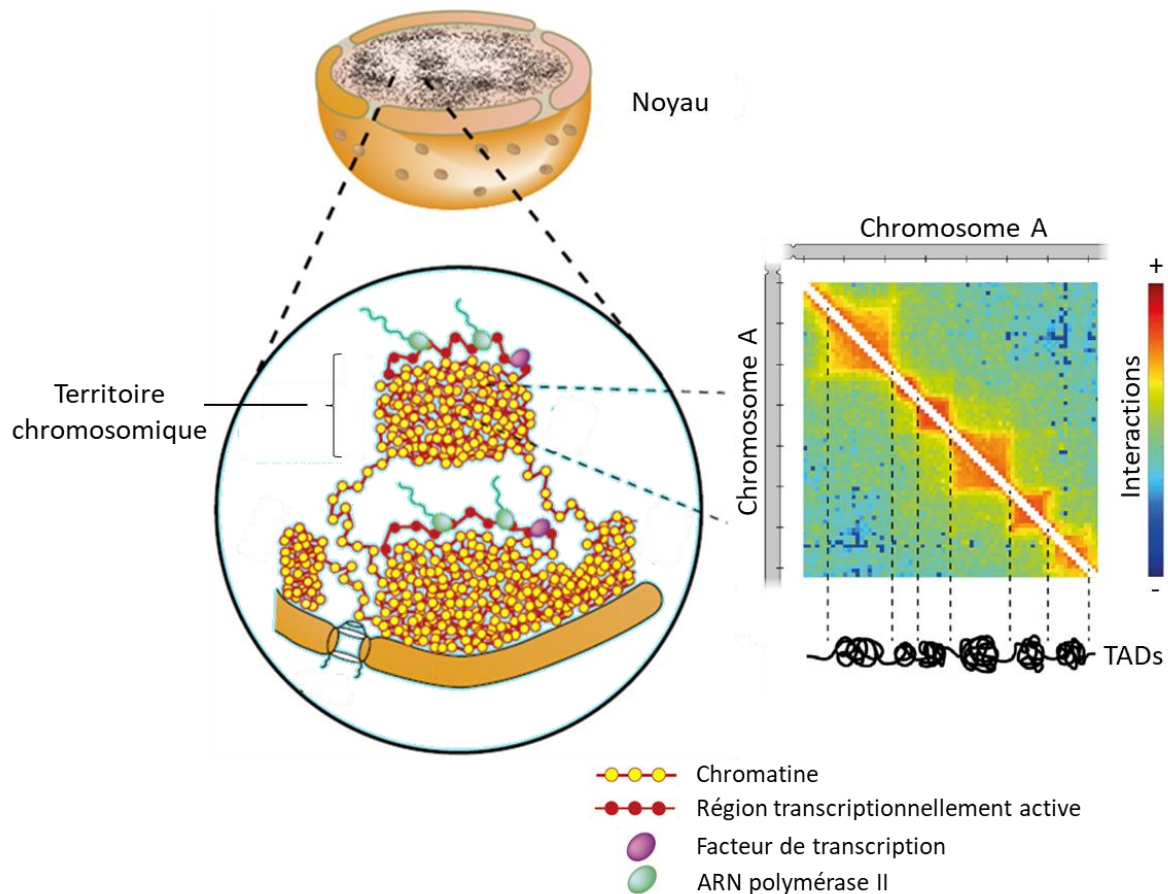


Figure 17 : Structures d'ordres supérieurs de la chromatine.
Adapté de (Maeshima et al., 2016).

III. Facteurs épigénétiques et régulation des processus liés à l'ADN

A. Modifications post-traductionnelles des histones

1. Types de modifications post-traductionnelles des histones

Comme leur nom le suggère, les modifications post-traductionnelles des histones (MPTs) sont des modifications covalentes des histones engendrées par une enzyme qui intervient après l'étape de traduction de l'ARN messager en protéine. Ces MPTs jouent un rôle central dans la régulation de la structure chromatinienne et, de ce fait, contrôlent les processus cellulaires nécessitant l'accès au génome (Zhou et al., 2011). Il existe plusieurs types de modifications que l'on peut répartir en deux groupes selon la taille des groupements considérés. Le premier groupe comprend alors les modifications de petite taille que sont l'acétylation de lysine, la méthylation (mono-, di- et triméthylation) de lysine et d'arginine, la phosphorylation de sérine, de thréonine et de tyrosine, la citrullination d'arginine et l'isomérisation de proline. Le deuxième groupe comprenant les modifications de plus grande taille inclut l'ubiquitinylation, la sumoylation, l'ADP ribosylation et la biotinylation de lysine (Bannister & Kouzarides, 2011). D'autres types de modifications d'histones ont été mis en évidence plus récemment comme la β -N-

acetylglucosamine de sérine et thréonine (Sakabe et al., 2010), la crotonylation (Tan et al., 2011), la succinylation ainsi que la malonylation de lysine (Xie et al., 2012). Néanmoins, les modifications les plus étudiées restent l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitinylation. La plupart de ces modifications sont réversibles et localisées au niveau des extrémités N-terminale et C-terminale non structurées des histones.

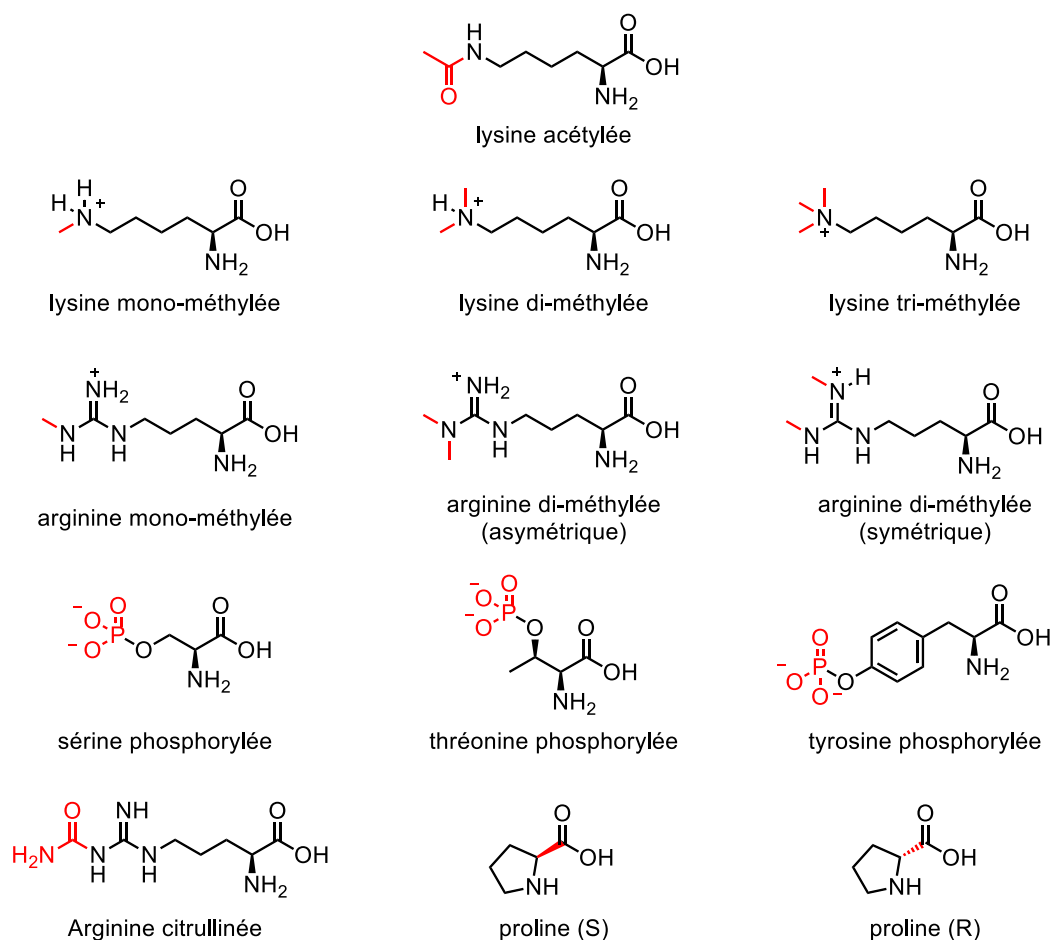


Figure 18 : Modifications post-traductionnelles des acides aminés.

Image réalisée sur ChemDraw.

2. Code histone

La diversité des profils de MPTs ainsi que leur implication dans la régulation de l'expression des gènes ont conduit au développement d'un « code histone » (Strahl & Allis, 2000). Ce code cherche à faire le lien entre les types de modifications, leurs impacts sur la chromatine et leurs implications dans les processus biologiques. Il ne se limite pas à la description des interactions histone/ADN mais comprend l'ensemble des processus sous-jacents que sont le dépôt et le retrait des modifications par un large panel d'enzymes de modification des histones et la reconnaissance spécifique de ces modifications par des protéines non-histones. Ces dernières traduisent alors l'information contenue dans ce code en processus biologiques fondamentaux tels que la transcription (Zhou et al., 2011), la réplication (Collins et al., 2002), la mitose et la méiose (D. 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) en recrutant de nombreux éléments. Ainsi, le code histone complète l'information contenue dans le code génétique et l'étend considérablement.

a) L'acétylation

L'acétylation est le résultat du transfert d'un groupement acétyl depuis un acétyl-CoA vers le groupement amino-terminal des résidus lysine d'une protéine donnée grâce à l'action catalytique d'enzymes appelées histone-acétyltransférases (HATs). Il existe deux grandes classes de HATs : les HATs de type A et de type B (K. K. Lee & Workman, 2007). Les HATs de type A sont nucléaires et peuvent être classées en trois familles selon leurs homologues de séquence et leur structure : GNAT (Gcn5-related N-AcetylTransferases), MYST (MOZ-Ybf2-Sas2-TIP60) et CBP/p300. Les HATs de type B sont essentiellement cytoplasmiques. Elles sont responsables de l'acétylation des histones libres néo-synthétisées. Les groupements acétyl ajoutés par les HATs de type B sur les histones sont enlevés après leur import dans le noyau et leur incorporation dans la chromatine (Ruiz-Carrillo et al., 1975). Cette réaction inverse est catalysée par des histone-désacétylases (HDACs) subdivisées en six classes selon leurs homologues de séquence et leur structure. Pour information, les HATs et HDACs sont listées dans les annexes 1 et 2.

En général, l'acétylation contribue à une ouverture plus importante de la chromatine car elle supprime la charge positive des histones et diminue donc leur interaction avec les groupements phosphates chargés négativement de l'ADN. L'acétylation rendant ainsi les gènes plus accessibles, elle est le plus souvent associée à une activation de la transcription (L. Xu et al., 1999). Il existe également des protéines impliquées dans le contrôle de la transcription (Filippakopoulos et al., 2012), la réparation des dommages à l'ADN (H.-S. Lee et al., 2010) et la progression du cycle cellulaire (Collins et al., 2002) capables de reconnaître une lysine acétylée.

b) La méthylation

La méthylation est le résultat du transfert d'un groupement méthyle depuis une S-adénosylméthionine (SAM) vers le groupement ϵ -aminé d'une lysine ou Ω -guanidino d'une arginine. Cette réaction est catalysée par des histone-lysine-méthyltransferases (HKMTs) ou histone-arginine-méthyltransferases (PRMTs) en fonction du résidu qu'elles ciblent. Ces enzymes peuvent permettre l'ajout de 1 à 3 groupements méthyle sur le même résidu. On distingue alors deux classes de PRMTs : les PRMTs de type I méthylent l'arginine de manière asymétrique tandis que les PRMTs de type II méthylent l'arginine de manière symétrique (Y. Zhang & Reinberg, 2001). La déméthylation des groupements mono-, di- ou triméthylés est catalysée par des histone-déméthylases (HDMs). On distingue deux classes de HDMs selon leur mécanisme d'action : une réaction d'oxydation d'amine dépendante de la flavine adénine dinucléotide ou une hydroxylation nécessitant un Fe(II) et l' α -cétoglutarate comme cofacteurs (Klose & Zhang, 2007). Ces enzymes de méthylation et de déméthylation sont spécifiques à la fois d'une protéine mais également

d'un résidu en particulier ce qui permet un contrôle très fin. Pour information, les HMTs et HDMs sont listées dans les annexes 3 et 4.

Contrairement à l'acétylation, la méthylation n'impacte pas la charge mais augmente l'encombrement stérique et l'hydrophobicité du résidu. La méthylation ne peut pas être réduite à un rôle en particulier car celui-ci dépend du niveau de méthylation, du résidu considéré et du complexe protéique reconnaissant la modification. En effet, la monométhylation de H3K4 au niveau des enhancers est souvent associée à une activation de la transcription des gènes (Bannister & Kouzarides, 2011). En revanche, bien qu'elle soit le plus souvent associée à une activation de la transcription (Bannister & Kouzarides, 2011), la triméthylation de H3K4 peut avoir un rôle plus ambigu. H3K4me3 peut être reconnue par la sous-unité TAF3 du complexe de transcription TFIID activant la transcription (M. Vermeulen et al., 2007) mais aussi par la sous-unité ING2 de la protéine HDAC mSin3a réprimant rapidement les gènes (Shi et al., 2006). Dans les cas de H3K9 et H3K20 et H3K27, le degré de méthylation est associé à des différences de condensation de la chromatine. Ainsi, H3K27me3 est un marqueur d'hétérochromatine facultative au niveau des gènes silencieux et H3K9me3 est enrichi avec HP1 (Heterochromatin Protein 1) dans l'hétérochromatine constitutive (Bannister & Kouzarides, 2011; Trojer & Reinberg, 2007).

c) La phosphorylation

La phosphorylation est le résultat du transfert d'un groupement phosphate depuis une molécule d'ATP (Adénosine TriPhosphate) vers un l'oxygène de la chaîne latérale d'une sérine, une thréonine ou une tyrosine. Cette réaction et son inverse sont catalysées par un large panel de kinases et de phosphatases listées dans les annexes 5 et 6.

L'ajout d'un groupement phosphate apporte une charge négative au résidu modifié. L'affinité de l'histone concernée pour l'ADN s'en trouve donc diminuée ce qui crée une décondensation locale de la chromatine. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'identification et la caractérisation des phosphorylations d'histones aient montré leurs rôles majeurs dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, la mitose/méiose et la régulation de la transcription, passant tous les trois par un remodelage de la chromatine et l'expression de gènes. Il est intéressant de remarquer qu'une même phosphorylation peut jouer un rôle dans plusieurs processus cellulaires. Par exemple, la phosphorylation de H4S1 chez la levure est impliquée dans la compaction de la chromatine et la stabilisation du nucléosome lors de processus aussi divers que la réparation de l'ADN, la transcription et la sporulation (Rossetto et al., 2012). Il est encore plus remarquable qu'une même phosphorylation puisse avoir des effets diamétralement opposés selon le contexte dans lequel elle a lieu. Par exemple, la phosphorylation de H3S10 ou H3S28 est impliquée dans la condensation de la chromatine lors de la mitose ou de la méiose et le relâchement de la chromatine lors de la transcription (Rossetto et al., 2012). De telles divergences de rôles de la phosphorylation mais aussi plus largement des MPTs des histones suggèrent l'existence d'un important aspect combinatoire.

3. Communication croisée des modifications d'histones

De nombreuses études ont révélé que la présence de plusieurs modifications sur une même histone, sur des histones d'un même nucléosome ou de nucléosomes voisins peut être la base d'une communication croisée modulant la fonction de ces modifications. De même, la présence de certaines MPTs peut directement influencer sur l'apparition ou non d'une modification sur un résidu voisin (Bannister & Kouzarides, 2011; Fischle, Wang, & Allis, 2003). Ainsi, certaines MPTs sont mutuellement exclusives et d'autres sont, au contraire, positivement corrélées. Par exemple, la méthylation de H3K9 (souvent associée à une répression de la chromatine) est reconnue par la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1) qui peut interagir à son tour avec l'histone méthyltransférase Suv39 capable de méthyliser le même résidu sur un nucléosome voisin (Margueron et al., 2005). Cependant, si la lysine 9 est déjà acétylée, la méthylation ne peut se faire et la propagation de cette dernière marque sera bloquée.

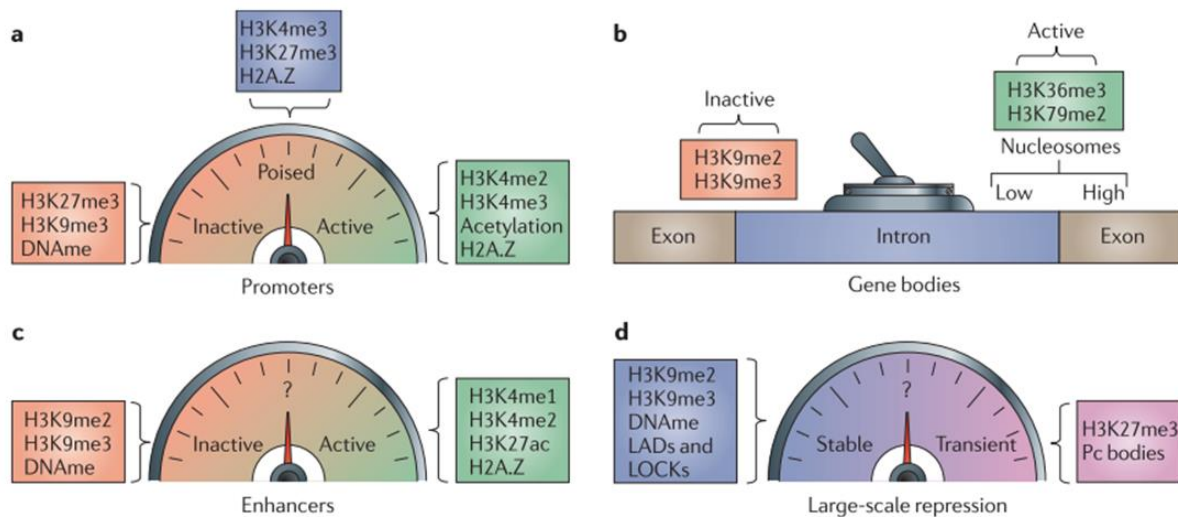


Figure 19 : Les différents niveaux de contrôle des modifications d'histones.
(Zhou et al., 2011)

Cette nature combinatoire des MPTs des histones apporte un haut niveau de complexité au code histone. Il se doit d'être pris en compte lorsque l'on s'intéresse à l'impact des MPTs des histones sur la transcription des gènes puisqu'elles agissent de concert et non individuellement (Strahl & Allis, 2000). La présence de plusieurs modifications sur la même histone ou des histones voisines peut avoir des effets difficiles à prévoir. La complexité engendrée par cet aspect combinatoire présente toutefois un intérêt majeur puisqu'il permet une régulation fine de l'expression des gènes.

4. Domaines d'interaction avec des histones modifiées

Les MPTs des histones peuvent participer à la régulation de l'expression des gènes de deux manières différentes. D'une part, certaines modifications peuvent impacter la structure de la chromatine en altérant les propriétés physiques des nucléosomes comme leur mobilité, leur taille, leur conformation et leur stabilité. D'autre part, certaines modifications peuvent agir de manière indirecte en favorisant ou en empêchant le

recrutement de protéines à la chromatine. Ces protéines peuvent être des enzymes de modification d'histones entraînant alors des communications croisées, des facteurs de remodelage dépendants de l'ATP entraînant une modification de la compaction de la chromatine ou encore des facteurs de transcription.

a) Domaines d'interaction avec des résidus acétylés

La reconnaissance d'un résidu acétylé par une protéine est possible lorsque celle-ci possède un bromodomaine. Il s'agit d'un petit domaine protéique composé de quatre hélices α reliées par des boucles qui constituent une poche hydrophobe. L'existence des bromodomaines a été mise en évidence pour la première fois chez la drosophile dans la protéine Brahma (Tamkun et al., 1992). Il a depuis été identifié dans plus d'une centaine d'autres protéines chez divers organismes. Chez l'homme, il est présent dans la plupart des histones-acétyltransférases telles que les protéines de la famille GNAT ou celles de la famille CBP/p300 mais également au sein de certains complexes de remodelage de la chromatine ATP-dépendants, notamment de la sous-famille SWI/SNF (Filippakopoulos et al., 2012).

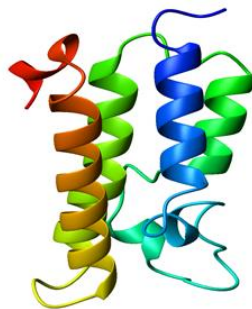


Figure 20 : Structure tri-dimensionnelle d'un bromodomaine.

b) Domaines d'interaction avec des résidus méthylés

Contrairement au bromodomaine qui est le seul domaine d'interaction avec les résidus acétylés, il existe plusieurs domaines capables d'interagir avec les résidus méthylés.

Le chromodomaine assure une interaction spécifique avec les lysines méthylées. Il est composé d'un feuillet β antiparallèle faisant face à une hélice α (Ball et al., 1997). Les chromodomaines peuvent être subdivisés en trois classes structurellement distinctes : la famille HP1 (Heterochromatin Protein 1), la famille Polycomb et la famille CHD (Chromodomain Helicase DNA-binding) (Milosevich & Hof, 2016). Les familles HP1 et Polycomb reconnaissent les marques H3K9me3 et H3K27me3 respectivement (Fischle, Wang, Jacobs, et al., 2003) tandis que la famille CHD reconnaît les marques H3K4me3 (Flanagan et al., 2005). Ainsi, les protéines recrutées par les résidus méthylés via un chromodomaine sont principalement impliquées dans la régulation de l'hétérochromatine et de la transcription (Flanagan et al., 2005).

Le domaine Tudor est composé d'un feuillet antiparallèle faisant face à une ou deux hélices α (Patel, 2016). Il permet notamment à la protéine 53BP1 de reconnaître les deux marques p53K582me2 et H4K20me2 impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN (Botuyan

et al., 2006; Kachirskaia et al., 2008) et à la protéine JMJD2A (JuMonJi Domain containing 2A), une histone déméthylase, de se fixer aux résidus H3K4me3 et H4K20me2/3 (J. Lee et al., 2008).

Le motif répété MBT reconnaît les lysines mono- et di- méthylées et permet donc une répression spécifique de certains gènes lors de processus aussi divers que la régulation de la mitose, la suppression de tumeurs et le maintien de l'identité cellulaire et de l'organisation spatiale de l'organisme lors du développement (Bonasio et al., 2010).

Le motif PWWP, tout comme le chromodomaine, le motif MBT et le domaine Tudor, appartient à la famille des protéines Royal qui utilisent une cage aromatique pour reconnaître les lysines méthylées (Patel, 2016). Les protéines contenant le motif PWWP (proline-tryptophane-tryptophane-proline) sont principalement impliquées dans la régulation de la transcription, la réparation des dommages à l'ADN et la méthylation de l'ADN (Slater et al., 2003).

Le doigt de zinc de type PHD est la classe la plus vaste à ce jour de domaine de lecture des lysines méthylées avec plus d'une centaine de structures caractérisées. Elles sont constituées d'un motif conservé incluant un feuillet β antiparallèle et deux sites de chélation d'atomes de zinc. En générale, le doigt de zinc de type PHD permet une reconnaissance spécifique des modifications H3K4me2/3 et H3K9me2/3 (Teske & Hadden, 2017). Ce motif est présent au sein de certains activateurs transcriptionnels de la famille CBP/p300 ainsi que dans certains complexes à activité HMT, HDM ou encore HDAC.

Le motif WD40 est composé de quatre brins β dont la séquence se termine par un dipeptide tryptophane-acide aspartique (W-D). La répétition de plusieurs motifs WD40 (entre quatre et seize) forme, après repliement, un domaine structural en forme de turbine dont l'ouverture au centre permet la reconnaissance de lysines méthylées sur des histones. Ce motif se trouve généralement sur des protéines appartenant à de larges complexes impliqués dans la biogenèse de vésicules, la cytokinèse, la dynamique de la chromatine et la régulation de la transcription (Teske & Hadden, 2017).

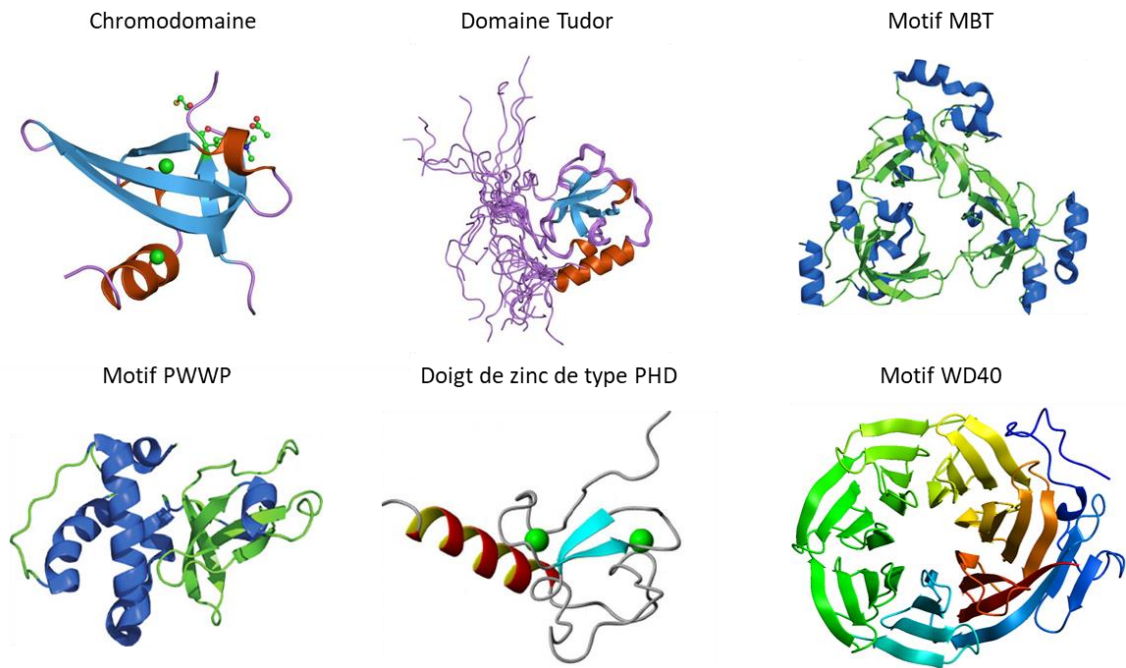


Figure 21 : Structures tri-dimensionnelles des domaines d'interaction avec des résidus méthylés.

c) Domaines d'interaction avec des résidus phosphorylés

Il n'existe actuellement que peu de protéines identifiées comme étant capables d'interagir spécifiquement avec des résidus phosphorylés d'histones. Seuls deux domaines structuraux ont été caractérisés : SH2 (Src Homology region 2) et BRCT (BREast Cancer-susceptibility protein-1 C-Terminal). Le domaine SH2, composé d'un feuillet β antiparallèle flanqué de deux hélices α , est présent dans plusieurs kinases et phosphatases (Pawson et al., 2001). Quant au domaine BRCT, il s'agit d'une séquence répétée d'une centaine d'acides aminés présente notamment dans des protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN telles que MDC1 et 53BP1 (Stucki et al., 2005; Ward et al., 2003).

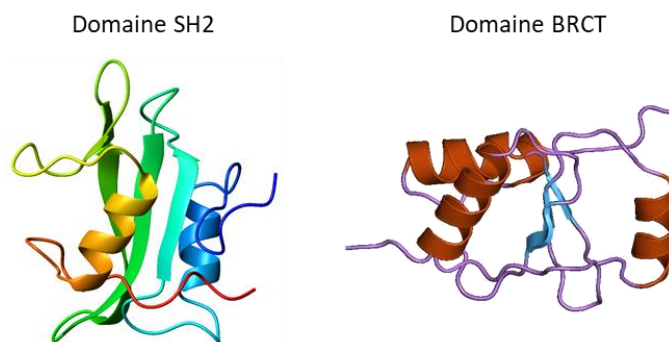


Figure 22 : Structures tri-dimensionnelles des domaines d'interaction avec des résidus phosphorylés.

B. Histones canoniques et variants

Les études portant sur l'information épigénétique se sont longtemps limitées au MPTs des histones. Néanmoins, les variants d'histones jouent également un rôle majeur dans la

régulation de la dynamique chromatinienne. Les histones font partie des protéines les mieux conservées au cours de l'évolution. Ces protéines sont codées par plusieurs loci ce qui permet l'existence de plusieurs séquences alternatives pour chaque type d'histone (Marzluff et al., 2002). Chez les mammifères par exemple, 26 gènes codent pour 19 histones H2A différentes. 11 de ces protéines sont considérées comme canoniques car elles sont très similaires en termes de séquences (plus de 97% de similitudes) et aucune fonction particulière ne leur a été attribuée. On peut donc distinguer les histones canoniques de leurs variants selon deux modes de classification différents. En se basant sur leur structure, on peut distinguer les variants homéomorphes dont la séquence ne diffère que de quelques acides aminés, et les variants hétéromorphes dont les variations de séquences sont telles qu'elles impactent la mobilité électrophorétique de ces protéines (Franklin & Zweidler, 1977; M. H. P. West & Bonner, 1980). Le deuxième mode de classification se base quant-à-lui sur les caractéristiques fonctionnelles des variants : expression dépendante ou non de la réplication (Albig & Doenecke, 1997; R. S. Wu et al., 1982), expression spécifique dans un tissu (Doenecke et al., 1997), réalisation d'une fonction particulière (P. Chen, Zhao, & Li, 2013; Skene & Henikoff, 2013), etc. Selon cette dernière classification, seuls 3 variants spécifiques des cellules germinales ont été identifiés parmi les 19 protéines H2B existantes chez l'Homme tandis que les 6 histones H3 pourtant similaires à plus de 96% sont toutes considérées comme des variants. A contrario, l'histone H4 n'a pas de variant alors qu'elle est codée par 14 gènes différents.

Les gènes codant pour les histones canoniques sont regroupés en clusters et ne possèdent pas d'introns. De plus, leurs ARNm ne sont pas polyadénylés mais possèdent une structure en épingle à cheveux nécessaire à leur stabilité et leur traduction pendant la phase S (Dominski & Marzluf, 1999; Pandey et al., 1990). En revanche, les pré-ARNm des variants d'histones peuvent contenir des introns. Ils peuvent donc subir des épissages alternatifs (comme pour macro-H2A) et sont polyadénylés (Marzluff et al., 2002; Rasmussen et al., 1999).

Les histones canoniques sont majoritairement exprimées pendant la phase S et incorporées dans la chromatine au cours de 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; R. S. Wu et al., 1982). Ainsi, à la différence des histones canoniques qui sont plutôt associées à l'ADN nouvellement synthétisé et majoritairement impliquées dans la régulation de la transcription, les variants d'histones remplacent les histones déjà intégrées à la chromatine sous certaines conditions pour remplir des fonctions spécifiques telles que la réparation des dommages à l'ADN, l'établissement des centromères ainsi que l'activation et la répression de la transcription (Talbert & Henikoff, 2010). Leurs fonctions particulières s'expliquent par les altérations de structure et de dynamique qu'elles entraînent au niveau des nucléosomes. Ainsi, la présence de tels variants dans la chromatine ajoute un niveau de complexité à la régulation de la structure chromatinienne.

1. Les variants de l'histone H2A

L'histone canonique H2A est composée d'environ 130 acides aminés lui conférant une masse moléculaire proche de 14kDa. Il existe 8 variants de H2A : H2A.X, H2A.Z, macroH2A (subdivisé en macroH2A1 et macroH2A2), H2A.Bbd (aussi subdivisé en H2A.Bbd type 1 et type 2/3), H2A.V et H2A.J. Tous ces variants ont des masses moléculaires différentes des formes canoniques et peuvent posséder des isoformes.

a) H2A.X

Chez les mammifères, entre 2 et 25% des nucléosomes contiennent le variant H2A.X. Chez l'homme en particulier, il est présent dans tous les types cellulaires. Il possède 86% d'homologie avec la séquence canonique. Il contient un motif consensus SQ en position 139, au niveau de son extrémité C-terminale (Mannironi et al., 1989). Ce motif peut être phosphorylé par les kinases ATM, ATR et DNA-PK (Burma et al., 2001). Dans le cas de cassures double brin notamment, le niveau de la forme phosphorylée appelée γ H2A.X augmente considérablement formant ce qui est appelé des foyers γ H2A.X (pour de plus amples détails, voir la partie II-A du premier chapitre). La présence de γ H2A.X est associée avec une conformation relâchée de la chromatine permettant une meilleure accessibilité des cassures aux protéines de réparation (Fink et al., 2007). De même, il a été montré que l'incorporation du variant H2A.X dans la chromatine limite la fixation de l'histone de liaison H1. Cependant, cela ne semble pas altérer de manière significative la structure du nucléosome. En revanche, lorsque ce variant est phosphorylé, non seulement la fixation de l'histone H1 est encore plus limitée mais le nucléosome est également déstabilisé (Li et al., 2010).

H2A.X contient un deuxième site de phosphorylation, la tyrosine 142. Contrairement à la sérine 139, la tyrosine 142 possède un niveau basal non nul de phosphorylation dans l'ensemble des cellules de mammifère. La déphosphorylation de ce résidu s'avère notamment être cruciale pour la phosphorylation de la sérine 139 et une réparation des dommages à l'ADN correcte (Cook et al., 2009; Xiao et al., 2009).

Par ailleurs, des souris n'exprimant pas ce variant présentent une instabilité génomique au niveau de leurs cellules B et T ainsi que leurs fibroblastes (Celeste et al., 2002). L'absence de forme phosphorylée de H2A.X altère les recombinaisons de l'ADN (Petersen et al., 2001) et, lorsque la délétion est couplée à une délétion de p53, les souris sont prédisposées à développer des lymphomes ainsi que d'autres types de cancers (Bassing et al., 2003).

b) H2A.Z

Le variant H2A.Z peut représenter jusqu'à 15% de la quantité totale de H2A incorporés dans la chromatine. Il possède 60% d'homologie avec la séquence canonique. Les particularités de séquence de ce variant en modifient les caractéristiques électrostatiques. Cela crée des déstabilisations au sein du nucléosome entre les dimères H2A.Z-H2B et H3-H4 mais aussi une perturbation de l'interaction avec l'histone de liaison H1 (Suto et al., 2000; Thakar et al., 2009). L'instabilité des nucléosomes engendrée par

ce variant pourrait expliquer son rôle. En effet, lors de sa découverte chez *Tetrahymena thermophila*, H2A.X a essentiellement été trouvé dans les zones transcriptionnellement actives et absent des régions silencieuses (Allis et al., 1980). Il a depuis été confirmé que la présence de H2A.Z est corrélée à une activation transcriptionnelle et que ce variant est enrichi au niveau des TSS (Transcription Start Site) actifs (Barski et al., 2007). Par ailleurs, la décompaction de la chromatine induite par ce variant facilite le recrutement de protéines de réparation des dommages à l'ADN au niveau des cassures double brin (Y. Xu et al., 2012).

c) macroH2A

Le variant macroH2A diffère de H2A canonique essentiellement par sa taille de 372 acides aminés, soit près de trois fois celle de H2A canonique. Le premier tiers de sa séquence présente 65% d'homologie avec H2A tandis que le reste en C-terminal n'en présente aucune. Deux gènes présents sur le chromosome X codent pour macroH2A1 et macroH2A2 (Chadwick & Willard, 2001b). Deux épissages alternatifs de macroH2A1 (macroH2A1.1 et macroH2A1.2) résultent finalement en trois isoformes de macroH2A (Rasmussen et al., 1999). Les nucléosomes contenant macroH2A sont plus stables du fait d'une interaction plus forte de macroH2A avec H2B. Cela induit un niveau de compaction plus élevé de la chromatine (Chakravarthy & Luger, 2006; Changolkar & Pehrson, 2002; Muthurajan et al., 2011). MacroH2A, qui est présent aussi bien dans les cellules mâles que femelles, semble enrichi au niveau du chromosome X inactif des cellules femelles (Costanzi & Pehrson, 1998). Il est également enrichi au niveau de l'allèle muet lors de l'empreinte parentale (Choo et al., 2006). Ces données, ainsi que d'autres études, suggèrent donc un rôle de ce variant dans la répression des gènes (Doyen et al., 2006). MacroH2A est également surexprimé pendant la différenciation des cellules souches. Il participe alors à leur stabilisation dans leur état différencié ce qui permet d'éviter leur reprogrammation en cellules pluripotentes (Barrero et al., 2013; Gaspar-Maia et al., 2013; Pasque et al., 2011).

d) H2A.Bbd

A l'inverse des autres variants, H2A.Bbd est spécifique des mammifères. Il ne présente que 48% d'homologie avec H2A canonique et est considérablement plus court que les autres variants. Contrairement à macroH2A, H2A.Bbd est totalement absent du chromosome inactif X mais est très abondant dans les régions actives du génome (Chadwick & Willard, 2001a). A l'instar de H2A.Z, les nucléosomes contenant H2A.Bbd semblent moins stables que ceux contenant une version canonique de H2A et l'ADN s'enroulant autour est considérablement plus court avec 118 paires de base contre 147 habituellement (Bao et al., 2004; Gautier et al., 2004). Ce variant pourrait donc contribuer à faciliter la transcription des gènes en augmentant l'accessibilité de la chromatine (Tolstorukov et al., 2012).

2. Les variants de l'histone H2B

Malgré l'existence de 19 protéines H2B, seuls 3 variants spH2B (sperm-specific H2B), TSH2B (Testis-Sperm specific H2B) et H2BFWT (H2B histone Family member W Testis-specific) ont été clairement identifiés et on en ignore encore toutes les fonctions (Churikov et al., 2004; Gineitis et al., 2000; Zalensky et al., 2002). spH2B a été découvert dans un complexe se liant aux télomères et H2BFWT semble être également enrichi dans les régions télomériques ce qui laisse penser que ces deux variants participeraient à la stabilisation des complexes télomériques (Churikov et al., 2004; Gineitis et al., 2000). TSH2B possède quant-à-lui dans sa partie N-terminale une phénylalanine à la place d'une sérine phosphorylable. Or cette sérine est normalement phosphorylée par MST1 (Macrophage-STimulating 1) 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.

3. Les variants de l'histone H3

La famille de l'histone H3 comprend H3.1 et H3.2 qui sont considérés comme des histones pseudo-canoniques, le variant H3.3, le variant centromérique CENP-A et des variants spécifiques aux testicules non présents dans les cellules somatiques.

Les histones H3.1 et H3.2 sont fortement exprimées lors de la phase S et incorporées à la chromatine pendant la réplication. H3.1 est codé par 10 gènes différents tandis que H3.2 n'est codé que par 3 gènes. Au niveau de leur séquence protéique, un seul acide aminé diffère entre H3.2 et H3.1. Cette subtile variation semble toutefois permettre une légère modulation de fonction puisque H3.1 est principalement associé à l'hétérochromatine constitutive tandis que H3.2 est plutôt localisé au niveau de l'hétérochromatine facultative (Hake & Allis, 2006).

a) H3.3

Dans certains cas, le variant H3.3 peut représenter près de la moitié des espèces totales de H3 incorporées dans la chromatine. Il diffère de l'histone pseudo-canonique H3.1 par seulement 5 acides aminés et peut s'incorporer dans la chromatine soit lors de la phase S par la même voie que les histones pseudo-canoniques soit indépendamment de celle-ci (Ahmad & Henikoff, 2002). Son expression est maintenue tout au long du cycle cellulaire. Bien que ses différences de séquences par rapport aux histones pseudo-canoniques soient faibles, H3.3 est le plus souvent incorporé lors d'une activation transcriptionnelle où il remplace H3.1 (Mito et al., 2005; Schwartz & Ahmad, 2005). En accord avec ce remplacement spécifique, H3.3 est enrichi en marques associées à une activation de la transcription comme H3K4me3 et colocalise avec un autre variant d'histone, H2A.Z, au niveau des promoteurs de gènes actifs tandis que H3.1 est plus généralement associé à des marques plutôt répressives (Hake et al., 2006; Jin et al., 2009). De plus, l'incorporation de H3.3 contribue à une ouverture de la chromatine et favorise la transcription en inhibant la formation de structures d'ordre supérieur malgré un effet très limité sur la stabilité du nucléosome (P. Chen, Zhao, Wang, et al., 2013).

b) CENP-A

Les centromères sont des régions particulières de la chromatine où se forment les kinétochores, des plateformes d'ancrage pour les microtubules qui vont permettre la ségrégation des chromatides pendant la division cellulaire (Amor et al., 2004). Le variant CENP-A (CENtromer Protein A) doit son nom à sa localisation spécifique dans cette région chromosomique et est essentiel à la propagation et au maintien des centromères (McKinley & Cheeseman, 2016; Yoda et al., 2000). CENP-A ne partage que 50% d'homologie avec l'histone pseudo-canonique H3.1. Ce variant est exprimé tout au long du cycle cellulaire mais présente un pic d'expression en fin de phase S. Il est ensuite intégré à la chromatine par la chaperonne HJURP (Holliday Junction Recognition Protein) au début de la phase G1 (Dunleavy et al., 2009; Foltz et al., 2009; Jansen et al., 2007). En complément de son rôle au niveau des centromères, il a été montré que des embryons de souris déficientes pour CENP-A décèdent dans la première semaine de gestation et présentent des anomalies de fragmentation et d'hypercondensation de la chromatine (Howman et al., 2000).

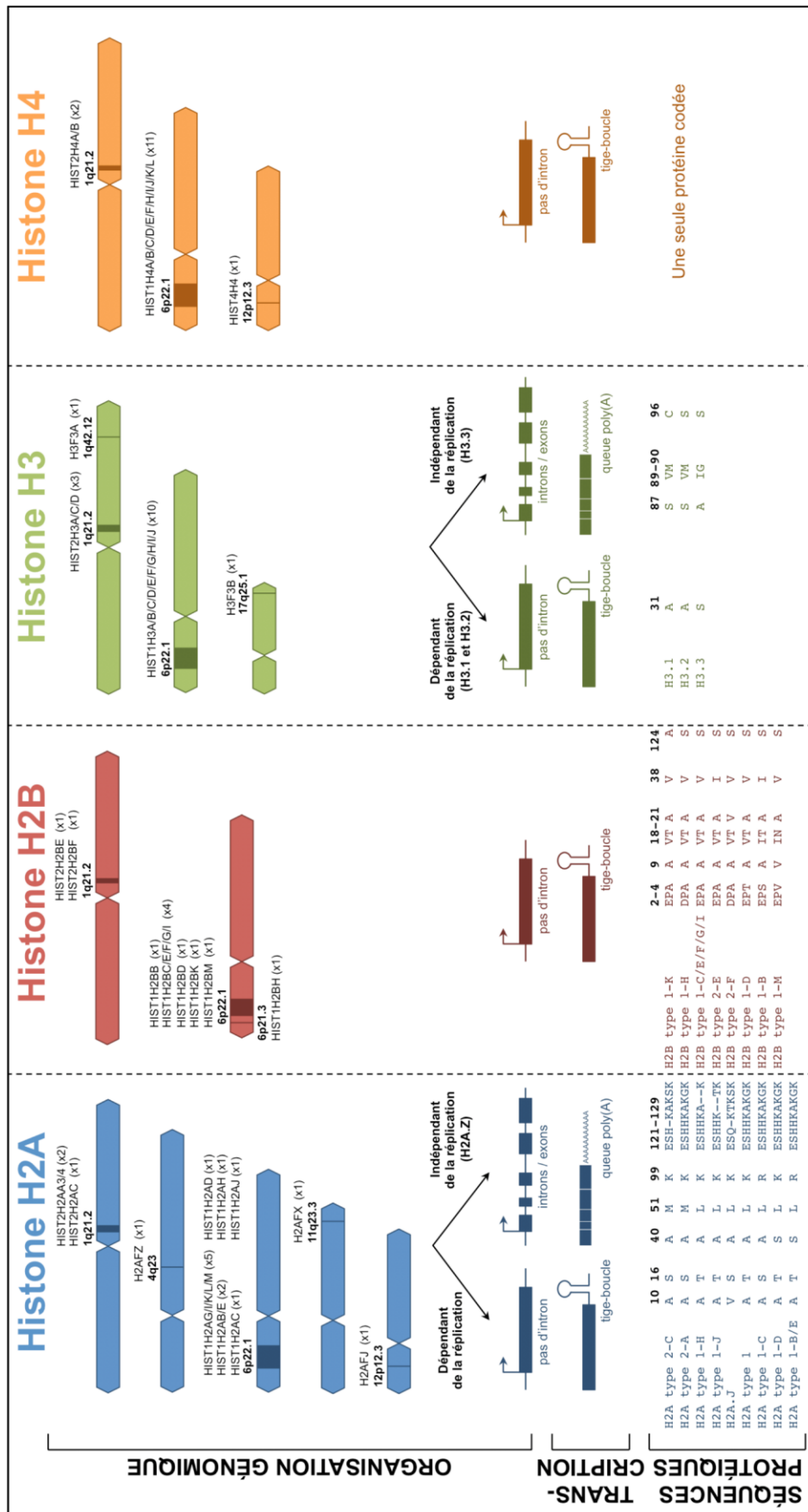
4. Les variants de l'histone de liaison H1

L'histone H1 joue un rôle clé dans la compaction et la formation des structures d'ordre supérieur de la chromatine (Robinson & Rhodes, 2006). Cette histone se lie au nucléosome au niveau du point d'entrée et de sortie de l'ADN et protège l'ADN de liaison entre les nucléosomes. H1 stabilise ainsi l'interaction de l'ADN avec le nucléosome et limite l'action des complexes de remodelage ATP-dépendants (Hill, 2001). Puisque la présence de H1 augmente la compaction de la chromatine, il a été postulé que cela diminue l'accessibilité à des facteurs de transcription. A l'origine, H1 a donc été associé à une répression de l'expression des gènes. Cependant, il a depuis été montré par FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) que la dynamique d'association et de dissociation de H1 avec la chromatine est extrêmement rapide (Misteli et al., 2000). De plus, l'existence de plusieurs variants et MPTs dont certaines offrant la possibilité de recrutement de facteurs de transcription suggère que H1 serait plus un régulateur très fin de la transcription qu'un répresseur général (Harshman et al., 2013; Kamieniarz et al., 2012).

Chez l'homme, il existe 10 variants de l'histone de liaison H1. H1.0 à H1.5 et H1.X sont exprimés dans de nombreuses cellules somatiques. H1t, H1T2 et H1oo sont quant-à-eux spécifiques des cellules germinales (Izzo et al., 2013). L'expression de H1.1 à H1.5 et H1t est dépendante de la réplication de l'ADN tandis que celle des autres est indépendante de la réplication de l'ADN.

Les fonctions des variants de H1 restent difficiles à mettre en évidence. En effet, le simple ou double knockout de variants de H1 chez la souris ne résulte pas en des phénotypes très marqués mais en une compensation par la surexpression d'autres variants. Cela laisse penser qu'une certaine redondance des rôles des variants existerait (Fan et al., 2001). Cette redondance semble toutefois limitée puisque les variants de H1 possèdent des profils spatiaux-temporels d'expression différents, notamment au cours de la différenciation cellulaire et du développement embryonnaire (Izzo et al., 2008).

D'ailleurs, le knockout simultané de trois variants de H1 résulte en une réduction de 50% de la quantité totale de H1 et s'avère létal à l'état embryonnaire (Fan et al., 2005). On peut tout de même souligner le fait que le variant H1.2 semble être bien corrélé à l'expression des gènes. Il est notamment moins abondant que les autres au niveau des TSS (Transcription Start Site) actifs et sa présence au niveau des promoteurs augmente avec la répression de l'expression des gènes (Millán-Ariño et al., 2014).



*Figure 23 : Organisation génomique, transcription et séquences protéiques des histones.
Image réalisée par Kévin Contrepois*

.

Chapitre 3 : L'information épigénétique associée à la sénescence cellulaire

La chromatine possède une structure dynamique grâce au remplacement permanent des histones, à leurs modifications multiples et à l'intégration de variants. Cette variabilité permet une régulation fine de diverses fonctions : transcription, réplication, réparation des dommages. En prolifération, une grande partie de cette modulation structurale a lieu lors de la réplication de l'ADN. Or, les cellules sénescents ont beau ne plus proliférer, elles restent métaboliquement actives. Comment les fonctions de la chromatine peuvent donc être maintenues lors de la sénescence ? Le dernier chapitre de cet état de l'art apporte des pistes de réflexion sur les mécanismes permettant la modification de la structure de la chromatine en sénescence par l'insertion de variants ou des changements de modifications post-traductionnelles dans le contexte de la sénescence cellulaire. Je m'attarderai plus particulièrement sur le variant H2A.J et les données préliminaires à ce projet de doctorat.

I. Epigénome de la sénescence

A. Modifications épigénétiques en sénescence

1. Marques épigénétiques associées aux SAHFs

La marque la plus évidente d'une réorganisation structurale globale de la chromatine lors de la sénescence est la formation de SAHFs. L'utilisation de la microscopie confocale a permis de résoudre la structure en couches concentriques de ces SAHFs. Ils présentent en leur cœur un enrichissement de la marque répressive H3K9me3 entouré d'un enrichissement de la marque H3K27me3. Les SAHFs sont également enrichis en la protéine HP1 (Heterochromatin Protein 1), des protéines d'architecture de la chromatine de la famille HMGA et le variant d'histone macroH2A. En revanche, les marques d'euchromatine comme H3K9ac et H3K4me3 en sont exclues (Chandra et al., 2012; Narita et al., 2006; R. Zhang et al., 2005).

On peut également observer un enrichissement de la marque H4K20me3 dans les cellules sénescents et âgées, spécifiquement au cœur des SAHFs, avec H3K9me3. Cette dernière marque permet notamment le recrutement de la protéine méthyltransférase SUV420H2 responsable de la modification de H4K20 (Nelson et al., 2016).

2. Modification des domaines chromatinien et territoires chromosomiques en sénescence

La perte de lamine B1 est une autre caractéristique notable des cellules en sénescence. Une conséquence directe de cette perte de lamine B1 est le détachement des domaines chromatinien habituellement liés à la lamine nucléaire : les LADs (Lamina-Associated Domains). En conditions normales, la liaison de la chromatine à la lamine de l'enveloppe nucléaire favorise sa condensation sous forme d'hétérochromatine et joue un rôle

protecteur envers des séquences répétées du génome. La perte de cette interaction entraîne donc une déstabilisation et une redistribution de cette hétérochromatine vers l'intérieur du noyau (Camps et al., 2015; van Steensel & Belmont, 2017). On peut se demander si l'apparition des SAHFs ne pourrait pas être une conséquence de cette redistribution de l'hétérochromatine.

Une analyse par ChIP-seq (Chromatin ImmunoPrecipitation - DNA sequencing) de la distribution de H3K4me3 et H3K27me3 a été réalisée dans des cellules en sénescence répliquative, sénescence induite par activation d'un oncogène et des cellules de patients atteints de progéria (donc une population hétérogène de cellules âgées caractérisées par une perte de lamine B1 pas forcément toutes sénescents). Cette étude a montré des changements à grande échelle avec l'apparition de domaines enrichis en ces deux marques et d'autres déplétés en H3K27me3. La perte de H3K27me3 dans ce second type de domaine est fortement corrélée avec l'augmentation de l'expression des gènes associés à la sénescence : gènes anti-prolifératifs, du SASP, etc. (Shah et al., 2013).

On peut observer en sénescence une réorganisation plus générale des structures d'ordres supérieurs de la chromatine. Dans chaque territoire chromosomique sont identifiables des compartiments séparés qui peuvent être actifs ou réprimés. Ces compartiments sont eux-mêmes divisés en TADs (Topologically Associated Domains) (Cremer et al., 2000; Cremer & Cremer, 2001). Chaque structure individuelle est séparée des autres grâce à la présence de protéines comme la cohésine, CTCF (CCCTC-binding Factor) et la condensine II (Merkenschlager & Nora, 2016; Rosin et al., 2018). Il a été montré que la structure des TADs et des compartiments reste globalement inchangée en sénescence par rapport à des conditions de prolifération ou quiescence. Cependant, les interactions longue distance sont diminuées tandis que les interactions courte distance sont accrues en sénescence répliquative. De plus, certains TADs opèrent des changements de compartiment dans le sens actif vers réprimé ou l'inverse. Ces changements sont d'ailleurs en accord avec les modifications d'expression génique (Criscione et al., 2016).

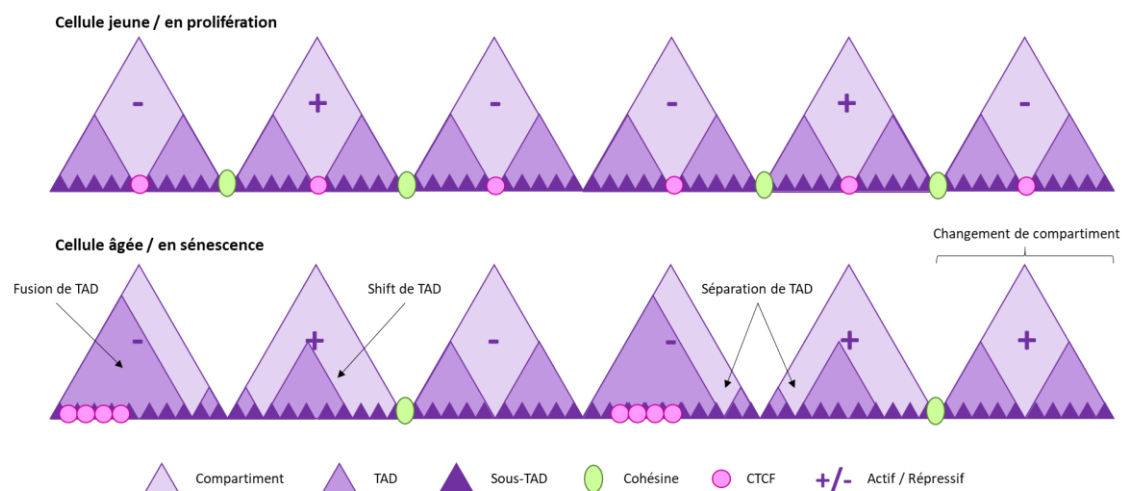


Figure 24 : Changements d'organisation spatiale globaux associés à la sénescence.
Adapté de (N. Yang & Sen, 2018).

3. Modifications épigénétiques et expression des gènes en sénescence

Un enrichissement important de la marque d'activation H4K16ac au niveau des promoteurs des gènes actifs peut être observé dans les cellules en sénescence répliquative (Nativio et al., 2018; Rai et al., 2014).

Par ailleurs, une diminution de la protéine méthyltransférase EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) est associée à une diminution de la marque H3K27me3 et une induction rapide de la sénescence dans des cellules primaires humaines (Ito et al., 2018). Au contraire, l'inhibition de la protéine méthyltransférase MLL1 en sénescence ne diminue que modestement le niveau de la marque H3K4me3 mais drastiquement celui de γ H2AX au niveau des gènes du SASP ce qui inhibe leur expression (Capell et al., 2016).

Quant à H3K27ac, une cartographie de sa localisation dans des cellules en prolifération, quiescentes et en sénescence induite par l'activation d'un oncogène a révélé un remodelage dynamique très important au niveau des enhancers en sénescence. Cette marque est en effet perdue au niveau des enhancers proches des gènes impliqués dans la prolifération tandis que de nouveaux super enhancers apparaissent à proximité des gènes du SASP. Certains de ces super enhancers sont des sites de liaison de BRD4. L'inhibition de BRD4 ou simplement de son bromodomaine permet de réguler l'expression des gènes du SASP sans avoir d'impact sur le maintien de la sénescence (Tasdemir et al., 2016). Une étude indépendante plus récente a également montré que l'histone acétyltransférase p300 induit la formation de ces super enhancers en sénescence. De plus, sa déplétion avant induction de sénescence entraîne un retard à l'entrée en sénescence répliquative d'environ 6-7 passages et sa déplétion après entrée en sénescence diminue l'expression des gènes associés à la sénescence situés à proximité des super enhancers (Sen et al., 2019).

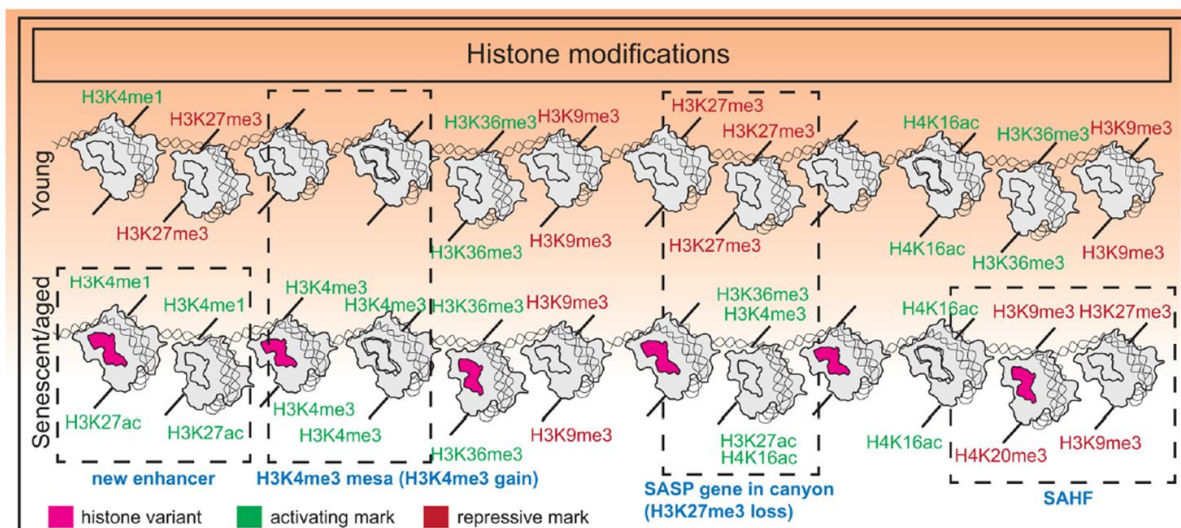


Figure 25 : Changements de modifications d'histones en sénescence.

(N. Yang & Sen, 2018)

B. Variants d'histones et sénescence

L'implication des variants d'histone dans le vieillissement, la sénescence cellulaire et le cancer ayant fait l'objet d'une revue rédigée pendant ce doctorat et insérée dans la partie résultat, ce sujet ne sera pas davantage développé ici.

II. Le variant H2A.J

A. Variant H2A.J et sénescence

Le laboratoire ayant accueilli ce projet de doctorat s'intéresse à l'identification et la caractérisation de nouveaux régulateurs et biomarqueurs de la sénescence cellulaire. Les travaux de thèse de Kévin Contrepois ont permis le développement d'une méthode de profilage rapides des isoformes d'histones par UHPLC-MS (Ultra High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry) (Contrepois et al., 2010). L'utilisation de cette méthode lui a permis de réaliser une étude détaillée des modifications post-traductionnelles et variants impliqués dans la compaction de la chromatine et le maintien à long terme de l'organisation chromatinienne pendant la sénescence cellulaire. Plusieurs modèles d'induction de la sénescence ont été étudiés (sénescence répllicative, induite par activation d'un oncogène et induite par des dommages à l'ADN) à un temps précoce et un temps plus tardif : 5 jours et 21 jours.

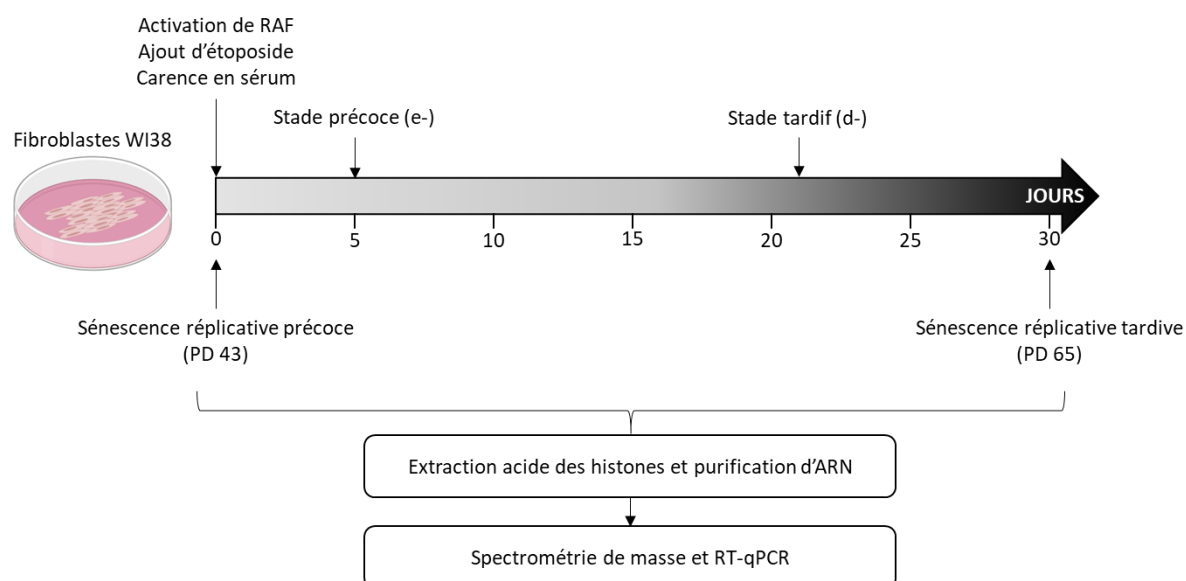


Figure 26 : Schéma du protocole expérimental de K. Contrepois.

Parmi les résultats obtenus, K. Contrepois a mis en évidence l'accumulation spécifique d'un variant de H2A dans des conditions de sénescence caractérisée par des dommages persistants à l'ADN. Ce variant nommé H2A.J qui ne représente que 1% de la quantité totale de H2A en prolifération s'accumule jusqu'à atteindre 7 à 11% de la quantité totale de H2A dans des conditions de sénescence avec dommages à l'ADN (Contrepois et al., 2017).

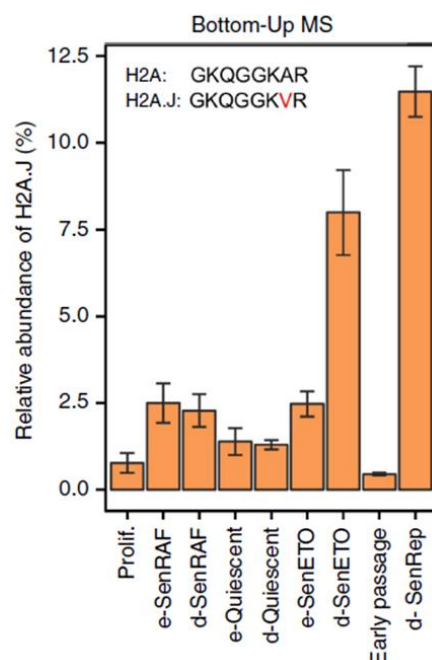


Figure 27 : Accumulation du variant d'histone H2A.J en sénescence induite avec des dommages à l'ADN dans des fibroblastes humains.

Abondance relative de H2A.J par rapport à l'ensemble des H2A canoniques déterminée par la quantification du peptide Gly5-Arg12.

Les travaux de thèse de Clément Coudereau ont ensuite permis de montrer que le variant H2A.J n'a pas d'effet visible sur l'entrée ou le maintien de la sénescence en réponse à des dommages à l'ADN mais est nécessaire à l'expression des gènes du SASP.

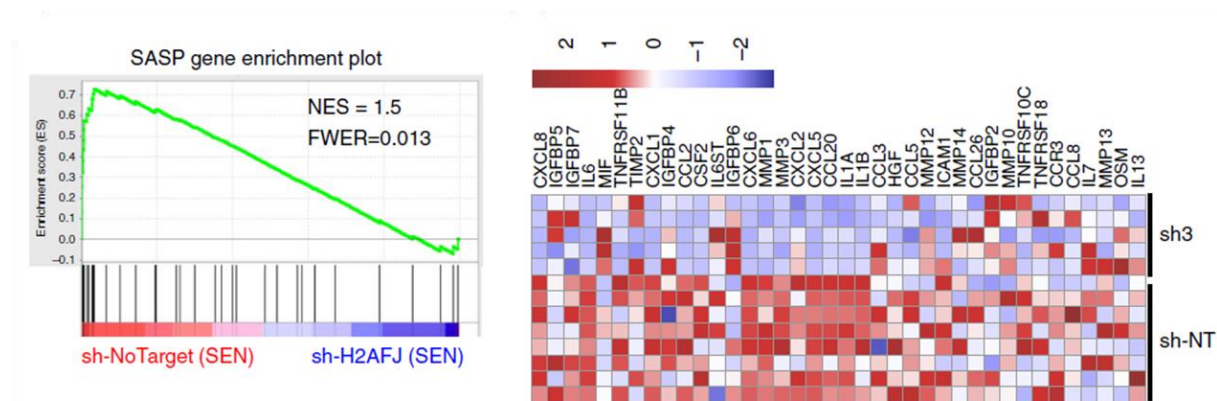


Figure 28 : Importance de l'accumulation de H2A.J pour une expression normale du SASP en sénescence.

A gauche, un graphique d'analyse GSEA montrant le rang de 38 gènes du SASP parmi l'ensemble des gènes différentiellement exprimés avec le knock-down de H2A.J dans des fibroblastes WI38 immortalisés hTERT sénescents. A droite, la heat map correspondante pour les 38 gènes du SASP (chaque ligne représente un réplicat biologique).

Cet effet spécifique au niveau des gènes du SASP ne peut néanmoins pas être expliqué par une localisation spécifique de H2A.J au niveau de ces gènes sur la chromatine. Une analyse ChIP-seq a au contraire montré que le variant H2A.J se retrouve sur l'ensemble du génome (Contrepolis et al., 2017).

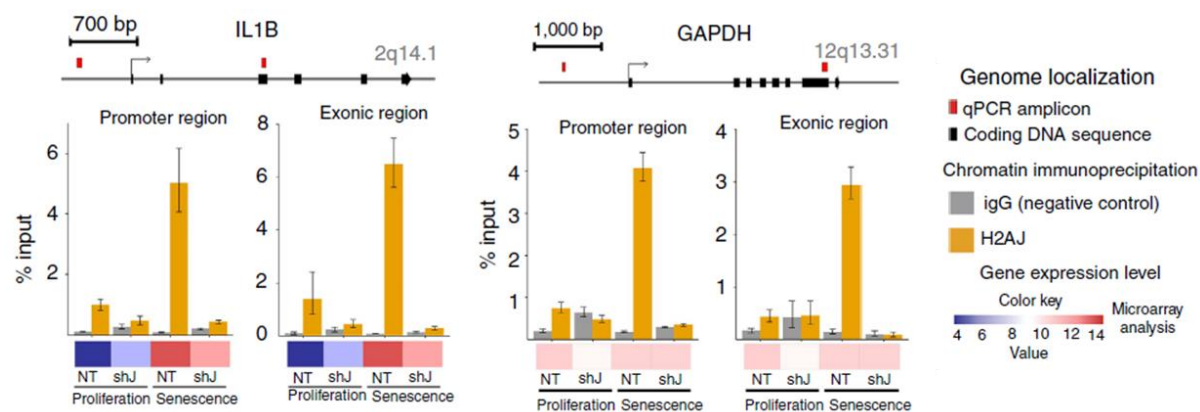


Figure 29 : ChIP H2A.J ciblé sur le gène du SASP IL1B et le gène de ménage GAPDH.

En collaboration avec le laboratoire de Claudia Rübe (Université de Saarland, Germany), il a également été montré par immunofluorescence que le pourcentage de cellules épidermales positives pour H2A.J augmente avec l'âge à la fois chez la souris et chez l'homme mais aussi chez de jeunes souris irradiées pour induire des dommages à l'ADN. Le variant H2A.J pourrait donc constituer un nouveau marqueur de sénescence à la fois *in vitro* et *in vivo* (Contrepois et al., 2017).

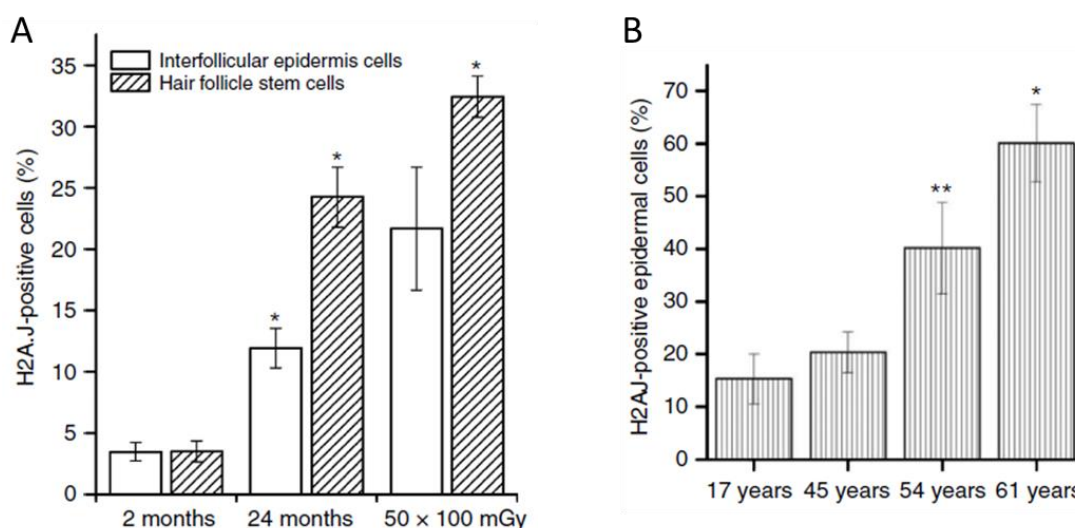


Figure 30 : Accumulation de H2A.J avec l'âge dans l'épiderme murin (A) et humain (B).

Marquage H2A.J par immunofluorescence dans des sections de peau chez la souris et l'homme aux âges indiqués ainsi que chez de jeunes souris (âgées de 2 mois) traitées avec des irradiations à faible dose répétées.

En poussant l'analyse plus loin, il a été montré que cette accumulation de H2A.J avec l'âge est variable d'un organe à l'autre chez la souris. Une forte et rapide augmentation de niveau de H2A.J a notamment pu être observée dans le foie et les reins. Cela pourrait indiquer l'existence de fonctions spécifiques de H2A.J dans certains organes (Contrepois et al., 2017).

Indépendamment du laboratoire, il a été observé que des lymphocytes T présentant les caractéristiques typiques de la sénescence (soit un arrêt prolifératif, un marquage positif

avec la β -galactosidase, une expression accrue de p16 et p21, la présence de SAHFs et l'expression de facteurs du SASP) surexprimaient également le variant H2A.J (Fukushima et al., 2018). Une autre étude a également montré une augmentation de l'expression de H2AFJ avec l'âge dans la rétine chez l'homme (Parapuram et al., 2010).

B. Spécificités du variant H2A.J

Le variant d'histone H2A.J a été découvert pour la première fois chez la souris en 2005 (Nishida et al., 2005). Le gène H2AFJ codant pour H2A.J n'est pas localisé au niveau des clusters classiques de H2A (sur les chromosomes 1 et 6) mais sur le chromosome 12 à la bande cytogénétique p12.3 (Rosen et al., 2003). Le gène H2AFJ s'exprime indépendamment de la réplication.

Seul un ARN messager polyadénylé existe pour H2AFJ. Cela pourrait être dû à l'insertion de 214 nucléotides dans son motif tige-boucle qui inactiverait sa fonction. Cette particularité de séquence pourrait également expliquer son expression constitutive. La quantité totale de l'ARNm augmente légèrement en absence de prolifération mais à un niveau équivalent en sénescence et en quiescence. Or, l'accumulation de la protéine H2A.J est spécifique de la sénescence induite avec des dommages à l'ADN. L'accumulation de la protéine H2A.J en sénescence résulterait donc d'un phénomène post-transcriptionnel (Contrepois et al., 2017).

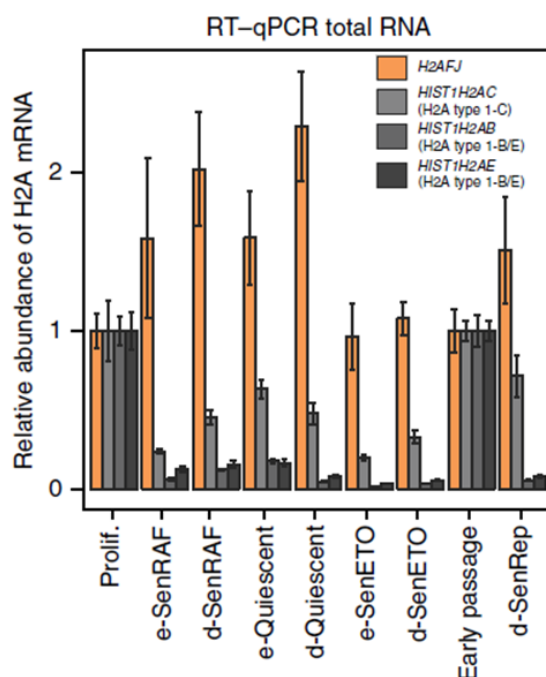


Figure 31 : Quantification de l'ARN messager de H2A.J et de diverses H2A en prolifération, sénescence et quiescence.

Prolif. : prolifération ; *Quiescent* : quiescence 5 jours ; *SenRAF* : sénescence induite par l'activation de RAF 5 jours ; *SenETO* : sénescence induite par traitement étoposide 5 jours ; *SenRep* : sénescence répliquative.

La séquence protéique de H2A.J possède des spécificités intéressantes. Au niveau de son extrémité N-terminale, H2A.J possède une valine à la place d'une alanine en position 11. Cette caractéristique est unique parmi les variants de H2A et est équivalente à la présence de deux groupements méthyle supplémentaires sur l'histone. La séquence de H2A.J diffère également au niveau de ces 7 derniers acides aminés C-terminaux. En particulier, H2A.J possède un motif SQ (sérine-thréonine) potentiellement phosphorylable en position 123. Cette caractéristique n'est partagée que par H2AX dont le rôle clé dans la réponse aux dommages à l'ADN a été décrit précédemment. Bien que H2A.J soit présent de manière globale sur la chromatine, on peut supposer que sa forme phosphorylée ne se trouve qu'au niveau des gènes que ce variant régule donc au niveau des gènes du SASP dans un contexte de sénescence induite par des dommages à l'ADN.

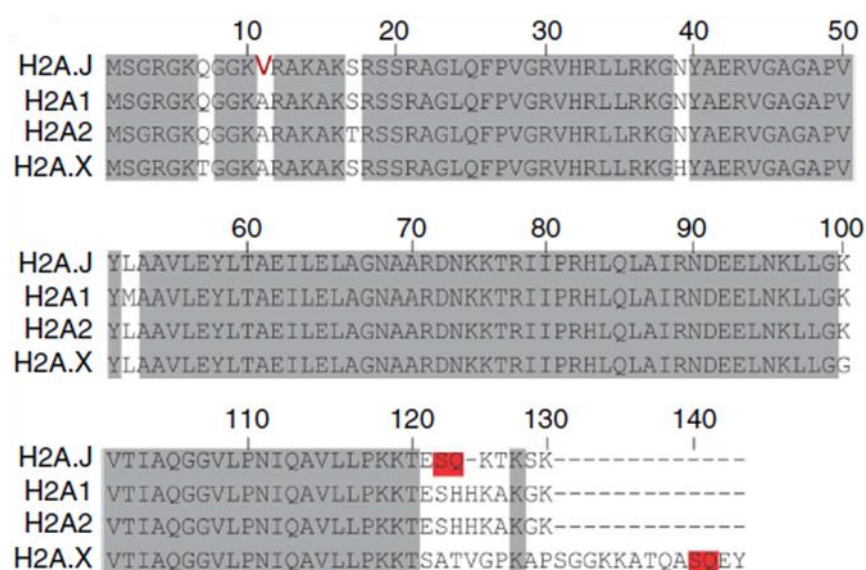


Figure 32 : Alignement de séquence protéique de H2A.J avec H2A1, H2A2 et H2A.X.

C. Le variant H2A.J dans d'autres contextes

Pendant longtemps, le variant H2A.j est resté très peu décrit dans la littérature mais il connaît dernièrement une popularité grandissante. L'organisation structurale du nucléosome contenant H2A.J parmi ses histones de cœur a ainsi été décrit récemment (Tanaka et al., 2020). Autrement, ce variant apparaît principalement dans des études en cancérologie.

Une dynamique d'expression de H2AFJ a été décrite dans un contexte de progression de tumeur mélanocytaire. Ce gène est préférentiellement exprimé dans les lésions bénignes initiales puis diminue au cours de la progression tumorale (de Wit et al., 2005). Notre équipe a également étudié la dynamique d'expression de H2A.J dans un modèle de carcinogenèse dans l'épiderme de souris. Il a ainsi été montré une accumulation de kératinocytes positifs pour H2A.J et p16 à des temps précoces. Plus tardivement sont parfois apparus des papillomes. Les cellules autour de ces papillomes présentaient alors un marquage élevé pour H2A.J et p16 tandis que les cellules formant les papillomes en

étaient dépourvues (Contrepolis et al., 2017). Par ailleurs, le traitement de lignées de mélanome avec des composés anti-inflammatoires non-stéroïdiens entraîne une forte diminution de l'expression de H2AFJ (Yoshitake et al., 2017). Ainsi, H2A.J pourrait jouer un rôle dans la progression tumorale et pourrait être un biomarqueur pour le diagnostic précoce de mélanomes et la réponse aux thérapies.

H2A.J a également été décrit dans d'autres types de cancers. En effet, une augmentation du nombre de copies du gène H2AFJ est fréquente dans les cancers du sein et est associée à une augmentation du niveau de H2A.J (Cornen et al., 2014; Yao et al., 2006). De plus, H2AFJ est surexprimé dans les cancers du sein résistants aux thérapies (Katayama et al., 2019). De même, il a été identifié comme gène surexprimé et potentiellement impliqué dans la résistance au sorafenib dans des carcinomes hépatiques (J. Liu et al., 2019). Dans le cancer colorectal, une forte expression de H2AFJ est négativement corrélée avec les survies sans événement et sans rechute. Elle est aussi positivement corrélée avec la résistance à la chimio et radiothérapie (X. Wang et al., 2019). Enfin, dans le contexte de glioblastomes multiformes, une surexpression de H2AFJ est détectée et associée avec une faible réponse à la chimiothérapie. Dans des lignées cellulaires, le knockdown de H2AFJ permet alors de diminuer cette résistance tandis que sa surexpression l'augmente (H.-H. Lee et al., 2020).

Ainsi, H2A.J semble être un potentiel biomarqueur de résistance aux thérapies et de pronostic défavorable dans certains contextes tumoraux. Les premiers indices sur le mécanisme d'action impliqué suggèrent que H2A.J favoriserait le développement d'un phénotype inflammatoire néfaste (H.-H. Lee et al., 2020; X. Wang et al., 2019).

Projet de doctorat

Description générale

La sénescence est une réponse aux stress des cellules caractérisée par un arrêt prolifératif stable. Les cellules qui entrent en sénescence connaissent un certain nombre de changements que ce soit morphologiques ou métaboliques avec notamment une augmentation de l'activité β -galactosidase ainsi que de l'activité autophagique, une réorganisation structurale globale de la chromatine accompagnée de modifications d'expression génique, etc. En particulier, les cellules sénescence acquièrent un phénotype sécrétoire inflammatoire appelé SASP.

Il a été montré chez l'homme et chez la souris, une accumulation des cellules sénescences avec l'âge. Bien que leur proportion reste relativement faible en ne dépassant pas 20% des cellules dans les tissus âgés, ce nombre est suffisant pour avoir des conséquences physiologiques importantes. En effet, les cellules sénescences ne proliférant pas, l'intégrité des tissus peut être davantage compromise en cas de lésion. Pire encore, les facteurs inflammatoires du SASP peuvent endommager ou amplifier des dommages dans les tissus environnants. Par conséquent, il a été montré que la sénescence contribue non seulement au vieillissement mais aussi au développement de nombreuses maladies liées à l'âge.

Dans le but de diminuer les effets délétères de l'accumulation de cellules sénescences, deux approches sont envisageables. La réponse la plus étudiée depuis quelques années est l'élimination spécifique de ces cellules par ce que l'on appelle des sénolytiques. Une autre possibilité serait de moduler l'expression du SASP. Cependant, les mécanismes d'activation de ce phénotype sécrétoire demeurent à ce jour trop peu connus pour que cette piste thérapeutique soit développée.

Des prérequis importants à de telles applications apparaissent donc. D'une part, la connaissance des voies de signalisations spécifiques de la sénescence et du SASP est bien entendu impérative pour tenter de les perturber. D'autre part, l'évaluation de l'effet de composés requière des moyens d'identification des cellules sénescences *in vitro* et *in vivo*. Des biomarqueurs existent évidemment mais seule leur utilisation combinée permet l'identification de cellules sénescences sans équivoque.

Les cellules sénescences présentent une réorganisation profonde de la chromatine avec la formation de SAHFs, des modifications de domaines chromatinien et de territoires chromosomiques, une relocalisation de modifications post-traductionnelles d'histones ainsi que l'incorporation de variants d'histones. Ces changements considérables contribuent non seulement à l'établissement et au maintien de la sénescence mais aussi à

ses spécificités transcriptomiques. L'état de la chromatine des cellules sénescences apparaît donc comme un pilier fondamental de cette réponse.

Le laboratoire ayant accueilli ce projet de doctorat est spécialisé dans l'identification de biomarqueurs et de mécanismes de régulation épigénétiques de la sénescence cellulaire. Il y a notamment été développé une méthode de profilage des histones par UHPLC-MS (Ultra High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry) (Contrefois et al., 2010). L'utilisation de cette méthode a permis de réaliser une étude détaillée des modifications post-traductionnelles et variants impliqués dans la compaction de la chromatine et le maintien à long terme de l'organisation chromatinienne pendant la sénescence cellulaire. Ainsi, il a été observé une diminution globale de l'acétylation de H4K16 dans plusieurs types de sénescence, contribuant à la formation des SAHFs (Contrefois et al., 2012). Il a également été mis en évidence l'accumulation spécifique d'un variant de H2A dans des conditions de sénescence caractérisée par des dommages persistants à l'ADN. Ce variant nommé H2A.J qui ne représente que 1% de la quantité totale de H2A en prolifération s'accumule jusqu'à atteindre 7 à 11% de la quantité totale de H2A dans des conditions de sénescence avec dommages à l'ADN (Contrefois et al., 2017). Il a ensuite été montré au sein du laboratoire que le variant H2A.J n'a pas d'effet visible sur l'entrée ou le maintien de la sénescence en réponse à des dommages à l'ADN mais est nécessaire à l'expression des gènes du SASP. Pour autant, le variant H2A.J se retrouve sur l'ensemble du génome et pas seulement au niveau des gènes qu'il semble réguler spécifiquement (Contrefois et al., 2017).

Ce projet de thèse s'inscrit dans la continuité de l'étude du variant H2A.J. Diverses thématiques y ont donc été explorées :

- la compréhension du mécanisme par lequel l'accumulation de ce variant contrôle la dérégulation des gènes du SASP en sénescence
- l'identification de potentielles fonctions physiologiques et organe/tissu/cellule-spécifiques de ce variant.

Sujet 1 : Les variants d'histones dans le vieillissement, la sénescence cellulaire et le cancer

I. Introduction

Les histones canoniques sont incorporées dans la chromatine au cours de la réplication. En revanche, les variants d'histones peuvent être exprimés tout au long du cycle cellulaire (Albig & Doenecke, 1997; R. S. Wu et al., 1982). Ainsi, à la différence des histones canoniques qui sont plutôt associées à l'ADN nouvellement synthétisé et majoritairement impliquées dans la régulation de la transcription, les variants d'histones remplacent les histones déjà intégrées à la chromatine sous certaines conditions pour remplir des fonctions spécifiques telles que la réparation des dommages à l'ADN, l'établissement des centromères ainsi que l'activation et la répression de la transcription (Talbert & Henikoff, 2010). Leurs fonctions particulières s'expliquent par les altérations de structure et de dynamique qu'elles entraînent au niveau des nucléosomes et a fortiori à des niveaux d'ordre supérieur de la chromatine.

En sénescence, caractérisée par un arrêt de la prolifération, il paraît concevable d'observer une diminution progressive de la quantité d'histones canoniques intracellulaire. Certaines questions se posent alors. L'expression de variants peut-elle alors être suffisante pour pallier ce déficit et permettre le maintien des fonctions de la chromatine ? Les variations d'histones incorporées peuvent-elle expliquer l'apparition des phénotypes chromatinien caractéristiques de la sénescence ?

Le sujet des variants d'histones dans le contexte de la sénescence n'a volontairement pas été développé dans l'introduction de cette thèse puisqu'il a fait l'objet d'une revue répondant à l'invitation du journal **International Review of Cell and Molecular Biology** (IRCMB). Cette revue fait également état des connaissances sur l'implication des variants d'histones dans le vieillissement et le cancer. Les liens entre ces trois contextes sont d'ailleurs précisés dans la revue afin de clarifier certaines notions et les enjeux qu'ils représentent.

II. Stratégies de recherche des données et d'écriture

La recherche des données utiles à l'écriture de cette revue a été réalisée sur Pubmed en utilisant comme mots clefs le nom des variants avec toutes des variations possibles (par exemple : macroH2A, macro-H2A, macroH2A.1, macroH2A1, etc.), leur identifiant UniProt ainsi que le nom des gènes codants pour ces variants. Les publications ainsi répertoriées ont été classées selon le sujet abordé pour chacun des variants. Des thèmes pertinents et permettant le regroupement d'informations sur plusieurs variants ont été déterminés pour l'élaboration d'un plan d'écriture de la revue. Ainsi, celle-ci ne décrit pas les variants les uns après les autres mais reflète leur complémentarité et la puissance

combinatoire de leur incorporation au sein de la chromatine ensemble ou séparément dans l'espace et le temps.

Histone Variants in Aging and Cancer

Adèle Mangelinck¹ and Carl Mann^{1,*}

¹ Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France.

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 33-169089294; Fax: 33-16908046; Email: carl.mann@cea.fr

Eukaryotic DNA is packaged with a vast panel of proteins into a complex macromolecular structure called chromatin. The basic unit of this compaction is the nucleosome in which 147 base pairs of DNA are wrapped around a histone octamer containing a central heterotetramer (H3-H4)₂ flanked by two heterodimers H2A-H2B (Luger et al., 1997; Davey et al., 2002). The linker histone H1 binds to the nucleosome at the DNA entry-exit point thus stabilizing its structure and protects the DNA linking adjacent nucleosomes. Compelling evidence has demonstrated that histones play a fundamental role in the regulation of virtually all chromatin processes. Histone post-translational modifications including methylation, acetylation, phosphorylation and ubiquitylation among others have been extensively described as dynamic modulators of chromatin processes (Bannister & Kouzarides, 2011). An additional layer of complexity is overlaid by the presence of histone variants differing from their canonical counterparts by only a few amino acids or large domains. These variants are subject to growing interest as an increasing number of studies have demonstrated that they too are essential regulators of chromatin dynamic and further processes. Herein, we review the recent discoveries suggesting that the incorporation of histone variants are key determinants in complex biological phenomena such as aging and cancer.

Keywords: histone, variant, aging, senescence, cancer

General considerations about histone variants

Histones are amongst the best conserved proteins throughout evolution. They are encoded by several loci which allows the existence of alternative sequences for each type of histone (Marzluff et al., 2002). In mammals for example, 26 genes encode for 19 different H2A. 11 of these are considered canonical as they share more than 97% homologies in their protein sequence and no particular function has been attributed to them. The other 8 are the variants H2A.X, H2A.Z (or H2A.Z.1), H2A.V (or H2A.Z.2), H2A.J, macroH2A1 and macroH2A2, H2A.Bbd type 1 and type 2/3. Thus, we can distinguish canonical histones from their variants on the basis of two classification systems. First, based on their structures, we can differentiate homeomorphic variants whose sequences only differ by a few amino acids, from heteromorphic variants whose sequence variations are to such an extent that they impact their electrophoretic mobilities (Franklin & Zweidler, 1977; West & Bonner, 1980). The second classification system is based on the functional characteristics of variants: replication-dependent or -independent expression (Albig & Doenecke, 1997; Wu et al., 1982), tissue-specific expression (Doenecke et al., 1997), fulfillment of a particular function (Chen et al., 2013; Skene & Henikoff, 2013), etc. According to this classification system, only 3 variants specific to germ cells have clearly been identified to date among the 19 H2B proteins existing in humans. On the contrary, the H3 histones, comprising H3.1, H3.2, H3.3, CENP-A and 2

testis-specific mates, share more than 96% sequence homologies but are all considered as variants. As for H4, this histone has no variant even if it is encoded by 14 different genes. Core histones are not the only ones to have variants. The linker histone H1 has 10 variants, H1.0 to H1.5 and H1.X being expressed in numerous somatic cells and H1t, H1T2 and H1oo being germinal cells-specific.

Canonical histones encoding genes cluster on a few regions of the genome and do not contain introns whereas variants encoding genes are on isolated loci and may contain introns allowing for alternative splicings (as for macroH2A) (Marzluff et al., 2002; Rasmussen et al., 1999). Moreover, unlike variants, canonical histones mRNA are not polyadenylated but have a hairpin structure necessary for their stability and their translation during the S phase (Dominski & Marzluff, 1999; Pandey et al., 1990).

Hence, canonical histones are mainly expressed in the S phase and incorporated into the chromatin during replication. This is not necessarily the case for variants that can be expressed all over the cell cycle (Albig & Doenecke, 1997; Wu et al., 1982). As a consequence, canonical histones are usually associated with newly synthesized DNA and implicated in transcriptional regulation whereas variants commonly replace histones already integrated into the chromatin under certain conditions to fulfill specific functions such as DNA damage repair, centromere formation and transcription activation or repression (Talbert & Henikoff, 2010). These specific roles are rendered possible by the structural and dynamical alterations of the nucleosomes that they create. Histone variants incorporation in the chromatin then adds complexity in the regulation of chromatin organisation.

Aging: the cause of all evils?

As time passes, errors and damages accumulate in organisms whereas clearance and quality control become less effective. The engendered deteriorations can have easily observable consequences in humans such as hair greying and loss of skin elasticity but also more profound changes in a wide variety of interconnected homeostatic mechanisms. This makes of aging one of the most intricate and complex biological phenomena. Among the age-related mechanisms, cellular senescence is a widely described process.

Cellular senescence was firstly described in 1961 by Hayflick and Moorhead as they showed that human fibroblasts cultured in vitro could not divide indefinitely and stopped proliferating after about 50 doublings (Hayflick & Moorhead, 1961). Since then, the definition of senescence has been extended to become a stress response characterized by a stable proliferative arrest. Stresses can be due to replicative exhaustion but also irradiation or drug-induced DNA damages, oncogene activation or tumor suppressor loss, oxidative stress, etc. Then, subsequent characteristics of senescent cells are the expression of cell-cycle inhibitors p16 and p21, an increase of autophagic activity, an increased resistance to apoptosis, the expression of a pro-inflammatory secretory phenotype called SASP (senescence-associated secretory phenotype) and a global reorganization of chromatin that can be illustrated by the formation of SAHFs (senescence-associated heterochromatin foci) (reviewed in Hernandez-Segura et al., 2018).

It has been reported that senescent cells accumulate with age in mice and primates tissues. It has been shown in mice that the percentage of senescent cells increases from 1.4% to 13.8% in subcutaneous stromal cells and to a lesser extent from 5.9% to 6.9% in lung epithelial

cells, 0.2% to 3.5% in spleen cells, 0.3% to 3.3% in small intestinal cells and 0.16% to 1.48% in lymph node cells between the ages of 2 months and 2 years (Biran et al., 2017). Although these numbers could seem low as they usually stick below 20%, it is important to remember that senescent cells are non proliferating cells so tissue integrity may be endangered in case of injuries. Even worse, senescent cells release inflammatory factors capable of creating and amplifying damages in surrounding tissue via a paracrine action. As a consequence, senescence not only has been shown to contribute to aging but also to the development of many age-related diseases. To counteract the deleterious effects of senescent cells accumulation, one logical response would be the elimination of those aged and/or damaged cells. As a matter of fact, the search for senescent cells-targeting drugs called senolytics has ridden high over the last years (reviewed in Muñoz-Espín & Serrano, 2014; McHugh & Gil, 2017).

Indeed, the immune system never is infallible and its efficiency declines with organismal aging. Such compounds could then compensate for this loss. The bulk of all immune parameters changes with age is termed immunosenescence and it leads to the establishment of a subclinical low-grade chronic inflammation called inflamm-aging (Franceschi et al., 2000). However, it is important to note that the immune system in the elderly is a result of a continually evolving process where some functions are reduced but others remain unchanged or even increased (Sansonetti et al., 2008). More precisely, aging is associated with a thymus involution that could explain several immunosenescence characteristics as it may induce compensatory proliferation of T cells, which can then lead to premature T cell senescence and changes in T cell subpopulations contributing to immune system abnormalities (Goronzy & Weyand, 2003). A shift in cytokine profile in T cell response to inflammation has also been described in the elderly people (Stacy et al., 2002). Additionally, aging is associated with an accumulation of self-reactive memory B cells that may be reactivated in the elderly (Stacy et al., 2002). Such changes of both T and B cell function result in decreased immunity to exogenous antigens and increased autoreactivity. Together, immunosenescence and inflamm-aging have been linked to several age-related diseases, including coronary heart disease and stroke, Alzheimer disease and several autoimmune disorders such as diabetes mellitus, lupus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis (Grolleau-Julius & Ray, 2010).

Cancer cells and aged cells are fundamentally opposite, as cancer cells can be thought of as hyperactive cells with advantageous mutations, rapid cell division and increased energy consumption, while aged cells are hypoactive with accumulated disadvantageous mutations, cell division inability and a decreased ability for energy production and consumption. However, aging and cancer remain tightly interconnected as they share mechanisms including telomere attrition, genomic instability, epigenetic changes, loss of proteostasis, decreased nutrient sensing and altered metabolism, and also cellular senescence (Aunan et al., 2017). Senescence is dually involved in cancer. Indeed, under the activation of an oncogene, cells can undergo a senescence process which limits their malignant transformation (Deng et al., 2004; Guerra et al., 2003; Sarkisian et al., 2007; Tuveson et al., 2004; Woods et al., 1997). However, the establishment of a pro-inflammatory environment via the SASP expression favours the tumorigenesis and the tumoral progression (Coppé et al., 2006; Krtolica et al., 2001; Liu & Hornsby, 2007; Parrinello et al., 2005). Hence, even if the end-results may either be shared or divergent, mechanisms of aging are still clearly involved in carcinogenesis and aging remains the most potent risk factor for cancer development, whatever its type is (Siegel et al., 2015).

There is growing evidence of epigenetic mechanisms involvement in aging and age-related diseases. Epigenetics governs the expression and repression of genes which is determinant for many crucial mechanisms such as embryonic development, cell differentiation and stress response. As a matter of fact, it is constantly evolving. Epigenetic mechanisms include DNA methylation by DNA methyltransferases (DNMTs), histone post-translational modifications such as methylation, acetylation, phosphorylation and ubiquitylation, incorporation of histone variants in the chromatin, structural modifications of chromatin and changes in microRNAs as well as other noncoding regulatory RNAs expression (Grolleau-Julius & Ray, 2010).

When considering the epigenetic information hidden behind biological phenomena, studies mainly focus on DNA methylation or histone post-translational modifications. However, the incorporation of histone variants is also a powerful tool for the regulation of the chromatin dynamics and further processes.

Histone variants in aging

Many mechanistic studies of aging performed at both molecular and cellular levels focus on the understanding of cellular (or replicative) senescence. In this section, we propose to focus on the true subject of gerontology and discuss the one of cellular senescence afterwards.

Accumulation of histone variants, a hallmark of aging?

An increase of both macroH2A1.1 and macroH2A1.2 isoforms levels in the liver with age has been observed in mouse and human. In particular, the proportion of nuclei that stain positive respectively for macroH2A1.1 and macroH2A1.2 has been shown to rise from 36.5% to 45.2% and 36.4% to 56.2% between 33-48 year-old and 72-81 year-old healthy human hepatic tissue. Interestingly, these increases are even more drastic in contexts of age-related tissue dysfunction such as viral cirrhosis (about 80% positive nuclei for each isoform) or hepatocellular carcinoma (more than 95%) (Borghesan et al., 2016).

Similarly, the H2A.J histone variant has been found to accumulate with age in mouse as well as in human epidermal cells. In this study, less than 5% of cells stain positive in young mice (2 months), but this number reaches about 12% and 25% of respectively hair follicle stem cells and interfollicular epidermal cells in old mice (24 months). Likewise, the percentage of H2A.J positive epidermal cells in human increases from 15% to 60% between 17-year-old and 61-year-old tissues (Contrepois et al., 2017). Similarly, an increased expression of H2AFJ has been observed in human retina with age (Parapuram et al., 2010). Further analysis of H2A.J accumulation with age has shown organ-specific differences in mouse. Indeed, H2A.J levels remain low in the brain even after a year whereas they reach about 11% and 16% of canonical H2A respectively in the liver and kidney of 3-months-old mice (Contrepois et al., 2017). Nevertheless, the physiological relevance of H2A.J accumulation with age (including some tissue-dependent variability) remains unknown to date.

Age-dependent increasing levels of H3.3 are observable in non-senescent but slow or non-dividing cells contexts like terminally differentiated cells or stem cells. Notably, H3.3 progressively accumulates in the mouse brain, liver and kidney with age resulting in near complete replacement of H3.1 and H3.2 by the age of 18 months. The accumulation rate is slower but still occurs in other organs leading for example to 76% of H3.1/H3.2 being replaced by H3.3 in the heart of 24-months mice (Tvardovskiy et al., 2017). This accumulation of H3.3

cannot simply come down to a passive replacement for chromatin state maintenance as, for instance, proteins have been found to be specialized in distinguishing H3.3 from H3.1 or H3.2, and vice versa. Several of these specialized proteins are involved in post-translational modifications of histones. Interestingly, the relative abundances of a number of H3 PTMs, including both individual and combinatorial modifications, undergo profound changes in mouse somatic tissues with age, concomitantly with the progressive replacement of H3.1/H3.2 by H3.3. Remarkably, a subset of age-regulated PTMs, including K36me2, exhibit stable enrichment on H3.3, suggesting that the increase in their levels during mouse lifespan might be directly associated with accumulation of H3.3 (Tvardovskiy et al., 2017). Although the physiological relevance of H3 variant replacement with age remains largely undefined, it has been shown that H3.3 plays an essential role in regulating pro-longevity transcriptional programs in *C. elegans* (Piazzesi et al., 2016).

Histone variants impact healthy aging and leanness

Nutritional strategies based on caloric restriction and fasting have proven to be very efficient to counteract the occurrence of aging-related pathologies and to promote healthy aging. In particular, short-term fasting cycles and the administration of fasting mimicking diets have been shown to diminish cardiovascular and metabolic risk factors in humans, improve cancer outcome by empowering chemotherapy, slow down tissue aging in animal models, promote cell regeneration and boost the immune system (Brandhorst et al., 2015; Di Biase & Longo, 2016; Cheng et al., 2014). As a result, high-fat diets are commonly used strategies to accelerate tissue aging and promote the appearance of aging-related physiological dysfunctions.

Interestingly, the expression level of macroH2A is altered during obesity-related pathologies. More specifically, it increases in the liver of mice fed a lipogenic diet displaying NAFLD (non-alcoholic fatty liver disease) or its inflammatory form NASH (non-alcoholic steatohepatitis) (Pogribny et al., 2009). Functional studies have shown that macroH2A1.1 and macroH2A1.2 isoforms might have different roles in obesity-related changes. Indeed, macroH2A1.1-overexpressing hepatocytes display ameliorated glucose metabolism, reduced expression of lipogenic genes and fatty acids content that would suggest a protective role in liver cells (Pazienza et al., 2014; Podrini et al., 2015). As for macroH2A1.2, it is nearly absent in the visceral adipose tissue of obese humans and its overexpression markedly inhibits adipogenesis in vitro. Surprisingly, macroH2A1.1 might on the contrary have a pro-adipogenic role as its protein levels positively associate with body mass index and its overexpression enhances adipogenesis in vitro (Pazienza et al., 2016).

Another histone variant has been found to be implicated in adipogenesis. Indeed, the incorporation of H2A.Z at the promoter regions of PPARgamma (peroxisome proliferator-activated receptor) target genes by p400/Brd8 seems to be essential to allow adipocyte maturation (Couture et al., 2012).

Histone variants in senescence

Canonical histones expression being dependent on replication, it is conceivable that the proliferative arrest encountered by senescent cells would lead to a depletion of those proteins. Then, several questions arise in this particular context. Is the expression of histone variants sufficient to overcome the loss of canonical ones and maintain chromatin functions? Is the

incorporation of these variants involved in the appearance of senescence characteristic phenotypes?

Loss of histones, a hallmark of senescence?

Different studies have shown that a global loss of histones occurs in the chromatin of cells undergoing senescence.

The tendency differs for histone variants with some of them being depleted as for canonical histone but others being enriched. Indeed, it has been observed that both H2A.V and H2A.Z levels are decreased in human melanocytes induced to senesce via serial passages (replicative senescence) or BRAFV600E (oncogene-induced senescence) (Vardabasso et al., 2015). Similarly, CENP-A histone variant level undergoes a striking decrease in fibroblasts undergoing replicative and Ras-induced senescence. In the meantime, other centromere protein levels increase gradually (Maehara et al., 2010). These data indicate that the centromere protein composition goes through significant changes in senescence. However, high levels of H3.3 can be observed in replicative senescence (Rai et al., 2014) and a global enrichment of both macroH2A1.1 and macroH2A1.2 isoforms has been observed as fibroblasts enter senescence after oncogene activation (Chen et al., 2015, Sporn et al., 2009). A mass spectrometry-based analysis of the histone profile in senescence has also shown an accumulation of the H2A.J histone variant specifically in the chromatin of fibroblasts induced into senescence with persistent DNA damages, meaning long-term replicative and therapy-induced senescence. This variant that only represents 1% of H2A total amount in proliferation increases by 7-to-11-folds in senescence with persistent DNA damages. Additionally, H2A.J has been found to accumulate in an in vivo model of RAS-induced senescence in mouse keratinocytes (Contrepois et al., 2017). Similarly, an accumulation of H2A.J has been observed in T and T helper cells displaying common features of senescence (Fukushima et al., 2018; Nguyen et al., 2019).

Core histone variants are not the only ones to be affected in senescence. Linker histone H1 levels have indeed been found to drastically decrease in senescent fibroblasts (Funayama et al., 2006). However, the phenotypic implications of this depletion remain unknown to date.

Changes of histone composition have been implicated in the senescence entry itself and its maintenance but also in the appearance of a key phenotype: the expression of SASP.

Histone variants regulate the senescence entry and maintenance

It has been shown that CENP-A knockdown is sufficient to induce a premature senescence that requires p53, but not p16INK4A-pRb (Maehara et al., 2010). The mechanism of action of the other depleted histone variant, H2A.Z, has been more extensively described. H2A.Z has been shown to bind to the promoter of p21 at the p53 binding site and the p400 remodelling complex is thought to be responsible for this localisation. Upon DNA damage, H2A.Z is depleted from the cell cycle inhibitor p21 promoter, inducing its transcriptional activation (Gévry et al., 2007). This removal of H2A.Z could be due to a simple loss of p400 in senescence or positively directed by the chromatin remodeling protein INO80 (Gévry et al., 2007; Ding et al., 2018). Interestingly, the depletion of p400 increases p21 expression and induces premature senescence in a p53-dependent pathway (Chan et al., 2005). Similarly, the depletion of H2A.Z only induces the expression of p21 and premature senescence in p53 competent cells (Gévry et al., 2007). This suggests that an interplay between H2A.Z and p53

regulates p21 expression at the chromatin level. Remarkably, the use of histone deacetylase inhibitors (HDACi) induces at p21 promoter a reduction of H2A.Z level, an increase of acetylated H2A.Z and the recruitment of RNA polymerase II responsible for p21 expression (Bellucci et al., 2013). H2A.Z acetylation could be performed via Tip60 acetyltransferase but contradictory data weaken this hypothesis (Gévry et al., 2007; Bellucci et al., 2013). Be that as it may, one activator of p21 expression and cell cycle arrest in senescence may then not be H2A.Z itself but its acetylated form.

Several roles have been attributed to H3.3 enrichment in the entry and maintenance of senescence. First, ChIP-seq analysis has shown that H3.3 is preferentially incorporated at promoters of active genes in replicative senescence (Rai et al., 2014). In oncogene-induced and replicative senescence, a cleaved form of this variant named H3.3cs1, which lacks 21 amino acids of the N-terminal tail has been reported. Then this cleaved variant cannot hold post-translational modifications like H3K14ac, H3K18ac, H3K4me3, etc. Ectopic expression of H3.3, and to a greater extent H3.3cs1, is sufficient to induce senescence via a rapid transcriptional downregulation of cell cycle genes (Duarte et al., 2014).

Secondly, H3.3 and macroH2A have been implicated in the appearance and maintenance of SAHFs. Interestingly, the promyelocytic leukemia protein (PML) plays an important role in regulating H3.3 incorporation into the chromatin. PML multimerizes to form PML nuclear bodies which may also contain H3.3 and its histone chaperones HIRA, DAXX, ATRX and DEK (Delbarre et al., 2013; Ishov et al., 1999; Xue et al., 2003; Ivanauskiene et al., 2014). Of note, whereas H3.1 and H3.2 copurify with the histone chaperone CAF-1, which is responsible for their replication-coupled incorporation into the chromatin (Tagami et al., 2004), there are different replication-independent pathways for H3.3 incorporation. HIRA deposits H3.3 at actively transcribed regions in euchromatin (Ahmad & Henikoff, 2002; Schwartz & Ahmad, 2005; Jin et al., 2009). Surprisingly, H3.3 is also deposited in heterochromatin and regulatory loci, including the pericentromeric and telomeric regions by the DAXX-ATRX complex and DEK (Drané et al., 2010; Lewis et al., 2010; Sawatsubashi et al., 2010). Not all PML nuclear bodies are identical in protein composition which may account for their very variable functions. Indeed, PML bodies may as well be involved in chromatin remodelling processes favoring transcription (Kumar et al., 2007) or harbor proteins important for the formation of heterochromatin such as HP1 and SUV39H1 (Seeler et al., 1998; Carbone et al., 2006). Importantly, H3.3 chaperone HIRA is recruited to PML nuclear bodies in senescence and disruption of this translocation impairs the formation of SAHFs (Ye et al., 2007). Hence, fine regulation of H3.3 incorporation into the chromatin might be essential for the establishment and maintenance of the senescence-specific chromatin structure, including SAHFs. These heterochromatin foci notably contain high levels of macroH2A. macroH2A enrichment in SAHF occurs after their formation which indicates that this histone variant is dispensable for the formation of SAHFs but it seems to play a role in their maintenance (Zhang et al., 2005). The formation of such heterochromatin foci is thought to be involved in the repression of E2F target genes (pro-proliferative genes) (Narita et al., 2003). It has been then hypothesized that SAHFs could favor senescence entry and maintenance. However, there are proofs indicating that preventing their formation neither affects senescence entry nor its stability (Contrepois et al., 2012). Be that as it may, fibroblasts cultured in medium conditioned by cells in oncogene-induced senescence (OIS) see their chromatin being enriched in macroH2A1 and acquire a senescent phenotype. Then, this histone variant may be implicated in the paracrine induction of senescence (Chen et al., 2015).

Histone variants drive SASP expression

Even if the macroH2A histone variant is usually associated with a repressif role and enriched in heterochromatin, it has been shown that the macroH2A1.1 isoform is enriched in euchromatin where it can either activate or repress transcription in regions characterized by histones hyperacetylation (Chen et al., 2014). More precisely, macroH2A1.1 can specifically recognize H2BK20ac via its C-terminal macrodomain (Ruiz & Gamble, 2018). The specialized role of macroH2A1.1 in transcription regulation is determined by its ability to interact with poly(ADP-riboses) (PAR) generated by PARP1 (Kustatcher et al., 2005) which induces an acetylation of H2BK12 and H2BK120 (Chen et al., 2014, Yu et al., 2017). SASP genes are localised in the genomic regions containing macroH2A1.1 and histones hyperacetylation. This suggests a local direct regulation of SASP gene expression by macroH2A1.1 (Chen et al., 2014, 2015). Its depletion in fibroblasts does not impact their entry in senescence under oncogene activation but drastically reduces SASP expression, the induction of an endoplasmic reticulum (ER) stress, the generation of reactive oxygen species (ROS) and oxidative DNA damages but also the activation of the DNA damage response (DDR). The overexpression of macroH2A1.1 in proliferative fibroblasts has exactly the opposite effect that can be counteracted by PARP1 inhibition. An additional ER stress in OIS leads to a reduction of ROS and DDR activation. Hence, macroH2A1.1 may play a direct activating role in SASP expression but also an indirect repressive role on the same genes via the induction of an ER stress, the generation of ROS and the subsequent oxidative DNA damages and activation of the DDR (Chen et al., 2015).

Similarly, the depletion of H2A.J by sh-RNAs has been found to strongly delay the derepression of SASP genes. However, targeted ChIP and ChIP-seq analyses have revealed that this specific role of H2A.J cannot be explained by a differential localisation at SASP genes loci and its mechanism of action remains unknown to date (Contrepois et al., 2017).

Hypothesized roles of linker histone H1 in senescence

H1.2 and H1.4 most abundant H1 variants simultaneous depletion by sh-RNA has been shown to increase the accessibility of the chromatin at repeated regions of the genome including transposable elements and endogenous retroviruses. The generated noncoding RNAs may then trigger an interferon response (Izquierdo-Boulstridge et al., 2017). Interestingly, it has been shown that the activation of the interferon pathway is sufficient to induce a senescence entry and the expression of SASP (Glück et al., 2017; Moiseeva et al., 2006; Takahashi et al., 2018). A direct link between H1.2 depletion and senescence entry or SASP expression has not yet been proved but this track would merit to be explored.

Histone variants in cancer

Histone variants, senescence and cancer

As previously said, senescence is dually involved in cancer. Indeed, under the activation of an oncogene or in response to DNA damages, cells can undergo a senescence process which stops their proliferation and limits their malignant transformation. However, the establishment of a pro-inflammatory environment via the SASP expression favours the tumorigenesis and the tumoral progression. Hence, it may not be a surprise to find an increased proportion of senescent cells nearby tumours. And indeed, an increase of senescent cells can be observed in premalignant lesions and in tissues adjacent to tumors but they are strongly reduced in the tumors themselves (Chen et al., 2005; Collado et al., 2005; Contrepois et al., 2017). As a

consequence, the characteristic changes in histone variants content and distribution in senescence can be observed in this pathological context.

For instance, higher macroH2A1.1 expression has been observed in premalignant mouse lung adenoma lesions in comparison to the corresponding malignant adenocarcinomas (Sporn et al., 2009). Moreover, the use of the DMBA/TPA model for skin carcinogenesis (an initial DMBA treatment for mutagenesis followed by a continued TPA treatment for tumor promotion) shows an accumulation of H2A.J and p16 positive senescent keratinocytes. Further TPA treatment also leads to the outgrowth of occasional papillomas. H2A.J and p16 staining is then elevated in the skin adjacent to papillomas, but reduced in the cells forming the papillomas (Contrepois et al., 2017). Similarly, a differential expression pattern has been found to occur for H2AFJ during melanocytic tumour progression. The gene shows a preferential expression in benign melanocytic tumour stages that is lost during tumour progression (de Wit et al., 2005). Moreover, melanoma cell lines treated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs encounter a significant downregulation of H2AFJ expression (Yoshitake et al., 2017).

Histone variants determine therapy response and cancer outcome

Interestingly, histone variants positively or negatively implicated in senescence entry and maintenance see their expression levels conversely modified in cancer contexts and their roles in therapy response and cancer outcome perfectly match the hypothesis we could do from the data obtained in senescence studies.

Indeed, we previously said that CENP-A knockdown is sufficient to induce senescence. Conversely, high levels and localisation to non-centromeric regions of CENP-A are observed in a vast panel of cancers such as hepatocellular carcinoma (Li et al., 2011; Long et al., 2018), glioblastoma (Stangeland et al., 2015), breast cancer (McGovern et al., 2012), lung adenocarcinoma (Liu et al., 2018), prostate cancer (Song et al., 2019) and colorectal cancer (Tomonaga et al., 2003) among others. Importantly, elevated CENP-A expression correlates with malignant progression, higher-grade tumor and increased invasiveness, resistance to therapies and poor patient outcome in several cancer types (Sun et al., 2016; Zhang et al., 2016).

Similarly, H2A.Z, whose depletion can induces a premature senescence, is overexpressed in many types of cancers (Wang et al., 2006; Kim et al., 2013; Baptista et al., 2013; Hua et al., 2008; Yang et al., 2016; Vardabasso et al., 2015). In particular, H2A.Z overexpression is an indicator of poor prognosis in melanoma, hepatocellular carcinoma and breast cancer (Hua et al., 2008; Yang et al., 2016; Vardabasso et al., 2015). However, most of the studies do not clearly distinguish between H2A.Z.1 and H2A.V (also known as H2A.Z.2). Hence, specific functions remain unsettled but H2AFZ-KO mouse model studies suggest that the two genes are non-redundant (Faast et al., 2001). Interestingly, H2A.Z.1 favours metastasis by increasing epithelial–mesenchymal transition (EMT) and tumour growth via proliferation promotion in hepatocellular carcinoma (Yang et al., 2016). As for H2A.V, its coding gene H2AFV has been identified in genomic signatures of high grade breast cancer (Cava et al., 2014; Sotiriou et al., 2006). It has also been shown that both H2A.Z.1 and H2A.V are highly expressed in melanoma and that high expression levels correlate with metastatic melanoma and shorter survival of patients. In addition, H2A.V deficiency could sensitize melanoma cells to chemotherapy and targeted therapies (Vardabasso et al., 2015).

On the contrary, H3.3 and macroH2A variants expressions seem to be positively correlated with senescence entry and maintenance. The special case of H3.3 in cancer will be discussed in a separated part. As for macroH2A, its expression is greatly downregulated in various types of cancer (Sporn et al., 2009, 2012; Kapoor et al., 2010; Novikov et al., 2011; Hu et al., 2016; Vieira-Silva et al., 2019) and a tumor suppressive role is generally attributed to this variant. Hence, macroH2A expression loss correlates with progression of melanoma, bladder cancer and neoplasms (Kapoor et al., 2010; Kim et al., 2013; Hu et al., 2016). Depletion of macroH2A also results in increased aggressiveness of teratomas, melanoma, breast cancer and bladder cancer (Kapoor et al., 2010; Creppe et al., 2012; Dardenne et al., 2012; Park et al., 2016), while its overexpression reduces proliferation in several cancer cell lines (Kapoor et al., 2010; Novikov et al., 2011; Dardenne et al., 2012). Interestingly, loss of macroH2A1 enhances cells' stem-like properties, positively linked with aggressiveness, in bladder cancer and hepatocellular carcinoma (Park et al., 2016; Lo Re et al., 2018). However, macroH2A1 isoforms may have very different effects. Indeed, macroH2A1.1 prevents EMT (Hodge et al., 2018) and its expression level negatively correlates with proliferation and poor prognosis in lung and colon cancer (Sporn et al., 2009, 2012; Novikov et al., 2011; Li et al., 2016). On the contrary, macroH2A1.2 expression positively correlates with proliferation in cancer cell lines in general (Chen et al., 2014). Moreover, a high macroH2A1.2 to macroH2A1.1 ratio increases migration, invasion and growth of breast cancer cell lines (Dardenne et al., 2012; Li et al., 2012). Nevertheless, these functions may be context-dependent as a tumor suppressive role has also been described for macroH2A1.2 in melanoma and bladder cancer (Kapoor et al., 2010; Park et al., 2016). On the contrary, macroH2A1.1 expression has been found to positively correlate with poor survival and EMT in triple negative breast cancer (Lavigne et al., 2014).

H2A.J histone variant is not associated with senescence entry or maintenance. However, a H2AFJ copy number gain is very frequent in breast cancer and is associated with an increase of H2A.J expression (Cornen et al., 2014; Yao et al., 2006). In addition, H2AFJ is overexpressed in therapy resistant breast cancers (Katayama et al., 2019). Similarly, H2AFJ has been identified as a significantly overexpressed gene and a potential player in sorafenib resistance in hepatocellular carcinomas (Liu et al., 2019). In colorectal cancer, high H2AFJ expression is negatively correlated with event-free and relapse-free survivals and positively correlated with chemoradiotherapy resistance (Wang et al., 2019). Finally, in glioblastoma multiforme, H2AFJ upregulation is detected and associated with poor chemotherapy response. Whereas H2AFJ knockdown diminishes this resistance, H2AFJ overexpression promotes it in several glioblastoma multiforme cell lines (Lee et al., 2020). First hints suggest that H2AFJ is involved in poor cancer outcome and therapy resistance through an inflammation promotion (Wang et al., 2019; Lee et al., 2020).

As for linker histone H1, its expression in prostate cancer is positively correlated with an increase of proliferation (Sato et al., 2012). Its depletion in breast and prostate cancer cells can induce a proliferative arrest and the induction of senescence (Sancho et al., 2008; Sato et al., 2012). It also enhances cancer cells resistance to DNA damage inducing therapies (Konishi et al., 2003).

Mutated histone variants are key drivers of pediatric cancers

Given their importance in transcription (and so signaling pathways) regulation, genes coding for chromatin-associated or chromatin regulatory proteins are frequently mutated in cancers.

In particular, mutation of histones themselves can occur. The first histone mutants were identified in genes encoding H3.3 (H3F3A and H3F3B) in pediatric high-grade glioma (Schwartzentruber et al., 2012; Wu et al., 2012). Subsequent studies have extended the panel of cancers carrying H3.3, and to a lesser extent H3.1, mutations to chondroblastoma, giant cell tumors of bone, pediatric soft tissue sarcoma and leukemia among others (Behjati et al., 2013; Lu et al., 2016; Lehnertz et al., 2017). Pediatric cancers are usually marked by their small number of mutations. Hence, H3's reveal all their potential as biomarkers and therapeutic targets in these cancers. The most studied mutations are the lysine to methionine mutants K27M and K36M as they hit target sites of methylation. Interestingly, these mutations affect not only the methylation potential on the mutated histone residue but also global methylation of non-mutated ones thus engendering major chromatin perturbations (Lewis et al., 2013; Bender et al., 2013; Chan et al., 2013). Other mutations include G34R, G34V, G34W and G34L (Behjati et al., 2013). Moreover, crosstalks between these mutations and the nearby modifications have also been observed. For instance, G34R/V mutations have been found to strongly impinge on the modification of H3K36 (Lewis et al., 2013). For more details, the consequences of these mutations have recently been reviewed in Lowe et al., 2019. Interestingly, the prevalence of H3.3 mutations may be tumor-type dependent. Indeed, whereas K27 and G34 of H3.3 are affected in 31% of pediatric brain tumors (Schwartzentruber et al., 2012), 95% of chondroblastomas exhibit K36M alterations, and 92% of giant cell tumors of bone have K27 mutation (Behjati et al., 2013).

H2A and H2B mutations have also been identified at high frequency in adult uterine and ovarian serous carcinomas. However, even if H2A and H2B mutations are significantly enriched in these tumors, no particular mutation seems to be recurrent. Still, functional studies have shown that these mutants might contribute to EMT and the evolution of carcinoma to sarcoma (Zhao et al., 2016).

Histone variants alter cancer transcriptomes

Perturbations in the histone variant network can lead to the transcriptional activation or repression of genes involved in cancer development.

For instance, macroH2A isoforms both contribute to stable gene repression in Polycomb-bound regions and signal-induced gene activation (Gamble et al., 2010). Loss of macroH2A in cancer has been shown to reactivate the pro-proliferative gene CDK8 in melanoma cells (Kapoor et al., 2010) and the stemness-promoting gene LIN28B in bladder cancer (Park et al., 2016). Moreover, macroH2A1 normally represses rDNA gene clusters that are overexpressed in highly proliferative cells (Cong et al., 2014). In a colorectal cancer cell line, however, macroH2A1 together with DNA methylation leads to the repression of the cell cycle inhibitor p16, resulting in higher proliferation (Barzily-Rokni et al., 2011).

The H2A.Z variant, generally overexpressed in cancers, facilitates the transcriptional activation of genes promoting cancer development and/or metastasis. Indeed, in hormone-dependent breast and prostate cancer, H2A.Z is upregulated and contributes to the hormone receptor-dependent gene activation that drives proliferation and tumorigenesis (Hua et al., 2008; Slupianek et al., 2010; Dryhurst et al., 2011; Tyagi et al., 2018). In particular, the acetylated form of H2A.Z accumulates at promoters of active genes and correlates with oncogene activation in cancer (Valdés-Mora et al., 2012). Its accumulation at neo-enhancers in prostate cancer is also notably a prerequisite for hormone receptor activation (Valdés-Mora

et al., 2017). Furthermore, the p400 ATPases, which can incorporate the H2A.Z variant into the chromatin, promotes oncogenic Wnt signalling and counteracts the tumour-suppressive function of the histone acetyltransferase TIP60 (Chevallard-Briet et al., 2014). As for H2A.V, this variant would promote cellular proliferation by recruiting BRD2 and E2F1 to E2F target genes and facilitating their transcription (Vardabasso et al., 2015).

Histone variants impact DNA damage repair and genomic stability

DNA damage and repair are double-edged swords in cancer. First, if not properly repaired, DNA damage can promote genomic and genetic instability, which are associated with premalignant stages and drive cancer progression (Negrini et al., 2010). Secondly, however, the induction of high levels of DNA damage is an effective treatment strategy to kill cancer cells (Helleday et al., 2008).

H2A.X is a histone variant containing a SQ motif in its C-terminal tail (Mannironi et al., 1989). This motif can be phosphorylated by ATM, ATR and DNA-PK, notably in case of DNA damages (Burma et al., 2001, Rokagou et al., 1998). The resulting gammaH2A.X forms large foci and renders chromatin structure more relaxed which increases the accessibility of breaks to repair proteins (Fink et al., 2007). gammaH2A.X also directly participates in their recruitment (d'Adda di Fagagna, 2008). As a consequence, H2AFX-KO mice show a genomic instability in their fibroblasts, B cells and T cells (Celeste et al., 2002) as the absence of the phosphorylated form of H2A.X impairs DNA recombinations (Peterson et al., 2001). When this deletion is coupled with a p53 one, mice are predisposed to develop lymphomas and other types of cancer (Bassing et al., 2003). Moreover, deletion of band 11q23 where H2AFX maps has been detected at a particularly high frequency in several human cancers, including breast cancer and hematological malignancies (Monni et al., 2001; Srivastava et al., 2008). In all cases, it is associated with chromosomal instability and higher-grade tumor / poor patient outcome. Hence, gammaH2A.X has a pivotal role in the DDR and is a key tumor suppressor factor preventing genomic instability.

DNA double-strand breaks can be repaired either by homologous recombination or non-homologous end joining (NHEJ) (Hiom, 2010). H2A.Z histone variant is implicated in both of them. It is rapidly incorporated in the chromatin at DNA damage sites and locally relaxes chromatin structure thus improving the accessibility to the DNA repair machinery (Xu et al., 2012). Then, H2A.Z can either be removed by ANP32E and initiate homologous recombination (Gursoy-Yuzugullu et al., 2015) or remain at DNA damage sites and favour NHEJ (Jiang et al., 2015), which is more likely to generate genomic translocations and gene fusions. Interestingly, to our knowledge only the H2A.Z.2 isoform has been shown to undergo such relocalisations after the induction of DNA double strand breaks (Nishibuchi et al., 2014). H3.3, together with PARP1 and CHD2, also contributes to the assembly of NHEJ complexes (Luijsterburg et al., 2016).

MacroH2A has been implicated in chromatin rearrangement during the DDR. However, this variant favours homologous recombination by increasing chromatin compaction. Both macroH2A1.1 and macroH2A1.2 isoforms are recruited to sites of DNA damage but their roles differ. MacroH2A1.1 is rapidly recruited upon DNA-damage associated PARP1 activation and initial chromatin relaxation (Timinszky et al., 2009; Xu et al., 2012, Kozlowski et al., 2018). There, it restrains chromatin opening through inhibition of PARP1 activity. MacroH2A1.2 shows a later accumulation and facilitates the recruitment of H3K9 methyltransferase PRDM2

to promote chromatin condensation at DNA damage sites and promote their repair by homologous recombination (Khurana et al., 2014). Interestingly, macroH2A is frequently downregulated in cancers whereas H2A.Z and H3.3 are mainly overexpressed. This could promote error-prone NHEJ over homologous recombination in cancers and worsen genomic instability. Furthermore, macroH2A1.2 accumulates at fragile genomic regions, meaning sites of recurrent replication stress, and promotes BRCA1 recruitment protecting them against replication-stress induced DNA damage and senescence (Kim et al., 2018).

It has been shown that H1.2 linker histone variant is an essential regulator of the DDR-involved protein ATM. H1.2 can protect the chromatin from an aberrant activation of ATM by interacting with its MRN complex-recruiting site (Li et al., 2018). Upon DNA damage, H1.2 undergoes rapid PARP1-dependent chromatin dissociation through poly-ADP-ribosylation of its C-terminus and further proteasomal degradation (Li et al., 2018). The engendered accelerated turnover may participate to a general H1.2 depletion in senescence. At least, it explains why H1.2 depletion in cancer cells enhances their resistance to DNA damage inducing therapies (Konishi et al., 2003).

CENP-A mislocalization to chromosome arms is a cornerstone of chromosome instability, a hallmark of many cancers and a major contributor to tumorigenesis. Indeed, CENP-A mislocalization has been reported to promote chromosome congression and segregation defects in turn leading to lagging chromosomes, micronuclei formation and a delay in mitotic exit (Shrestha et al., 2017). Concomitant depletion of CENP-A and p53 increases the frequency of errors in chromosome segregation during mitosis leading to genome instability (Maehara et al., 2010). In parallel, it has been shown that upon DNA damage, a global relocation of CENP-A occurs. This phenomenon has been shown to require p53 and to be required for proper DNA repair (Hédouin et al., 2017; Lawrence et al., 2015).

In the normal and error-free cell aging, DDR also occurs naturally. Indeed, successive replications lead to telomere shortening and loss of protection. At some point, the activation of the DDR at chromosome ends causes the arrest of cell proliferation by inducing senescence or apoptosis. To escape this tumor suppressor mechanism, cancer cells require the activation of a telomere maintenance mechanism. In most cancers, immortalization derives from the re-activation of telomerase but 10 to 15% of tumors are telomerase-negative and utilize the alternative telomere lengthening (ALT), based on homologous recombination (Cesare & Reddel, 2010; Shay & Bacchetti, 1997; Diley & Greenberg, 2015; De Vitis et al., 2018). Hence, ALT activation likely requires the inactivation of factors repressing the homologous recombination of telomeres. H3.3 chaperone ATRX not only inhibits homologous recombination but is also able to repress ALT activity when transiently expressed in ALT-positive/ATRX-negative cells (Napier et al., 2015). This may explain why the majority of ALT cancers display mutations in ATRX ou ATRX depletion at the protein level (Lovejoy et al., 2012).

Conclusion

H2A.X is the most described and exploited histone variant in the context of cancer. The immunodetection of gammaH2A.X is commonly used to quantify DNA damage in cells and tissues, and has a precious diagnostic and prognostic value in cancer. Indeed, high levels of gammaH2A.X are indicative of defective DNA repair and genomic instability characteristic of premalignant lesions and tumors, and are associated with higher malignancy and poor

prognosis in various cancers. Moreover, as many therapeutic strategies aim to induce DNA damage in cancer cells, gammaH2A.X also serves to measure the effects of treatment in patients (reviewed in Redon et al., 2012).

Other histone variants such as H2A.Z or CENP-A for instance also correlate remarkably well with cancer development and outcome in many contexts. Their use as biomarkers for diagnostic and prognostic evaluation could then easily be envisaged.

Still about histone variants and cancer, one promising therapeutic application concerns H3.3 mutants. Antigens derived from these cancer-specific somatic mutations are indeed ideal targets for immunotherapy as their expression is almost entirely limited to tumor cells and so therapy-induced toxicity is greatly limited. Of note, a clinical trial is currently carried out to assess the safety and the efficacy of an H3.3 K27M-peptide vaccine in pediatric gliomas (PNOC007 trial, NCT02960230).

Sujet 2 : Mécanisme d'action du variant H2A.J dans la régulation de l'expression du SASP en sénescence

I. Introduction

Les premières études réalisées au sein du laboratoire ont mis en évidence l'existence d'un variant de H2A, nommé H2A.J, s'accumulant dans les cellules induites en sénescence avec des dommages à l'ADN. La déplétion de H2A.J par interférence ARN a ensuite permis de montrer que ce variant n'a pas d'effet significatif sur l'entrée et le maintien de la sénescence, la morphologie des cellules sénescents et leur viabilité. En revanche, l'accumulation de H2A.J en sénescence s'est avérée nécessaire pour l'expression des gènes du SASP. Pour autant, le mécanisme d'action de H2A.J dans cette régulation spécifique restait, avant ce projet de doctorat, un mystère. Notamment, une analyse ChIP-seq avait montré que ce variant est incorporé sur l'ensemble du génome ce qui laissait présager de l'implication d'autres acteurs dans cette régulation spécifique.

L'étude du mécanisme par lequel l'accumulation du variant H2A.J contrôle la dérégulation des gènes du SASP en sénescence constitue le travail majeur de cette thèse. Après une brève description des stratégies adoptées lors de cette étude, les résultats seront présentés sous la forme d'une publication.

II. Stratégies d'analyses

A. Identification des partenaires protéiques de H2A.J

La première approche envisagée dans le but de comprendre le mécanisme par lequel le variant H2A.J, s'accumulant sur l'ensemble du génome en sénescence avec des dommages à l'ADN, contrôle spécifiquement la dérégulation des gènes du SASP a été l'identification de ses partenaires protéiques. Il existe de nombreuses méthodes d'investigation des interactions protéine-protéine. Elles ne fournissent pas toutes les mêmes informations et chacune possède des avantages et des inconvénients. Notamment, des critères importants à maîtriser lors de l'emploi de ces méthodes sont la sensibilité et la spécificité. En effet, une haute sensibilité permet de détecter un très grand nombre d'interactions et une haute spécificité permet de s'assurer de l'existence réelle des interactions détectées.

Au cours de ce projet de doctorat, plusieurs méthodes biochimiques d'investigation des interactions protéine-protéine ont été utilisées. Je vais donc dans cette partie présenter ces techniques afin d'expliquer les choix qui ont été fait.

1. Fixer ou ne pas fixer les interactions

La réticulation chimique est un prérequis régulièrement employé pour fixer les interactions protéiques en place avant d'essayer d'isoler et identifier les protéines qui interagissent. Le choix de fixer ou non ces interactions dépend alors du contexte. La fixation permet en effet de stabiliser les interactions fragiles ou particulièrement éphémères. Le risque principal est alors la possible formation d'agrégats due à la

formation de réseaux étendus. Si les interactions étudiées sont relativement stables, il sera donc préférable de ne pas faire de fixation afin de diminuer les interactions non-spécifiques. Au-delà de la réticulation classique par le formaldéhyde, il existe des alternatives mieux adaptées à certains cas ou plus originales comme des analogues d'acides aminés tels que la diazirine photo-activable.

2. La co-immunoprécipitation comme technique de base

La co-immunoprécipitation est la technique de base pour l'identification des interactions protéine-protéine. Elle repose sur l'utilisation d'un anticorps lié à des billes pour isoler la protéine à étudier. Les différents partenaires protéiques accrochés à cette protéine lors de l'analyse peuvent ensuite être identifiés par Western blot. Cette méthode ne peut néanmoins être utilisée que pour vérifier des éléments dont on suppose déjà la présence et ne permet donc pas le criblage. Il faut également noter que la co-immunoprécipitation révèle à la fois des interactions directes et indirectes. Un résultat positif indique donc que deux protéines interagissent directement ou par l'intermédiaire d'un ou plusieurs pontages moléculaires qui peuvent être des pontages de protéines, d'ADN, d'ARN ou d'autres molécules.

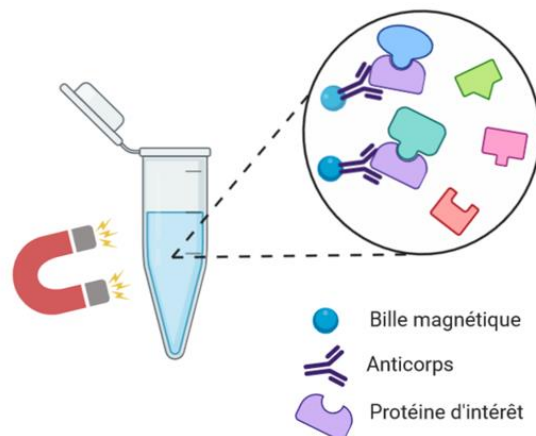


Figure 33 : Schéma descriptif du principe de la co-immunoprécipitation.

Une alternative fonctionnant en intracellulaire est la technique de double hybride. Pour cela, on utilise deux protéines test : l'une pouvant se fixer à une séquence activatrice et l'autre pouvant activer la transcription du gène rapporteur mis sous contrôle de cette séquence. On design ensuite deux protéines chimériques : l'une constituée de l'une des protéines test fusionnée avec la première protéine d'intérêt et l'autre formée de l'autre protéine test fusionnée à l'autre protéine d'intérêt. Si les deux protéines interagissent effectivement, la transcription du gène rapporteur pourra se faire. Etant données les manipulations faites sur les protéines, cette méthode échoue facilement et nécessite de nombreux contrôles. Elle peut néanmoins s'avérer précieuse dans le cas où un anticorps spécifique ne serait pas disponible pour une co-immunoprécipitation.

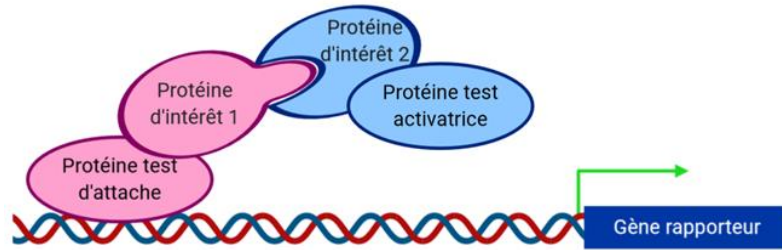


Figure 34 : Schéma descriptif du principe du double hybride.

3. La tandem affinity purification comme technique de criblage

La tandem affinity purification repose sur deux immunoprécipitations successives d'une protéine chimérique portant une étiquette composée de deux domaines d'affinité. La double immunoprécipitation du lysat des cellules exprimant cette protéine chimérique permet une excellente spécificité mais implique aussi l'impossibilité de détecter les interactions protéine-protéine transitoires. Cette méthode peut être couplée à de la spectrométrie de masse pour une identification à haut débit.

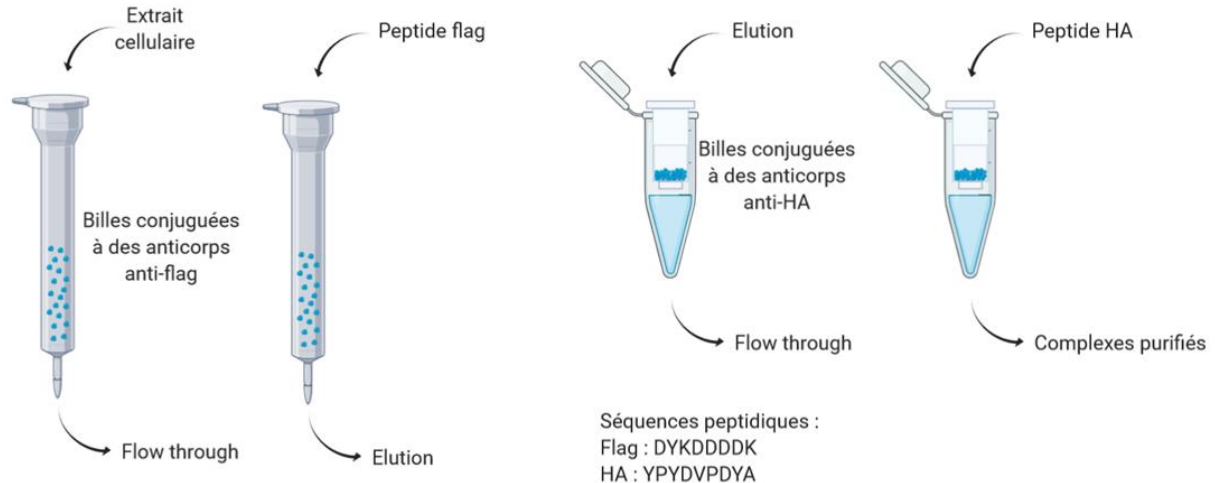


Figure 35 : Schéma descriptif du principe de la tandem affinity purification.

4. La chromatographie d'exclusion stérique pour séparer les complexes

La chromatographie d'exclusion stérique permet de séparer des complexes protéiques en fonction de leur volume hydrodynamique. Par cette méthode, on peut donc réaliser un premier tri des différents complexes et identifier par spectrométrie de masse les protéines impliquées. Une co-immunoprécipitation peut ensuite être réalisée sur chacune des fractions d'élution afin de confirmer l'interaction entre une protéine d'intérêt et ses partenaires potentiels. Cette combinaison de méthodes permet donc à la fois l'identification d'interactions protéine-protéine et celle des complexes protéiques auxquels elles appartiennent.

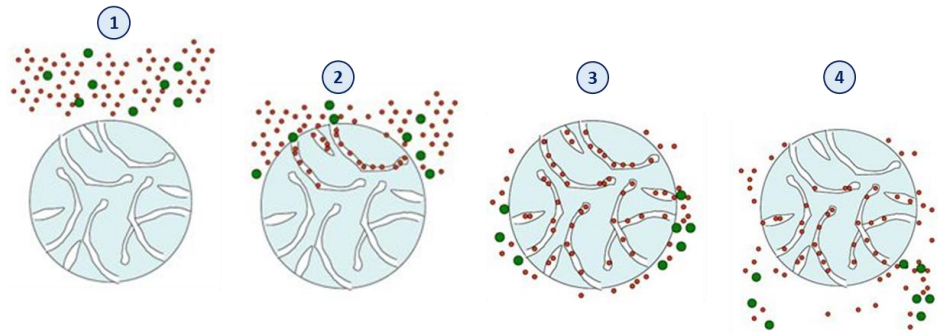


Figure 36 : Schéma descriptif de la séparation de complexes par chromatographie d'exclusion stérique.

Les complexes de grand volume (en vert) ne rentrent pas dans les billes poreuses et parcourent donc en chemin plus court à travers la colonne.

5. Un peu d'intracellulaire pour compléter ?

Le Proximity Ligation Assay, ou PLA, in situ est une méthode immunohistochimique utilisant des sondes pour la détection des protéines, leurs interactions et leurs modifications. Le principe repose sur l'utilisation de deux anticorps primaires (produits dans différentes espèces) spécifiques des deux protéines étudiées. Deux anticorps secondaires jouent ensuite le rôle de sonde. Ils contiennent chacun une petite séquence ADN capable d'interagir avec celle de l'autre lorsqu'elles se trouvent à proximité. L'assemblage des séquences forme un cercle d'ADN qui est largement amplifié par réplication. L'ajout de sondes fluorescentes d'ADN complémentaire à ces cercles permet ensuite l'obtention d'un signal fort et donc une détection aisée. Des alternatives classiques au PLA sont les méthodes de complémentation bimoléculaire et le Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). Les méthodes de complémentation bimoléculaires sont basées sur le design de deux protéines liées à des fragments complémentaires d'une sonde (fluorescente la plupart du temps) et leur expression dans des cellules. Si les deux protéines interagissent effectivement, les fragments vont pouvoir interagir et former la sonde. Dans le cas du FRET, la différence réside dans ce qui est lié aux deux protéines : un fluorophore excité et donc donneur d'énergie pour l'une et un fluorophore accepteur pour l'autre. Techniquement, la PLA peut être mise en œuvre plus rapidement et à moindre coût tout en assurant une excellente sensibilité. Elle semble donc être un choix raisonnable en première approche. Dans un second temps, le FRET permet d'obtenir des données quantitatives sur la force de l'interaction ou la distance entre les deux protéines.

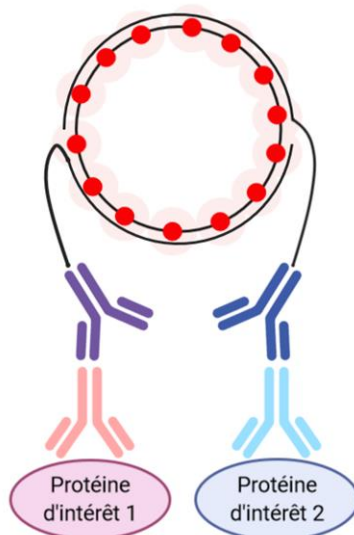


Figure 37 : Schéma descriptif du principe du Proximity Ligation Assay.

B. Immunoprécipitations de chromatine et analyses transcriptomiques

La seconde approche envisagée dans le but de comprendre les mécanismes d'action du variant H2A.J en sénescence a été l'identification des voies de signalisations activées dans différentes conditions. Le protocole d'induction de sénescence avec des dommages à l'ADN principalement utilisé dans l'étude initiale du laboratoire sur H2A.J consistait en un traitement étoposide à 20 μM sur deux semaines suivies d'une semaine supplémentaire sans étoposide, soit un total de trois semaines. Un nouveau protocole d'induction permettant une réduction importante de cette durée a été établi en début de doctorat. Il consiste en 48h de traitement étoposide à 100 μM suivis de 5 jours sans étoposide, soit un total de 7 jours. Par cette méthode, la sénescence est induite efficacement, un SASP important est exprimé et la mortalité cellulaire reste faible.

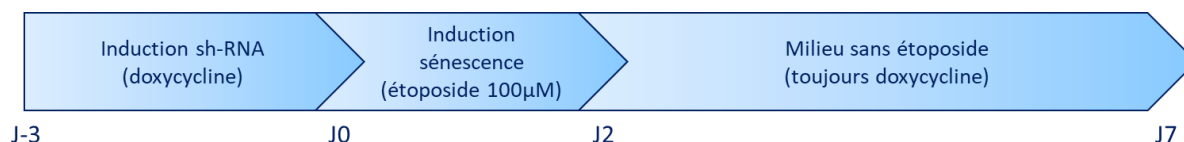


Figure 38 : Protocole d'induction de la sénescence en 7 jours.

L'influence de l'accumulation du variant H2A.J a alors pu être étudiée grâce au modèle de fibroblastes humains WI38 immortalisés hTERT et contenant un système inductible d'ARN interférent élaboré par C. Coudereau. Le système inductible est sous le contrôle d'un promoteur tet-on (TripZ®) sensible à la tétracycline et la doxycycline. Les ARN interférents ciblent les ARN de H2AFJ (shH2AFJ #3) ou aucun ARN (shNoTarget).

shNoTarget Prolifération	shNoTarget Sénescence
shH2AFJ #3 Prolifération	shH2AFJ #3 Sénescence

Tableau 1 : Conditions cellulaires expérimentales.

Une étude comparative de ces quatre conditions a donc été réalisée. Elle a été basée sur des techniques de ChIP-seq et de RNA-seq (détaillées ci-après). L'utilisation de ChIP-seq permet une localisation génomique des marques d'activation et de répression de la chromatine telles que H3K4me3, H3K27ac, H3K9me3 et H3K27me3 ainsi que de la RNA polymérase II. Les RNA-seq permettent ensuite de vérifier l'activation effective de la transcription de certains gènes. La suite de la stratégie a reposé sur une analyse bioinformatique comparative et intégrative des données dans les différentes conditions en se focalisant en particulier sur l'identification de voies de signalisations différentiellement activées.

1. Principe du ChIP-seq

L'immunoprécipitation de la chromatine, ou ChIP, est une méthode qui permet de déterminer les sites de liaison de l'ADN sur le génome pour une protéine particulière et donne accès à une représentation des interactions protéine-ADN qui ont lieu dans une cellule (single-cell) ou une population de cellules.

Le principe à la base de ce procédé est que les protéines qui se lient à l'ADN, soit par exemple les facteurs de transcription et les histones, peuvent être réticulées avec l'ADN auquel elles sont liées. L'utilisation d'un anticorps spécifique d'une protéine présumée liée à l'ADN permet alors l'immunoprécipitation du complexe protéine-ADN du lysat cellulaire.

La réticulation s'effectue le plus souvent par un traitement des cellules avec du formaldéhyde. Celui-ci forme alors des ponts méthylène (liaisons covalentes) entre les NH₂ des acides aminés et acides nucléiques. Après la réticulation, les cellules sont lysées et l'ADN est fragmenté à l'aide d'un traitement MNase et/ou d'une sonication. La MNase est une nucléase permettant de réaliser des coupures double-brin entre les nucléosomes. Après optimisation de la concentration en MNase et du temps de digestion, on peut obtenir de manière très reproductible des fragments d'ADN de la taille de mononucléosomes, soit environ 147 paires de bases. La sonication est quant-à-elle une méthode mécanique de fragmentation cassant non seulement l'ADN mais aussi tous les composants des cellules. Cela peut s'avérer utile dans le cas de cellules difficiles à lyser. De plus, cette méthode permet la génération de fragments d'ADN de taille adaptable sans biais dû à la structure de la chromatine. On procède ensuite à l'immunoprécipitation pour obtenir des complexes protéine-ADN purifiés. Ces derniers sont alors traités avec une RNase et une protéinase puis chauffés pour supprimer les réticulations par le formaldéhyde. L'ADN peut ainsi être purifié. L'identification et le dénombrement des fragments d'ADN peuvent ensuite être obtenus par qPCR ou séquençage haut débit (on parle alors de ChIP-seq). Le séquençage haut débit permet une localisation des sites de liaison de la protéine sur l'ensemble du génome sans a priori. En revanche, l'utilisation de la qPCR simple nécessite la connaissance de la ou les régions du génome ciblées par la protéine mais permet en contrepartie une plus grande sensibilité.

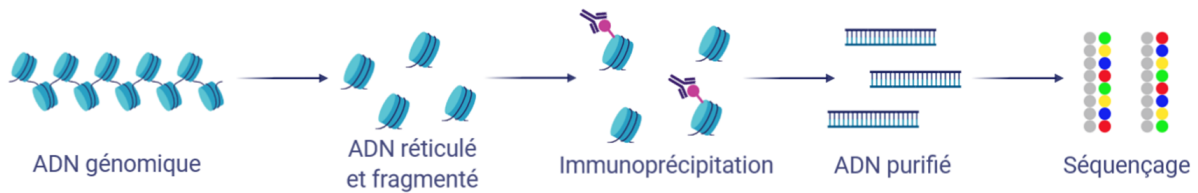


Figure 39 : Etapes du ChIP-seq.

2. Principe du RNA-seq

Le protocole expérimental pour du RNA-seq est une simple purification d'ARN suivie d'une transcription inverse permettant leur conversion en ADNc et leur séquençage. Les particularités résident dans la sélection des ARN à séquencer. Les ARN polyadénylés sont les plus couramment analysés car ils représentent les ARN stables non ciblés pour dégradation et correspondent à des ARN messagers dont le but est la traduction en protéines. Leur purification est basée sur l'utilisation de billes magnétiques poly(T). Une sélection moins restrictive est la simple élimination de l'ARN ribosomal, représentant tout de même 90% de l'ARN total, par l'hybridation de sondes spécifiques. Il existe également des protocoles pour la sélection d'autres ARN, notamment les microARN, les ARN nascents, les ARN non-codants, etc.

3. Analyses bioinformatiques

Les stratégies initialement envisagées pour les analyses bioinformatiques des données de ChIP-seq et de RNA-seq sont ici détaillées sous forme de schémas. Les protocoles détaillés effectivement utilisés sont disponibles au lien indiqué dans la publication.

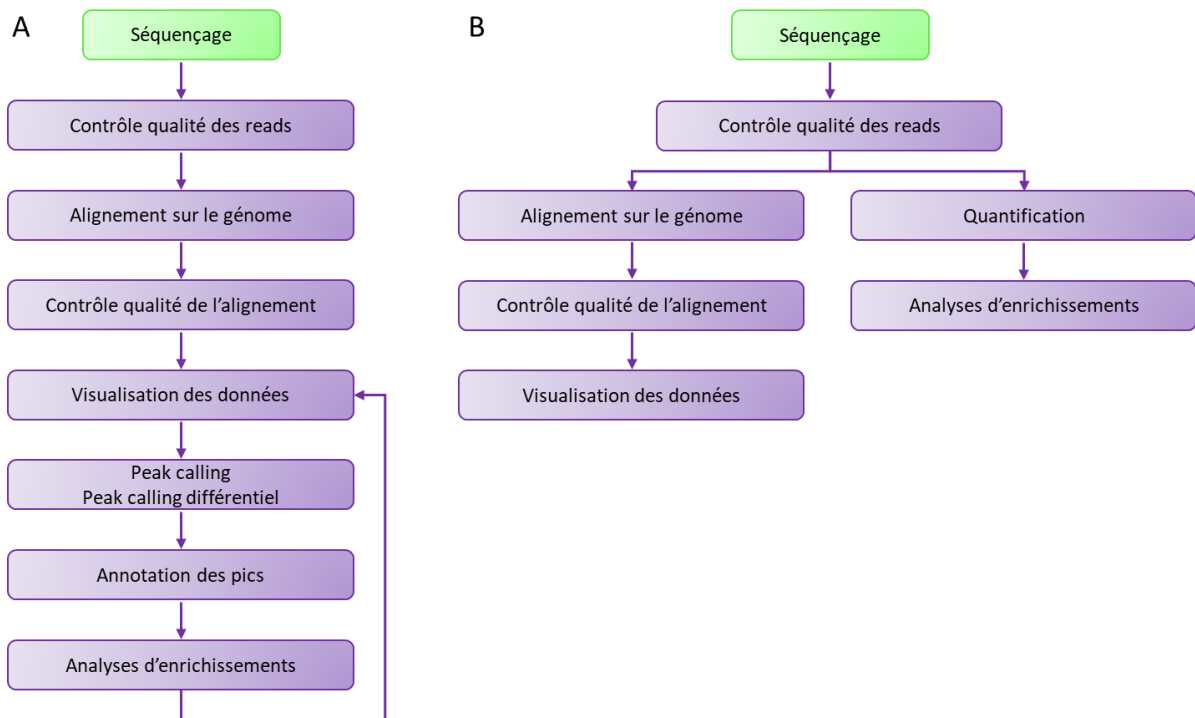


Figure 40 : Stratégies d'analyses de données de ChIP-seq (A) et RNA-seq (B).

The H2A.J histone variant contributes to Interferon-Stimulated Gene expression in senescence by its weak interaction with H1 and the derepression of repeated DNA sequences

Adèle Mangelinck¹, Clément Coudereau¹, Régis Courbeyrette¹, Khalid Ourarhni², Ali Hamiche², Christophe Redon³, William M. Bonner³, Erwin van Dijk¹, Céline Derbois⁴, Robert Olaso⁴, Jean-François Deleuze⁴, François Fenaille⁵, Claudia E. Rübe⁶, Jean-Yves Thuret¹, and Carl Mann^{1,*}

¹ Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198 Gif-sur-Yvette, France.

² Département de Génomique Fonctionnelle et Cancer, Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC)/Université de Strasbourg/CNRS/INSERM, 67404 Illkirch Cedex, France.

³ Developmental Therapeutics Branch, Laboratory of Molecular Pharmacology, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD. 20892, U.S.A.

⁴ Université Paris-Saclay, CEA, Centre National de Recherche en Génomique Humaine, 91057 Evry, France

⁵ Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), MetaboHUB, F-91191 Gif sur Yvette, France.

⁶ Saarland University Hospital, Department of Radiation Oncology, 66421 Homburg/Saar, Germany.

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 33-169089294; Fax: 33-16908046; Email: carl.mann@cea.fr

ABSTRACT

The histone variant H2A.J was previously shown to accumulate in senescent human fibroblasts with persistent DNA damage to promote inflammatory gene expression, but its mechanism of action was unknown. We show that H2A.J accumulation contributes to weakening the association of histone H1 to chromatin and increasing its turnover. Decreased H1 in senescence is correlated with increased expression of some repeated DNA sequences, increased expression of STAT/IRF transcription factors, and transcriptional activation of Interferon-Stimulated Genes (ISGs). The H2A.J-specific Val-11 moderates the transcriptional activity of H2A.J, and H2A.J-specific Ser-123 can be phosphorylated in response to DNA damage with potentiation of its transcriptional activity by the phospho-mimetic S123E mutation. Our work demonstrates the functional importance of H2A.J-specific residues and potential mechanisms for its function in promoting inflammatory gene expression in senescence.

INTRODUCTION

Eucaryotic DNA is contained in nucleosomes composed of 2 copies each of 4 core histones (H2A, H2B, H3, H4), or their variants, plus a linker histone from the H1 family (1). Packaging of DNA into nucleosomes compacts the genome and restricts its access to enzymes involved in DNA transcription, replication, and repair. Expression of the canonical core histones is linked to the replication of DNA (2) and allows rapid reassembly of replicated DNA into chromatin. In contrast, a set of histone variants are typically expressed in a constitutive fashion that allows their continued expression in post-mitotic cells (3). Histone variants are thought to play specialized roles in gene transcription and DNA repair due to their specific protein sequences. For example, the H3.3 variant differs from canonical H3.1/H3.2 by only 4/5 amino acids that confer specificity with regards to recognition by histone chaperone complexes and by differential post-translation modification (4). The H2A.X variant has a short C-terminal extension containing an SQE motif that is phosphorylated by DNA damage response kinases in response to DNA damage. Phospho-H2A.X then recruits proteins involved in DNA repair and recombination (5).

The H1 linker histones join adjacent nucleosomes and contribute to chromatin compaction that can repress gene transcription (6). Indeed, depletion of histone H1 was shown to lead to derepression of repeated DNA sequences that subsequently triggered the expression of innate immunity pathways leading to expression of Interferon-Stimulated Genes (ISGs) (7). Association of H1 to chromatin involves its binding to both linker DNA and core histones including the C-terminal region of H2A (8, 9). The H2A.J histone variant encoded by the unique H2AFJ gene (or H2AJ gene in the new HUGO histone gene nomenclature) is expressed constitutively and differs by canonical H2A by Val-11 instead of Ala-11, and the last 7 amino acids containing an SQ motif in H2A.J (10, 11). We previously showed that H2A.J accumulates in senescent human fibroblasts induced into senescence by persistent DNA damage where it promotes inflammatory gene expression, an important component of the senescent-associated secretory phenotype (SASP) (11). H2A.J was found to be widely deposited in chromatin, and its mechanism of action was not defined. In this work, we show that H2A.J-specific residues are functionally important, and we show that H2A.J accumulation contributes to decreased levels of H1 in senescence, derepression of repeated DNA sequences, and activation of ISG expression.

MATERIAL AND METHODS

Cells and cell culture. WI-38hTERT/ pTRIPz-sh-No Target (Thermo RHS4743) and WI-38hTERT/pTRIPz-sh3-H2AFJ (Thermo V3THS_351902) human fetal pulmonary fibroblasts and their culture conditions were previously described (11). Cells were mycoplasma negative. Senescence was induced by etoposide treatment following a protocol that allowed rapid induction of inflammatory gene expression (12). Briefly, cells were grown in the presence of 1 µg/ml doxycycline for 3 days to induce the expression of sh-RNAs before senescence induction by incubation with 100 µM etoposide for 48 hours. Cells were then washed and incubated in fresh medium without etoposide for 5 days before harvesting cells for analysis. Doxycycline was maintained throughout the experiment to ensure continual expression of the sh-RNAs.

Stable WI-38hTERT cell lines that allow doxycycline-regulated expression of H2A.J, H2A.J mutants, and H2A-type1 were produced by infection with pTRIPz lentiviruses in which the appropriate H2A.J or H2A coding sequences were cloned as synthetic AgeI-MluI DNA fragments in place of the corresponding pTRIPz fragment. Transduced cells were selected for resistance to 1 µg/ml puromycin. The synthetic DNA also coded for a Flag-HA epitope that was added to the N-terminus of the histone proteins to allow their expression to be distinguished from endogenous sequences, and silent mutations rendered the encoded H2AFJ mRNAs resistant to the action of sh-H2AFJ RNAs. The sequence of the synthetic DNA fragments is shown in [Supplementary Table 1](#). Lentiviruses were prepared from pTRIPz plasmids by co-transfection of 293T cells with packaging plasmids as described (13).

The effect of expressing H2A.J, H2A.J mutants, and H2A-type1 on the transcriptome of proliferating WI-38hTERT fibroblasts was performed by inducing the expression of each construct with 100 ng/ml doxycycline for 7 days before harvesting RNAs. Multiple genes encode canonical H2A species that are polymorphic at several amino acid residues (11). The H2A-type1 sequence chosen to represent canonical H2A in this study, in addition to Ala-11 and a canonical H2A C-terminus, differs from H2A.J

by a threonine in position 17 instead of serine. However, other canonical H2A species also contain Ser-17 as for H2A.J. Thus, Ser-17 is not an H2A.J-specific residue.

T47D luminal breast epithelial cells for biochemical experiments were cultivated in RPMI-1640 + Gluta-Max medium containing 10% FBS + pen/strep.

Mouse Embryonic Fibroblasts. A 7 bp deletion at the beginning of the H2AFJ gene was introduced by a TALEN-mediated DNA break in the C57BL/6-N (Charles River) genome by Cyagen. This H2AFJ Δ 7 mutation created a frame shift with a premature stop codon at the beginning of the H2AFJ coding sequence ([Supplementary Figure 1A](#)). The founder heterozygous mutation was then back-crossed 6 times to C57BL/6-N mice provided by the Janvier Laboratory (France). Viable homozygous mutants were obtained after the second backcross. The homozygous H2A.J-ko mice are viable and fertile and their further phenotypic characterization will be described in a future publication. IF analysis of MEFs and mass spectrometric analysis of histones extracted from kidneys showed the absence of detectable H2A.J in the homozygous mutant ([Supplementary Figures 1B and 1C](#)). MEFs were produced from individual H2A.J-ko or isogenic WT C57BL/6-N embryos as described (14) with minor modifications as described below, and each embryo was sex genotyped by PCR (15). 3 different female WT and H2A.J-ko MEFs were used for the transcriptome analyses. MEFs were cultivated in DMEM + Gluta-Max (Gibco 31966) + 10% FBS + pen/strep in a 5% carbon dioxide and 5% oxygen incubator. MEFs were passed twice before inducing senescence by treatment with 2.5 μ M etoposide for 6 days (with media changed after 3 days), followed by 3 days incubation in fresh medium without etoposide ([Supplementary Figures 1D and 1E](#)). PolyA⁺ RNA-seq was performed as described below.

Western blots. Whole cell extracts were prepared by flash freezing cell culture plates and scraping on ice in denaturing sample buffer containing protease and phosphatase inhibitors. Protein samples were slightly sonicated, heated to 95°C for 15 minutes, and electrophoresed in SDS-12% polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were blocked in Intercept Blocking Buffer PBS (Eurobio 927-40003) and incubated overnight at 4°C with the first antibodies. The Li-Cor Odyssey CLx infrared imaging system was used to detect the second Dylight-680 or Dylight-800 labelled antibodies following the manufacturer's protocols. The following antibodies were used for immunoblotting: anti-H2A.J (custom-made and characterized as described (11), 1:1,000), anti-H2A (Abcam, ab18255, 1:1,000), anti-H1.2 (Abcam, ab181977 and ab4086, 1:1,000 and 1:500), anti-flag M2 (Sigma, F1804, 1:1,000), anti-GAPDH (Abcam, ab9485, 1:5,000), anti-p16 (BD, 554079, 1:250), anti-p21 (Cell Signaling, 2947S, 1:1,000), anti-STAT1 (Invitrogen, AHO0832, 1:500), anti-phospho-STAT1 (Cell Signaling, 7649S, 1:250), anti- γ H2AX (Millipore, 05-636, 1:1,000).

Mass Spectrometric Identification of phospho-S123-H2A.J in irradiated mouse kidneys. A mouse was irradiated with 50 Gy ionizing irradiation, sacrificed 30 minutes post-IR, and organs were dissected and frozen. Histones were purified by acid extraction from kidneys and liver as previously described (11). To search for phosphorylation of H2A.J, acid-extracted histones were digested with Asp-N and Arg-C (Roche) and the resulting digests were analyzed by chromatography on an Ultimate 3000 nanoLC (Dionex, Sunnyvale, CA) coupled to a maXis UHR QTOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a CaptiveSpray ionization source (Bruker Daltonics), essentially as

described before (16). Peptides were first loaded onto a trapping column (C18 PepMap100, 300 μ m i.d. x 5 mm, 5 μ m) at 20 μ L/min in 4% acetonitrile containing 0.1% formic acid. Then, the peptides were eluted towards the nano-column (C18 PepMap, 75 μ m i.d. x 15 cm, 3 μ m, 100 Å) at a flow rate of 300 nL/min, maintained at 35°C and using a 65-min linear gradient (from 4 to 35% acetonitrile containing 0.1% formic acid). The mass spectrometer source settings were as follows: capillary voltage, 1.5 kV; dry gas, 4.0 L/min; dry temperature, 150°C. The MS analysis was carried out in the positive ion mode with a resolution of ~50,000 at m/z ~1200, while MS/MS acquisitions were performed in a data-dependent acquisition mode using the seven most intense precursor ions. Precursor ions from the 400-2000 m/z window were fragmented under CID conditions for peptide identification. All data sets were re-calibrated using a lock mass (m/z 1221.9906) before data analysis. Resulting MS and MS/MS data were manually extracted and interpreted.

Tandem affinity purification of Flag-HA-H2A.J and Flag-HA-H2A were performed as previously described (17).

Co-immunoprecipitation assays. Trypsinized cells were washed with PBS and quickly with Hypotonic Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, protease inhibitors). Cells were then incubated on ice for 10 minutes in Hypotonic Lysis Buffer and flash frozen in liquid nitrogen. Cell membranes were disrupted using a Dounce homogenizer with a type B pestle (25 strokes). Nuclei were pelleted by centrifugation at 1,500 g for 10 minutes at 4°C. Nuclear pellet was washed once with Hypotonic Lysis Buffer, then resuspended in Nuclear Extraction Buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 1% sodium deoxycholate, 1 mM DTT, protease inhibitors) and incubated on ice for 30 minutes. Chromatin and cell debris were pelleted by centrifugation at 21,000 x g for 15 minutes at 4°C and the supernatant was recovered as the nucleoplasmic fraction. This fraction was complemented with 25mM Tris-HCl (pH 7.5) to reduce NaCl concentration to 150 mM (600 μ l final volume). Protein concentrations were determined using the Pierce 660 nm Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #22662) and a NanoDrop 2000 spectrophotometer according to the manufacturer's protocols. Fractions were treated with Benzonase Nuclease (Millipore, #E1014) for 30 minutes at room temperature. 10 μ l of Protein A/G Magnetic Beads for IP (ThermoFisher Scientific, #10003D) were used for each IP. Beads were incubated for 1 hour at R.T. with 5 μ g of antibody in 10 μ l of IP Buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.3% Triton-X-100, 0.3% sodium deoxycholate, 0.3 mM DTT, protease inhibitors). 10% BSA in IP Buffer were added to the beads for a 5% BSA final concentration. After a 2 hours incubation at 4°C, supernatants were removed and the antibody-coupled beads were incubated overnight at 4°C on a wheel with 200 μ l / condition of nucleoplasmic fraction adjusted to equal protein concentrations (complemented with EGTA to 2 mM final concentration where indicated). After IP, beads were washed three times with 0.1% Tween-20 in PBS and finally resuspended in Western blot denaturing buffer. Samples were incubated for 15 minutes at 95°C for complete elution of proteins from the beads and analyzed by Western blot as described above. The following antibodies were used for IP: anti-IgG (Cell Signaling, 2729S), anti-H1.2 (Abcam, ab181977 and ab4086).

Identification of H1.2-H2A complexes. Approximately 30 million T47D cells were trypsinized and washed with PBS and then with Hypotonic Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 mM MgCl₂,

10 mM KCl, 0.5 mM DTT, protease inhibitors). Cells were then incubated on ice for 10 minutes in Hypotonic Lysis Buffer and flash frozen in liquid nitrogen. Cell membranes were disrupted using a Dounce homogenizer with a type B pestle (25 strokes). Nuclei were pelleted by centrifugation at 23,000 x g for 5 minutes at 4°C. The nuclear pellet was washed once with Hypotonic Lysis Buffer then resuspended in Extraction Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 2 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 20% glycerol, protease inhibitors) and incubated for 1 hour at 4°C with agitation. Supernatant was recovered after centrifugation at 89,000 x g for 20 minutes at 4°C. This extract was kept on ice for 2 hours. Protein complexes were then separated by gel exclusion chromatography on a Superose 6 Increase 10/300 column with a 0.5 ml.min⁻¹ flow rate of Extraction Buffer. 1/5 of 0.5 ml fractions were concentrated by TCA precipitation and analyzed by Western blot to identify H1.2 and H2A-containing fractions. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry of electrospray ionized tryptic peptides by the I2BC MS platform was used to identify histone chaperones within the gel filtration fractions containing H1.2 and H2A.

Successive salt extractions of chromatin. Differential salt extraction of chromatin-associated proteins followed a previous protocol (18). Trypsinized cells were washed with PBS and quickly with Hypotonic Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, protease inhibitors). Cells were then incubated on ice for 10 minutes in Hypotonic Lysis Buffer and flash frozen in liquid nitrogen. Cell membranes were disrupted using a Dounce homogenizer with a type B pestle (25 strokes). Nuclei were pelleted by centrifugation at 1,500 x g for 10 minutes at 4°C. Nuclear pellets were washed once with Hypotonic Lysis Buffer then resuspended in Nuclear Extraction Buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 1% sodium deoxycholate, 1 mM DTT, protease inhibitors) and incubated on ice for 30 minutes. Chromatin was pelleted by centrifugation at 21,000 x g for 15 minutes at 4°C and the supernatant was recovered as the nucleoplasmic fraction. This fraction was complemented with 25mM Tris-HCl (pH 7.5) to reduce NaCl concentration to 150 mM and EGTA to 2 mM final concentration. The chromatin pellet was resuspended in MNase digestion Buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂). Chromatin was incubated with 7.5 U.ml⁻¹ MNase (Sigma, #N3755) for 15 minutes at 37°C with mixing at 800 rpm in an Eppendorf Thermomixer. The reaction was stopped by addition of EGTA to 2 mM final concentration and cooling on ice. Insoluble components were pelleted by centrifugation at 21,000 g for 15 minutes at 4°C and the supernatant was recovered as the MNase-digested fraction. This fraction was complemented with twice the fraction volume of IP Buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.3% Triton-X-100, 0.3% sodium deoxycholate, 0.3 mM DTT, protease inhibitors) and EGTA to 2 mM final concentration. The pellet was resuspended in IP Buffer and incubate for 1 hour at 4°C on a wheel. Insoluble components were pelleted by centrifugation at 21,000 g for 15 minutes at 4°C. Supernatant was recovered as the 150 mM extract fraction. This fraction was complemented with EGTA to 2 mM final concentration. The pellet was resuspended in Max Extract Buffer (25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 600 mM NaCl, 0.3% Triton-X-100, 0.3% sodium deoxycholate, 0.3 mM DTT, protease inhibitors) and incubated overnight at 4°C on a wheel. Insoluble components were pelleted by centrifugation at 21,000 g for 15 minutes at 4°C and the supernatant was recovered as the 600 mM extract fraction.

This fraction was complemented with EGTA to 2 mM final concentration. All fractions were concentrated and desalted by TCA precipitation and analyzed by Western blot.

H1 turnover following cycloheximide shutoff of protein synthesis. Cells were treated with 50 µg/ml cycloheximide and flash frozen at indicated time points. Protein extraction and analysis were performed as described in the Western blot protocol.

EdU incorporation to assess cell proliferation. 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) was added to cell culture medium to 25 nM final concentration for 24 hours. Cell fixation, permeabilization and EdU detection were performed with Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit (ThermoFisher Scientific #C10337) according to the manufacturer's protocols. Imaging was performed using a Leica DMIRE2 inverted motorized microscope.

Senescence-associated β-galactosidase activity. Formaldehyde-fixed cells were stained with 1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal) in 40 mM citric acid-sodium phosphate (pH 6.0), 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ buffer for 40 hours at 37°C as described (19).

Immunofluorescence. Formaldehyde-fixed cells were permeabilized with 0.2% Triton-X-100 in PBS, blocked with 5% BSA in 0.1% Tween-20 and PBS for 10 minutes and incubated with primary antibody in blocking buffer for 2 hours at room temperature. Cells were then incubated with an Alexa-488-labeled secondary antibody diluted to 1:500 in blocking buffer for 1 hour at room temperature. Nuclei were stained with 500 ng/ml DAPI for 10 minutes at room temperature. Imaging was performed using Metamorph software on a Leica DMIRE2 inverted motorized microscope. The following primary antibodies were used: anti-H2A.J (custom-made as previously described and characterized (11), 1:1,000), anti-p21 (Cell Signaling, 2947S, 1:500), anti-IL1α (R&D Systems, MAB200, 1:200), anti-IL6 (R&D Systems, AF-206, 1:200), anti-STAT1 (Invitrogen, AHO0832, 1:250).

ChIP-seq. Cells were crosslinked with 1% formaldehyde for 10 minutes and then quenched with glycine at 200 mM final concentration. Cells were washed with cold PBS, scraped and pelleted by centrifugation at 1,500 x g for 10 minutes at 4°C. Cells were washed again twice with cold PBS and stored at -80°C in 50 µl of PBS. 150 µl of SDS Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% SDS, 1 mM EDTA, protease inhibitors) was added to crosslinked cells. Cells were incubated on ice for 10 minutes before transfer to 2 ml Eppendorf tubes and addition of 1,300 µl of MNase ChIP dilution buffer (20mM Tris-HCl (pH 8.0), 1% Triton-X-100, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 3 mM CaCl₂). Cells were pre-warmed to 37°C for 5 minutes before incubation with 1 U/ml of MNase (Sigma, #N3755) for 15 minutes at 37°C with mixing at 800 rpm in an Eppendorf Thermomixer. The reaction was stopped by addition of EGTA to 10 mM final concentration and cooling on ice. Cells were pelleted by centrifugation at 5,000 g for 5 minutes at 4°C. Cell pellets were resuspended in 300 µl of RIPA buffer (1X PBS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, protease inhibitors) and transferred into Bioruptor-specific tubes. Sonication was performed with a Diagenode Bioruptor Pico sonication device using the following program: 10 cycles of 30 seconds on and 30 seconds off. Cell debris were pelleted by centrifugation at 15,000 x g for 5 minutes at 4°C. Chromatin fragmentation was checked by treating 5% aliquots of each step (bulk after MNase treatment, supernatant after MNase treatment and supernatant after sonication) with 0.1 mg/ml RNase A at 37°C for 1 hour and 0.2 mg/ml

proteinase K at 65°C overnight, phenol/chloroform purification and then running in a 3% agarose gel in Sodium-Borate Buffer (10 mM sodium hydroxide, pH adjusted to 8.5 with boric acid) at 200 V for 30 minutes to check lengths of the DNA fragments. The protocol was optimized to yield a peak of fragmented chromatin around 100-300bp. DNA concentrations were determined using an Invitrogen Qubit 2.0 Fluorometer according to the manufacturer's protocols. 100 µl of Dynabeads protein G (ThermoFisher Scientific, #10003D) were used for each IP. Beads were washed three times with 1 ml of PBS/BSA mix (5 mg/ml BSA in 1X PBS, protease inhibitors) before being resuspended in 300 µl of PBS/BSA mix and stored at 4°C overnight on a wheel. 5 µg of antibody was added to the beads and tubes were put back on the wheel at 4°C for 2 hours. The following antibodies were used: anti-H3K4me3 (Cell Signaling, 9751S), anti-RNA polymerase II (Abcam, ab817), anti-H3K27me3 (Millipore, 07-449) and anti-H3K9me3 (Abcam, ab8898). Antibody-coupled beads were washed three times with cold PBS/BSA mix before being resuspended in 100 µl of PBS/BSA mix. 300 µl of fragmented chromatin adjusted to equal DNA concentrations between conditions was added to the antibody-coupled beads and tubes were put back on the wheel at room temperature for 1 hour, then at 4°C for additional 2 hours. A 5% Input of fragmented chromatin was kept. Supernatant was discarded and beads were washed five times with 1 ml of cold LiCl Wash Buffer (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM LiCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate) for 3 minutes on a wheel at 4°C then once with 1 ml of cold TE Wash Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM Tris-EDTA) for 1 minute on a wheel at 4°C. Beads were resuspended in 200 µl of IP Elution Buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃) and Input volumes were adjusted to 200 µl with IP Elution Buffer. Reverse crosslinking and ChIPed DNA recovery was performed by incubating the beads- and Input-containing tubes at 65°C for 1 hour with vortexing every 15 minutes. Beads-containing tubes were centrifuged at 21,000 g for 3 minutes at room temperature to recover the ChIPed DNA-containing supernatant. Each Input and ChIP sample was treated with 0.1 mg.ml⁻¹ RNase A at 37°C for 1 hour and 0.2 mg.ml⁻¹ proteinase K at 65°C overnight, then processed through phenol/chloroform purification. DNA concentrations were determined using the Qubit.

Illumina ChIP-seq libraries were then prepared with the NEBNext Ultra II DNA Library Preparation Kit (#E7645S) according to the manufacturer's protocols. DNA concentration was checked using the Qubit after PCR amplification and after cleanup of PCR reaction. Size distribution was checked after cleanup of PCR reaction on an Agilent 2100 Bioanalyzer High Sensitivity DNA chip. Correct ligation of adaptors and sequencing primers was also checked by PCR and migration in a 3% agarose gel in Sodium-Borate Buffer at 200 V for 30 minutes. 43 bp paired-end DNA sequencing on an Illumina NextSeq 500 apparatus was performed by the I2BC high throughput DNA sequencing platform.

ChIP-qPCR. Cells were crosslinked with formaldehyde 1% for 10 minutes and then quenched with glycine at 200 mM final concentration. Cells were washed with cold PBS, scraped and pelleted by centrifugation at 1,500 g for 10 minutes at 4°C. Cells were washed again twice with cold PBS and stored at -80°C in 50 µl of PBS. 300 µl of MNase-PBS Buffer (1X PBS, 1% NP-40, 3 mM CaCl₂, protease inhibitors) was added to crosslinked cells and then transferred to Bioruptor-specific tubes. A first sonication was performed to liberate nuclei with a Diagenode Bioruptor Pico sonication device using the following program: 6 cycles of 10 seconds on and 30 seconds off. This program had to be

repeated once for senescence conditions. Tubes were pre-warmed to 37°C for 5 minutes before incubation with 10 U/ml MNase (Sigma, #N3755) for 15 minutes at 37°C under spinning at 800 rpm in an Eppendorf Thermomixer comfort. The reaction was stopped by addition of EGTA to 10 mM final concentration and cooling on ice. A second sonication was performed to liberate the fragmented chromatin with a Diagenode Bioruptor Pico sonication device using the following program: 6 cycles of [30 seconds ON – 30 seconds OFF]. MNase-PBS Buffer complemented with SDS and sodium deoxycholate, respectively to 0.1% and 0.5% final concentration. Cell debris were pelleted by centrifugation at 21,000 g for 10 minutes at 4°C. Each step of the fragmentation (initial state, liberation of nuclei and liberation of chromatin) was checked under a microscope.

Chromatin fragmentation was checked as described in ChIP-seq protocol and ChIP was performed as described in ChIP-seq protocol. The antibody used for ChIP was anti-H1.2 (Abcam, ab4086).

Quantitative PCR was performed as described in RT-qPCR protocol. Values were normalized to Input DNA levels. DNA primers for the qPCR are shown in [Supplementary Table 2](#).

Total RNA-seq and small RNA-seq. RNA was purified using the mirVana miRNA Isolation Kit (ThermoFisher Scientific, #AM1560) according to the manufacturer's protocols to yield a fraction containing total RNAs and a second fraction enriched in small RNAs. The total RNA fraction was used with the Illumina Ribo-Zero Scriptseq library kit to deplete cytosolic rRNA and prepare DNA libraries. The small RNA fraction was used with the NEBNext small RNA library prep kit (New England Biolabs, #E7300) to produce a small RNA library. Libraries were subjected to size selection on a 6% native polyacrylamide gel to enrich for molecules with inserts within the miRNA size range (18-25 nt). Both libraries were sequenced using 43 bp paired-end reads. The library preparation and DNA sequencing were performed by the I2BC high-throughput DNA sequencing platform.

polyA⁺ RNA-seq. Cells were lysed and RNAs were purified using the Machery/Nagel Nucleospin RNA+ kit. The Illumina TruSeq Stranded mRNA kit was used to select polyA⁺ RNAs and to prepare DNA libraries for sequencing using 43 bp paired-end reads.

RT-qPCR. RNA was extracted as indicated in RNA-seq and Illumina Bead ChIP Array protocols. cDNA was prepared from 500ng of RNA using random hexamer primers. Quantitative PCR was performed with a Luminaris Color HiGreen Fluorescein qPCR Master Mix (Thermo Scientific #K0384) and a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) following the manufacturer's protocols. Values were normalized to GAPDH RNA levels. DNA primers for the qPCR are shown in [Supplementary Table 2](#).

Illumina Bead ChIP Array transcriptome analyses. The effect of expressing H2A.J, H2A.J mutants, and H2A-type1 on the transcriptome of proliferating WI-38hTERT fibroblasts was assessed by microarray analyses using Illumina HumanHT-12v4 Bead Chip Arrays as previously described (11).

DNA Sequence availability. RNA-seq, ChIP-seq, and microarray data were deposited in the EBI Array Express database under the following accession numbers: MEF polyA⁺ RNA-seq (E-MTAB-9704), Illumina Bead Chip microarrays (E-MTAB-9706), RNA-seq of small RNAs (E-MTAB-9710), RNA-seq of rRNA-depleted total RNAs (E-MTAB-9714), ChIP-seq of RNA polymerase II (E-MTAB-9717), ChIP-seq of H3-K4me3 (E-MTAB-9718).

Bioinformatic analyses. R and bash scripts are posted on Zenodo. Briefly, fastq files were trimmed with Cutadapt (20), quality controlled with FastQC (21), mapped to the hg19 human genome with bwa (22), or bowtie, or bowtie2 (23). For ChIP-seq experiments, peaks were identified with macs2 (24), annotated with ChIPseeker (25), and pathway enrichment analysis was performed with ReactomePA (26). For some RNA-seq analyses, alignment was performed to the transcriptome instead of the genome with salmon (27). Read counts were then aggregated to the gene level with tximeta (28), and differential gene expression was analysed with DESeq2 (29), edgeR (30), and limma-voom (31, 32). Gene set enrichment analysis was performed with camera (33) and with the Broad Institute server (34). RepEnrich2 (<https://github.com/nerettilab/RepEnrich2>) was used to assign bam files generated by bowtie2 to repeated DNA elements, and differential expression analysis was then performed as above for unique sequences.

The bash and R codes used for the ChIP-seq, Ribo-Zero RNA-seq, and small-RNA-seq analyses are available at Zenodo (10.5281/zenodo.4147010). Code and salmon quant files for the MEF transcriptome analysis are available at Zenodo (10.5281/zenodo.4140080). Illumina Bead Chip microarray analysis code and idat files are available at Zenodo (doi:10.5281/zenodo.4139402).

RESULTS

H2A interacts more strongly with H1 compared to H2A.J

We immuno-purified Flag-HA-H2A.J from the nucleosoluble fraction of HeLa S3 cells to compare its interacting partners with those of similarly purified canonical H2A (Figure 1A and Supplementary Table 3). Most abundant proteins co-purifying with H2A.J also co-purified with H2A including Importin9 and the histone chaperones NAP1L and FACT (composed of subunits SPT16 and SSRP1) (Supplementary Table 3, highlighted in yellow). It is thus likely that H2A.J is imported into the nucleus and deposited in chromatin similarly to H2A. The only difference in identified bands between the H2A and H2A.J purifications was the presence of histone H1 in association with nucleosoluble H2A, but not H2A.J. We thus sought to verify this differential interaction using targeted co-immunoprecipitation experiments. We prepared WI-38hTERT human fibroblast cell lines expressing either Flag-HA-H2A.J or Flag-HA-H2A and immunoprecipitated histone H1 from the nucleosoluble fraction and evaluated the amount of co-precipitated H2A.J or H2A by immunoblotting. We observed significantly lower levels of H2A.J associated with H1 compared to H2A in 4 independent experiments (Figure 1B). Remarkably, we noticed that the interaction of H1 with H2A, and to a lesser extent with H2A.J, was increased in the presence of the calcium chelator EGTA. This result suggests that calcium, previously shown to affect the secondary structure of histone H1 (35), weakens the interaction of H1 with H2A and H2A.J. H2A is typically found in a heterodimeric complex with H2B (36, 37). Superose 6 gel filtration of T47D cell nucleosoluble extracts showed that H2A and H1 were found in high molecular weight fractions that also contained the histone chaperones NAP1L, NASP, and SSRP1 (Supplementary Figure 2 and Supplementary Table 4). It is thus possible that H1 interacts with H2A-H2B in the nucleosoluble compartment of cells in association with histone chaperones.

H2A.J Overexpression Decreases H1 Levels

The lower apparent affinity of H2A.J for H1 suggests that increasing H2A.J deposition in chromatin might lead to a decreased chromatin association of H1. We explored this possibility by isolating nuclei from proliferating WI-38 fibroblasts over-expressing Flag-HA-H2A or Flag-HA-H2A.J and extracting chromatin-associated proteins by micrococcal nuclease (MNase) digestion and successive extraction with buffers containing increasing salt concentrations. MNase digestion in low-salt conditions preferentially liberates euchromatic nucleosomes whereas higher salt extractions are required to liberate heterochromatic nucleosomes (18). Histone H1 was associated to a greater extent with the chromatin of cells over-expressing H2A compared to H2A.J suggesting that its chromatin affinity and/or abundance is decreased by H2A.J overexpression (Figure 1C and 1D). Since H2A.J interacts less well with H1 compared to H2A, we considered that increased H2A.J levels in senescent fibroblasts might contribute to increased soluble H1 and a potentially increased turnover of H1. We first compared the effect of overexpressing Flag-HA-H2A.J versus Flag-HA-H2A in proliferating fibroblasts on total H1 levels. In three independent experiments, overexpression of H2A and H2A.J led to decreased levels of H1 in total cell extracts, but H2A.J overexpression led to greater decreases in H1 levels (Figure 2A). Cycloheximide protein synthesis shutoff experiments indicated that the half-life of H1 was shorter in fibroblasts over-expressing H2A.J compared to H2A (Figure 2B), which could explain the decreased H1 levels in cells over-expressing H2A.J.

We previously showed that H2A.J levels are low in proliferating WI-38 fibroblasts and increased in senescent WI-38 fibroblasts (11). It was also shown that H1 levels decrease in senescent WI-38 fibroblasts (38). Consistent with a role for H2A.J in decreasing H1 levels, we found H1 levels to be slightly higher in senescent WI-38 fibroblasts depleted for H2A.J compared to control sh-NT cells (Figure 2C). The relatively modest difference in H1 levels suggests that other factors contribute to H1 decreases in senescence, such as transcriptional repression of H1 genes (see below), and increased calcium in senescence.

H2A.J Expression Contributes to Interferon-Stimulated Gene Expression in Senescence

Our biochemical experiments above suggest that increased expression of H2A.J in senescent fibroblasts could contribute to the decrease of histone H1 in senescence. Previous work from the Jordan lab has shown that H1 depletion can lead to the derepression of Interferon-Stimulated Genes (ISGs) (7). Our previous work showed that H2A.J depletion inhibited inflammatory gene expression in senescent fibroblasts, and ectopic expression of H2A.J in proliferating fibroblasts stimulated inflammatory gene expression, and in particular, ISGs (11). Thus, decreased H1 levels in senescent fibroblasts, dependent in part on increased levels of H2A.J in senescence, could contribute to the transcription of ISGs as part of the inflammatory gene expression program in senescence. To test this possibility further, we performed genome-wide analyses of the activating histone H3-K4me3 activation mark and RNA pol II occupancy in WI-38/sh-NT and WI-38/sh-H2AFJ in proliferating and senescent fibroblasts (Figure 3). We induced senescence with etoposide using a protocol (12) that allowed rapid induction of inflammatory genes (Supplementary Figure 3). Macs2 (24) was used to identify ChIP-seq peaks that distinguished the sh-NT and sh-H2AFJ fibroblasts in etoposide-induced senescence. Peaks with differential intensity were mapped to proximal genes with ChIPseeker (25), and the generated gene set was then analyzed by Reactome pathway enrichment analysis (26). Interferon

signaling pathways and Interferon-Stimulated Genes were the highest scoring pathways (Figure 3A, B, and C). Notably, MIR3142HG encoding miR-146A, was the gene whose H3-K4me3 peak was the most affected by H2A.J knock-down (Figure 3D). RNA-seq of small RNAs showed that miR-146A was highly induced in senescent fibroblasts (Figure 3E) as has been previously reported (39). Consistent with the decreased levels of the activating H3-K4me3, miR-146A levels were greatly reduced in H2A.J knock-down cells relative to the NT controls (Figure 3F and Supplementary Table 5). Interestingly, most previous data on miR-146A indicate that it is a negative feedback regulator of the Interferon pathway (39, 40), thereby suggesting a defect in this pathway in cells depleted for H2A.J.

H1 depletion was associated with transcriptional derepression of repeated DNA sequences and transcriptional activation of ISGs (7). We previously reported transcriptome analyses of WI-38/hTERT fibroblasts expressing sh-NoTarget and two different H2AFJ-shRNAs using Illumina Bead Chip arrays that showed a defect in inflammatory gene expression in H2A.J-deleted fibroblasts in senescence (11). We now describe Ribo-Zero RNA-seq to more globally assess effects of H2A.J depletion on RNA levels in senescence. Principal component analysis showed good separation of senescent versus proliferating and sh-NT versus sh-H2AFJ transcriptomes (Figure 4A). Comparison of sh-NT cells induced into senescence with etoposide relative to proliferating cells showed the anticipated repression of E2F-activated cell cycle genes and loss of canonical histone gene expression, including histone H1 genes, accompanied by increased expression of NFkB and Interferon-regulated inflammatory genes (Figure 4B, 4C and Supplementary Table 6). Comparison of sh-H2AFJ cells in senescence relative to sh-NT control cells in senescence also confirmed the previous microarray analysis indicating a defect in inflammatory gene expression in H2A.J knock-down cells (Figure 4D-G). GSEA indicated that down-regulation of Interferon Response Genes was the most significantly affected gene set (Figure 4E), which is consistent with the CHIP-seq results for H3-K4me3 and RNA polII (Figure 3). We next compared levels of RNAs transcribed from repeated DNA sequences. Consistent with previous studies (41, 42), most differentially expressed repeat RNAs were up-regulated in senescent relative to proliferating cells with the greatest increase assigned to HSATII pericentromeric satellite sequences (Figure 5A). Comparing H2A.J-ko cells with sh-NT cells in senescence, we found lower levels of RNAs transcribed from 7 repeated DNA elements and increased transcription from 4 elements (Figure 5B). Three repeated DNA elements, MER53, LTR26, and LTR23, were induced during the senescence of sh-NT control cells and underexpressed in the H2A.J knock-down cells in senescence relative to sh-NT cells. We identified DNA primers that allowed specific PCR amplification of LTR23 and LTR26 sequences from genomic DNA, but we were unsuccessful in finding primers that allowed amplification of MER53 sequences. We used the LTR23 and LTR26 primers in ChIP-qPCR experiments to quantify the abundance of H1.2 bound to those sequences in sh-NT and sh-H2AFJ cells in proliferation and in senescence. We found higher levels of H1.2 bound to LTR23 and LTR26 sequences in the H2A.J-knock-down cells compared to the sh-NT controls in both proliferation and senescence (Figure 5C). In the H2A.J knock-down cells relative to sh-NT, we also found higher levels of H1 bound to the promoter regions of the inflammatory genes IFI6, OAS2, CXCL8, and to the TYR gene that is not expressed in fibroblasts. For most of these sequences, there was less H1 bound in senescent cells compared to proliferating cells. Overall, these

ChIP-qPCR results were correlated with global levels of H1 that were higher in sh-H2AFJ cells compared to sh-NT cells, and higher in proliferating compared to senescent cells (Figure 2C).

Senescent H2A.J-KO MEFs show defects in Interferon-Stimulated Gene expression.

An H2A.J knock-out mouse was prepared as described in the Materials and Methods (Supplementary Figures 1A-1C) and used to prepare mouse embryonic fibroblasts (MEFs). We further tested a role for H2A.J in ISG expression by analyzing the transcriptome of WT and H2A.J MEFs induced into senescence by etoposide (Supplementary Figure 1D and 1E). The transcriptomes of senescent WT and H2A.J-KO showed strong separation from proliferating MEFs, and a weaker separation distinguished WT and H2A.J-KO MEFs (Supplementary Figure 4A). Strikingly, gene set enrichment analysis indicated highly significant defects in Interferon Response Gene Expression in the H2A.J-KO MEFs in senescence with significant down-regulation in senescent H2A.J-KO cells of a series of oligoadenylate synthase genes (*Oas1g*, *Oas1a*, *Oasl1*, *Oas2*, *Oasl2*) and several ISGs (Supplementary Figure 4C and 4D and Supplementary Table 7). Thus, H2A.J also contributes to ISG expression in the heterologous context of senescent MEFs.

STAT1 activation is inhibited in senescent fibroblasts depleted for H2A.J

ISGs are transcriptionally activated by STAT and IRF transcription factors (43). STAT1, STAT2, IRF1, IRF2, and IRF7 genes were all transcriptionally up-regulated in senescent WI-38hTERT/sh-NT cells and down-regulated in senescent sh-H2AFJ cells, with STAT1 and IRF7 showing the greatest differential effect (Figure 6A). This deficit in STAT and IRF expression in the H2A.J-ko cells likely contributes to their lower level of ISG expression. Transcriptional activation of ISGs often involves phosphorylation and nuclear translocation of STAT transcription factors. Our transcriptomic analysis indicated that STAT1 was the most highly transcribed STAT factor in WI-38 fibroblasts and its expression was activated 6-fold in senescence (Supplementary Table 6). Western blot and IF experiments showed that STAT1 levels, its phosphorylation, and its nuclear translocation were increased during etoposide-induced senescence, and all of these events were reduced in cells depleted for H2A.J (Figure 6B, 6C and 6D). Thus, H2A.J is required for maximal activation of the STAT1 pathway in senescence.

The Conserved H2A.J-Specific Val-11 and Ser-124 are implicated in its transcriptional activity.

H2A.J differs from canonical H2A only by a valine at position 11 instead of alanine, and the 7 C-terminal amino acids containing a potential minimal phosphorylation site SQ for DNA-damage response kinases (Figure 7A). We previously showed that this C-terminal sequence is important for the transcriptional activity of H2A.J (11). To test the functional importance of these H2A.J-specific sequences, we mutated Val-11 to Ala as is found in all canonical H2A sequences, and we mutated Ser-123 to either Glu to mimic a phospho-serine residue or to Ala to prevent phosphorylation. We also substituted the C-terminus of H2A.J with the C-terminus of H2A. These mutants, WT-H2A.J and canonical H2A-type1 were ectopically expressed in proliferating fibroblasts, and their microarray transcriptomes were compared to that of proliferating and senescent fibroblasts without ectopic histone expression. Genome-wide transcriptome analysis indicated that senescent fibroblasts clustered distinctly from proliferating fibroblasts, and proliferating fibroblasts expressing the H2A.J-V11A and H2A.J-S123E mutants clustered distinctly from fibroblasts expressing the other H2A.J

mutants, WT-H2A.J, and H2A (Figure 7B and Supplementary Table 8). Hallmark gene set enrichment analysis of the transcriptomes of fibroblasts expressing H2A.J-V11A or H2A.J-S123E versus control proliferating fibroblasts indicated that they showed the same highly significant enrichment for the Epithelial-Mesenchyme Transition, TNF-Alpha Signaling Via NF-kB, and Inflammatory Response gene sets (Figure 7C). Notable inflammatory genes including IL1A, IL1B, IL6, CXCL8, and CCL2 are contained in these gene sets and are often induced in senescence as part of the senescence-associated secretory phenotype (44). Heat maps showed that the H2A.J-V11A and H2A.J-S123E mutants were particularly apt at activating the expression of these inflammatory genes in proliferating fibroblasts (Figure 7D). RT-qPCR experiments confirmed these results for selected inflammatory genes (Supplementary Figure 5). Val11 thus appears to restrict the potential of H2A.J to promote inflammatory gene expression. The phospho-mimetic H2A.J-S123E mutant also hyperactivated inflammatory gene expression relative to WT-H2A.J or the non-phosphorylatable mutant H2A.J-S123A, suggesting that phosphorylation of S123 might be involved in its transcriptional activity. H2A.J-S123 is expected to be in proximity to nucleosomal DNA (45, 46) and to the interaction site of H2A.J with H1 (8, 9), so phosphorylation of S123 might impact both of these interactions. We found that H2A.J-S123E co-immunoprecipitated less efficiently with H1.2 compared to H2A.J-S123A (Figure 7E), suggesting that phosphorylation of H2A.J-S123 would further weaken association of H2A.J with H1. We did not detect phosphorylation of H2A.J-S123 in senescent human fibroblasts by mass spectrometry. Since H2A.J is highly expressed in the liver and kidney of mice (11), we tested for phosphorylation of H2A.J 30 minutes after irradiating mice with 50 Gy of ionizing irradiation, and we observed S123 phosphorylation at an estimated level of about 1% of all H2A.J molecules (Supplementary Figure 6). In contrast, in the same sample, more than 50% of all H2A.X molecules were phosphorylated at its C-terminal SQE motif. Thus, in response to ionizing irradiation, H2A.X is phosphorylated much more efficiently than H2A.J. A more sensitive detection method is necessary to determine whether H2A.J is phosphorylated at low levels in senescent fibroblasts. Overall, our mutational analysis indicates that the conserved Val11 and Ser-123 are functionally important for H2A.J transcriptional activity.

DISCUSSION

Our previous work indicated that accumulation of H2A.J promoted the expression of inflammatory genes in senescent WI-38 fibroblasts with persistent DNA damage (11). Furthermore, over-expression of H2A.J in proliferating fibroblasts increased inflammatory gene expression, and in particular, Interferon-Stimulated Genes (ISGs). Derepression of repeated DNA sequences has been reported in some senescent cells (42, 47), and we confirmed this finding for our WI-38 fibroblasts induced into senescence by treatment with the DNA-damaging agent etoposide. Repeat RNAs can induce the expression of ISGs (7, 42). In this work, we show that some repeat RNAs are expressed at lower levels in senescent WI-38 cells depleted for H2A.J, which may contribute to the decreased ISG expression observed in these cells relative to sh-NT control cells. We suggest that derepression of repeated DNA transcription in senescence is explained at least in part by the reported decrease in histone H1 levels in senescent cells (38). We show here that that accumulation of H2A.J in senescent

cells contributes to decreasing the half-life of histone H1 by a weakened interaction of H2A.J with H1 compared to H2A with H1. We suggest that the stability of H1 is controlled by its association with chromatin and with histone chaperone complexes in the nucleosoluble compartment, and these associations are weakened when H2A.J levels increase in senescence leading to increased turnover of H1. The C-terminus of H2A was previously shown to interact with H1 (8, 9), so it is plausible that the divergent C-terminus of H2A.J relative to H2A could weaken its interaction with H1. H2A forms a heterodimeric complex with H2B rapidly after its synthesis (36, 37). In the nucleosoluble compartment of cells, we find H1 in gel filtration fractions containing H2A, H2B, and histone chaperones including NASP, NAP1L, and FACT. We thus suggest that nucleosoluble H1 interacts with H2A and H2B in complex with histone chaperones, but further work is necessary to precisely characterize these complexes. Interestingly, the association of H2A with H1 is stabilized in the presence of the calcium chelator EGTA. Calcium was previously shown to influence the secondary structure of H1 (35), and calcium levels are increased in senescent cells (48). We thus suggest that both increased H2A.J expression and increased calcium levels in senescent cells participate in destabilizing the interaction of H1 with chromatin thereby increasing the turnover of H1 in senescence. Further factors leading to H1 decreases in senescence include transcriptional repression of H1 genes, and the yet uncharacterized pathway responsible for H1 turnover (38). Decreased H1 levels in senescence would then contribute to the derepression of some repeated DNA sequences and consequent activation of ISG expression (Figure 8). This model is consistent with previous work indicating that H1 levels decrease in senescent WI-38 fibroblasts (38), and loss of H1 leads to transcriptional derepression of repeated DNA sequences and ISG expression (7). This model requires further testing. Unfortunately, previous work indicated that over-expressing H1 in senescent cells did not allow significant restoration of H1 levels (38). Thus, we need to better characterize the pathway leading to H1 proteolysis in senescence so that we can restore H1 levels and test its effect on ISG expression. The innate immunity proteins that recognize repeat RNAs in senescence must also be identified (49). Transcriptional activation of ISGs is mediated by STAT and IRF transcription factors (43). We found that STAT1, STAT2, IRF1, IRF2, and IRF7 mRNA levels increased in senescent WI-38 control cells, and this induction was inhibited in cells knocked-down for H2A.J. Consistently, nuclear STAT1 protein and phospho-STAT1 were reduced in senescent cells depleted for H2A.J. The reduced expression of STAT/IRF factors could explain the reduced expression of ISGs in H2A.J-depleted senescent cells. Transcriptional activation of interferon (IFN) genes by STAT/IRF factors serves in an auto-activation loop to boost expression of ISGs (43). The IFNB1 gene was induced in senescent WI-38 cells, but its expression level was low (Supplementary Table 6). De Cecco et al. showed that IFN gene activation is a late event in the DNA-damage induced senescence of fibroblasts (42). We analyzed cells at 7 days after inducing senescence with etoposide, so we suggest that the induction of IFN gene expression was only just beginning at this early time point. These authors also showed that the RB1 transcriptional repressor contributes to repression of L1 repeated DNAs in senescence. It remains to be seen whether H1 and Rb contribute independently to repression of repeated DNA or whether they are part of the same pathway.

H2A.J differs from canonical H2A only by a substitution of valine for alanine at position 11, and in the last 7 amino acids containing an SQ motif in H2A.J that could potentially be phosphorylated on Ser-123. We tested the effect on inflammatory gene expression of ectopically expressing mutants of these conserved residues of H2A.J in proliferating fibroblasts relative to wild-type H2A.J and canonical H2A-type1. The H2A.J-V11A mutant increased expression of inflammatory genes to a greater extent than wild-type H2A.J, indicating that Val11 normally moderates the potential of H2A.J to promote inflammatory gene expression. Valine differs from alanine by the addition of 2 methyl groups on its side chain. The N-terminal tails of core histones protrude from the nucleosome surface such that they can interact with chromatin regulators. Methylation of histone N-terminal lysine and arginine residues can contribute to both activation or repression of transcription by forming binding surfaces for the recruitment of transcriptional regulators (50). We speculate that the dimethyl groups of H2A.J-Val11 form part of a binding site for a regulatory factor that limits its potential to promote inflammatory gene expression. We also mutated Ser-123 to Ala to block phosphorylation and to Glu to mimic phosphorylation. The H2A.J-S123E mutant hyper-activated inflammatory gene expression whereas the H2A.J-S123A mutant acted similarly to WT-H2A.J. Ser-123 is close to nucleosomal DNA (45, 46) and its phosphorylation could weaken the interaction of DNA with the nucleosome to facilitate transcription. Ser-123 is also close to the site of interaction of H2A with H1 (8, 9) and we found that the H2A.J-S123E mutant interacted less well with H1 compared to H2A.J which in turn interacts less well than H2A. Thus, H2A.J-S123 phosphorylation could potentially promote inflammatory gene expression by both loosening the association of DNA with the nucleosome and by weakening the interaction of H1 with chromatin. Mass spectrometry experiments revealed that H2A.J was phosphorylated at Ser-123 after irradiation, but at levels that were much lower than for H2A.X. Two factors may contribute to the lower phosphorylation of H2A.J by DNA damage response (DDR) kinases. First, the H2A.J-SQK sequence may be a less optimal substrate than the H2A.X-SQE motif for DDR kinases, and second, the longer C-terminal tail of H2A.X would lead to its greater extrusion from the nucleosome that would facilitate access of the DDR kinases to the SQ motif. We were unable to detect phosphorylation of H2A.J-Ser123 in senescent human fibroblasts. If H2A.J was phosphorylated at only a small number of sites near genes that it regulates, then we may have been unable to detect it with the reagents and methods currently at our disposal. High affinity anti-phospho-S123-H2A.J antibodies will be necessary to test for low-level phosphorylation of H2A.J at specific chromatin sites. Our current work has demonstrated the functional importance of conserved H2A.J N-terminal and C-terminal residues and it has suggested potential mechanisms for their action in terms of interactions with H1 and other negative transcriptional regulators, and the wrapping of DNA around nucleosomes (Figure 8).

AVAILABILITY

The bash and R codes used for the ChIP-seq, Ribo-Zero RNA-seq, and small-RNA-seq analyses are available at Zenodo (10.5281/zenodo.4147010). Code and salmon quant files for the MEF transcriptome analysis are available at Zenodo (10.5281/zenodo.4140080). Illumina Bead Chip microarray analysis code and idat files are available at Zenodo (doi:10.5281/zenodo.4139402).

ACCESSION NUMBERS

RNA-seq, ChIP-seq, and microarray data were deposited in the EBI Array Express database under the following accession numbers: MEF polyA+ RNA-seq (E-MTAB-9704), Illumina Bead Chip microarrays (E-MTAB-9706), RNA-seq of small RNAs (E-MTAB-9710), RNA-seq of rRNA-depleted total RNAs (E-MTAB-9714), ChIP-seq of RNA polymerase II (E-MTAB-9717), ChIP-seq of H3-K4me3 (E-MTAB-9718).

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 1. DNA sequences of synthetic DNA fragments encoding Flag-HA (FH) tagged H2A.J, the indicated H2A.J mutants, and H2A. These fragments were cloned into the Age1/MluI sites of lentiviral pTRIPz to place the coding sequences under the control of the tet-ON promoter.

Supplementary Table 2. Sequence of primers used for qPCR

Supplementary Table 3. Tandem mass spectrometry analysis of proteins co-purifying with Flag-HA-H2A.J from the nucleosoluble fraction of HeLa S3 cells.

Supplementary Table 4. Tandem mass spectrometry analysis of proteins co-purifying with H1 and H2A after Superose 6 gel filtration of T47D nucleosoluble extracts.

Supplementary Table 5. Levels of small RNAs (TPM) and differentially-expressed genes for WI-38hTERT sh-NT and sh3-H2AFJ cells in proliferation and etoposide-induced senescence.

Supplementary Table 6. Levels of total RNAs (TPM) after rRNA depletion, and differentially-expressed genes, for WI-38hTERT sh-NT and sh3-H2AFJ cells in etoposide-induced senescence and for sh-NT cells in senescence versus proliferation.

Supplementary Table 7. RNA levels (TPM) and differentially-expressed genes for WT and H2A.J-KO MEFs in proliferation and etoposide-induced senescence.

Supplementary Table 8. Gene expression levels and differentially expressed genes from Illumina Bead Chip microarrays of WI-38hTERT cells in proliferation and etoposide-induced senescence, and of proliferating WI-38hTERT cells over-expressing WT-H2A.J, H2A.J mutants, and canonical H2A-type1.

Supplementary Data are available at NAR online.

ACKNOWLEDGEMENT

This work has benefited from the facilities and the expertise of the High-throughput Sequencing Platform and the SiCaPS Proteomic platform of the I2BC (Institute for Integrative Biology of the Cell), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198, Gif-sur-Yvette cedex, France.

FUNDING

This work was supported by the French Agence Nationale de la Recherche [ANR17H2AJFUN to C.M.] and from the German Federal Ministry of Education and Research [BMBF; 02NUK035A to C.E.R.]. Funding for open access charge: Agence Nationale de la Recherche.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

1. Cutter,A.R.R. and Hayes,J.J.J. (2015) A brief review of nucleosome structure. *FEBS Lett.*, 10.1016/j.febslet.2015.05.016.
2. Marzluff,W.F.F. and Koreski,K.P.P. (2017) Birth and Death of Histone mRNAs. *Trends Genet.*, 10.1016/j.tig.2017.07.014.
3. Skene,P.J. and Henikoff,S. (2013) Histone variants in pluripotency and disease. *Development*, **140**, 2513–24.
4. Shi,L., Wen,H. and Shi,X. (2017) The Histone Variant H3.3 in Transcriptional Regulation and Human Disease. *J. Mol. Biol.*, 10.1016/j.jmb.2016.11.019.
5. Bonner,W.M., Redon,C.E., Dickey,J.S., Nakamura,A.J., Sedelnikova,O.A., Solier,S. and Pommier,Y. (2008) γH2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **8**, 957–967.
6. Hergeth,S.P.P. and Schneider,R. (2015) The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *EMBO Rep.*, 10.15252/embr.201540749.
7. Izquierdo-Bouldstridge,A., Bustillos,A., Bonet-Costa,C., Aribau-Miralbés,P., García-Gomis,D., Dabad,M., Esteve-Codina,A., Pascual-Reguant,L., Peiró,S., Esteller,M., *et al.* (2017) Histone H1 depletion triggers an interferon response in cancer cells via activation of heterochromatic repeats. *Nucleic Acids Res.*, 10.1093/nar/gkx746.
8. Shukla,M.S., Syed,S.H., Goutte-Gattat,D., Richard,J.L.C., Montel,F., Hamiche,A., Travers,A., Faivre-Moskalenko,C., Bednar,J., Hayes,J.J., *et al.* (2011) The docking domain of histone H2A is required for H1 binding and RSC-mediated nucleosome remodeling. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 2559–2570.
9. Vogler,C., Huber,C., Waldmann,T., Ettig,R., Braun,L., Izzo,A., Daujat,S., Chassignet,I., Lopez-Contreras,A.J.J., Fernandez-Capetillo,O., *et al.* (2010) Histone H2A C-terminus regulates chromatin dynamics, remodeling, and histone H1 binding. *PLoS Genet.*, 10.1371/journal.pgen.1001234.
10. Nishida,H., Suzuki,T., Tomaru,Y. and Hayashizaki,Y. (2005) A novel replication-independent histone H2a gene in mouse. *BMC Genet.*, **6**, 10.
11. Contrepolis,K., Coudereau,C., Benayoun,B., Schuler,N., Courbeyrette,R., Thuret,J.-Y., Ma,Z., Derbois,C., Nevers,M., Snyder,M., *et al.* (2017) A novel histone variant H2A . J accumulates in senescent human cells with persistent DNA damage and promotes inflammatory gene expression. *Nat. Commun.*, **8**, 1–15.
12. Capell,B.C., Drake,A.M., Zhu,J., Shah,P.P., Dou,Z., Dorsey,J., Simola,D.F., Donahue,G., Sammons,M., Rai,T.S., *et al.* (2016) Mll1 is essential for the senescenceassociated secretory phenotype. *Genes Dev.*, **30**, 321–336.

13. Barde,I., Salmon,P. and Trono,D. (2010) Production and titration of lentiviral vectors. *Curr. Protoc. Neurosci.*, 10.1002/0471142301.ns0100s37.
14. Durkin,M., Qian,X., Popescu,N. and Lowy,D. (2013) Isolation of Mouse Embryo Fibroblasts. *BIO-PROTOCOL*, 10.21769/bioprotoc.908.
15. Kunieda,T., Xian,M., Kobayashi,E., Imamichi,T., Moriwaki,K. and Toyoda,Y. (1992) Sexing of mouse preimplantation embryos by detection of Y chromosome- specific sequences using polymerase chain reaction. *Biol. Reprod.*, 10.1095/biolreprod46.4.692.
16. Goyallon,A., Cholet,S., Chapelle,M., Junot,C. and Fenaille,F. (2015) Evaluation of a combined glycomics and glycoproteomics approach for studying the major glycoproteins present in biofluids: Application to cerebrospinal fluid. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 10.1002/rcm.7125.
17. Obri,A., Ouarrhni,K., Papin,C., Diebold,M.L.L., Padmanabhan,K., Marek,M., Stoll,I., Roy,L., Reilly,P.T.T., Mak,T.W.W., *et al.* (2014) ANP32E is a histone chaperone that removes H2A.Z from chromatin. *Nature*, 10.1038/nature12922.
18. Henikoff,S., Henikoff,J.G., Sakai,A., Loeb,G.B. and Ahmad,K. (2009) Genome-wide profiling of salt fractions maps physical properties of chromatin. *Genome Res.*, **19**, 460–469.
19. Dimri,G.P., Lee,X., Basile,G., Acosta,M., Scott,G., Roskelley,C., Medrano,E.E., Linskens,M., Rubelj,I., Pereira-Smith,O., *et al.* (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 9363–9367.
20. Martin,M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, **17**, 10.
21. Andrews,S. (2010) FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>, citeulike-article-id:11583827.
22. Li,H. (2013) Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM.
23. Langmead,B. and Salzberg,S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*, 10.1038/nmeth.1923.
24. Feng,J., Liu,T., Qin,B., Zhang,Y. and Liu,X.S. (2012) Identifying ChIP-seq enrichment using MACS. *Nat. Protoc.*, 10.1038/nprot.2012.101.
25. Yu,G., Wang,L.G. and He,Q.Y. (2015) ChIP seeker: An R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. *Bioinformatics*, 10.1093/bioinformatics/btv145.
26. Yu,G. and He,Q.Y. (2016) ReactomePA: An R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization. *Mol. Biosyst.*, 10.1039/c5mb00663e.

27. Patro,R., Duggal,G., Love,M.I., Irizarry,R.A. and Kingsford,C. (2017) Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat. Methods*, 10.1038/nmeth.4197.
28. Love,M.I., Soneson,C., Hickey,P.F., Johnson,L.K., Tessa Pierce,N., Shepherd,L., Morgan,M. and Patro,R. (2020) Tximeta: Reference sequence checksums for provenance identification in RNA-seq. *PLoS Comput. Biol.*, 10.1371/journal.pcbi.1007664.
29. Love,M.I., Anders,S. and Huber,W. (2014) Differential analysis of count data - the DESeq2 package.
30. Anders,S., McCarthy,D.J., Chen,Y., Okoniewski,M., Smyth,G.K., Huber,W. and Robinson,M.D. (2013) Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nat. Protoc.*, 10.1038/nprot.2013.099.
31. 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.
32. Law,C.W., Chen,Y., Shi,W. and Smyth,G.K. (2014) Voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol.*, 10.1186/gb-2014-15-2-r29.
33. Wu,D. and Smyth,G.K. (2012) Camera: A competitive gene set test accounting for inter-gene correlation. *Nucleic Acids Res.*, 10.1093/nar/gks461.
34. 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.
35. Tarkka,T., Oikarinen,J. and Grundström,T. (1997) Nucleotide and calcium-induced conformational changes in histone H1. *FEBS Lett.*, **406**, 56–60.
36. Mosammaparast,N., Ewart,C.S. and Pemberton,L.F. (2002) A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *EMBO J.*, 10.1093/emboj/cdf647.
37. Chang,L., Loranger,S.S., Mizzen,C., Ernst,S.G., Allis,C.D. and Annunziato,A.T. (1997) Histones in transit: Cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. *Biochemistry*, 10.1021/bi962069i.
38. Funayama,R., Saito,M., Tanobe,H. and Ishikawa,F. (2006) Loss of linker histone H1 in cellular senescence. *J Cell Biol*, **175**, 869–880.
39. Bhaumik,D., Scott,G.K.K., Schokrpur,S., Patil,C.K.K., Orjalo,A.V. V., Rodier,F., Lithgow,G.J.J. and Campisi,J. (2009) MicroRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging (Albany. NY)*, 10.18632/aging.100042.

40. Taganov,K.D.D., Boldin,M.P.P., Chang,K.J.J. and Baltimore,D. (2006) NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 10.1073/pnas.0605298103.
41. De Cecco,M., Criscione,S.W.W., Peckham,E.J.J., Hillenmeyer,S., Hamm,E.A.A., Manivannan,J., Peterson,A.L.L., Kreiling,J.A.A., Neretti,N. and Sedivy,J.M.M. (2013) Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell*, 10.1111/accel.12047.
42. De Cecco,M., Ito,T., Petrashen,A.P.P., Elias,A.E.E., Skvir,N.J.J., Criscione,S.W.W., Caligiana,A., Broccoli,G., Adney,E.M.M., Boeke,J.D.D., *et al.* (2019) L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature*, 10.1038/s41586-018-0784-9.
43. Michalska,A., Blaszczyk,K., Wesoly,J. and Bluysen,H.A.R.A.R. (2018) A positive feedback amplifier circuit that regulates interferon (IFN)-stimulated gene expression and controls type I and type II IFN responses. *Front. Immunol.*, 10.3389/fimmu.2018.01135.
44. Coppé,J.P., Patil,C.K., Rodier,F., Sun,Y., Muñoz,D.P., Goldstein,J., Nelson,P.S., Desprez,P.Y. and Campisi,J. (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.*, 10.1371/journal.pbio.0060301.
45. Li,Z. and Kono,H. (2016) Distinct Roles of Histone H3 and H2A Tails in Nucleosome Stability. *Sci. Rep.*, 10.1038/srep31437.
46. Tanaka,H., Sato,S., Koyama,M., Kujirai,T. and Kurumizaka,H. (2020) Biochemical and structural analyses of the nucleosome containing human histone H2A.J. *J. Biochem.*, 10.1093/jb/mvz109.
47. Sidler,C., Woycicki,R., Li,D., Wang,B., Kovalchuk,I. and Kovalchuk,O. (2014) A role for SUV39H1-mediated H3K9 trimethylation in the control of genome stability and senescence in WI38 human diploid lung fibroblasts. *Aging (Albany. NY)*, 10.18632/aging.100678.
48. Martin,N. and Bernard,D. (2018) Calcium signaling and cellular senescence. *Cell Calcium*, 10.1016/j.ceca.2017.04.001.
49. Streicher,F. and Jouvenet,N. (2019) Stimulation of Innate Immunity by Host and Viral RNAs. *Trends Immunol.*, 10.1016/j.it.2019.10.009.
50. Patel,D.J.J. (2016) A structural perspective on readout of epigenetic histone and DNA methylation marks. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 10.1101/cshperspect.a018754.

TABLE AND FIGURES LEGENDS

Figure 1. H1 interacts less strongly with H2A.J compared to H2A. (A) Tandem affinity purification of (Flag-HA)-epitope tagged H2A.J (e-H2A.J) and e-H2A from the nucleosoluble fraction of HeLa S3 cells. Shown is the Coomassie Blue stain of proteins eluted from the affinity beads. Bands identified by mass spectrometry are labeled. Lane M contains a molecular weight marker. The Mock lane represents a purification from HeLa cells that do not express an epitope-tagged protein. Note that the major difference between the e-H2A.J and e-H2A purifications is the apparent absence of H1 in the e-H2A.J purification. e-H2A migrates more slowly than e-H2A.J because it contained 2 copies of the N-terminal Flag-HA epitope. (B) Upper panel: Western blots of the co-IP of FH-H2A.J or FH-H2A with histone H1.2 from nucleosoluble extracts of WI-38hTERT fibroblasts expressing FH-H2A.J or FH-H2A, in the absence or the presence of EGTA. Input shows the amounts of FH-H2A, FH-H2A.J, and H1.2 in the nucleoplasmic fractions used to immunoprecipitate H1.2. Lower panel: quantification of the results of 4 independent co-IP experiments showing that H2A co-immunoprecipitates to a greater extent with H1.2 than does H2A.J, and both interactions are reinforced when the IP is done in the presence of EGTA. Asterisk: $p < .05$ by 2-sided t-test. (C) Schematic for the experiment involving differential salt extraction of chromatin to assay the quantity of H1.2 bound to chromatin. (D) Western blot showing increased amounts of H1.2 associated with the chromatin of WI-38hTERT fibroblasts overexpressing FH-H2A compared to cells overexpressing FH-H2A.J.

Figure 2. H2A.J overexpression decreases H1.2 levels and half-life. (A) Upper panel: representative H1.2 Western blot ($n=3$) showing that overexpression of H2A.J in WI-38hTERT fibroblasts decreases the total amount of H1.2 to a greater extent than overexpression of H2A. GAPDH was used as the normalization control. Lower panel: quantification of H1.2/GAPDH signal for 3 Western blots. Asterisk: $p < .05$ for 2-sided t-test. (B) Time-course of H1.2 levels in WI-38hTERT fibroblasts overexpressing H2A or H2A.J after addition of cycloheximide to block protein synthesis. Shown is the quantification of the H1.2/GAPDH signal ratio for 3 independent experiments. (C) Left panel: Western blot showing H1.2 levels in WI-38hTERT/sh-NoTarget and WI-38hTERT/sh3-H2AFJ fibroblasts in proliferation and in senescence induced by etoposide treatment. Right panel: Quantification for 2 independent experiments of H1.2 levels normalized to GAPDH and to the levels in shNT cells in proliferation.

Figure 3. H3-K4me3 and RNA polymerase II ChIP-seq experiments show that interferon pathways are differentially affected by H2A.J knock-down in senescence, and are associated with defective induction of miR-146A, a negative feedback regulator of the interferon pathway. (A,B) Pathway enrichment analysis on differential H3-K4me3 peaks (A) and RNA polymerase II peaks (B). For both analyses, peaks that were both increased in senescent versus proliferating sh-NT cells, and in senescent sh-NT cells versus senescent sh-H2AFJ, were used for the Reactome pathway analysis. (C) Genome browser displays of RNA polymerase II ChIP-seq reads (magenta) and H3-K4me3 reads (citrus green) mapping to the OAS2 gene that is known to be activated by interferon. (D) Genome Browser displays of H3-K4me3 ChIP-seq reads mapping to the MIR3142HG encoding miR-146A. (E) Log2FC-Average Expression plots of differentially expressed small RNAs for shNT cells in senescence versus proliferation. (F) Log2FC-Average Expression plots of differentially expressed small RNAs for shNT cells in senescence versus sh-H2AFJ cells in senescence. The H2AJ

sequences up-regulated in sh3-H2AFJ cells are small RNA degradation products derived from the H2AFJ gene.

Figure 4. Ribo-Zero RNA-seq shows a defect in Interferon-Stimulate Gene expression in fibroblasts depleted for H2A.J in senescence. (A) PCA plot of the transcriptomes for 3 replicates of each of WI-38hTERT/sh-NT and WI-38hTERT/sh3-H2AFJ cells showing good separation of senescent versus proliferating and sh-NT versus sh3-H2AFJ transcriptomes. (B) Log2FC-Average Expression plots and (C) Hallmark GSEA of differentially expressed mRNAs for sh-NT cells in senescence versus proliferation. The GSEA shows highly significant Up-regulated enrichment of the senescent transcriptomes with Interferon and Inflammatory Response gene sets, and highly significant Down-regulated enrichment with E2F Target, G2M Checkpoint, and Myc Target gene sets as expected for senescent cells. (D) Log2FC-Average Expression plots of differentially expressed mRNAs for shNT cells in senescence versus sh-H2AFJ cells in senescence. (E) Log2FC-Average Expression plots and (F) Hallmark GSEA of differentially expressed mRNAs for senescent sh-H2AFJ cells versus senescent sh-NT cells. The GSEA shows highly significant enrichment with Down regulation of Interferon and Inflammatory Response gene sets in the sh3-H2AFJ cells in senescence. (F) Venn diagram summarizing the differential expression analysis indicating 1046 up-regulated genes in senescent versus proliferative sh-NT cells and 463 genes down-regulated in senescent sh-H2AFJ cells versus senescent sh-NT cells of which 260 represent genes that are also up-regulated in senescence in sh-NT cells. (G) Gene expression heat map for genes that are up-regulated ($\log_2FC > 4$) in senescent versus proliferative sh-NT cells and up-regulated in senescent sh-NT cells versus sh-H2AFJ cells ($\log_2FC > 1.5$).

Figure 5. A subset of repeat RNAs are up-regulated in senescent versus proliferative sh-NT cells and down-regulated in senescent sh-H2AFJ versus senescent sh-NT cells. (A) Log2FC-Average Expression plots of repeat RNAs that are differentially expressed in senescent versus proliferative WI38hTERT/sh-NT cells. The majority of repeat RNAs are up-regulated in senescence. (B) LTR23, LTR26, and MER53 are up-regulated in senescent sh-NT cells and down-regulated in senescent sh-H2AFJ cells relative to sh-NT cells. (C) H1.2 ChIP qPCR showing that H1 occupancy is decreased at LTR23, LTR26, and IFI6, OAS2, CXCL8, and TYR promoters in senescent versus proliferative sh-NT cells. H1 occupancy is increased at all of these sites in sh-H2AFJ cells versus sh-NT cells in both proliferation and senescence.

Figure 6. STAT1 activation in senescence is inhibited by H2A.J depletion. (A) Heat map of STAT and IRF RNA levels in sh-NT and sh3-H2AFJ cells in proliferation and senescence showing underexpression of several STAT and IRF genes in senescent sh3-H2AFJ cells relative to sh-NT cells. STAT1 is the most highly expressed STAT factor in senescent WI-38 fibroblasts. (B) IF images of STAT1 showing an increased intranuclear accumulation in senescent relative to proliferating sh-NT cells and a decreased signal in senescent sh-H2AFJ cells. (C) Quantification of the nuclear STAT1 signals for 3 independent IF experiments. Asterisk: $p < 0.05$ for a 2-sided t-test. (D) Western blot showing an increase of STAT1 and phospho-STAT1 in senescent relative to proliferating sh-NT cells and a decreased quantity in senescent sh3-H2AFJ cells.

Figure 7. H2A.J-specific residues Val-11 and Ser-123 are functionally important. (A) Schematic showing H2A.J-specific residues, and mutants that were expressed in proliferating fibroblasts to examine their effect on gene expression. (B) MDS plot showing 3 distinct transcriptome clusters: senescent fibroblasts (SEN), H2A.J-V11A with H2A.J-S123E, and a final cluster of control proliferating fibroblasts and the same cells overexpressing the remaining mutants or canonical H2A. (C) GSEA showing highly significant enrichment of Hallmark Epithelial-Mesenchymal Transition, TNFA Signaling via NFkB, and Inflammatory Response gene sets for proliferating fibroblasts expressing H2A.J-V11A or H2A.J-S123E mutants. The False Discovery Rate (FDR) q-values and Normalized Enrichment Scores (NES) are shown below the enrichment plots. (D) Heat map of RNA levels for 6 inflammatory genes showing increased expression in proliferating fibroblasts expressing the H2A.J-V11A or H2A.J-S123E mutants. (E) The H2A.J-S123E mutant co-IPs less well with H1.2 compared to The H2A.J-S123A.

Figure 8. Speculative Model summarizing H2A.J Function in Promoting Inflammatory Gene Expression. Accumulation of H2A.J in senescence competes with H2A for deposition in chromatin and association with H1 in nucleosoluble complexes. The weaker association of H2A.J for H1 and increased calcium in senescence, contributes to weaker association of H1 with chromatin and increased H1 turnover leading to increased transcription of some repeated DNA elements. Repeat RNAs would trigger innate immune pathways leading to STAT/IRF activation and ISG transcription. Phosphorylation of H2A.J-S123 in response to DNA damage may contribute to transcriptional activation of inflammatory genes by further weakening association of H2A.J with H1 and by decreasing the affinity of DNA with nucleosomes in the vicinity of inflammatory genes. H2A.J-Val11 moderates H2A.J transcriptional activity, so it may participate in recruiting a factor that limits inflammatory gene transcription.

Supplementary Figure 1. H2A.J-KO mouse and MEFs.(A) Nucleotide and encoded amino acid sequences of the beginning of the murine H2AFJ-WT and H2AFJΔ7 TALEN-mediated 7 bp deletion mutant showing the frameshift and premature stop codon introduced by the mutation. (B) Immunofluorescence assay with anti-H2A.J antibodies showing the absence of H2A.J expression in H2AFJΔ7-KO MEFs relative to WT MEFs. (C) Top-down mass spectrometry analysis of H2A type1 histones acid-extracted from the kidneys of 3 month old WT and H2AFJΔ7-KO mice showing the absence of H2A.J in the H2AFJΔ7-KO kidneys. Mass spectrometry was performed as previously described (Contrepois et al., 2017). (D, E) Induction of senescence after treating WT and H2A.J-ko MEFs with 2.5 μM etoposide. (D) BrdU incorporation assay showing the proliferative arrest induced by etoposide treatment (SEN). (E) Phase contrast images of WT and H2A.J-KO MEFs stained for SA-β-galactosidase activity and percent positive cells.

Supplementary Figure 2. Superose 6 gel filtration of nucleoplasmic extracts of T47D cells. Shown are Western blots to identify the elution fractions containing histones H1.2 and H2A.

Supplementary Figure 3. Assays demonstrating induction of senescence with activation of inflammatory gene expression for sh-NT and sh3-H2AFJ WI-38hTERT fibroblasts in proliferation and after treatment with 100 μM etoposide for 2 days followed by 7 days in

medium without etoposide. (A) Percentage of EdU-positive cells to assay proliferation. **(B)** Percentage of SA- β -galactosidase positive cells. **(C)** Quantification of p21 levels by an immunofluorescence assay. **(D)** p16 and p21 Western blots. One representative experiment of 3. Quantification of H2A.J **(E)**, IF1A **(F)**, and IL6 **(G)** levels by an immunofluorescence assay. Quantifications were done on 3 independent experiments. Asterisks: $p < 0.05$ by 2-sided t-tests.

Supplementary Figure 4. Senescent H2A.J-KO MEFs show defects in ISG expression. (A) Limma (Ritchie et al, 2015) multidimensional scaling plot (MDS) of the transcriptomes of WT and H2AFJ-KO MEFs in proliferation and senescence showing strong variation in the transcriptomes of cells in senescence versus proliferation, and a weaker variation distinguishing WT and H2A.J-KO MEFs. **(B)** GSEA using the Broad Institute c2 curated gene sets on the transcriptomes of WT and H2AFJ-KO MEFs in senescence versus proliferation showing enrichment for up-regulation of many Interferon and Immune Response gene sets. **(C)** Heat map of genes within the Interferon Response gene sets.

Supplementary Figure 5. RT-qPCR of CXCL1, CCL2, IL1B and CXCL8 mRNA levels in WI-38hTERT cells in proliferation and etoposide-induced senescence, and in proliferating cells overexpressing WT-H2A.J, the indicated H2A.J mutants, and canonical H2A. 4 biological replicates are shown for CXCL1 and CCL2. Although the magnitude of gene induction varied in the different replicates, expression of H2A.J-S123E and H2A.J-V11A always led to the highest levels of CXCL1 and CCL2 induction. Only one replicate was done for CXCL8 and IL1B.

Supplementary Figure 6. H2A.J is phosphorylated at S123 in mouse kidneys 30 minutes after 50 Gy irradiation. (A) Western blot of H2A.J and phospho-H2A.X in acid-extracted histones prepared from the liver and kidney of a mouse 30 minutes post-irradiation with 50 Gy of ionizing irradiation (IR) or a control non-irradiated mouse. An aliquot of the histones was also treated with calf intestinal phosphatase (CIP). The Western blot shows induced phosphorylation of H2A.X after IR. **(B,C)** Tandem LC-MS/MS of Asp-N digested histones showing spectral counts for the C-terminal unphosphorylated and phosphorylated C-terminal H2A.X and H2A.J peptides. **(D,E)** Tandem LC-MS/MS of Arg-C digested histones showing spectral counts for the C-terminal unphosphorylated and phosphorylated C-terminal H2A.J peptides. **(F,G)** Fragmentation patterns of the Arg-C C-terminal unphosphorylated and phosphorylated C-terminal H2A.J peptides allowing identification of these peptides and phosphorylation of H2A.J on Ser-123.

Supplementary Table 1. DNA sequences of synthetic DNA fragments encoding Flag-HA (FH) tagged H2A.J, the indicated H2A.J mutants, and H2A. These fragments were cloned into the Age1/MluI sites of lentiviral pTRIPz to place the coding sequences under the control of the tet-ON promoter.

Supplementary Table 2. Sequence of primers used for qPCR

Supplementary Table 3. Tandem mass spectrometry analysis of proteins co-purifying with Flag-HA-H2A.J from the nucleosoluble fraction of HeLa S3 cells.

Supplementary Table 4. Tandem mass spectrometry analysis of proteins co-purifying with H1 and H2A after Superose 6 gel filtration of T47D nucleosoluble extracts.

Supplementary Table 5. Levels of small RNAs (TPM) and differentially-expressed genes for WI-38hTERT sh-NT and sh3-H2AFJ cells in proliferation and etoposide-induced senescence.

Supplementary Table 6. Levels of total RNAs (TPM) after rRNA depletion, and differentially-expressed genes, for WI-38hTERT sh-NT and sh3-H2AFJ cells in etoposide-induced senescence and for sh-NT cells in senescence versus proliferation.

Supplementary Table 7. RNA levels (TPM) and differentially-expressed genes for WT and H2A.J-KO MEFs in proliferation and etoposide-induced senescence.

Supplementary Table 8. Gene expression levels and differentially expressed genes from Illumina Bead Chip microarrays of WI-38hTERT cells in proliferation and etoposide-induced senescence, and of proliferating WI-38hTERT cells over-expressing WT-H2A.J, H2A.J mutants, and canonical H2A-type1.

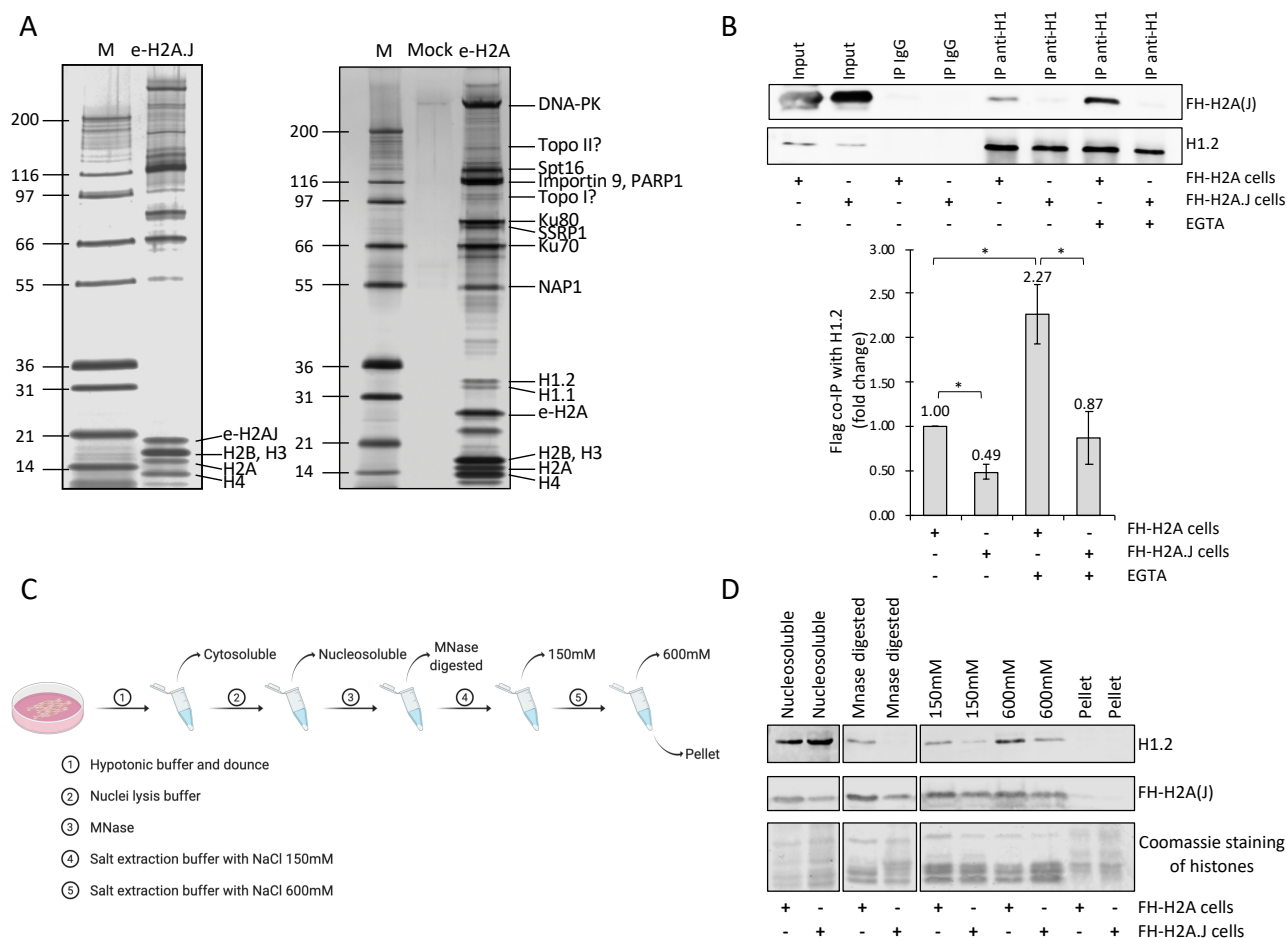


Figure 1. H1 interacts less strongly with H2A.J compared to H2A. (A) Tandem affinity purification of (Flag-HA)-epitope tagged H2A.J (e-H2A.J) and e-H2A from the nucleosoluble fraction of HeLa S3 cells. Shown is the Coomassie Blue stain of proteins eluted from the affinity beads. Bands identified by mass spectrometry are labeled. Lane M contains a molecular weight marker. The Mock lane represents a purification from HeLa cells that do not express an epitope-tagged protein. Note that the major difference between the e-H2A.J and e-H2A purifications is the apparent absence of H1 in the e-H2A.J purification. e-H2A migrates more slowly than e-H2A.J because it contained 2 copies of the N-terminal Flag-HA epitope. (B) Upper panel: Western blots of the co-IP of FH-H2A.J or FH-H2A with histone H1.2 from nucleosoluble extracts of WI-38hTERT fibroblasts expressing FH-H2A.J or FH-H2A, in the absence or the presence of EGTA. Input shows the amounts of FH-H2A, FH-H2A.J, and H1.2 in the nucleoplasmic fractions used to immunoprecipitate H1.2. Lower panel: quantification of the results of 4 independent co-IP experiments showing that H2A co-immunoprecipitates to a greater extent with H1.2 than does H2A.J, and both interactions are reinforced when the IP is done in the presence of EGTA. Asterisk, $p < .05$ for 2-sided t-test. (C) Schematic for the experiment involving differential salt extraction of chromatin to assay the quantity of H1.2 bound to chromatin. (D) Western blot showing increased amounts of H1.2 associated with the chromatin of WI-38hTERT fibroblasts overexpressing FH-H2A compared to cells overexpressing FH-H2A.J.

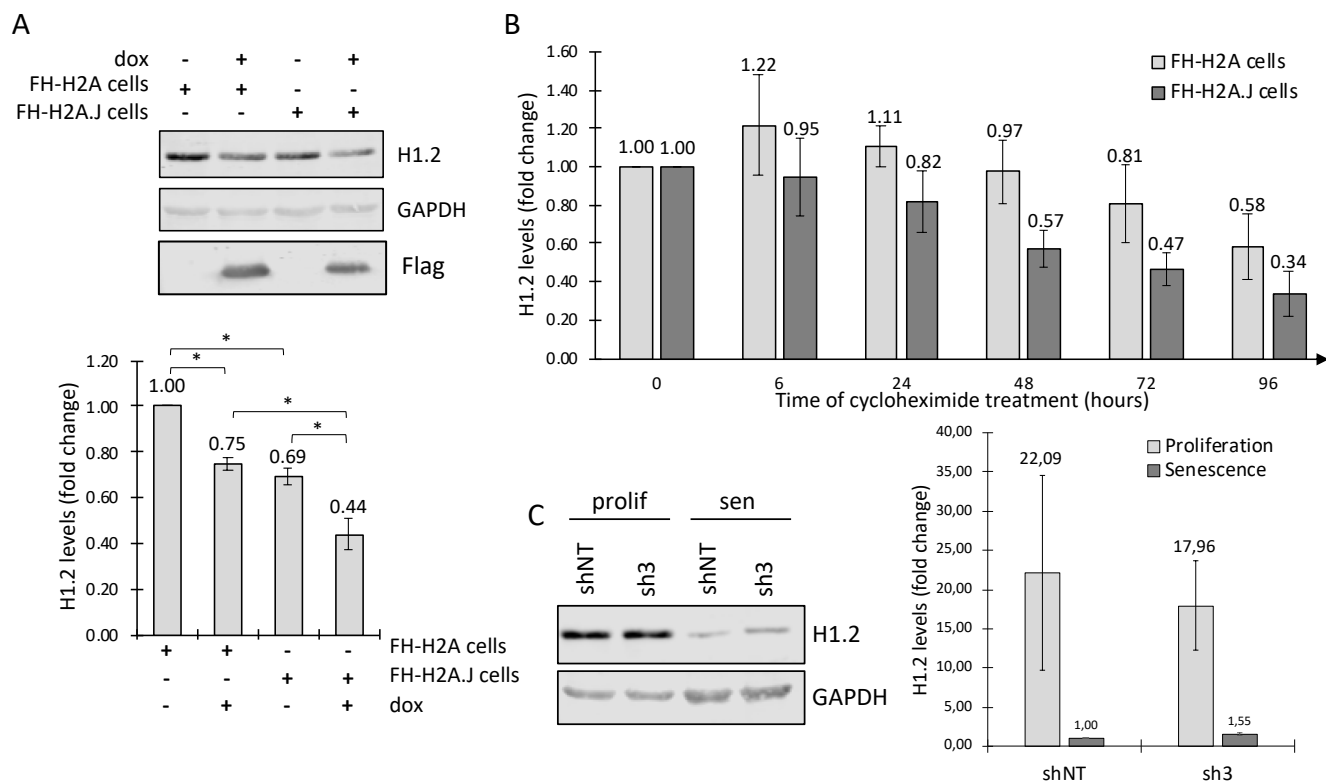


Figure 2. H2A.J overexpression decreases H1.2 levels and half-life. (A) Upper panel: representative H1.2 Western blot (n=3) showing that overexpression of H2A.J in WI-38hTERT fibroblasts decreases the total amount of H1.2 to a greater extent than overexpression of H2A. GAPDH was used as the normalization control. Lower panel: quantification of H1.2/GAPDH signal for 3 Western blots. Asterisk: $p < .05$ for 2-sided t-test. **(B)** Time-course of H1.2 levels in WI-38hTERT fibroblasts overexpressing H2A or H2A.J after addition of cycloheximide to block protein synthesis. Shown is the quantification of the H1.2/GAPDH signal ratio for 3 independent experiments. **(C)** Left panel: Western blot showing H1.2 levels in WI-38hTERT/sh-NoTarget and WI-38hTERT/sh3-H2AFJ fibroblasts in proliferation and in senescence induced by etoposide treatment. Right panel: Quantification for 2 independent experiments of H1.2 levels normalized to GAPDH and to the levels in shNT cells in senescence.

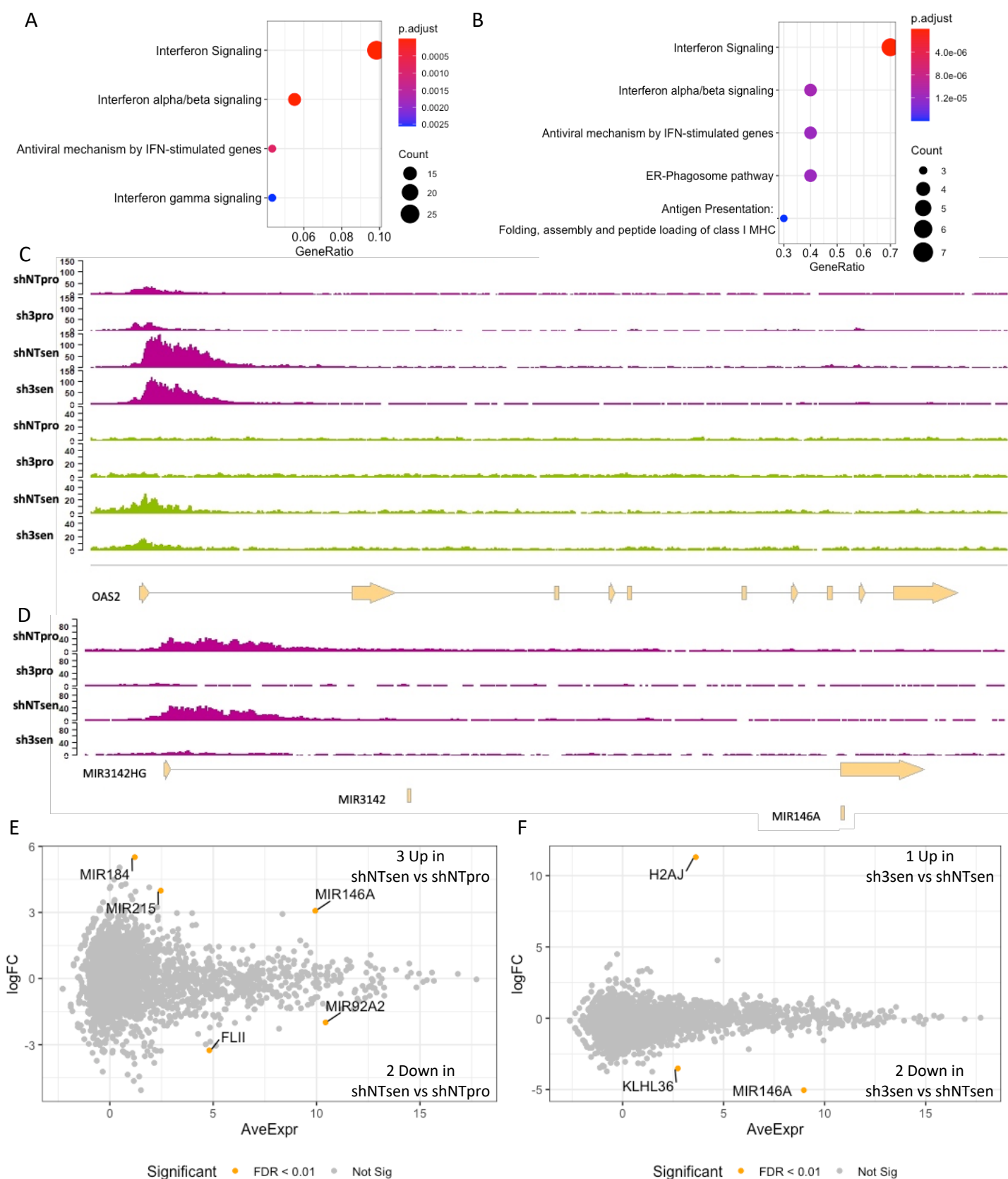


Figure 3. H3-K4me3 and RNA polymerase II ChIP-seq experiments show that interferon pathways are differentially affected by H2A.J knock-down in senescence, and are associated with defective induction of miR-146A, a negative feedback regulator of the interferon pathway. (A,B) Pathway enrichment analysis on differential H3-K4me3 peaks (A) and RNA polymerase II peaks (B). For both analyses, peaks that were both increased in senescent versus proliferating sh-NT cells, and in senescent sh-NT cells versus senescent sh-H2AFJ, were used for the Reactome pathway analysis. (C) Genome browser displays of RNA polymerase II ChIP-seq reads (magenta) and H3-K4me3 reads (citrus green) mapping to the OAS2 gene that is known to be activated by interferon. (D) Genome Browser displays of H3-K4me3 ChIP-seq reads mapping to the MIR3142HG encoding miR-146A. (E) Log2FC-Average Expression plots of differentially expressed small RNAs for shNT cells in senescence versus proliferation. (F) Log2FC-Average Expression plots of differentially expressed small RNAs for shNT cells in senescence versus sh-H2AFJ cells in senescence. The H2AJ sequences up-regulated in sh3-H2AFJ cells are small RNA degradation products derived from the H2AFJ gene.



Figure 4. Ribo-Zero RNA-seq shows a defect in Interferon-Stimulate Gene expression in fibroblasts depleted for H2A.J in senescence. (A) PCA plot of the transcriptomes for 3 replicates each of WI-38hTERT/sh-NT and WI-38hTERT/sh3-H2AFJ cells showing good separation of senescent versus proliferating (PC1) and sh-NT versus sh3-H2AFJ transcriptomes (PC2). (B) Log2FC-Average Expression plots and (C) Hallmark GSEA of differentially expressed mRNAs for sh-NT cells in senescence versus proliferation. The GSEA shows highly significant Up-regulated enrichment of the senescent transcriptomes with Interferon and Inflammatory Response gene sets, and highly significant Down-regulated enrichment with E2F Target, G2M Checkpoint, and Myc Target gene sets as expected for senescent cells. (D) Log2FC-Average Expression plots of differentially expressed mRNAs for shNT cells in senescence versus sh-H2AFJ cells in senescence. (E) Log2FC-Average Expression plots and (F) Hallmark GSEA of differentially expressed mRNAs for senescent sh-H2AFJ cells versus senescent sh-NT cells. The GSEA shows highly significant enrichment with Down regulation of Interferon and Inflammatory Response gene sets in the sh3-H2AFJ cells in senescence. (F) Venn diagram summarizing the differential expression analysis indicating 1046 up-regulated genes in senescent versus proliferative sh-NT cells and 463 genes down-regulated in senescent sh-H2AFJ cells versus senescent sh-NT cells of which 260 represent genes that are also up-regulated in senescence in sh-NT cells. (G) Gene expression heat map for genes that are up-regulated ($\log_2FC > 4$) in senescent versus proliferative sh-NT cells and up-regulated in senescent sh-NT cells versus sh-H2AFJ cells ($\log_2FC > 1.5$) that is enriched for inflammatory and interferon-stimulated genes.

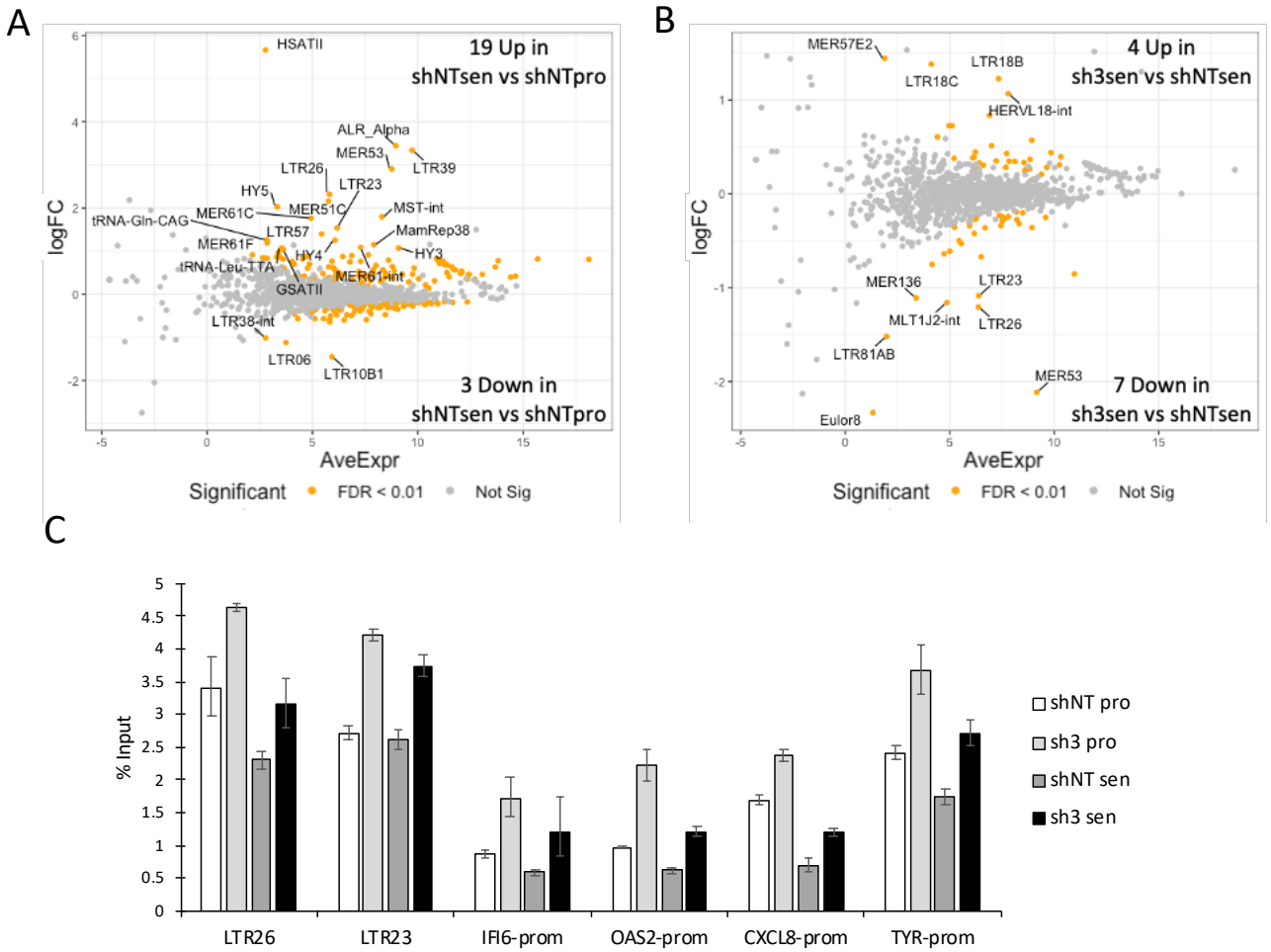


Figure 5. A subset of repeat RNAs are up-regulated in senescent versus proliferative sh-NT cells and down-regulated in senescent sh-H2AFJ versus senescent sh-NT cells. (A) Log2FC-Average Expression plots of repeat RNAs that are differentially expressed in senescent versus proliferative WI38hTERT/sh-NT cells. The majority of repeat RNAs are up-regulated in senescence. **(B)** LTR23, LTR26, and MER53 are up-regulated in senescent sh-NT cells and down-regulated in senescent sh-H2AFJ cells relative to sh-NT cells. **(C)** H1.2 ChIP qPCR showing that H1 occupancy is decreased at LTR23, LTR26, and IFI6, OAS2, CXCL8, and TYR promoters in senescent versus proliferative sh-NT cells. H1 occupancy is increased at all of these sites in sh-H2AFJ cells versus sh-NT cells in both proliferation and senescence.

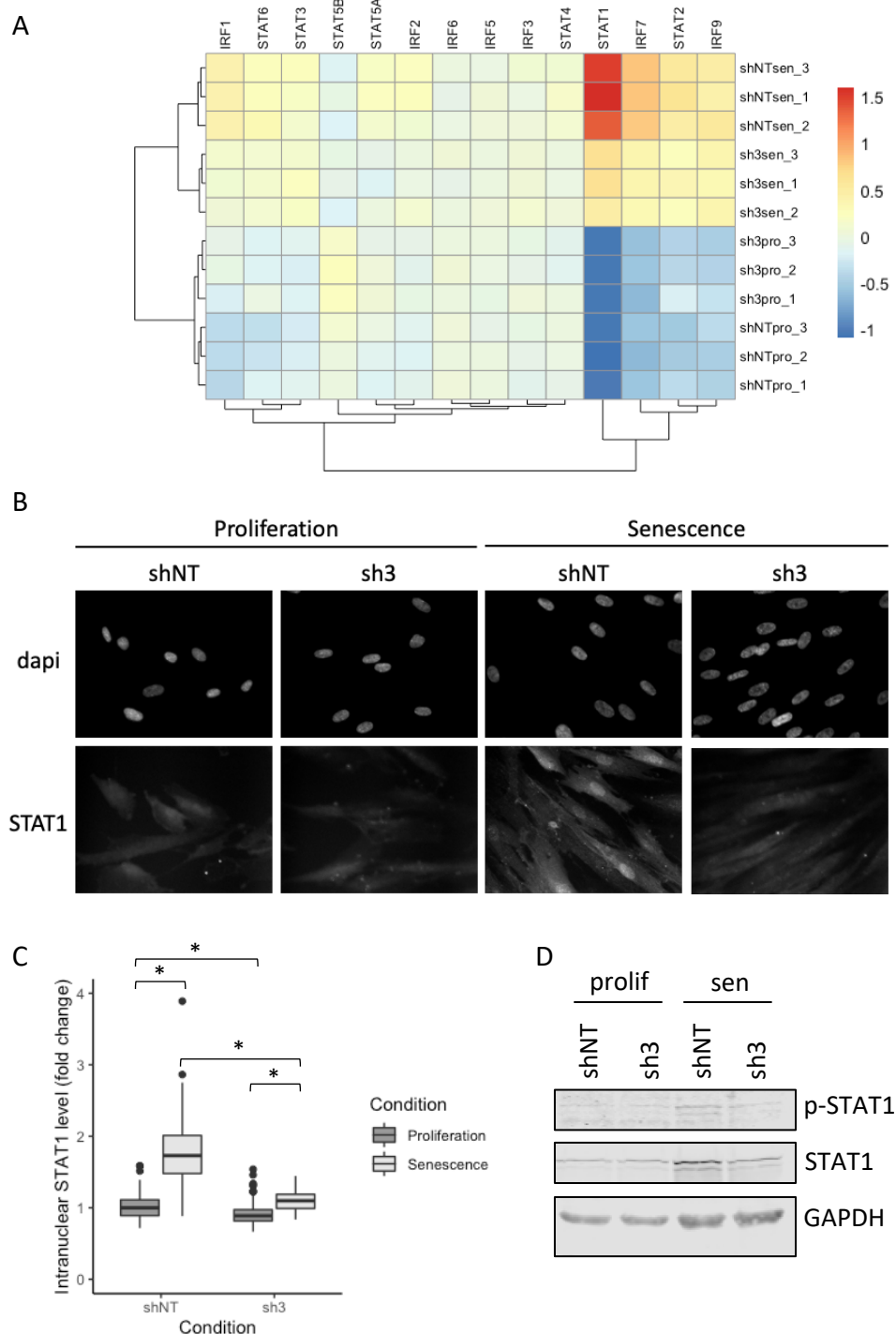


Figure 6. STAT1 activation in senescence is inhibited by H2A.J depletion. (A) Heat map of STAT and IRF RNA levels in sh-NT and sh3-H2AFJ cells in proliferation and senescence showing underexpression of several STAT and IRF genes in senescent sh3-H2AFJ cells relative to sh-NT cells. STAT1 is the most highly expressed STAT factor in senescent WI-38 fibroblasts. (B) IF images of STAT1 showing an increased intranuclear accumulation in senescent relative to proliferating sh-NT cells and a decreased signal in senescent sh-H2AFJ cells. (C) Quantification of the nuclear STAT1 signals for 3 independent IF experiments. Asterisk: $p < 0.05$ for a 2-sided t-test. (D) Western blot showing an increase of STAT1 and phospho-STAT1 in senescent relative to proliferating sh-NT cells and a decreased quantity in senescent sh3-H2AFJ cells.

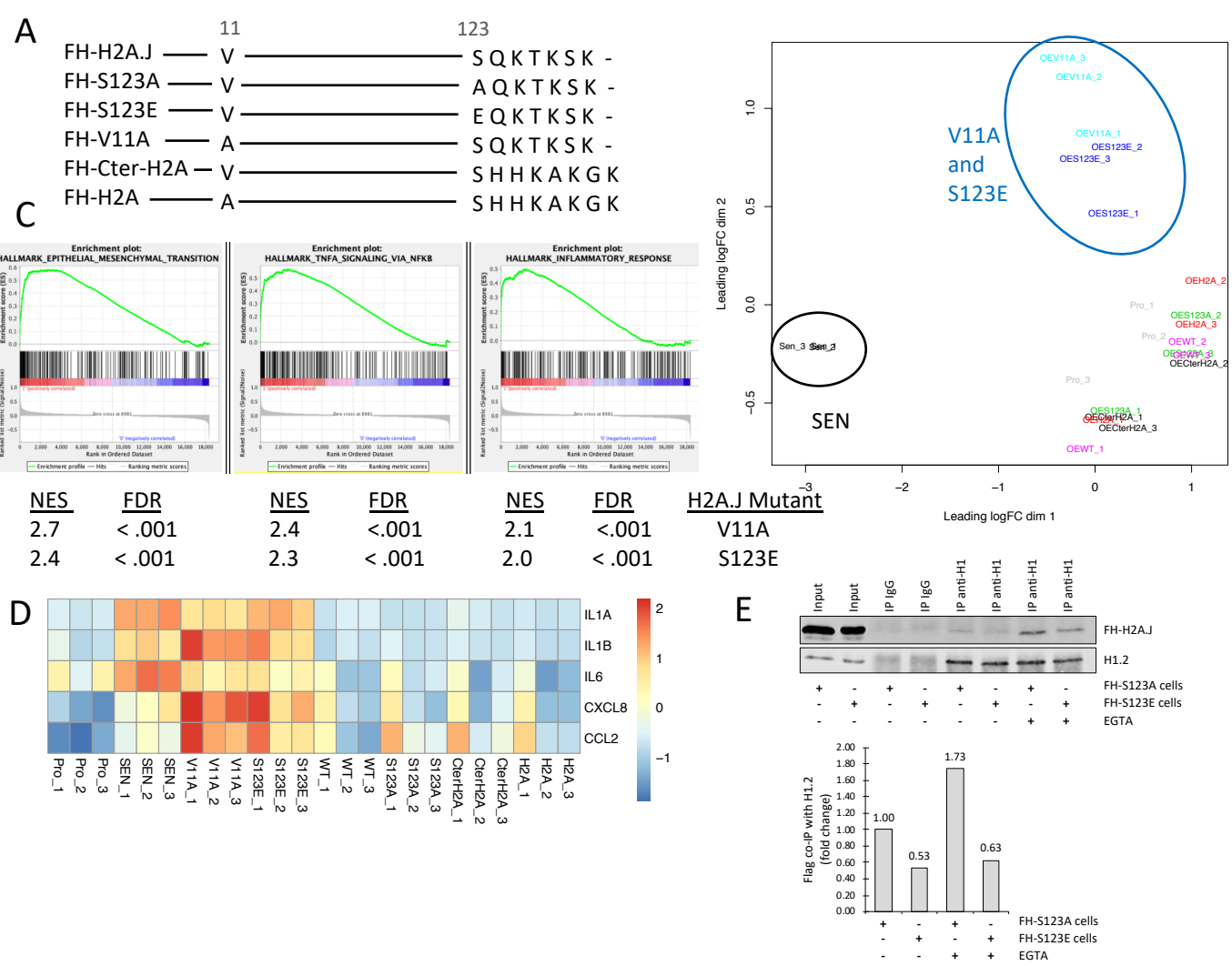


Figure 7. H2A.J-specific residues Val-11 and Ser-123 are functionally important. (A) Schematic showing H2A.J-specific residues, and mutants that were expressed in proliferating fibroblasts to examine their effect on gene expression. **(B)** MDS plot showing 3 distinct transcriptome clusters: senescent fibroblasts (SEN), H2A.J-V11A with H2A.J-S123E, and a final cluster of control proliferating fibroblasts and the same cells overexpressing the remaining mutants or canonical H2A. **(C)** GSEA showing highly significant enrichment of Hallmark Epithelial-Mesenchymal Transition, TNFA Signaling via NFkB, and Inflammatory Response gene sets for proliferating fibroblasts expressing H2A.J-V11A or H2A.J-S123E mutants. The False Discovery Rate (FDR) q-values and Normalized Enrichment Scores (NES) are shown below the enrichment plots. **(D)** Heat map of RNA levels for 6 inflammatory genes showing increased expression in proliferating fibroblasts expressing the H2A.J-V11A or H2A.J-S123E mutants. **(E)** The H2A.J-S123E mutant co-IPs less well with H1.2 compared to H2A.J-S123A.

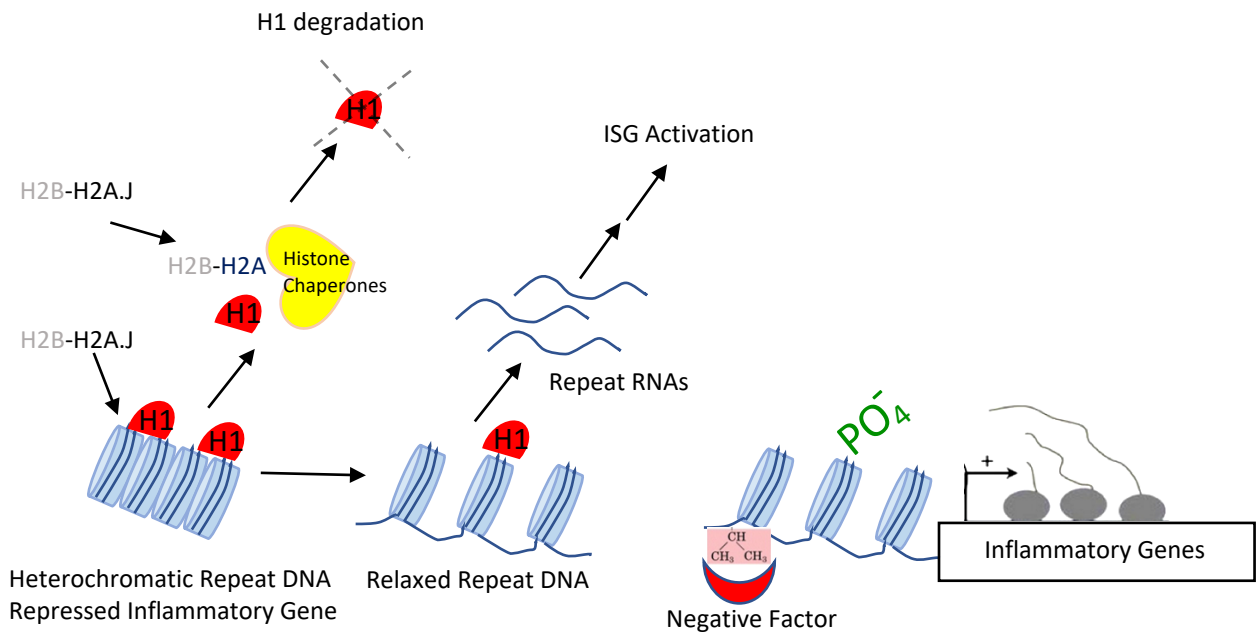


Figure 8. Speculative model summarizing H2A.J Function in Promoting Inflammatory Gene Expression. Accumulation of H2A.J in senescence competes with H2A for deposition in chromatin and association with H1 in nucleosoluble complexes. The weaker association of H2A.J for H1, and increased calcium in senescence, contributes to weaker association of H1 with chromatin and increased H1 turnover leading to increased transcription of some repeated DNA elements. Repeat RNAs would trigger innate immune pathways leading to STAT/IRF activation and ISG transcription. Phosphorylation of H2A.J-S123 in response to DNA damage may contribute to transcriptional activation of inflammatory genes by further weakening association of H2A.J with H1 and by decreasing the affinity of DNA with nucleosomes in the vicinity of inflammatory genes. H2A.J-Val11 moderates H2A.J transcriptional activity, so it may participate in recruiting a factor that limits inflammatory gene transcription.

WT

1/1 31/11 61/21

ATG TCC GGG CCA GGC AAG CAG GGC GGT AAG GTG CGC GCA AAG GCC AAG TCG CGC TCG TCG CGC GCG GGC CTG CAG TTC CCC GTG GGC CGC
M S G R G K Q G G K V R A K A K S R S S R A G G L Q F P V G R

91/31 121/41 151/51

GTT CAC CGG CTG CTG CCG AAG GGC AAC TAC GCG GAG AAG GTG GGC GCG GGA GCG CCC GTG TAC CTG GCG GCG GTG CTG GAG TAC CTG ACG
V H R L L R K G H Y A E A R V G A G A P V Y A C L A A V L E Y L T

H2AFJ-Δ7

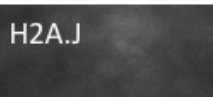
1/1 31/11 61/21

ATG TCC GGG CCA AAG GCG GTA AAG TGC GCG CCA AAG CCA AGT CGC GCT CGT CGC GCG CCG GCC TGC AGT TCC CCG TGG GCC GCG TTC ACC
M S G R R A V R C A P R P S R A R A R R R A C S S P M A A F T

91/31 121/41 151/51

GCG TGC TGC GGA AAG GCA ACT ACG CCG AGC GCG TGG GCG CCG GAG CCG TGT ACC TGG CCG CCG CCG TGC TGG AGT ACC TGA CCG CCG AGA
G C C G R A T T R S A M A G C G E R P C T M G C R R C M S T * R P R

B

WT	H2AFJ-Δ7
 H2A.J	 H2A.J
 DAPI	 DAPI

C

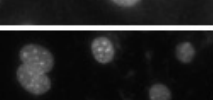
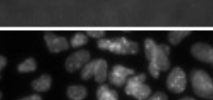
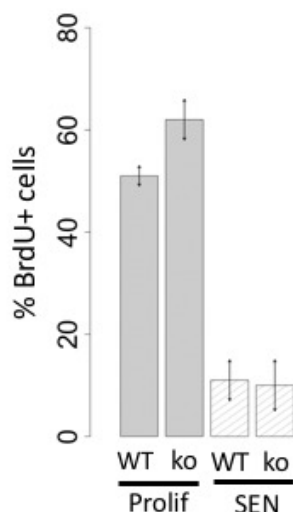
WT	H2AFJ-Δ7
 13838.5700 13958.0025 14044.9959 14116.9219	 13838.5647 13930.8370 14035.9402 14117.8933

Figure 2C displays two mass spectrometry spectra. The top spectrum is for the wild-type (WT) H2A.J peptide, showing major peaks at 13956.0025 and 14044.9959. The bottom spectrum is for the H2AFJ-Δ7 mutant peptide, showing major peaks at 13930.8370 and 14035.9402. Both spectra also show smaller peaks at 13838.5700 and 14116.9219 (WT) and 13838.5647 and 14117.8933 (mutant). A vertical dashed red line indicates the mass difference between the two peptides.

D BrdU Incorporation



E SA- β -galactosidase

WT H2AFJ-Δ7

Proliferation

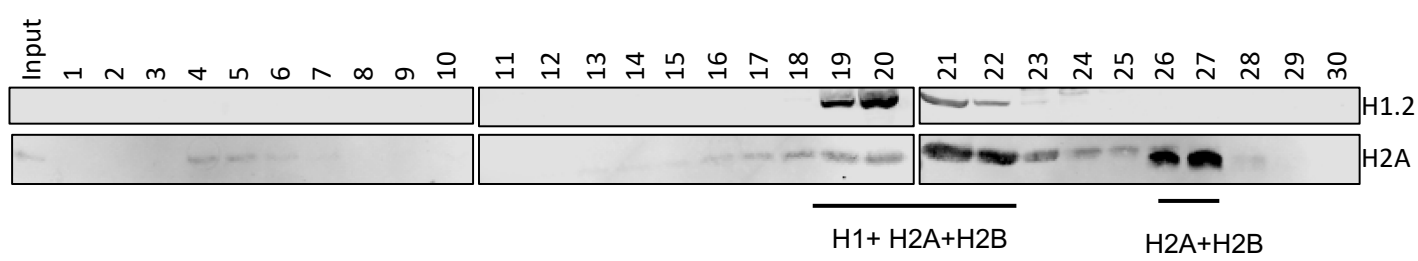
8 +/- 3% 5 +/- 2%

Senescence

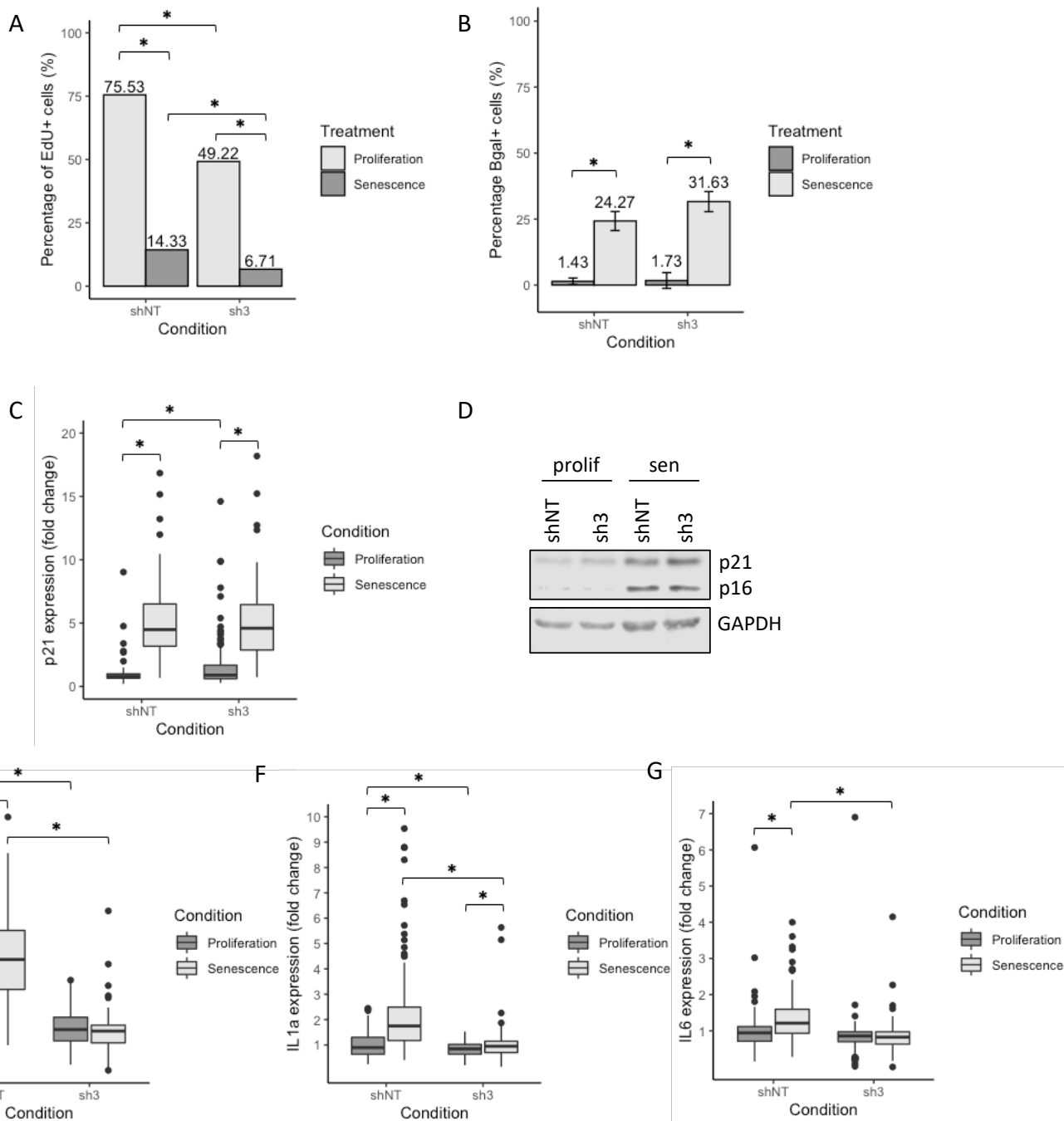
92 +/- 3% 94 +/- 3%

Senescence

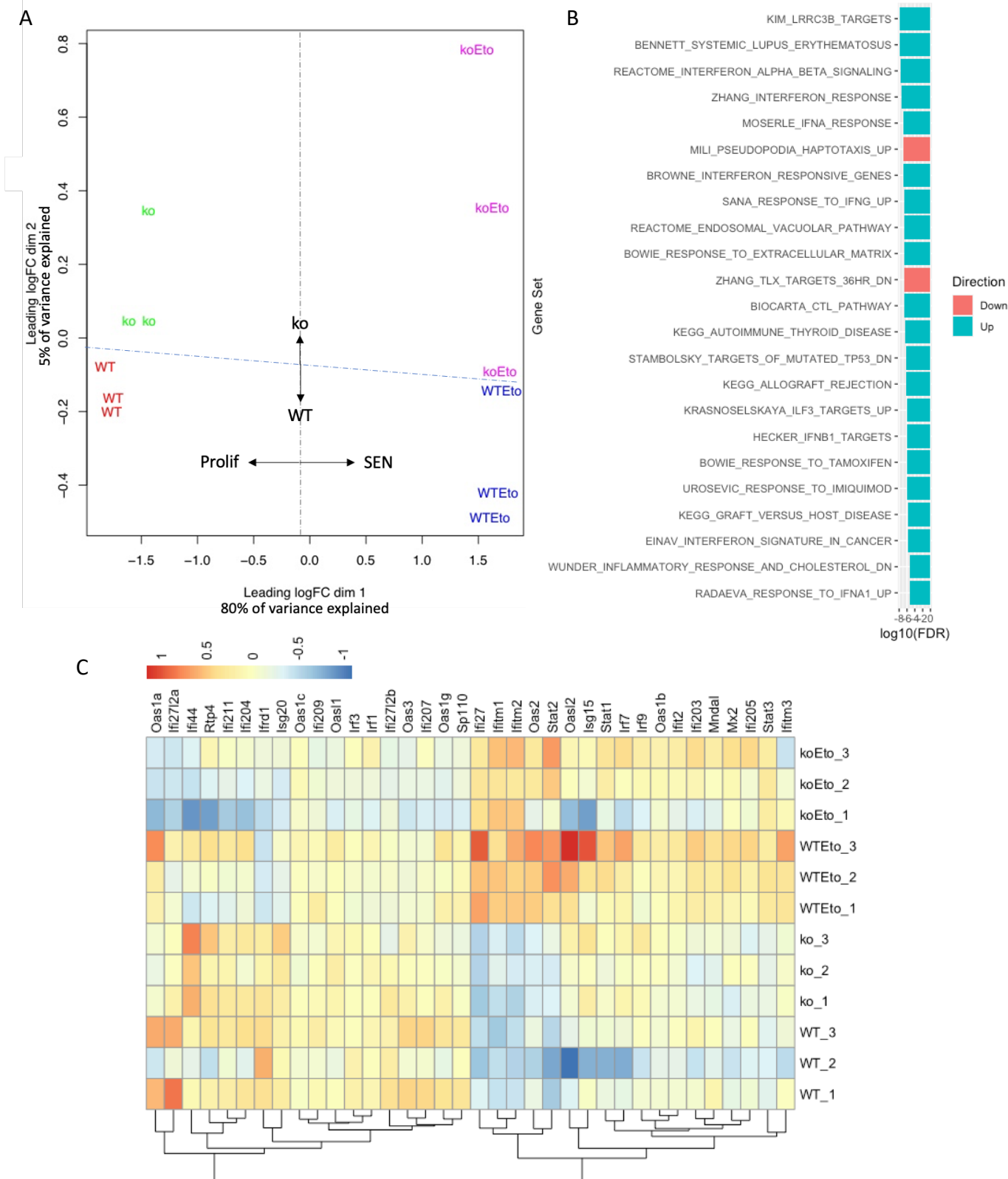
Supplementary Figure 1. H2A.J-KO mouse and MEFs. (A) Nucleotide and encoded amino acid sequences of the beginning of the murine H2AFJ-WT and H2AFJ Δ 7 TALEN-mediated 7 bp deletion mutant showing the frameshift and premature stop codon introduced by the mutation. (B) Immunofluorescence assay with anti-H2A.J antibodies showing the absence of H2A.J expression in H2AFJ Δ 7-KO MEFs relative to WT MEFs. (C) Top-down mass spectrometry analysis of H2A type1 histones acid-extracted from the kidneys of 3 month old WT and H2AFJ Δ 7-KO mice showing the absence of H2A.J in the H2AFJ Δ 7-KO kidneys. Mass spectrometry was performed as previously described (Contrepois et al., 2017). (D, E) Induction of senescence after treating WT and H2A.J-ko MEFs with 2.5 μ M etoposide. (D) BrdU incorporation assay showing the proliferative arrest induced by etoposide treatment (SEN). (E) Phase contrast images of WT and H2A.J-KO MEFs stained for SA- β -galactosidase activity and percent positive cells.



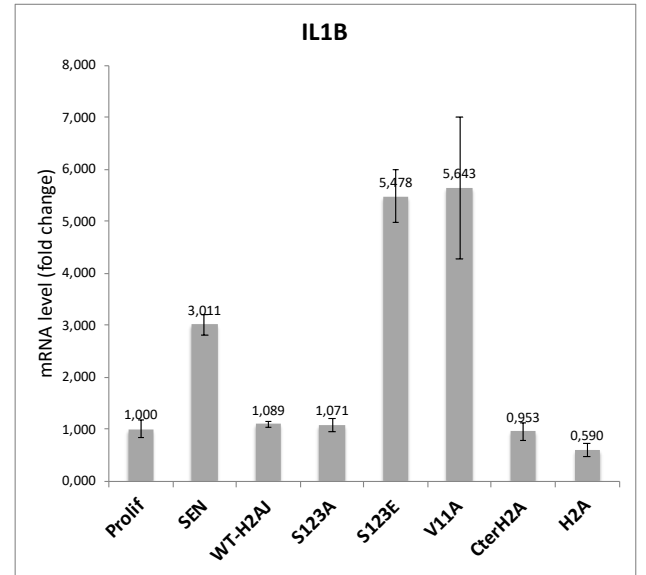
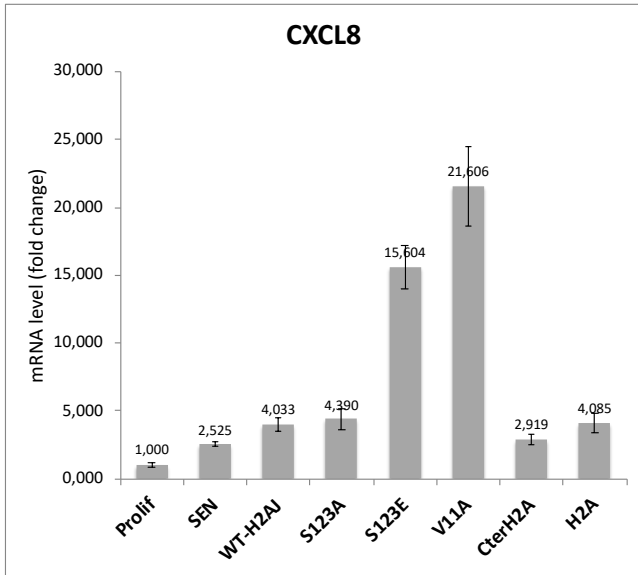
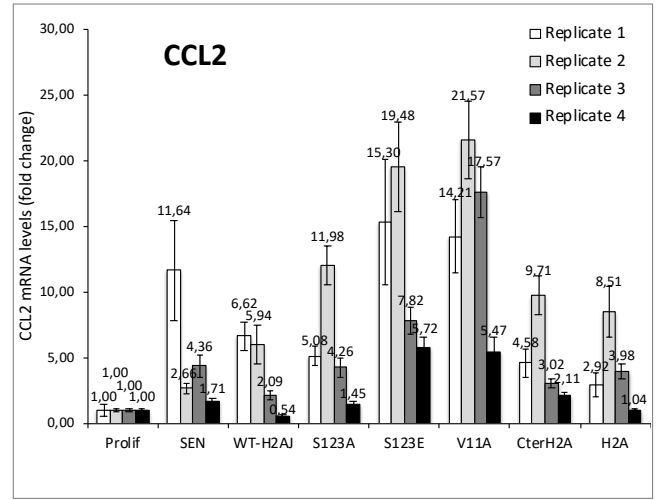
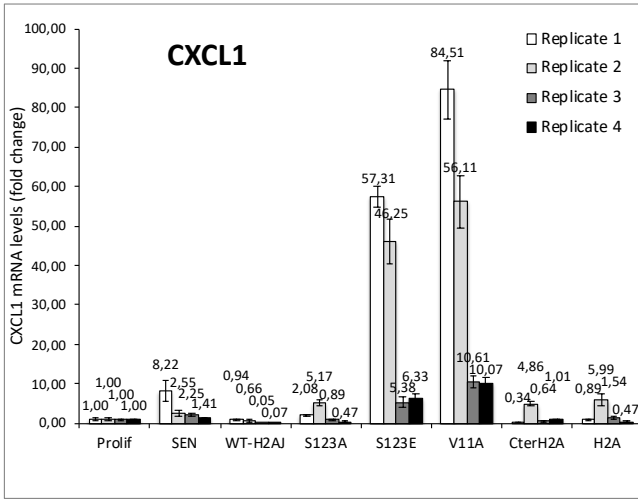
Supplementary Figure 2: Superose 6 gel filtration of nucleoplasmic extracts of T47D cells.
Shown are Western blots to identify the elution fractions containing histones H1.2 and H2A.



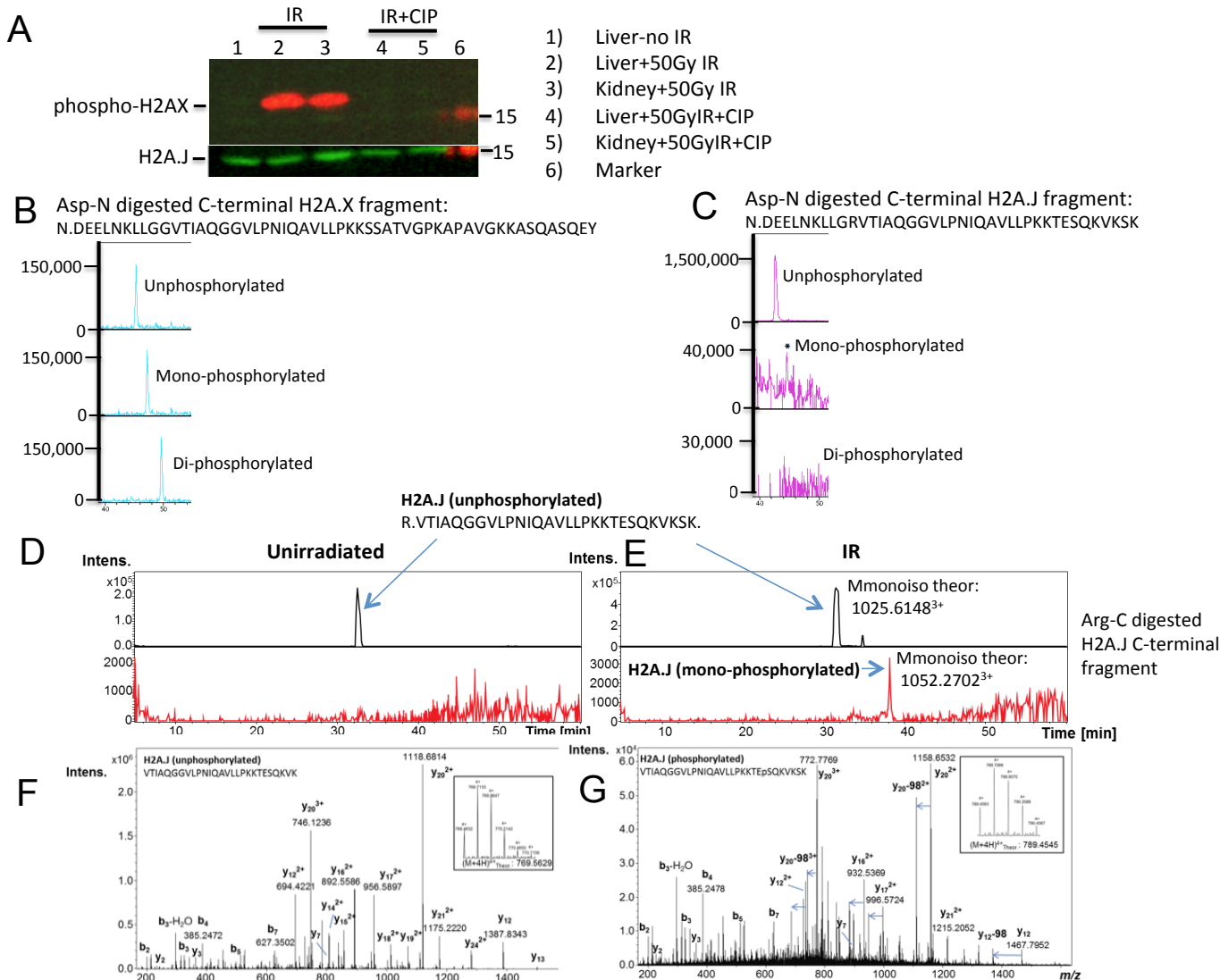
Supplementary Figure 3. Assays demonstrating induction of senescence with activation of inflammatory gene expression for sh-NT and sh3-H2AFJ WI-38hTERT fibroblasts in proliferation and after treatment with 100 μ M etoposide for 2 days followed by 7 days in medium without etoposide. (A) Percentage of EdU-positive cells to assay proliferation. (B) Percentage of SA- β -galactosidase positive cells. (C) Quantification of p21 levels by an immunofluorescence assay. (D) p16 and p21 Western blots. One representative experiment of 3. Quantification of H2A.J (E), IF1A (F), and IL6 (G) levels by an immunofluorescence assay. Quantifications were done on 3 independent experiments. Asterisks: p < 0.05 by 2-sided t-tests.



Supplementary Figure 4. Senescent H2A.J-KO MEFs show defects in ISG expression. (A) Limma (Ritchie et al, 2015) multidimensional scaling plot (MDS) of the transcriptomes of WT and H2AFJ-KO MEFs in proliferation and senescence showing strong variation in the transcriptomes of cells in senescence versus proliferation, and a weaker variation distinguishing WT and H2A.J-KO MEFs. (B) GSEA using the Broad Institute c2 curated gene sets on the transcriptomes of WT and H2AFJ-KO MEFs in senescence versus proliferation showing enrichment for up-regulation of many Interferon and Immune Response gene sets. (C) Heat map of genes within the Interferon Response gene sets.



Supplementary Figure 5. RT-qPCR of CXCL1, CCL2, IL1B and CXCL8 mRNA levels in WI-38hTERT cells in proliferation and etoposide-induced senescence, and in proliferating cells overexpressing WT-H2A.J, the indicated H2A.J mutants, and canonical H2A. 4 biological replicates are shown for CXCL1 and CCL2. Although the magnitude of gene induction varied in the different replicates, expression of H2A.J-S123E and H2A.J-V11A always led to the highest levels of CXCL1 and CCL2 induction. Only one replicate was done for CXCL8 and IL1B.



Supplementary Figure 6. H2A.J is phosphorylated at S123 in mouse kidneys 30 minutes after 50 Gy irradiation. (A) Western blot of H2A.J and phospho-H2A.X in acid-extracted histones prepared from the liver and kidney of a mouse 30 minutes post-irradiation with 50 Gy of ionizing irradiation (IR) or a control non-irradiated mouse. An aliquot of the histones was also treated with calf intestinal phosphatase (CIP). The Western blot shows induced phosphorylation of H2A.X after IR and constant levels of H2A.J. (B,C) Tandem LC-MS/MS of Asp-N digested histones showing spectral counts for the C-terminal unphosphorylated and phosphorylated C-terminal H2A.X and H2A.J peptides. (D,E) Tandem LC-MS/MS of Arg-C digested histones showing spectral counts for the C-terminal unphosphorylated and phosphorylated C-terminal H2A.J peptides. (F,G) Fragmentation patterns of the Arg-C unphosphorylated and phosphorylated C-terminal H2A.J peptides allowing manual identification of these peptides and phosphorylation of H2A.J on Ser-123. Of note, MS/MS spectra of phospho-peptides typically contain an intense neutral loss peak that resides at 98 Da lower than some ions, representing the loss of H_3PO_4 (indicated in the figure as “-98” and with a blue arrow).

ORF H2AFJ	ATGTCCGGTCGCGGGAAACAGGGCGGGCAAAGTGCAGCAAAGGCCAAATCCGCTCCTCC CGCGCGGGCCTGCAGTTCCCGGTGGGCCGAGTGCACAGACTGCTGCGCAAAGGGAACT ACGCGGAGCGAGTGGGCGCCGGGGCGCCGGTGTACCTGGCGGCGGTGTTGGAGTACCT TACGGCGGAGATCCTGGAGCTGGCTGGCAACGC cgcgctgacaacaagaag ACCAGGATAAT TCCCCGCCACCTGCAGCTGCCATC cgcaacgacgaggagtta AACAAGCTGCTGGGCAAAGTG ACCATCGCTCAGGGCGGCGTCCTGCCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCCCAAGAAGAC GGAGAGTCAGAAGACGAAGAGCAAATGA
FH-H2A.J	ATGTCCGGTCGCGGGAAACAGGGCGGGCAAAG TG CGAGCAAAGGCCAAATCCCGCTCCTC CCGCGCGGGCCTGCAGTTCCCGGTGGGCCGAGTGCACAGACTGCTGCGCAAAGGGAACT TACGCGGAGCGAGTGGGCGCCGGGGCGCCGGTGTACCTGGCGGCGGTGTTGGAGTACC TTACGGCGGAGATCCTGGAGCTGGCTGGCAACGCTGCCAGGGATAATAAAAAACCAGG ATAATTCCCCGCCACCTGCAGCTCGCCATCAGGAATGATGAAGAACTGAACAAGCTGCTG GGCAAAGTGACCATCGCTCAGGGCGGCGTCCTGCCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCC CAAGAAGACGGAG AGT CAGAAGACGAAGAGCAAATGA
FH-S123A	ATGTCCGGTCGCGGGAAACAGGGCGGGCAAAGTGCAGCAAAGGCCAAATCCCGCTCCTC CCGCGCGGGCCTGCAGTTCCCGGTGGGCCGAGTGCACAGACTGCTGCGCAAAGGGAACT TACGCGGAGCGAGTGGGCGCCGGGGCGCCGGTGTACCTGGCGGCGGTGTTGGAGTACC TTACGGCGGAGATCCTGGAGCTGGCTGGCAACGCTGCCAGGGATAATAAAAAACCAGG ATAATTCCCCGCCACCTGCAGCTCGCCATCAGGAATGATGAAGAACTGAACAAGCTGCTG GGCAAAGTGACCATCGCTCAGGGCGGCGTCCTGCCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCC CAAGAAGACGGAG GCT CAGAAGACGAAGAGCAAATGA
FH-S123E	ATGTCCGGTCGCGGGAAACAGGGCGGGCAAAGTGCAGCAAAGGCCAAATCCCGCTCCTC CCGCGCGGGCCTGCAGTTCCCGGTGGGCCGAGTGCACAGACTGCTGCGCAAAGGGAACT TACGCGGAGCGAGTGGGCGCCGGGGCGCCGGTGTACCTGGCGGCGGTGTTGGAGTACC TTACGGCGGAGATCCTGGAGCTGGCTGGCAACGCTGCCAGGGATAATAAAAAACCAGG ATAATTCCCCGCCACCTGCAGCTCGCCATCAGGAATGATGAAGAACTGAACAAGCTGCTG GGCAAAGTGACCATCGCTCAGGGCGGCGTCCTGCCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCC CAAGAAGACGGAG GAG CAGAAGACGAAGAGCAAATGA
FH-V11A	ATGTCCGGTCGCGGGAAACAGGGCGGGCAAAG GC CGAGCAAAGGCCAAATCCCGCTCCTC CCGCGCGGGCCTGCAGTTCCCGGTGGGCCGAGTGCACAGACTGCTGCGCAAAGGGAACT TACGCGGAGCGAGTGGGCGCCGGGGCGCCGGTGTACCTGGCGGCGGTGTTGGAGTACC TTACGGCGGAGATCCTGGAGCTGGCTGGCAACGCTGCCAGGGATAATAAAAAACCAGG ATAATTCCCCGCCACCTGCAGCTCGCCATCAGGAATGATGAAGAACTGAACAAGCTGCTG GGCAAAGTGACCATCGCTCAGGGCGGCGTCCTGCCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCC CAAGAAGACGGAGAGT CAGAAGACGAAGAGCAAATGA
FH-Cter-H2A	ATGTCCGGTCGCGGGAAACAGGGCGGGCAAAGTGCAGCAAAGGCCAAATCCCGCTCCTC CCGCGCGGGCCTGCAGTTCCCGGTGGGCCGAGTGCACAGACTGCTGCGCAAAGGGAACT TACGCGGAGCGAGTGGGCGCCGGGGCGCCGGTGTACCTGGCGGCGGTGTTGGAGTACC TTACGGCGGAGATCCTGGAGCTGGCTGGCAACGCTGCCAGGGATAATAAAAAACCAGG ATAATTCCCCGCCACCTGCAGCTCGCCATCAGGAATGATGAAGAACTGAACAAGCTGCTG GGCAAAGTGACCATCGCTCAGGGCGGCGTCCTGCCCAACATCCAGGCCGTGCTGCTGCC CAAGAAGACGGAGAGC CACCACAAGGCGAAGGGCAAGTAG
FH-H2A	ATGTCTGGGCGTGGCAAGCAGGGAGGCAAAGCTCGCGCCAAGGCCAAGACCCGCTCTTC TCGGGCCGGGCTTCAGTTTCCCGTAGGCCGAGTGCATCGCCTGCTCCGCAAAGGGCAACT ATGCGGAGCGGGTCGGTGCTGGAGCGCCGGTGTACCTGGCGGCGGTGCTGGAGTACCT GACCGCCGAGATCCTGGAGCTGGCTGGCAACGCGGCCCGCGACAATAAGAAGACTCGCA TCATCCGCGTCACCTCCAGCTGGCCATCCGTAACGATGAAGAACTCAACAAGCTTCTGG GCAAAGTGACCATCGCACAGGGTGGCGTCCTGCCCAACATCCAGGCCGTGCTACTGCC AAGAAGACCGAGAGCCACCACAAGGCGAAGGGCAAGTAG

Supplementary Table 1. DNA sequences of synthetic DNA fragments encoding Flag-HA (FH) tagged H2A.J, the indicated H2A.J mutants, and H2A. These fragments were cloned into the AgeI/MluI sites of lentiviral pTRIPz to place the coding sequences under the control of the tet-ON promoter.

ChIP-qPCR primers		
LTR26	for	CGTCAGCTGGTCTGAAGGA
	rev	ATCGTGGAGGGCGAGGGGCT
LTR23	for	GTTCTGACTAGCTGCCTCA
	rev	CTCCGATTAGCAGCAGTTAC
IFI6-promoter	for	GTGCAGAAATAGAAACTCCG
	rev	CTGCTGATAGATGGGCACAG
OAS2-promoter	for	AGGGCAGAGCCTCTGAGCTT
	rev	TGAAGTCTAGAGGCCTCTCT
CXCL8-promoter	for	ATGACTCAGGTTTGCCCTGA
	rev	TGCCTTATGGAGTGCTCCGGT
TYR-promoter	for	GTTTGATGCTGGAGGTGGGA
	rev	CTGGCTAATTGGAGTCACAG

RT-qPCR primers		
IFI6	for	AGCAGCGTCGTCATAGGTAAT
	rev	AGAGGTTCTGGGAGCTGCTG
OAS2	for	TGAACACCATCTGTGACGTCCT
	rev	ACCACTTCGTGAACAGACAGA
CXCL8	for	AGCCTTCCTGATTTCTGCAGCTCT
	rev	AATTTCTGTGTTGGCGCAGTGTGG
IL1B	for	TTCGACACATGGGATAACGAGG
	rev	TTTTTGCTGTGAGTCCCGGAG
GAPDH	for	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG
	rev	GGGGTCATTGATGGCAACAATA

Supplementary Table 2. Sequence of primers used for qPCR.

Sujet 3 : Fonctions physiologiques et organe/tissu/cellule-spécifiques du variant H2A.J

I. Introduction

Avant le début de ce doctorat, il avait été montré par le laboratoire que le variant H2A.J contrôle la dérégulation des gènes du SASP en sénescence induite avec des dommages à l'ADN. Etant donné le lien étroit entre sénescence, inflammation, vieillissement, maladies liées à l'âge et cancer, la question de fonctions physiologiques remplies par le variant H2A.J semble tout à fait légitime.

En collaboration avec le laboratoire de Claudia Rübe, il avait déjà été observé *in vivo* que ce variant s'accumule avec l'âge dans les cellules épidermales chez la souris et chez l'homme, ainsi qu'après irradiation chez de jeunes souris. Cette analyse élargie à d'autres organes chez la souris a également permis de mettre en évidence des différences inter-organes, H2A.J s'accumulant toujours avec l'âge mais de manière plus ou moins marquée. Ces données préliminaires pourraient être la résultante de fonctions autres que celle de contrôle de l'expression du SASP et potentiellement spécifiques de certains organes, tissus ou cellules de l'organisme.

Une part importante de ce travail de doctorat a été dédiée à l'établissement d'un modèle de souris et son étude afin de déterminer les fonctions *in vivo* du variant H2A.J. Je vais donc maintenant vous présenter ce modèle, les stratégies d'analyses mises en œuvre et les premiers résultats obtenus.

II. Le modèle de souris H2AFJ-KO

Dans le but d'étudier les fonctions *in vivo* du variant d'histone H2A.J, un modèle de souris dans lequel le gène H2AFJ est inactivé a été établi. L'inactivation ou knock-out (KO) a été sous-traitée à la société Cyagen et réalisée par injection de TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) dans des ovules fécondés de souris. Les TALENs sont des enzymes de restriction artificielles générées par fusion d'un domaine de liaison à l'ADN, appelé TALE, avec un domaine ayant la capacité de cliver l'ADN. Ces constructions ont donc la capacité de couper l'ADN au niveau d'une séquence spécifique. Dans notre cas, une délétion de sept paires de bases a ainsi été générée au début de la séquence codante de H2AFJ, entraînant un décalage du cadre de lecture et l'existence d'un codon stop prématuré.

```

GCTCTGCTTCCGCGAGCTGATTGGGTACGGTACCTGC
CTGTCACGGGCGGCAGCGGCTGCAGTTTGGCGAGGCA
GTTCCGGGGTGGCGCGCTCGTCCCGGAACTGAGCGA
GCCGGTGTGGAGTTCCAGGCGCGGGTTCGAGCATGT
CCGGGCG. AGGCAAG. CAGGGCGGTAAGGTGCGCGCC
AAGGCCAAGTCGCGCTCGTCGCGCGCGGGCCTGCAGT
TCCCCGTGGGCGCGTTCACCGGCTGCTGCGGAAGGG
CAACTACGCGGAGCGCGTGGGCGCGGGAGCGCCCGTG
TACCTGGCGGCGGTGCTGGAGTACCTTGACGGCCGAGA
TCCTGGAGCTGGCGGGCAACGCGGCGAGGGACAACAA
GAAGACGCGCATCATCCCTCGTCACCTGCAGCTGGCC
ATCCGCAACGACGAGGAGCTCAACAAGCTGCTGGGCC
GTGTGACCATCGCGCAGGGCGGCGTCTGCCCAATAT
CCAGGCCGTGCTGCTGCCCAAGAAGACGGAGAGCCAG
AAGGTGAAGAGCAAGTGAACCCGACAGACGGGTG
    
```

H2AFJ

Séquence ORF (Open Reading Frame)

Délétion dans les souris KO

Codon stop prémature dans les souris KO

Primers

Figure 41 : Séquence du gène H2AFJ et caractéristiques exploitées.

Notre laboratoire a ainsi obtenu trois souris mâles hétérozygotes H2AFJ-WT/KO parfaitement viables et fertiles qui ont été mises en accouplement afin d'obtenir des femelles hétérozygotes H2AFJ-WT/KO (WT : wild type), qui mises en accouplement à leur tour avec les mâles H2AFJ-WT/KO ont permis de constituer de jeunes couples homozygotes H2AFJ-KO/KO (25% des petits obtenus). Une analyse transcriptomique a alors été réalisée sur ces souris. Les résultats se sont alors avérés très étonnants. En effet, H2AFJ, n'était pas le seul gène dont l'expression variait d'une souris à l'autre. Cela indique une hétérogénéité de fond génétique dans la population, ce qui ne devrait pas être le cas au sein d'une lignée de souris. En contactant l'entreprise sous-traitante, ce mystère a pu être résolu : une confusion avait eu lieu concernant la souche de souris, les trois mâles initiaux étant des C57BL/6N et non des C57BL/6J.

Notamment, les C57BL/6J possèdent une mutation au niveau du gène Nnt (Nicotinamide nucleotide transhydrogenase) localisé sur le chromosome 13. Ce gène code pour une protéine mitochondriale impliquée dans le métabolisme des cellules β . Les souris C57BL/6J ont alors une espérance de vie normale mais sont plus sensibles au stress oxydatif et, mises sous régime high fat, elles prennent beaucoup plus de poids et développent une résistance à l'insuline ainsi qu'une baisse de tolérance au glucose.

Ces différences métaboliques pourraient entraîner des biais dans les résultats expérimentaux. Nous avons alors décidé de tirer parti de cette situation. Au cours des

deux premières années de doctorat, cinq rétrocroisements ont été réalisés afin d'obtenir deux souches homogènes : C57BL/6N H2AFJ-KO/KO et C57BL/6J H2AFJ-KO/KO.

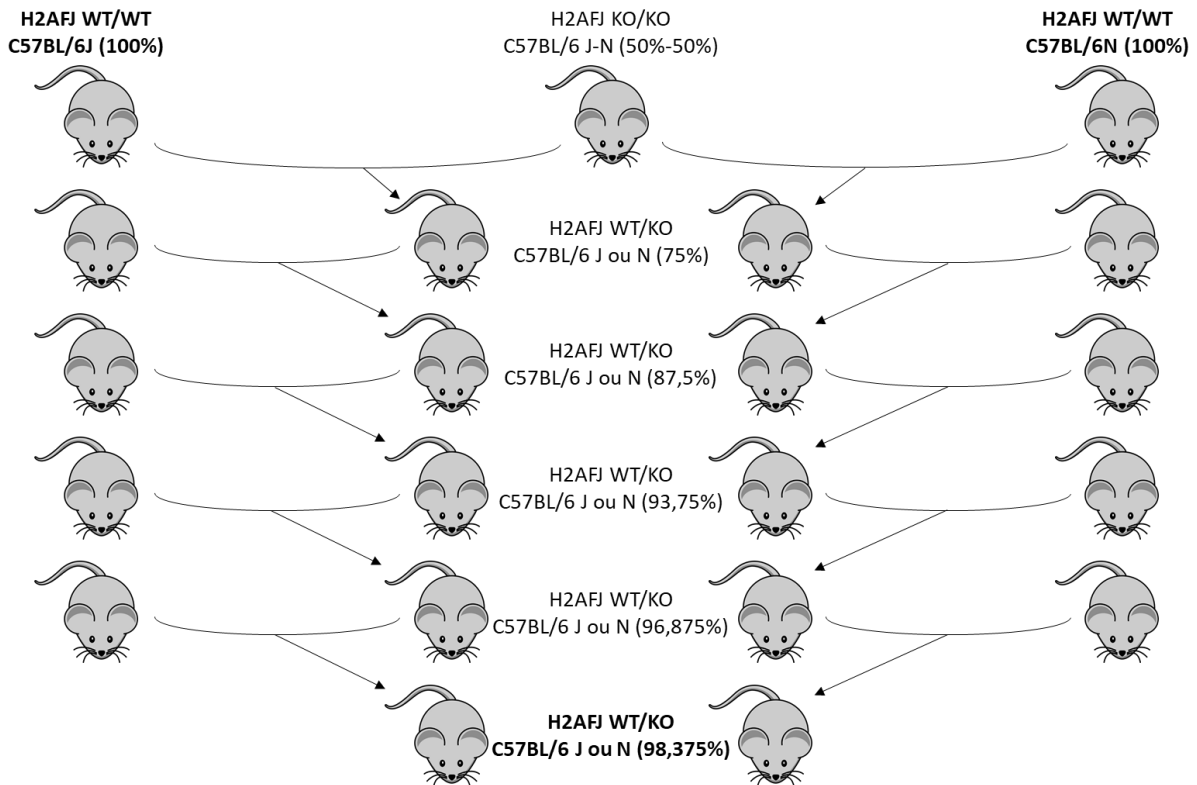


Figure 42 : Rétrocroisements et proximités génétiques théoriques.

Un rétrocroisement consiste en l'accouplement d'un souris hybride avec un individu WT ayant l'identité génétique ciblée. La détermination des individus hétérozygotes WT/KO à chaque génération a été réalisée par génotypage sur gel d'agarose avec une confirmation par séquençage. Le protocole de génotypage est basé sur le kit Bioutil Mouse Direct PCR Kit fournissant un mix de digestion pour l'extraction d'ADN génomique (à partir de bouts de queue dans notre cas) ainsi qu'un mix d'amplification PCR. Les primers utilisés lors de la PCR fournissent deux produits suivant la présence ou l'absence de la séquence délétée. Trois cas de figure sont donc possibles sur gel d'agarose : une seule bande correspondant à une séquence courte pour les souris KO/KO, une bande correspondant à une séquence plus longue pour les souris WT/WT ou les deux bandes pour les souris hétérozygotes WT/KO. Néanmoins, la différence de migration électrophorétique reste subtile. Cette étape a donc fait l'objet d'une optimisation afin d'améliorer la résolution et tous les résultats obtenus ont été confirmés par séquençage.

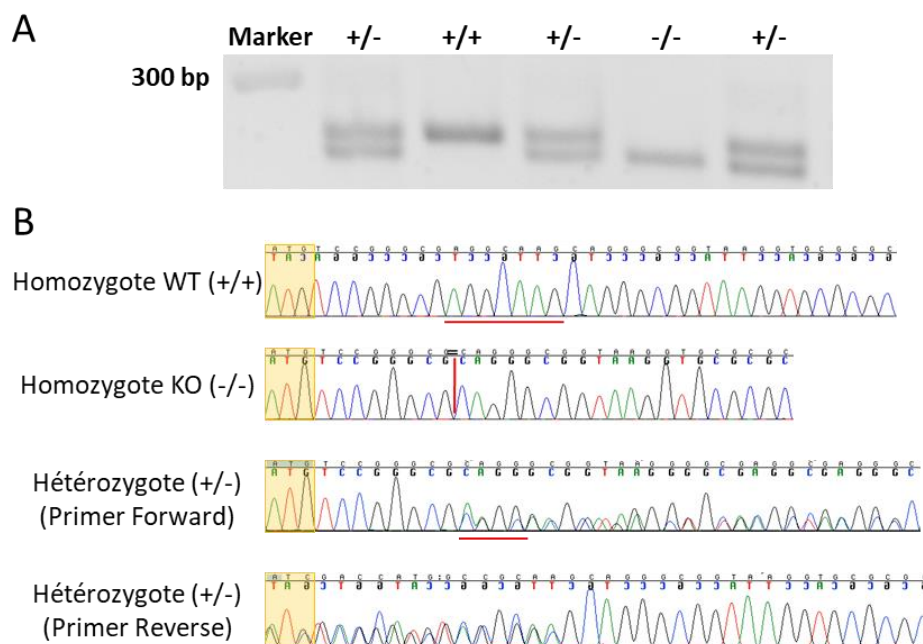


Figure 43 : Exemples de données de génotypage (A) et de séquençage (B) des souris.
 Pour le génotypage, les produits d'amplification PCR sont séparés sur gel d'agarose 3% en tampon SB 1X (SB 20X : 8g de soude + 45g d'acide borique + eau pour 1L) avec une migration à 200V pendant 60 minutes.

Au bout de cinq rétrocroisements, une évaluation globale de la proximité génétique de nos souris avec les souches « pures » C57BL/6J et C57BL/6N a été réalisée via une analyse des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) afin de confirmer l'homogénéité des deux modèles établis.

Souris	C57BL/6N	C57BL/6J
Inconnu 1	1.35%	98.65%
Inconnu 2	1.01%	98.99%
Inconnu 3	1.01%	98.99%
Inconnu 4	1.69%	98.31%
Inconnu 5	1.35%	98.65%
Inconnu 6	1.35%	98.65%
Inconnu 7	1.01%	98.99%
Inconnu 8	1.35%	98.65%
Inconnu 9	2.04%	97.96%
Inconnu 10	1.69%	98.31%
C57BL/6J	0.00%	100.00%
C57BL/6N	100.00%	0.00%
Hétérozygote	50.00%	50.00%

Tableau 2 : Proximité des souris issues du 5^{ème} rétrocroisement C57BL/6J avec les fonds génétiques de départ.

III. Stratégies d'analyses

A. Spécificités de localisation de H2A.J

Les spécificités de localisation tissulaire de H2A.J ont été étudiées par immunohistochimie en collaboration avec Christophe Redon (NCI/NIH, USA) pour l'étude chez l'homme et Claudia Rübe pour l'étude chez la souris.

B. H2A.J et sénescence/vieillesse/inflammation

1. Etude de longévité

Une étude de longévité comparative sur le modèle C57BL/6N a été mise en place et est toujours en cours. Ce travail majeur permettra d'évaluer les incidences de la présence ou absence du variant H2A.J sur l'espérance de vie et l'espérance de vie en bonne santé (prévalence de cancers, déclin de force et d'endurance avec l'âge, etc.). A cette fin, 40 souris ont été prévues pour chaque groupe (femelle WT, mâle WT, femelle KO, mâle KO), soit un total de 160 souris. En parallèle, d'autres souris du même modèle sont actuellement élevées dans le but d'une analyse complète à différents points : 6 mois, 12 mois et 18 mois. A ces moments, 5 souris de chaque groupe sont sacrifiées et on récupère leur sang pour une formulation sanguine et un dosage des cytokines circulantes ainsi que certains organes (foie, rein et peau sont initialement prévus) pour des analyses transcriptomiques. De plus, l'ensemble de ces souris est pesé tous les 3 mois afin d'assurer un suivi régulier.

2. Régime high fat

Une autre stratégie d'étude de l'implication du variant H2A.J dans le vieillissement et l'inflammation a été explorée. Elle est basée sur la mise sous régime high fat de souris C57BL/6J WT et KO. Chez l'homme, l'obésité est associée avec une plus faible espérance de vie et de nombreuses complications pathologiques telles que le diabète de type II, des maladies cardiovasculaires, des maladies neurodégénératives, des pathologies hépatiques, une infertilité et de nombreux cancers (Minamino et al., 2009). Ces complications sont principalement le fruit de dérèglements métaboliques causant des dérèglements hormonaux et une inflammation chronique. L'obésité induite par régime high fat chez la souris est caractérisée par des changements très similaires à ceux observés chez l'homme ce qui en fait un modèle pertinent. En particulier, les souris C57BL/6 ont une prise de poids importante sous ce régime (Winzell et al., 2004, 2007) et celles de la souche J, via la mutation nulle du gène Nnt, sont davantage susceptibles de développer des caractéristiques du diabète : intolérance au glucose, résistance à l'insuline, hyperglycémie, stéatose hépatique (foie gras) (M. M. Simon et al., 2013). De plus, il a été montré que des cellules sénescents s'accumulent dans le tissu adipeux de souris sous régime high fat (Minamino et al., 2009; Tchkonina et al., 2010) et que leur élimination par l'utilisation de sénolytiques permet de réduire les dysfonctions métaboliques induites par l'obésité (Palmer et al., 2019).

Dans un premier temps, 5 souris de chaque groupe ont été mises sous régime high fat (Référence produit : Research Diets D12492) à l'âge de 4 semaines et ont été pesées

chaque semaine à la même heure afin d'obtenir un suivi de poids. Il a été observé une prise de poids plus importante chez les mâles, permettant une meilleure distinction entre les souris WT et KO. De plus, cette prise de poids s'est avérée largement ralentir au bout de 15-16 semaines de régime. Une réitération de l'expérience a donc été décidée sur deux cohortes : l'une constituée de mâles et de femelles et l'autre de mâles uniquement afin de gagner en puissance statistique. Une analyse poussée à 15-16 semaines a été prévue sur ces deux cohortes en collaboration avec l'équipe de Geneviève Derumeaux (Hôpital Henri Mondor-Créteil) : tests de tolérance au glucose et à l'insuline, échographie cardiaque, pesée des organes et tissus adipeux, formulation sanguine, dosage des cytokines circulantes et sécrétées par certains tissus, etc. Finalement, cette analyse poussée a été réalisée à environ 40 semaines de régime à cause de la crise sanitaire de 2020.

C. Autres fonctions de H2A.J

Nous avons également été contacté par Michael Bulger (Université de Rochester, USA) pour un projet collaboratif. Son équipe avait en effet des données préliminaires *in vitro* suggérant l'implication de H2A.J dans l'érythropoïèse.

L'érythropoïèse est l'ensemble des processus de production des érythrocytes ou globules rouges à partir de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes. Elle a lieu dans la moelle osseuse rouge et est stimulée par la vitamine B12 et l'érythropoïétine (EPO), un facteur de croissance dont la production est stimulée par une baisse d'oxygène. L'érythropoïèse fait partie d'un phénomène plus large appelé hématopoïèse qui est le processus de production des cellules sanguines et des éléments associés.

Afin d'explorer la piste d'une implication de H2A.J dans l'érythropoïèse, nous avons élaboré un plan d'analyses préliminaires basé sur différentes études comparatives entre de jeunes souris de 3-4 mois C57BL/6N homozygotes WT et KO :

- Une formulation sanguine ainsi qu'un test EPO-ELISA : une formulation sanguine consiste en une numération des populations cellulaires en présence et une mesure d'autres paramètres biochimiques associés. Le test EPO-ELISA, réalisé sur le sérum, permet un dosage de l'érythropoïétine.
- Un test de réponse à la phénylhydrazine : la phénylhydrazine est capable de détruire les érythrocytes. Un suivi de repopulation par formulation sanguine permet une évaluation de l'érythropoïèse.
- Un bilan des précurseurs érythroïdes dans la moelle osseuse afin d'identifier la ou les éventuelles étapes dans lesquelles H2A.J jouerait un rôle.

IV. Résultats et discussions

A. Spécificités de localisation de H2A.J

La localisation tissulaire de H2A.J a été étudiée par immunohistochimie dans un large panel d'organes chez l'homme et chez la souris.

Tout d'abord, nous pouvons observer une expression très particulière de H2A.J dans les testicules. Les testicules appartiennent à l'appareil reproducteur mâle et remplissent deux fonctions : la spermatogenèse (production des spermatozoïdes) et la stéroïdogénèse (production hormonale). La spermatogenèse en particulier a lieu dans les tubes séminifères et englobe l'ensemble du processus de différenciation des spermatogonies en spermatozoïdes en passant par les stades de spermatocytes et spermatides. La spermatogenèse s'effectue de manière centripète de telle sorte que les spermatozoïdes soient finalement libérés dans la lumière au centre des tubes séminifères.

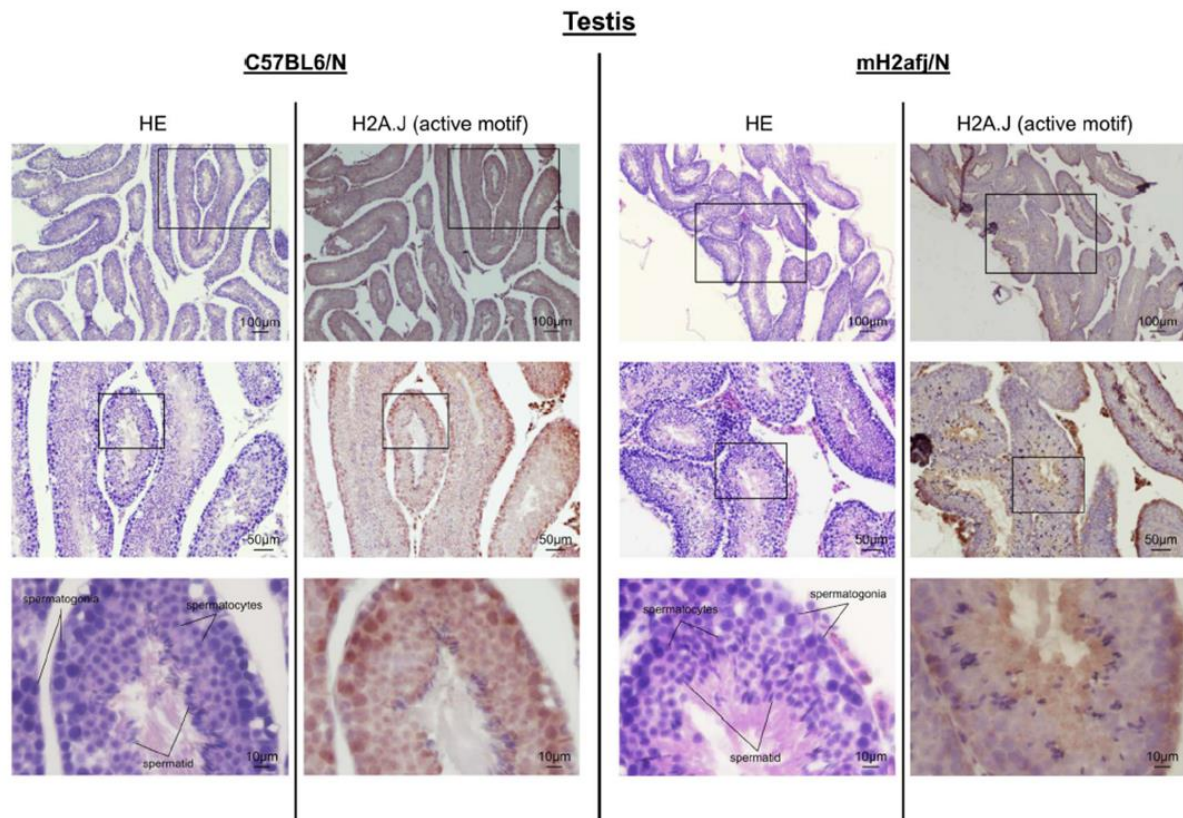


Figure 44 : Expression de H2A.J dans les testicules.

Coloration Hématoxyline/Eosine (HE) et expression de H2A.J par immunohistochimie dans des coupes de testicules de souris WT (à gauche) ou H2AFJ-KO (à droite). Données de Claudia Rübe.

Le variant H2A.J semble fortement exprimé dans les spermatogonies. Pour autant, aucune différence de fertilité n'a pu être observée entre les souris WT et KO. Cela laisse penser qu'une certaine compensation de la perte de H2A.J par H2A canonique ou d'autres variants pourrait être possible. Un tel phénomène de compensation a d'ailleurs été décrit dans les testicules lors de la déplétion du variant TH2B (Montellier et al., 2013).

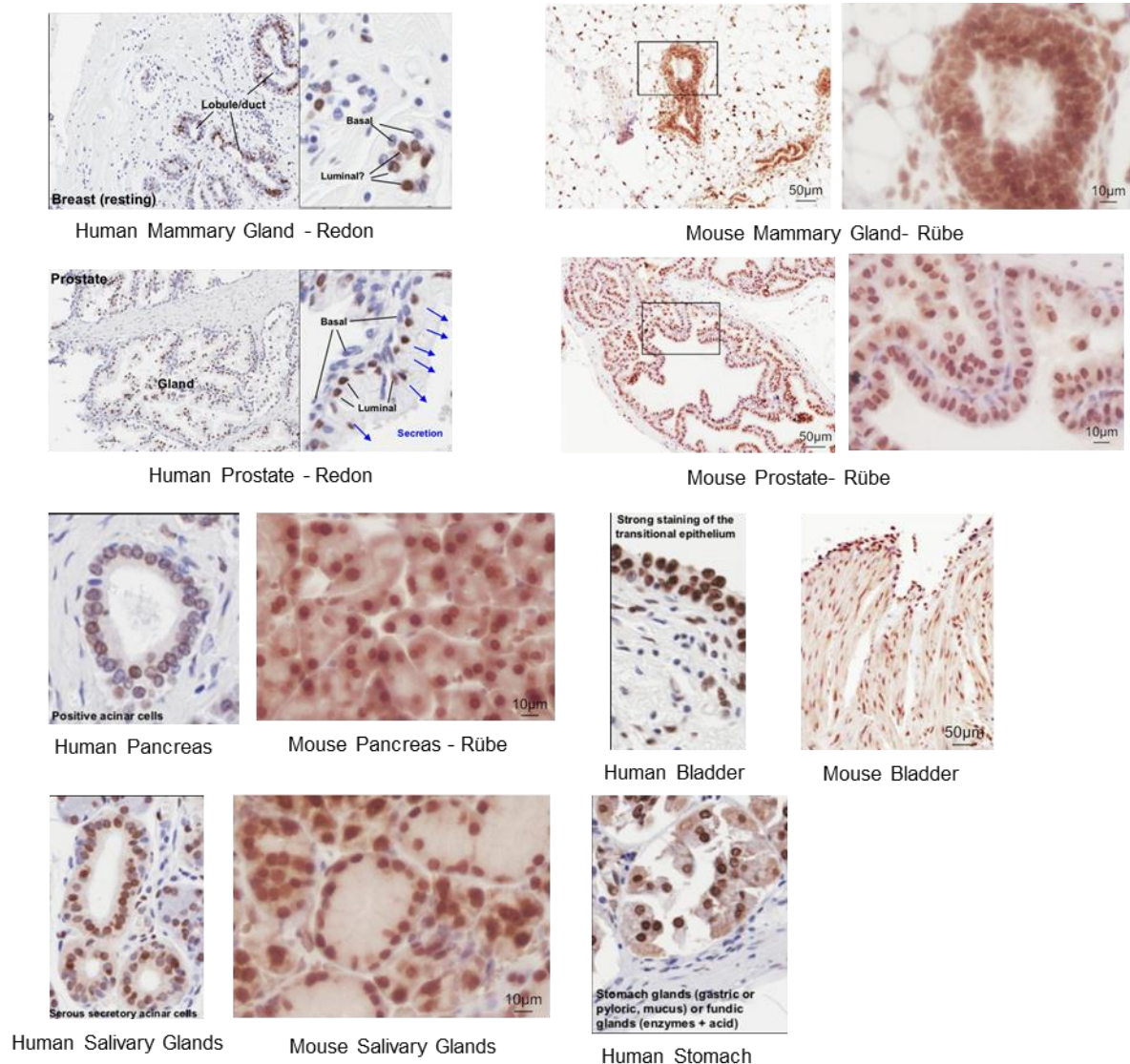


Figure 45 : Localisation tissulaire de H2A.J chez l'homme et la souris par immunohistochimie.

Données de Christophe Redon et Claudia Rübe.

Il est également possible de constater que l'expression de H2A.J est particulièrement forte au niveau des cellules épithéliales luminales de nombreuses glandes et de nombreux organes ayant des fonctions sécrétoires tels que les seins, la prostate, le pancréas, etc.

Dans la littérature, H2A.J est principalement décrit comme un régulateur du phénotype sécrétoire pro-inflammatoire en sénescence. Les données de localisation tissulaire invitent à la réflexion. En effet, le rôle du variant d'histone H2A.J pourrait-il être élargi à celui de régulateur de la sécrétion cellulaire ?

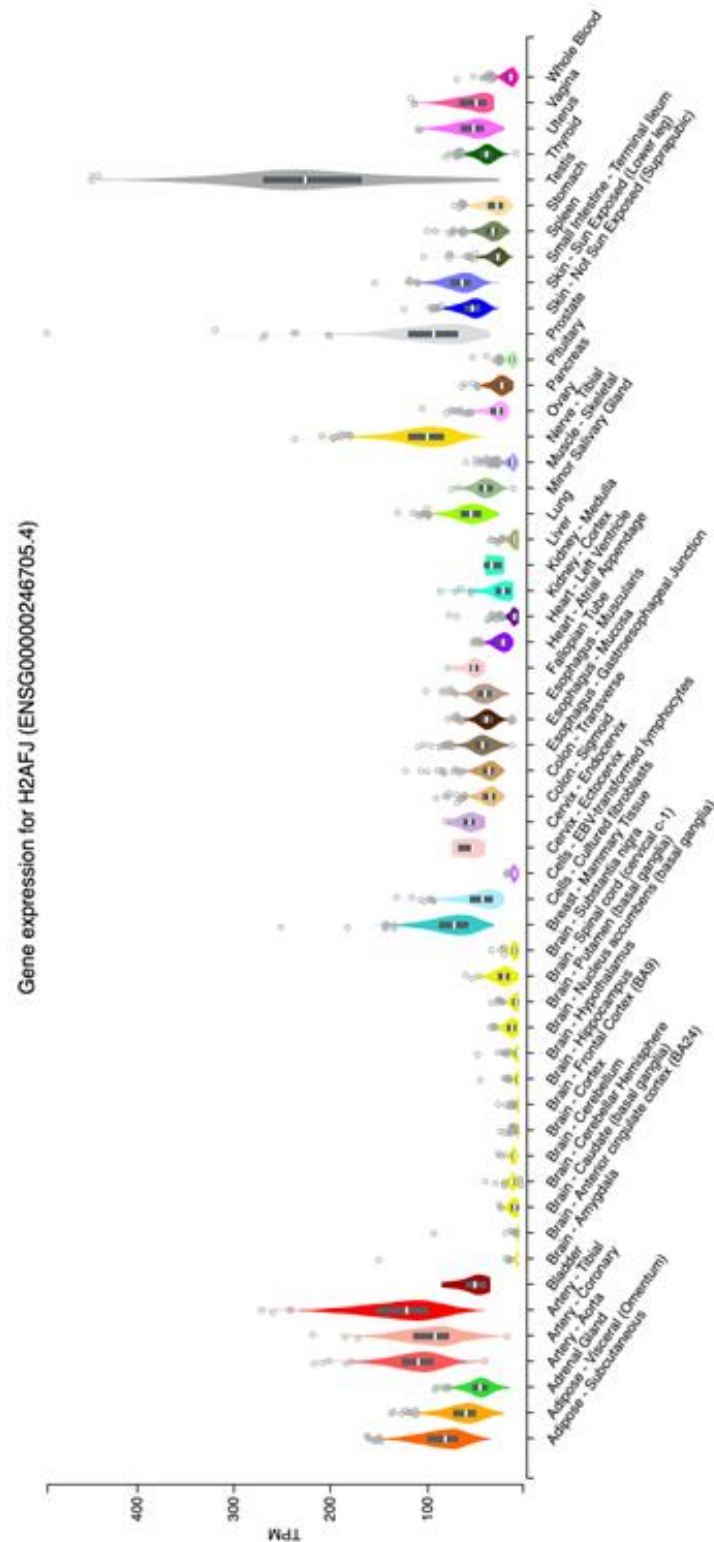


Figure 46 : Expression tissulaire du gène H2AFJ.

Données provenant de la base de données du projet GTEx (Genotype-Tissue Expression).

Les résultats d'immunohistochimie ont ensuite été comparés avec l'expression du gène H2AFJ à l'aide de bases de données transcriptomiques. Il est alors intéressant de voir que le gène H2AFJ est plus fortement exprimé dans les testicules ainsi que les organes ayant des fonctions sécrétoires comme les seins et la prostate.

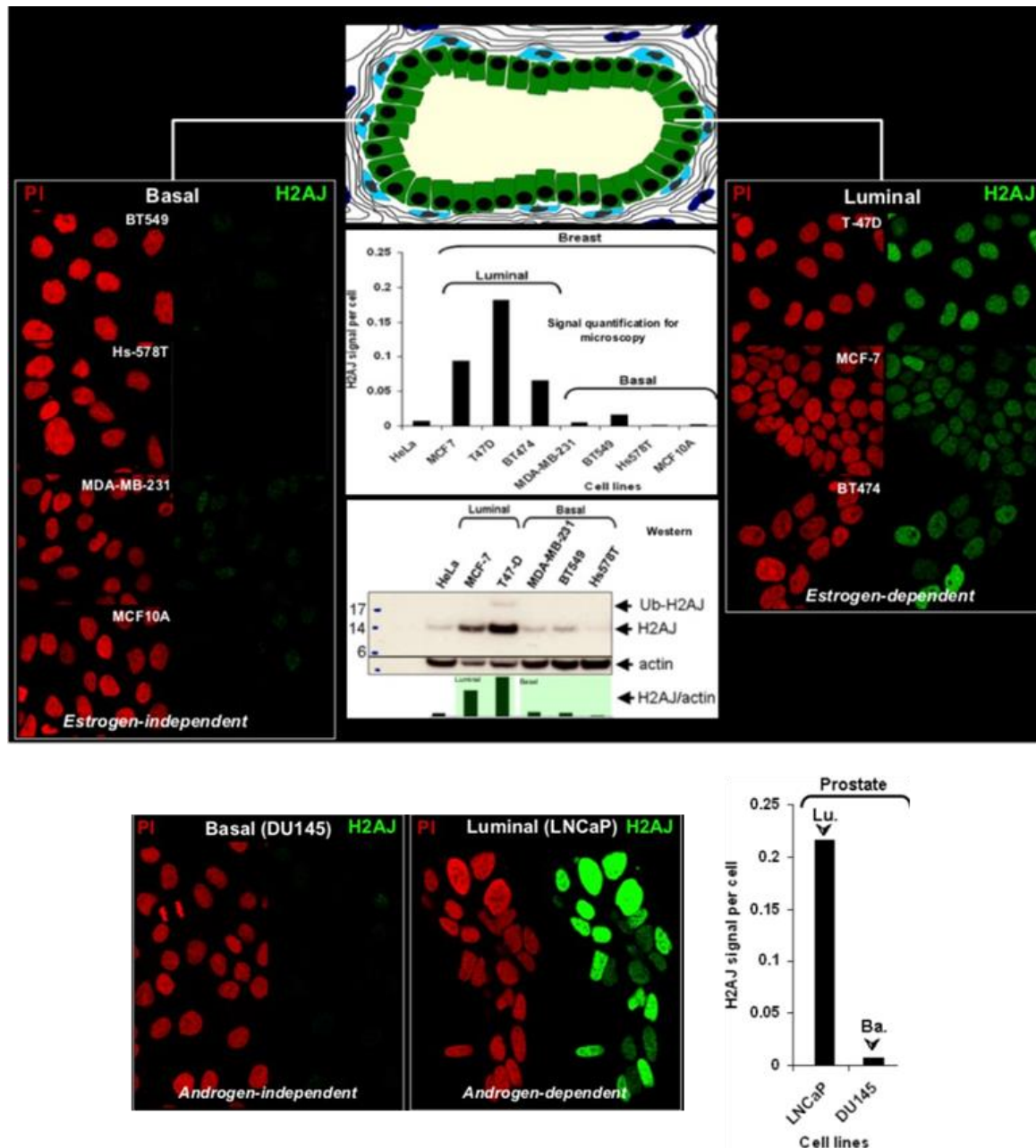


Figure 47 : Expression de H2A.J dans des lignées lumineales et basales de cancer du sein et de la prostate par immunofluorescence et Western Blot.

Données de Christophe Redon.

L'expression différentielle de H2A.J dans les cellules lumineales et basales a ensuite été vérifiée dans des lignées de cellules de cancer du sein et de la prostate. Il est intéressant de noter que, dans le panel de lignées cellulaires de cancer du sein testé, les T47D sont celles ayant la plus forte expression de H2A.J en prolifération.

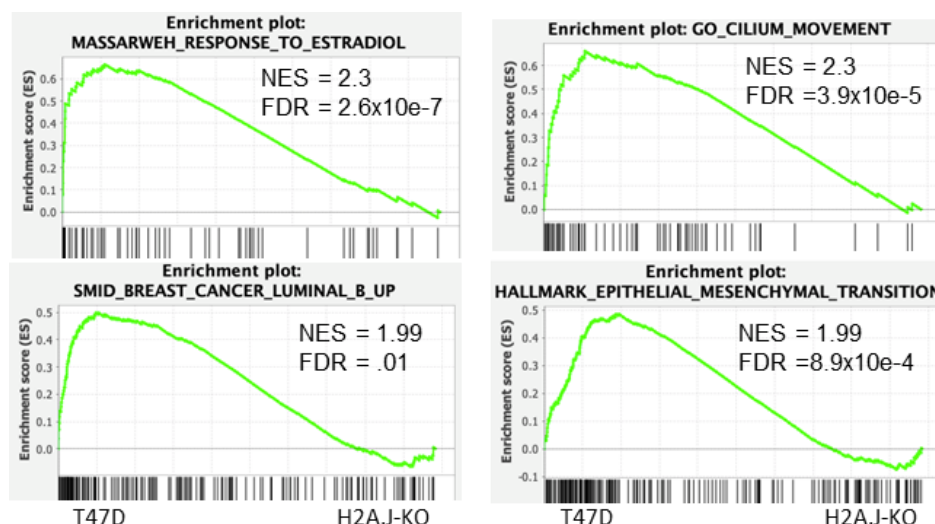


Figure 48 : Graphiques d'analyse GSEA dans les T47D parentales vs H2A.J-KO.

Ces cellules épithéliales mammaires ont donc été choisies pour l'établissement d'un modèle de déplétion de H2A.J en utilisant la technologie CrispR/Cas9. Une analyse transcriptomique a ensuite été réalisée dans les T47D parentales et deux lignées H2A.J-KO indépendantes en prolifération. Elle a permis de montrer que les gènes plus exprimés dans la lignée parentale sont enrichis en gènes régulés par l'œstrogène, en gènes enrichis dans des contextes de cancer du sein luminal de type B ainsi qu'en gènes impliqués dans la métastase cancéreuse. Ces résultats suggèrent que H2A.J favorise la réponse à l'œstrogène dans des cellules épithéliales mammaires et que ce variant d'histone pourrait être un biomarqueur de cancer du sein luminal de type B ainsi que de prédiction de métastase.

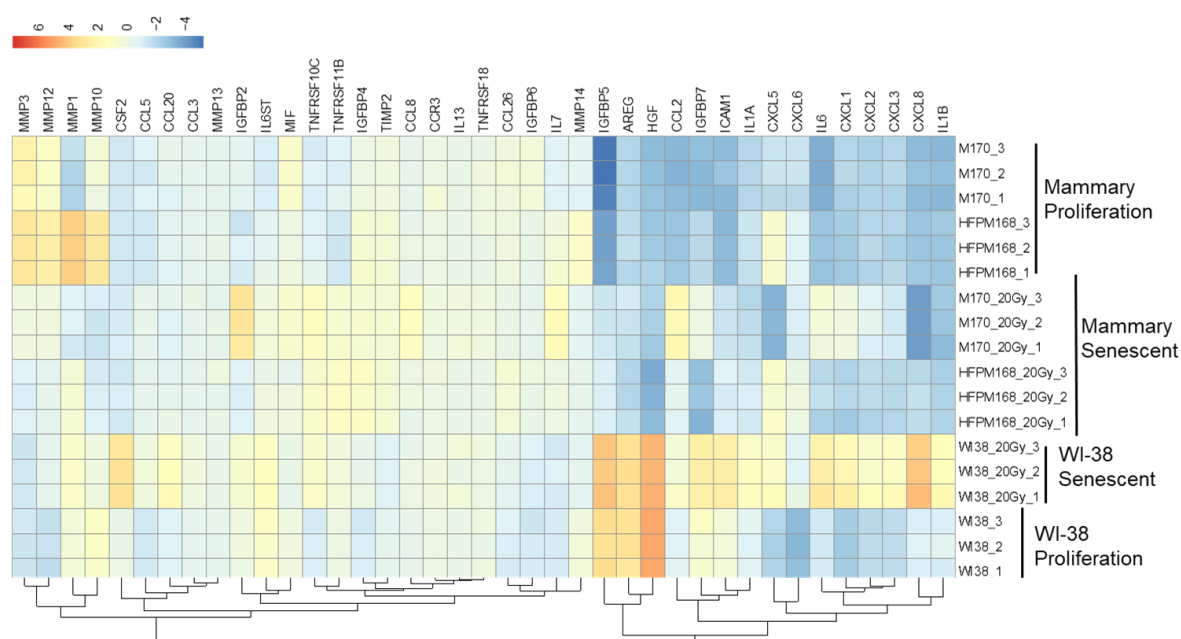


Figure 49 : Heat map des données transcriptomiques des WI38, HFP168 et HFP170 en prolifération et en sénescence concernant les facteurs du SASP.

Notre équipe a également obtenu auprès de Michèle Martin (CEA-Evry) des fibroblastes humains issus de plastie mammaire HFPM168 et HFPM170. Une analyse transcriptomique a été réalisée sur ces cellules en même temps que sur des WI38 dans des conditions de prolifération et de sénescence induite par irradiation 20Gy (analyse 10 jours post-irradiation). Une particularité des HFPM168 et 170 est alors apparue : ces deux lignées expriment un SASP fortement atténué en sénescence induite par des dommages à l'ADN. L'expression de H2A.J a donc été vérifiée par immunofluorescence dans les HFPM168. Il est alors possible de constater son absence d'accumulation en sénescence.

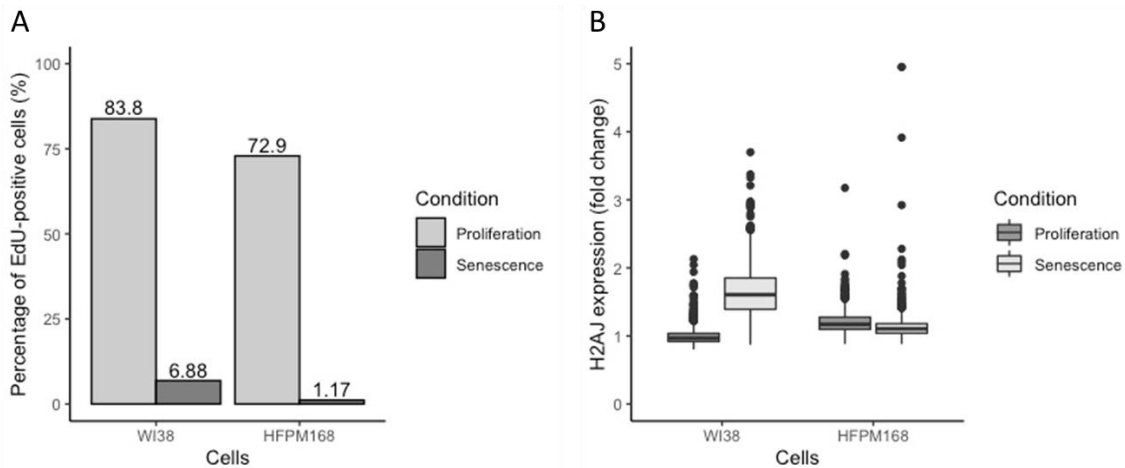


Figure 50 : Evaluation de l'arrêt prolifératif (A) et de l'expression de H2A.J (B) dans des WI38 et HFPM168 en prolifération et en sénescence induite par irradiation à 20 Gy - 10 jours.

Ainsi, les T47D, exprimant fortement H2A.J en l'absence de stress, et les HFPM168 et 170, exprimant un SASP atténué et dans lesquelles H2A.J ne s'accumule pas en sénescence induite par des dommages à l'ADN, constituent des modèles d'étude fonctionnelle de H2A.J très intéressants.

B. Etudes physiologiques

1. Etude de longévité

Au moment de l'écriture de cette thèse, les souris de la cohorte de longévité sont âgées d'un peu moins de 1 an et demi. Aucun impact de la délétion de H2A.J n'est alors observable sur la longévité des souris.

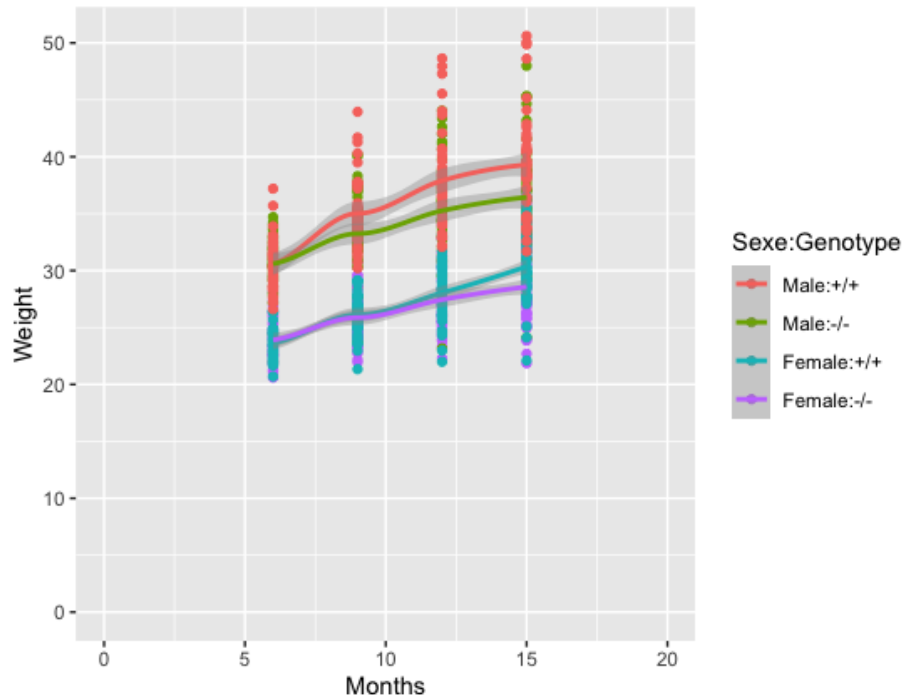


Figure 51 : Courbes de suivi de poids des souris de la cohorte de longévité.

Une pesée de ces souris tous les 3 mois a néanmoins mis en évidence une particularité des souris H2A.J-KO (-/-) : elles prennent moins de poids avec l'âge que les souris WT (+/+).

Cette première observation peut notamment être comparée aux résultats obtenus avec les souris mises sous régime high fat. Bien entendu, le modèle d'induction de la prise de poids est alors différent. Il devrait nous permettre d'obtenir un phénotype plus marqué et se développant plus rapidement.

2. Etude de l'obésité

a) Suivi de prise de poids

Il est intéressant de constater qu'à l'instar de la prise de poids avec l'âge, la prise de poids des souris mises sous régime high fat est plus faible chez les mâles KO par rapport aux mâles WT, et ce de manière reproductible. Chez les femelles en revanche, les résultats obtenus varient d'un réplicat à l'autre et ne nous permettent donc pas d'établir de conclusion claire quant à l'impact de la délétion de H2A.J sur la prise de poids. Nous pouvons expliquer cette difficulté d'interprétation des données chez les femelles par une plus grande variabilité inter-individuelle.

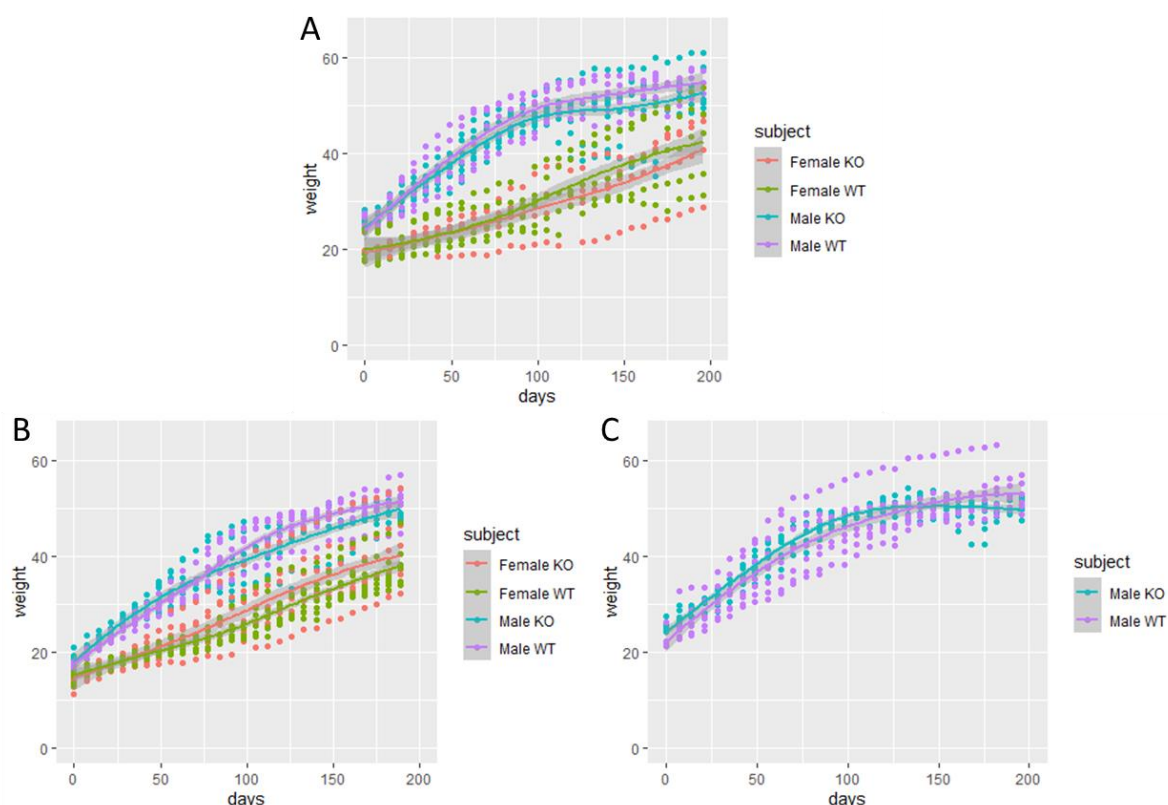


Figure 52 : Courbes de suivi de poids des souris des cohortes high fat.
 (A) Courbes de suivi de poids de la cohorte « test ». (B) Courbes de suivi de poids de la cohorte 1.
 (C) Courbes de suivi de poids de la cohorte 2.

Ainsi, H2A.J jouerait un rôle dans la prise de poids. La déplétion de ce variant entraînerait une prise de poids moins importante chez des souris, que ce soit avec l'âge ou en réponse à un régime high fat.

b) Etudes métaboliques

Un régime high fat, riche en acides gras, entraîne une perturbation du métabolisme du glucose et de l'insuline. Les acides gras servent de substrat à la production d'énergie et de précurseurs pour la synthèse de dérivés lipidiques impliqués dans des fonctions structurales, de signalisation cellulaire et de stockage de l'énergie. Malgré l'importance physiologique des acides gras, un surplus est toxique. Pour l'éviter, ils peuvent être métabolisés et stockés dans les adipocytes des tissus adipeux via la lipogenèse. La principale hormone stimulatrice de la lipogenèse est l'insuline. Or, cette dernière est également impliquée dans l'entrée de glucose dans les cellules β et les adipocytes où elle stimule la glycolyse. Ainsi, une activité accrue du métabolisme des lipides induite par un régime high fat induit également une activité accrue du métabolisme du glucose et donc, à terme, un épuisement des cellules β et une résistance à l'insuline (Parhofer, 2015).

Des études métaboliques ont donc été réalisées en collaboration avec l'équipe de Geneviève Derumeaux sur les cohortes high fat 1 et 2. Tout d'abord, des tests de tolérance à l'insuline puis, une semaine après, au glucose ont été réalisés par injection de

0,3UI/kg d'Umuline ou 1,5g/kg de glucose en intrapéritonéal dans les souris à jeun depuis 6 heures puis suivi cinétique de la glycémie par prélèvement en bout de queue.

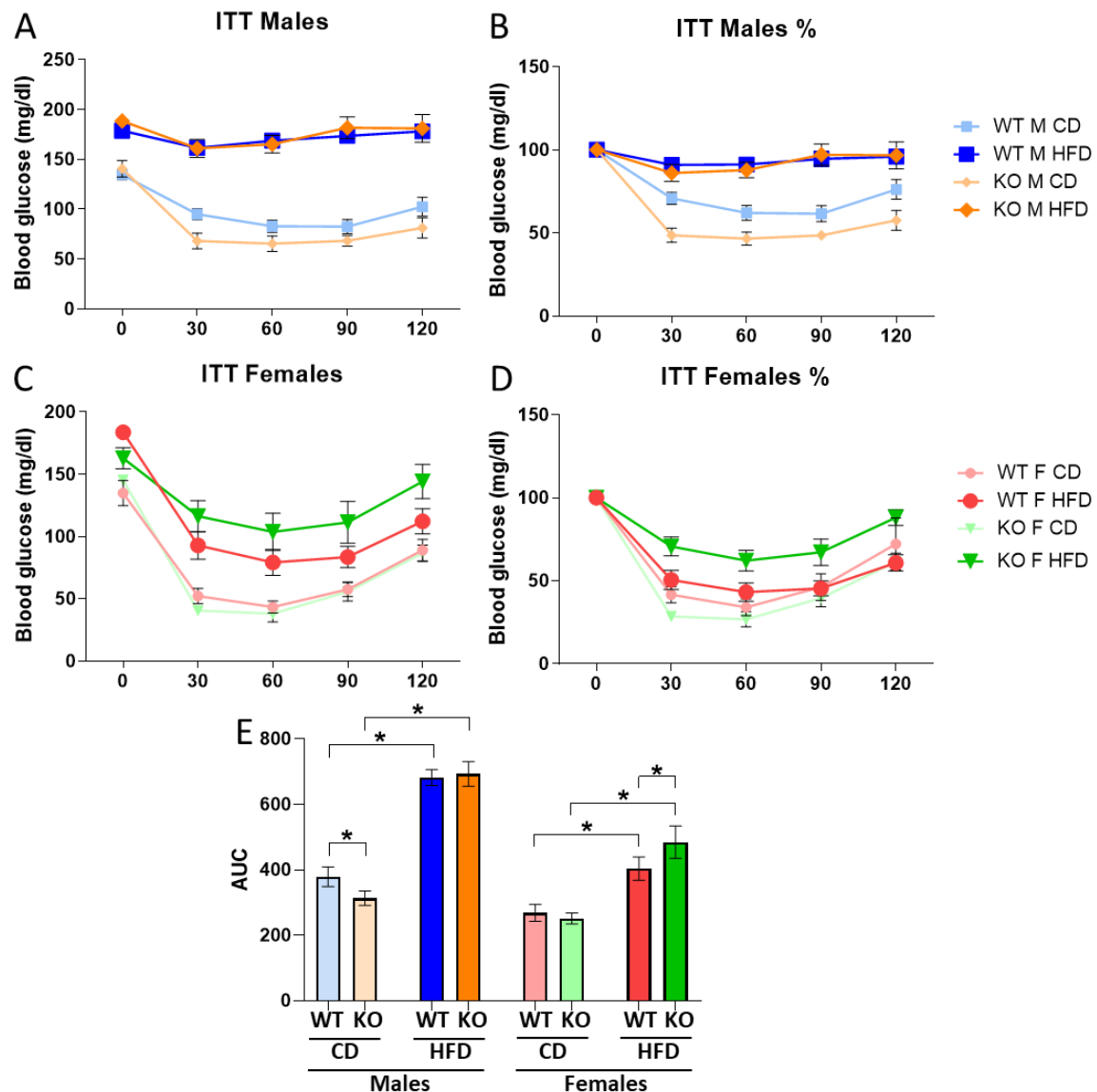


Figure 53 : Test de tolérance à l'insuline.

(A & B) Suivi cinétique de la glycémie en valeurs réelles et en pourcentages de glycémie avant injection d'insuline chez les mâles. (C & D) Suivi cinétique de la glycémie en valeurs réelles et en pourcentages de glycémie avant injection d'insuline chez les femelles. (E) Histogramme des aires sous courbes de glycémie en valeurs réelles. F : Females ; M : Males ; CD : Control Diet ; HFD : High Fat Diet ; * : $P < 0,5$.

Le test de tolérance à l'insuline montre comme attendu une diminution très significative de la réponse (et donc sensibilité) à l'insuline des souris mises sous régime high fat par rapport à celles sous régime contrôle. Pour ce qui est de l'effet du génotype, on peut observer une plus forte sensibilité des mâles KO par rapport aux WT sous régime contrôle. Cette différence disparaît en régime high fat. Dans cette dernière condition, on peut voir que la réponse à l'insuline des souris est très faible. La très forte résistance

à l'insuline très probablement engendrée par la longue période de régime high fat cache les effets possibles du génotype. La répétition de cette expérience chez des mâles plus jeunes et mis sous régime high fat moins longtemps pourrait favoriser l'observation d'un effet du génotype en régime high fat. Chez les femelles aucune différence significative due au génotype n'est observable en régime contrôle. En régime high fat en revanche, les femelles KO semblent moins sensibles à l'insuline que les femelles WT. Néanmoins, les écarts importants de poids entre ces souris pourraient entraîner un biais à l'origine de ce résultat.

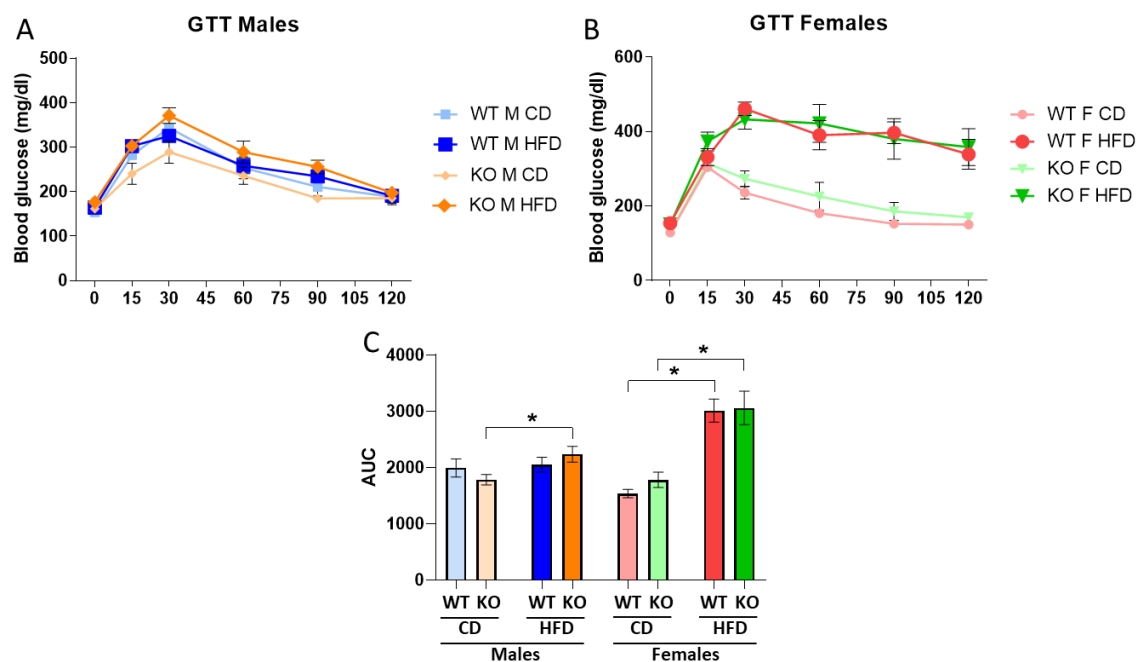


Figure 54 : Test de tolérance au glucose.

Suivi cinétique de la glycémie chez les mâles (A) et chez les femelles (B). (C) Histogramme des aires sous courbes de glycémie. F : Femelles ; M : Males ; CD : Control Diet ; HFD : High Fat Diet ; * : $P < 0,5$.

Le test de tolérance au glucose montre également un effet net du régime sur la réponse à une injection de glucose chez les femelles : celles sous régime high fat ont une glycémie augmentant fortement après injection et redescendant plus lentement ensuite. Chez les mâles, cet effet est très peu marqué. Il a été montré que l'âge est un facteur affectant fortement le métabolisme du glucose (Ternacle et al., 2017). Or, cette analyse a été réalisée chez des souris âgées d'environ 9 mois. Nous pouvons donc supposer que l'effet de l'âge entraîne un biais dans l'analyse de ce test.

Ainsi, les tests métaboliques laissent penser que la déplétion de H2A.J atténue les dysfonctions métaboliques apparaissant avec l'âge et un régime high fat. Cette première impression devra être confirmée chez des souris plus jeunes et mises sous régime high fat moins longtemps.

c) Récupération de matériel biologique et préparation d'échantillons

En parallèle des tests métaboliques, une échographie cardiaque a été réalisée chez les mâles. Une semaine après l'ensemble de ces analyses sur souris vivantes, ces dernières ont été disséquées. Après anesthésie, du sang a été prélevé au niveau de la veine cave pour une analyse des cytokines circulantes, une formulation sanguine et d'autres dosages. La majorité des organes ainsi que des tissus adipeux a été récupérée, pesée et séparée en deux pour des analyses histologiques et transcriptomiques. Des explants ont également été réalisés avec l'atrium et le tissu adipeux épидидymal (chez les mâles) ou gonadal (chez les femelles) afin d'analyser leur sécrétome sur 24h. Les données sont à ce jour disponibles pour deux de ces analyses : le poids des organes et les formulations sanguines.

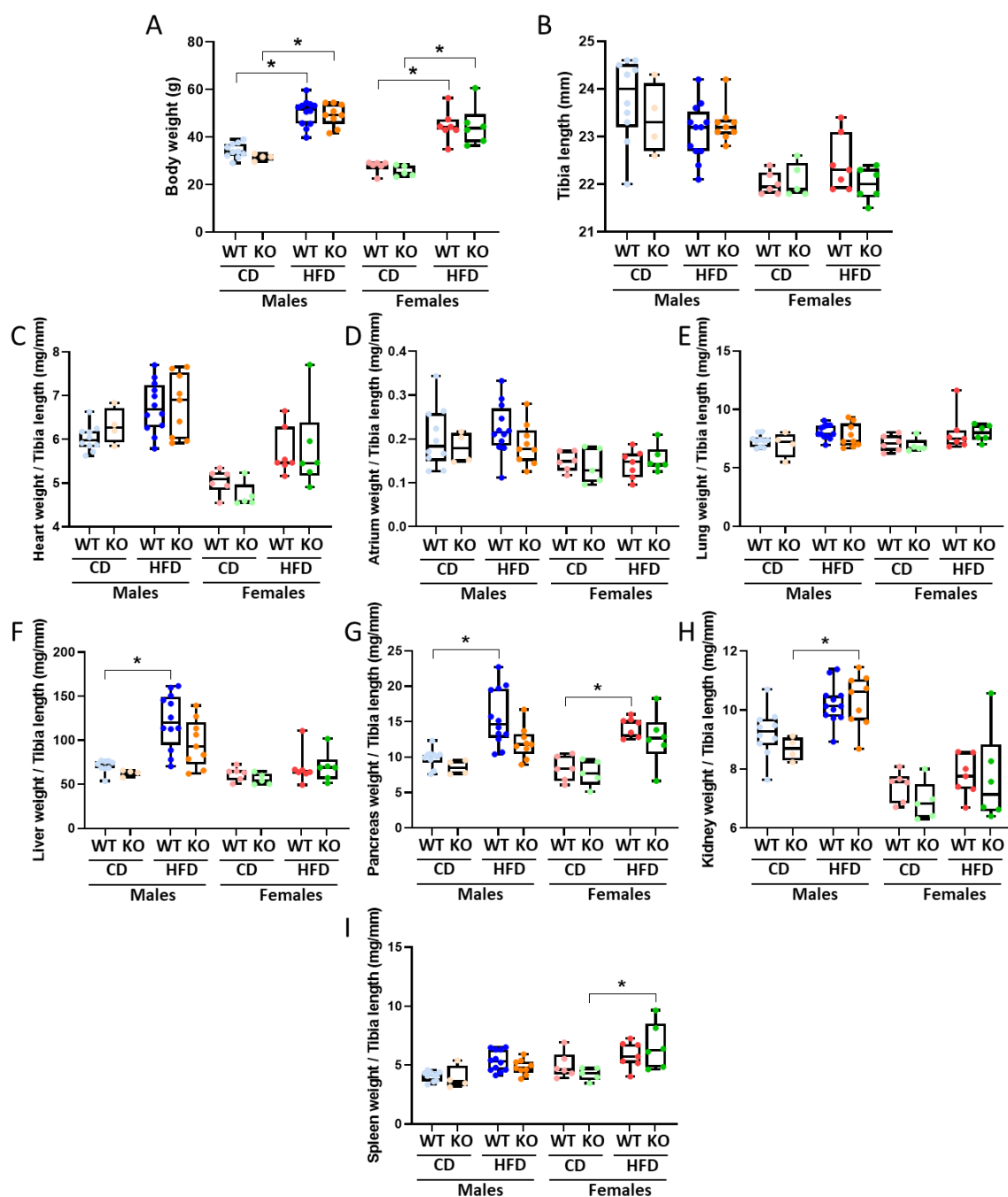


Figure 55 : Poids des organes des souris des cohortes high fat 1 & 2.

(A) Poids des souris le jour de la dissection. (B) Longueur de tibia. (C-I) Poids normalisés du cœur, de l'atrium, des poumons, du foie, du pancréas, d'un rein et de la rate. CD : Control Diet ; HFD : High Fat Diet ; * : $P < 0,5$.

En premier lieu, nous pouvons souligner que le poids corporel a bien été augmenté par le régime high fat chez les deux sexes. Pour l'analyse comparative de poids d'organes entre les différents groupes de souris, la longueur du tibia de la patte droite a été utilisée comme paramètre de normalisation.

d) Etude des fonctions cardiaques

Le poids de certains organes peut varier en cas de dysfonction cardiaque. En effet, il est notamment décrit dans la littérature qu'un régime high fat entraîne une hypertrophie de la paroi cardiaque ainsi qu'une dilatation de la cavité cardiaque (Raheer et al., 2008; Ternacle et al., 2017). De plus, une dysfonction cardiaque provoque une stase du sang dans les poumons et un œdème pulmonaire. Dans notre cas, on ne peut observer aucune différence significative concernant les poids du cœur, de l'atrium et des poumons, que ce soit en fonction du régime ou du génotype. Une tendance semble toutefois se dessiner. Les souris sous régime high fat possèdent un cœur et des poumons légèrement plus lourds que les souris sous régime contrôle.

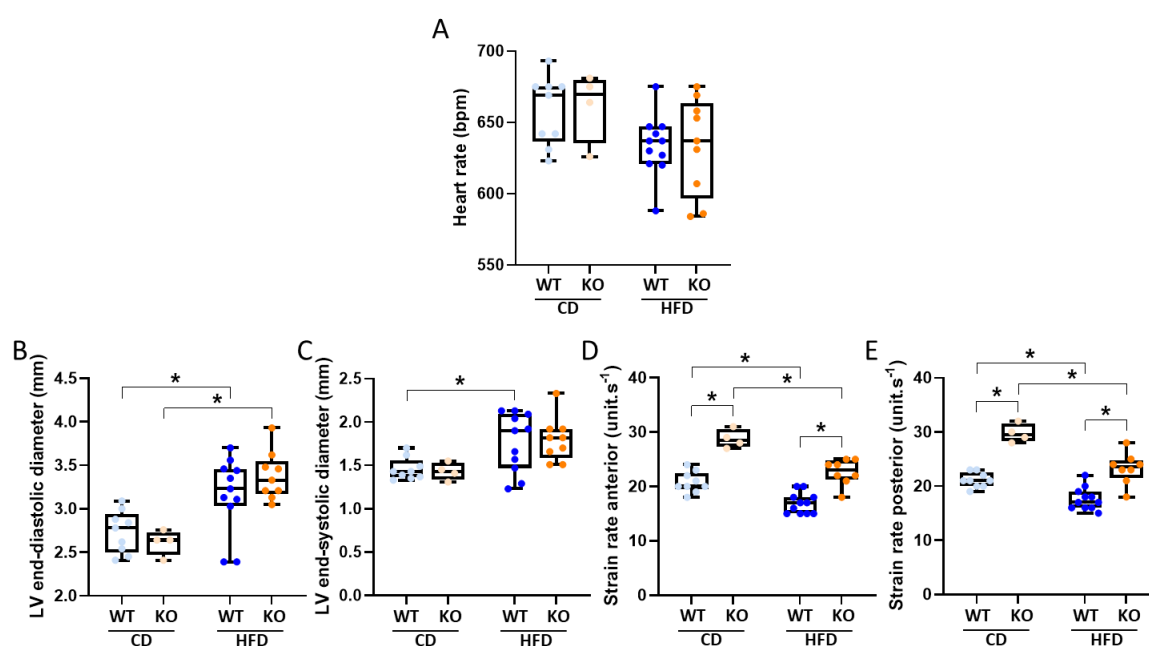


Figure 56 : Echographie cardiaque chez les souris mâles des cohortes high fat 1 & 2.

(A) Rythme cardiaque. (B & C) Diamètre du ventricule gauche à la diastole et la systole. (D & E) Vitesse de déformation cardiaque sur les faces antérieure et postérieure. LV : Left Ventricular ; CD : Control Diet ; HFD : High Fat Diet ; * : $P < 0,5$.

Une échographie cardiaque a été réalisée chez les mâles afin de caractériser précisément l'état de leurs fonctions cardiaques. Différents paramètres ont été étudiés : le rythme cardiaque, l'épaisseur de la paroi interventriculaire ainsi que de la paroi postérieure, le diamètre du ventricule gauche, la fraction éjectée du ventricule gauche et la vitesse de déformation cardiaque. Nous pouvons notamment observer une augmentation du diamètre du ventricule gauche chez les souris en régime high fat par rapport à celles sous régime contrôle. Le régime affecte également la vitesse de déformation cardiaque : les souris sous régime high fat ayant une vitesse de déformation cardiaque réduite par rapport à celles sous régime contrôle. Ces deux effets du régime ont déjà été décrits dans la littérature (Ternacle et al., 2017). Une information inédite et remarquable dans nos

données est un effet très net de la délétion de H2AFJ : les souris KO ont une vitesse de déformation cardiaque largement plus importante que les souris WT. Une hypothèse pouvant expliquer ce résultat est que les souris KO développeraient moins de fibrose cardiaque avec l'âge et sous régime high fat. Elle pourra être vérifiée par une analyse histologique par coloration rouge sirius pour la visualisation de l'accumulation des fibres du collagène.

La délétion de H2A.J permettrait donc une meilleure préservation des fonctions cardiaques avec l'âge et chez des souris obèses.

e) Etude du métabolisme

L'observation des organes impliqués dans la digestion et la régulation du métabolisme montre une augmentation de poids chez les souris sous régime high fat du foie, du pancréas et des reins. Le foie est notamment un organe de stockage et joue un rôle dans le métabolisme des glucides et des lipides. Le pancréas est quant-à-lui impliqué dans la production et la sécrétion d'hormones comme l'insuline et le glucagon. Les souris sous régime high fat et notamment celles de la souche C57BL/6J sont connues pour leur prise de poids importante, le développement d'une insulino-résistance et de pathologies cardiaques et rénales associées (Winzell et al., 2004, 2007). Ceci induit une activité accrue de ces organes et donc une augmentation de leur volume et de leur poids. Le génotype n'a pas d'impact significatif sur le poids du foie, du pancréas et des reins. Néanmoins, une tendance semble à nouveau se dessiner avec des organes moins lourds chez les souris KO, notamment chez les mâles sous régime high fat.

	WT	KO
M	4/4	11/17
F	1/7	2/6

Tableau 3 : Nombre de souris par groupe dans les cohortes 1 & 2 pour lesquelles une stéatose hépatique a pu être observée visuellement.

Cette dernière observation est compatible avec les données de test de tolérance à l'insuline montrant une meilleure sensibilité à l'insuline des souris mâles KO pour H2A.J. Un examen macroscopique rapide lors de la dissection laisse également penser que les souris KO sous régime high fat ont tendance à développer moins de stéatose hépatique. Cette observation pourra être confirmée par une analyse histologique. L'ensemble des données préliminaires concernant le métabolisme suggèrent donc fortement que la délétion de H2A.J aurait un effet protecteur contre les altérations induites par le vieillissement et un régime high fat.

f) Etude de la déposition lipidique

Différents tissus adipeux ont également été récupérés et pesés. Chez l'homme, comme chez la souris, il existe deux types de tissus adipeux : le tissu adipeux brun et le tissu adipeux blanc. Le tissu adipeux brun est localisé dans la région supra-claviculaire chez

l'homme et dans la région interscapulaire ainsi que supra-claviculaire chez la souris. La fonction principale de ces adipocytes bruns est d'assurer, grâce à la lipolyse de ses adipocytes, la thermogenèse (Cinti, 2017). Il existe ensuite deux sous-types de tissu adipeux blanc : le tissu adipeux blanc viscéral et le tissu adipeux blanc sous-cutané. Chez la souris, le tissu adipeux blanc viscéral peut être péri-épididymal ou gonadal (respectivement chez le mâle et chez la femelle), périrénal ou mésentérique. Le tissu adipeux blanc sous-cutané est lui situé dans la région inguinale. Chez l'homme, le tissu adipeux blanc sous-cutané représente plus de 80% du tissu adipeux total et aurait un effet bénéfique sur le métabolisme (Tran et al., 2008). Au contraire, le tissu adipeux blanc viscéral, représentant 10-20% du tissu adipeux total chez l'homme et 5-10% chez la femme, est généralement associé au développement de troubles métaboliques et cardiovasculaires (Shuster et al., 2012).

Sans surprise, les souris sous régime high fat ont des tissus adipeux globalement beaucoup plus développés que celles sous régime contrôle. Seul le tissu adipeux épididymal chez les mâles a connu une expansion limitée mais semblait davantage fibrotique à la première observation visuelle. Cette dernière observation pourra être confirmée par une analyse histologique par coloration rouge sirius pour la visualisation de l'accumulation des fibres du collagène. Il est également possible de voir que les souris KO mâles ont une déposition lipidique moindre dans le tissu adipeux brun.

Ainsi, la déplétion de H2A.J induit une modification plutôt faible de la déposition lipidique.

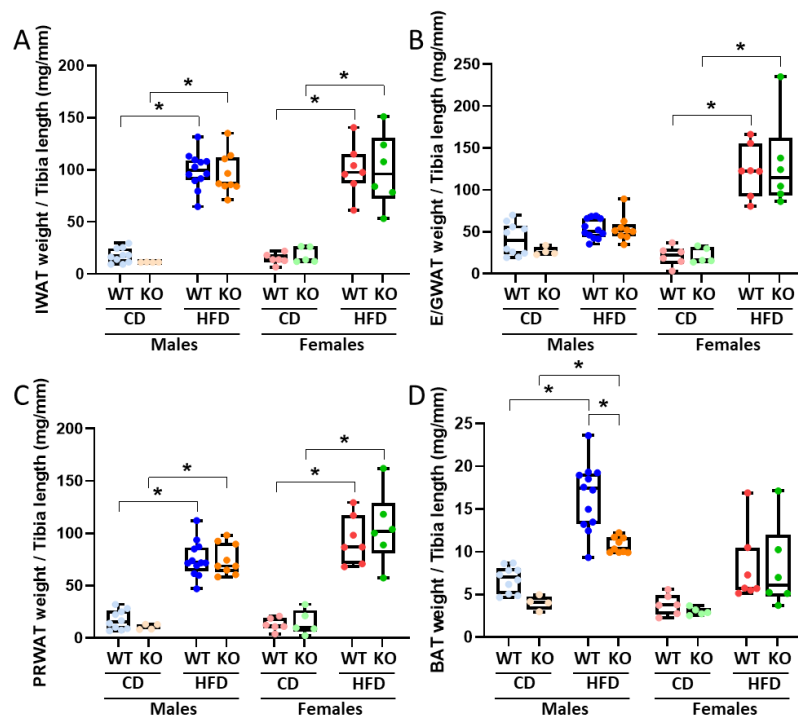


Figure 57 : Poids de différents tissus adipeux des souris des cohortes high fat 1 & 2. Poids normalisés du tissu adipeux blanc inguinale (A), épididymal ou gonadal (B), périrénal (C) et du tissu adipeux brun (D). CD : Control Diet ; HFD : High Fat Diet ; * : $P < 0,05$.

g) Etude de l'inflammation de bas-grade

Le développement important de tissu adipeux s'accompagne généralement d'une hypoxie et de la mort d'adipocytes ce qui induit l'expression d'un phénotype inflammatoire (Tchkonia et al., 2010). La rate est un organe jouant trois rôles essentiels. Elle fait partie des organes lymphoïdes secondaires qui sont des lieux de contact entre le système sanguin et le système lymphatique permettant l'activation de la réponse immunitaire. La rate est également impliquée dans la régulation de la formation et de la destruction des éléments figurés du sang (les globules rouges ou érythrocytes, les globules blancs ou leucocytes et les plaquettes ou thrombocytes). En effet, pendant le développement fœtal, la rate est un lieu d'hématopoïèse (avec le foie) petit à petit remplacé par la moelle osseuse qui devient l'organe hématopoïétique exclusif après la naissance. Néanmoins, en cas d'atteinte de la fonction hématopoïétique de la moelle osseuse, on peut observer une reprise de l'hématopoïèse splénique. Enfin, le troisième rôle de la rate découle des deux premiers puisqu'elle est impliquée dans le stockage des éléments figurés du sang (Kapila et al., 2019). Ainsi, le poids de la rate est un premier indicateur de l'inflammation. Or, il est possible d'observer certaines tendances : le poids de la rate semble plus élevé chez les souris sous régime high fat par rapport à chez les souris sous régime contrôle et il semble moins élevé chez les souris KO que chez les souris WT. Cela irait dans le sens attendu d'une augmentation de l'inflammation avec un régime high fat et laisse penser que H2A.J jouerait un rôle dans l'expression d'un phénotype inflammatoire dans un contexte plus large que la sénescence cellulaire.

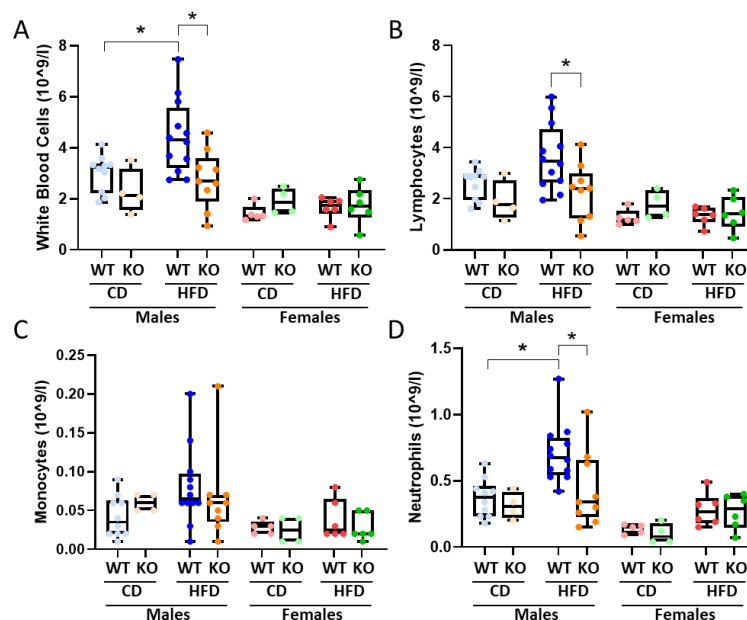


Figure 58 : Formulation sanguine des souris des cohortes high fat 1 & 2 : données concernant les populations de leucocytes.

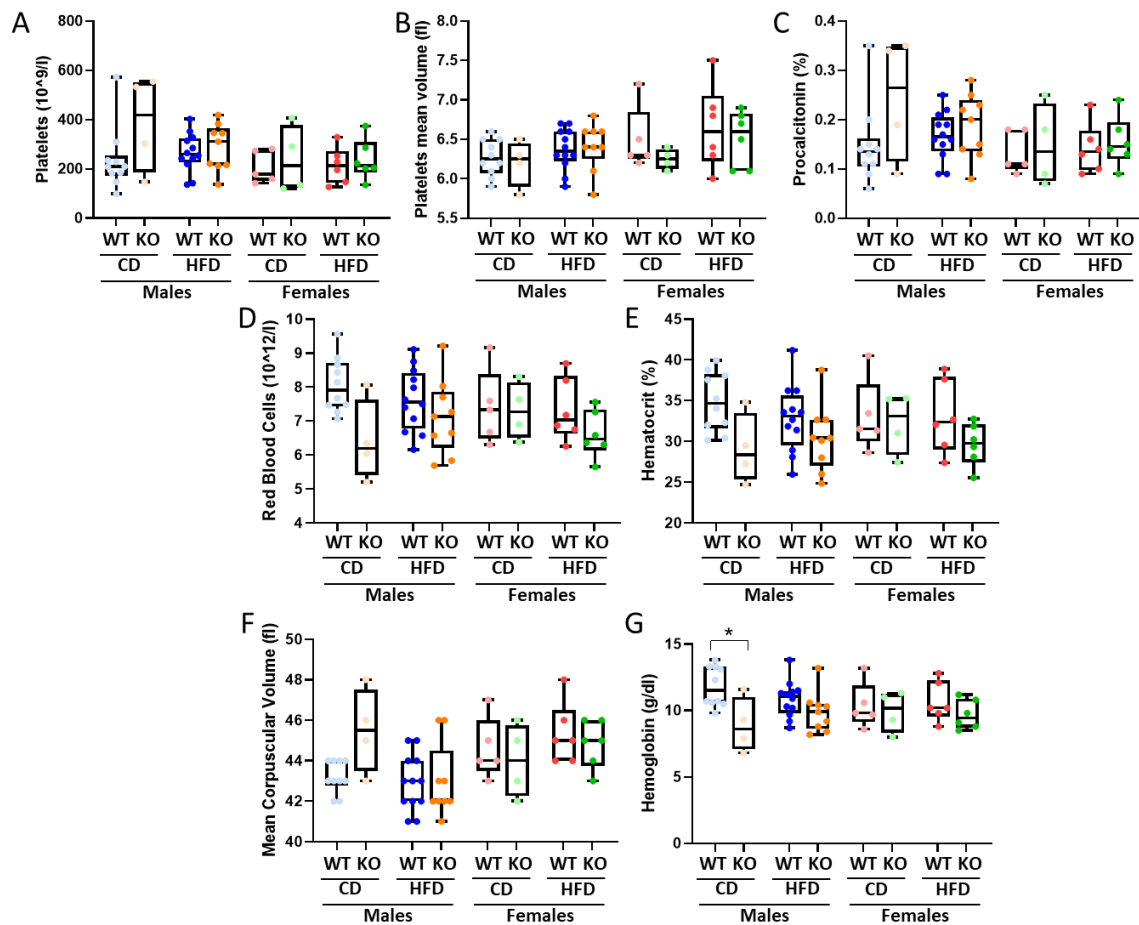
CD : Control Diet ; HFD : High Fat Diet ; * : $P < 0,05$.

Cette influence de H2A.J sur le développement d'un phénotype inflammatoire a également été explorée via l'analyse d'une formulation sanguine (Vetscan, Abaxis). Celle-ci a non seulement permis de mettre en évidence une augmentation des populations de leucocytes chez les souris mâles sous régime high fat mais aussi et surtout une différence significative en fonction du génotype, les souris KO ayant des populations leucocytaires moins développées.

Cette dernière observation est particulièrement intéressante et devrait faire l'objet d'une étude approfondie. En effet, les cellules immunitaires jouent un rôle clé dans l'inflammation, le remodelage et la résistance à l'insuline dans les tissus adipeux. Certaines populations de lymphocytes participeraient notamment à l'altération du métabolisme du glucose tandis que d'autres contribueraient au maintien de la sensibilité à l'insuline dans des contextes d'obésité (Clément & Vignes, 2009). Un développement plus modéré d'une inflammation chronique de bas-grade avec l'âge ou en cas d'obésité chez des sujets KO pour H2A.J pourrait ainsi influencer la déposition lipidique ainsi que les conséquences pathologiques au niveau des fonctions métaboliques et cardiaques.

3. Etude de l'érythropoïèse

La formulation sanguine réalisée sur les souris des cohortes high fat a également apporté des informations concernant les thrombocytes et les érythrocytes. Ni le régime alimentaire ni le génotype ne semblent affecter les thrombocytes. En revanche, une tendance reproductible d'un paramètre à l'autre de la santé érythrocytaire a pu être mise en évidence. En effet, les souris KO semblent avoir une population d'érythrocytes moins importante que les souris WT. Elles semblent aussi avoir globalement moins d'hémoglobine (molécule fixatrice du dioxygène dans les érythrocytes) ainsi que moins d'hémoglobine par cellule. Le volume moyen des érythrocytes semble également plus élevé chez les souris KO que chez les souris WT. Des facteurs pouvant induire une telle macrocytose sont des troubles de la lignée érythroblastique ou une carence en vitamine B12 et/ou folates. Une carence en fer favoriserait au contraire une microcytose (Kujovich, 2016).



**Figure 59 : Formulation sanguine des souris des cohortes high fat 1 & 2 : données concernant les populations de thrombocytes (A-C) et d'érythrocytes (D-G).
CD : Control Diet ; HFD : High Fat Diet ; * : $P < 0,5$.**

Avant l'étude des souris sous régime high fat, notre équipe avait été contactée par Michael Bulger. Son équipe avait en effet des données préliminaires *in vitro* suggérant l'implication de H2A.J dans l'érythropoïèse. D'autres souris, à raison de 5 / groupe, ont donc fait l'objet d'une étude spécifique de l'érythropoïèse. La formulation sanguine réalisée en collaboration cette fois-ci avec Daniel Lewandowski (CEA-Fontenay-aux-Roses) sur ces souris (prélèvement en rétro-orbital) a montré la même tendance anémique des souris KO par rapport aux souris WT.

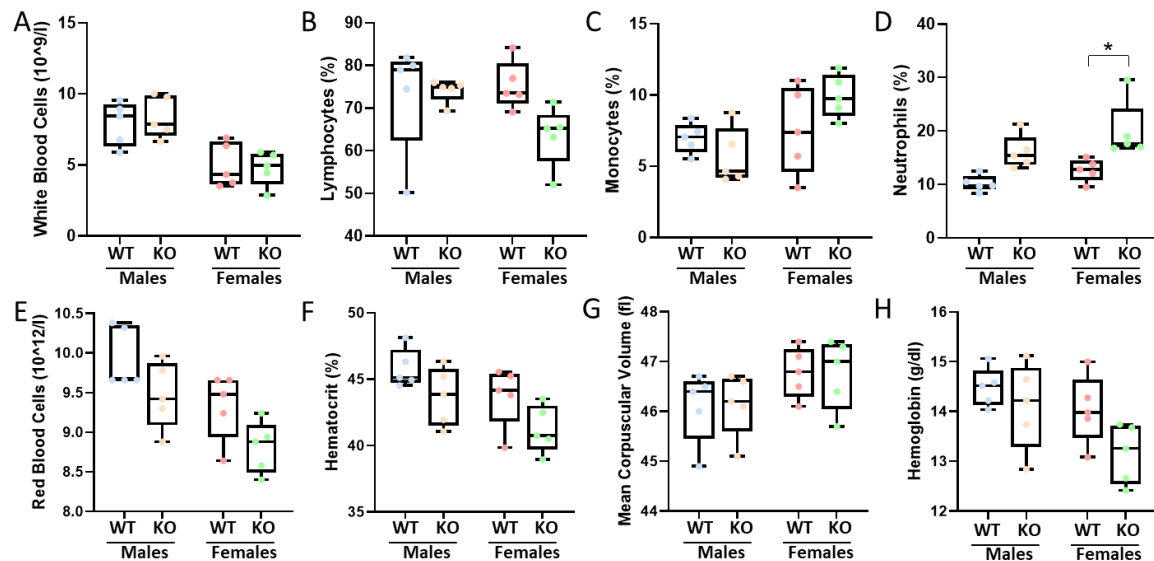


Figure 60 : Formulation sanguine des souris de l'étude de l'érythropoïèse.

* : $P < 0,05$.

Un test de réponse à la phénylhydrazine a donc été réalisé sur les souris. 100mg/kg de phénylhydrazine a été injectée en sous-cutané afin de détruire les érythrocytes puis leur repopulation a été suivie par formulation sanguine pendant 14 jours (prélèvement à la carotide). 2 souris KO (un mâle et une femelle) sont décédées au troisième jour de l'étude. Ceci pourrait être une première indication d'une plus grande sensibilité des souris KO à la phénylhydrazine. L'étude cinétique des paramètres concernant les érythrocytes a ensuite montré des différences significatives entre les souris KO et WT chez les mâles ainsi qu'une simple tendance chez les femelles. Les souris KO se révèlent donc davantage sensibles à la phénylhydrazine que les souris WT.

H2A.J semble donc impliqué dans l'érythropoïèse. Une étude des populations de précurseurs érythroïdes dans la moelle osseuse est prévue afin d'identifier la ou les étapes de différenciation dans lesquelles H2A.J jouerait un rôle.

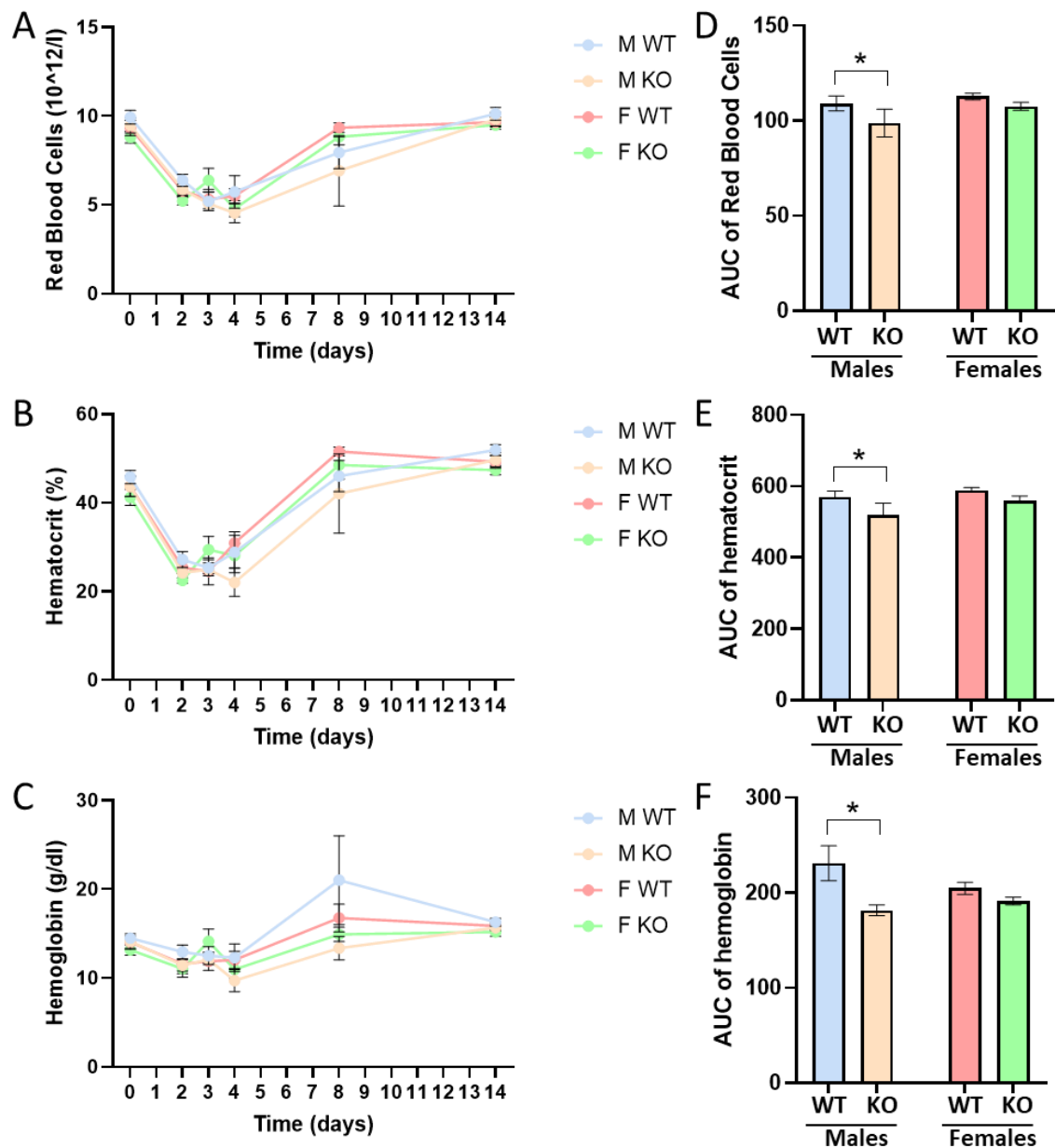


Figure 61 : Test de réponse à la phénylhydrazine.

(A, B, C) Suivi cinétique des érythrocytes, de l'hématocrite et de l'hémoglobine en valeurs réelles. (D, E, F) Suivi cinétique des érythrocytes, de l'hématocrite et de l'hémoglobine en pourcentages de valeurs avant injection. (G, H, I) Histogramme des aires sous courbes de valeurs réelles. F : Females ; M : Males ; * : $P < 0,5$.

Conclusion et perspectives

La sénescence cellulaire est une réponse aux stress caractérisée par un arrêt prolifératif stable et de nombreuses caractéristiques phénotypiques pouvant varier suivant le type cellulaire et le stimulus d'induction de la sénescence. En conditions de dommages à l'ADN, celle-ci s'accompagne notamment d'un phénotype sécrétoire pro-inflammatoire appelé SASP. *In vivo*, il permet une communication entre les cellules sénescents et le système immunitaire, facilitant l'élimination des cellules sénescents. Malheureusement, cette inflammation peut devenir chronique et favoriser l'apparition de pathologies si des cellules sénescents persistent.

Les travaux précédant mon arrivée au laboratoire ont permis de mettre en évidence une accumulation progressive du variant d'histone H2A.J en conditions de sénescence induite avec des dommages à l'ADN : sénescence répllicative ou induite par radio- ou chimiothérapie. Cette accumulation de H2A.J, résultant vraisemblablement d'un phénomène post-traductionnel, s'est avérée nécessaire à la dérégulation effective des gènes pro-inflammatoires du SASP.

Les trois années de doctorat matérialisées par cette thèse ont permis une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels H2A.J participe à la dérégulation des gènes du SASP en sénescence induite par des dommages à l'ADN ainsi qu'à un début de caractérisation *in vivo* de ce même variant d'histone.

Mécanisme d'action de H2A.J pendant la sénescence

Des études biochimiques dans un modèle de surexpression de H2A et H2A.J taggés Flag et HA ont permis de montrer une plus faible interaction de l'histone de liaison H1 avec H2A.J qu'avec H2A dans des extraits nucléosolubles. Cette interaction différentielle a plusieurs conséquences. Elle induit en effet une plus faible association de H1 avec la chromatine enrichie en H2A.J, un turnover plus rapide de cette histone de liaison et une diminution de sa quantité totale. Cela suggère que la stabilité de la protéine H1 est contrôlée par son association avec la chromatine et des complexes nucléaires libres de chaperons d'histones impliquant H2A. Certaines données suggèrent l'importance de l'extrémité C-terminale de H2A pour son interaction avec H1 (Shukla et al., 2011; Vogler et al., 2010). Les divergences de séquence protéique de H2A.J sur les 7 derniers acides aminés de cette région pourraient donc expliquer la plus faible interaction de H1 avec H2A.J.

La première partie biochimique de l'étude des mécanismes d'action de H2A.J permettrait d'expliquer qu'en condition de sénescence induite par des dommages à l'ADN, il est

possible d'observer que l'accumulation de H2A.J s'accompagne d'une perte importante de H1 alors que cette dernière est partiellement compensée par la déplétion de H2A.J.

L'étude omic de fibroblastes WI38 immortalisés en prolifération ou en sénescence induite par des dommages à l'ADN déplétés ou non pour H2A.J par interférence ARN a permis de révéler d'autres conséquences de cette interaction différentielle. L'accumulation de H2A.J et la perte de H1 en sénescence ont été corrélées avec la dérégulation de certaines séquences répétées de l'ADN et l'activation de la voie interféron. Cette étude omic pourrait être complétée par la caractérisation plus précise des facteurs de la voie interféron impliqués. Pour cela, des inhibiteurs pourraient notamment être utilisés pour déterminer le type d'activateur (ARN double brin ou ADN simple ou double brin), l'implication ou non de JAK1 avec le Ruxolitinib, etc. Par ailleurs, les sites de fixation de facteurs de transcription pourraient être identifiés par ATAC-seq (en cours) et l'analyse des motifs associés pourraient nous permettre d'identifier les facteurs de transcription impliqués.

H2A.J diffère de l'histone canonique H2A par une simple substitution de l'alanine 11 de H2A par une valine dans H2A.J ainsi que des 7 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale. Parmi ces 7 acides aminés, un motif SQ phosphorylable est présent dans la séquence de H2A.J. Le rôle de ces spécificités a été étudié. Pour cela, des lignées de fibroblastes immortalisés et modifiés pour surexprimer des mutants de H2A.J ont été développées. L'analyse transcriptomique de ces mutants a révélé un rôle de modérateur d'activité de la Val-11. D'un point de vue structurel, la valine diffère de l'alanine par la présence de deux groupements méthyle supplémentaires. Une hypothèse serait que ces motifs seraient reconnus par un facteur de régulation négatif. L'analyse transcriptomique a également révélé une potentialisation de l'activité de H2A.J avec le mutant S123E mimant une phosphorylation. Dans le même temps, le mutant S123A non phosphorylable s'est avéré très similaire au variant H2A.J. Au sein d'un nucléosome, la sérine 123 est localisée à l'entrée et la sortie de l'ADN qui est également le site de liaison de H1. La phosphorylation de la sérine 123 pourrait donc affaiblir la liaison de l'ADN à cet endroit. Une co-immunoprécipitation de H1 avec les mutants S123E et S123A a également montré une interaction plus faible de H1 avec le mutant de phosphorylation. La phosphorylation de la sérine 123 pourrait donc potentialiser l'activité de H2A.J par une diminution encore plus importante de son interaction avec H1.

L'existence effective d'une phosphorylation de H2A.J après induction de dommages à l'ADN a été démontrée *in vivo* par spectrométrie de masse. Elle n'a cependant lieu que sur une fraction très faible de H2A.J (seulement 1%). Il est possible que cette phosphorylation soit spécifique de certaines régions génomiques ainsi régulées. La vérification de cette hypothèse est compliquée par la difficulté de détection de niveaux aussi faibles de phosphorylation. Un anticorps anti-phospho-S123-H2A.J très sensible et spécifique a été obtenu par le laboratoire au cours de ce doctorat mais n'a pas permis d'obtenir de résultats concluants en ChIP-seq. Une méthode plus récente appelée Cut &

Tag est décrite comme une alternative plus performante au ChIP-seq. Elle permettrait notamment de diminuer le bruit de fond et d'améliorer la sensibilité. De plus, il serait intéressant d'identifier la ou les kinases responsables de la phosphorylation de H2A.J.

H2A.J et les phénotypes sécrétoires *in vivo*

La localisation tissulaire de H2A.J a été étudiée par immunohistochimie dans un large panel d'organes chez l'homme et chez la souris en collaboration avec Christophe Redon et Claudia Rübe. Cela a permis de montrer que ce variant d'histone est fortement exprimé dans les cellules luminales de glandes. Ce résultat a ensuite été confirmé dans des lignées de cancer du sein et de la prostate, deux organes où H2A.J est exprimé de façon importante.

Parmi ces lignées, les cellules épithéliales de cancer du sein luminal T47D ont été choisies pour l'établissement d'un modèle de déplétion de H2A.J en utilisant la technologie CrispR/Cas9. Une analyse transcriptomique a ensuite été réalisée dans les T47D parentales et deux lignées H2A.J-KO indépendantes en prolifération. Elle a permis de montrer que les gènes plus exprimés dans les cellules parentales sont enrichis en gènes régulés par l'œstrogène, en gènes enrichis dans des contextes de cancer du sein luminal de type B ainsi qu'en gènes impliqués dans la métastase cancéreuse. Ces résultats suggèrent que H2A.J favorise la réponse à l'œstrogène dans des cellules épithéliales mammaires et que ce variant d'histone pourrait être un biomarqueur de cancer du sein luminal de type B ainsi que de prédiction de métastase. Il est notamment décrit dans la littérature une augmentation fréquente du nombre de copies du gène H2AFJ dans les cancers du sein ainsi que du niveau d'expression de la protéine H2A.J (Cornen et al., 2014; Yao et al., 2006). La surexpression de H2AFJ est également corrélée à la résistance aux thérapies dans les cancers du sein mais aussi colorectaux, hépatiques et les glioblastomes multiformes (Katayama et al., 2019; H.-H. Lee et al., 2020; J. Liu et al., 2019; X. Wang et al., 2019).

De manière plus générale, les données de localisation tissulaire et transcriptomiques dans les T47D laissent supposer d'une implication générale de H2A.J dans la sécrétion et la réponse aux facteurs sécrétés. D'autres mécanismes que celui découvert dans le contexte de la sénescence et du SASP pourraient alors être mis en jeu.

Deux autres lignées particulièrement intéressantes pour l'étude de H2A.J ont été utilisées : les fibroblastes humains de plasticité mammaire HFPM168 et 170. Une analyse transcriptomique sur ces lignées a en effet révélé qu'elles expriment un SASP atténué par rapport aux WI38. Par ailleurs, H2A.J ne s'accumule pas en sénescence induite par des dommages à l'ADN dans les HFPM168. Il serait donc très intéressant d'étudier l'effet de la surexpression ectopique de H2A.J dans ces fibroblastes. Cela nous indiquerait si

H2A.J est non seulement nécessaire mais aussi suffisant pour induire l'expression du SASP.

H2A.J et sénescence/vieillesse/inflammation *in vivo*

Afin d'explorer plus en détail les rôles physiologiques de H2A.J, un modèle de souris dans lequel le gène H2AFJ a été invalidé en utilisant la technologie de nucléases TALEN a été développé. Deux premières approches ont été mises en place dans le but d'étudier le rôle de H2A.J dans des contextes de vieillissement et pro-inflammatoire : une étude de longévité et une étude de régime high fat. Celles-ci en sont encore à un stade précoce. Néanmoins, quelques données préliminaires permettent d'avancer des hypothèses. Les souris KO semblent en effet être moins prédisposées à l'obésité et les pathologies qui en découlent : diabète, inflammation chronique, dysfonctions cardiaques et rénales. Bien entendu, cela reste à confirmer et les mécanismes sous-jacents demeurent inexplorés. Des tests complémentaires sont prévus afin de mieux caractériser le phénotype des souris KO dans ces contextes pro-inflammatoires :

- Le dosage des cytokines circulantes et sécrétées par l'atrium et le tissu adipeux épididymal ou gonadal.
- Le dosage de facteurs circulants liés au métabolisme des lipides et des glucides tels que des adipokines, l'insuline, les triglycérides et les acides gras libres.
- L'analyse histologique des tissus afin d'évaluer la stéatose hépatique, la fibrose dans des organes ou tissus adipeux, l'infiltration macrophagique dans les tissus adipeux, etc.
- L'analyse transcriptomique de certains tissus et organes

Par ailleurs, il est possible qu'à l'issue de ces tests, une nouvelle cohorte high fat soit constituée pour une étude à moins long terme. Si ce devait être le cas, il serait alors intéressant de regarder également le comportement des souris à l'aide de cages métaboliques. Celles-ci permettraient de collecter des informations concernant la consommation de dioxygène, le rejet de CO₂, l'activité motrice spontanée, la prise alimentaire et la température dans les cages.

H2A.J et l'érythropoïèse

Des résultats préliminaires *in vitro* suggérant l'implication de H2A.J dans l'érythropoïèse ont été obtenus par l'équipe de Michael Bulger. Ce dernier nous a alors contactés et nous avons proposé d'étudier cette hypothèse dans notre modèle de souris. Une analyse des éléments figurés du sang de jeunes souris a donc été réalisée. Celle-ci a effectivement révélé une tendance anémique des souris KO. L'étude de l'implication de H2A.J a donc été

poursuivi avec un test de réponse à la phénylhydrazine. Ce dernier a mis en évidence une sensibilité plus importante des érythrocytes dans les souris KO ainsi qu'une repopulation plus lente. H2A.J serait donc bien impliqué dans l'érythropoïèse. Il reste néanmoins à déterminer la ou les étapes de différenciation dans lesquelles H2A.J jouerait un rôle ainsi que les mécanismes d'action mis en jeu. Dans ce but, une étude des populations de précurseurs érythroïdes dans la moelle osseuse est prévue.

Références bibliographiques

- Acosta J. C., Banito A., Wuestefeld T., Georgilis A., Janich P., Morton J. P., Athineos D., Kang T.-W., Lasitschka F., Andrulis M., Pascual G., Morris K. J., Khan S., Jin H., Dharmalingam G., Snijders A. P., Carroll T., Capper D., Pritchard C., ... Gil J. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.*, 15(8), 978-990. <https://doi.org/10.1038/ncb2784>
- Acosta J. C., O'Loughlen A., Banito A., Guijarro M. V., Augert A., Raguz S., Fumagalli M., Da Costa M., Brown C., Popov N., Takatsu Y., Melamed J., d'Adda di Fagagna F., Bernard D., Hernando E., & Gil J. (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, 133(6), 1006-1018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.038>
- Aguayo-Mazzucato C., Andle J., Lee T. B., Midha A., Talem L., Chipashvili V., Hollister-Lock J., van Deursen J., Weir G., & Bonner-Weir S. (2019). Acceleration of β cell aging determines diabetes and senolysis improves disease outcomes. *Cell Metab.*, 30(1), 129-142. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.006>
- Aguilar-Gurrieri C., Larabi A., Vinayachandran V., Patel N. A., Yen K., Reja R., Ebong I., Schoehn G., Robinson C. V., Pugh B. F., & Panne D. (2016). Structural evidence for Nap1-dependent H2A-H2B deposition and nucleosome assembly. *EMBO J.*, 35(13), 1465-1482. <https://doi.org/10.15252/emboj.201694105>
- Ahmad K., & Henikoff S. (2002). Histone H3 variants specify modes of chromatin assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(suppl. 4), 16477-16484. <https://doi.org/10.1073/pnas.172403699>
- Albig W., & Doenecke D. (1997). The human histone gene cluster at the D6S105 locus. *Hum. Genet.*, 101(3), 284-294. <https://doi.org/10.1007/s004390050630>
- Allis C. D., Glover C. V. C., Bowen J. K., & Gorovsky M. A. (1980). Histone variants specific to the transcriptionally active, amitotically dividing macronucleus of the unicellular eucaryote, *tetrahymena thermophila*. *Cell*, 20(3), 609-617. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90307-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90307-4)
- Alspach E., Flanagan K. C., Luo X., Ruhland M. K., Huang H., Pazolli E., Donlin M. J., Marsh T., Piwnicka-Worms D., Monahan J., Novack D. V., McAllister S. S., & Stewart S. A. (2014). p38MAPK plays a crucial role in stromal mediated tumorigenesis. *Cancer Discov.*, 4(6), 716-729. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0743>
- Alvarez F., Muñoz F., Schilcher P., Imhof A., Almouzni G., & Loyola A. (2011). Sequential establishment of marks on soluble histones H3 and H4. *J. Biol. Chem.*, 286(20), 17714-17721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.223453>
- Amor D. J., Kalitsis P., Sumer H., & Choo K. H. A. (2004). Building the centromere: from foundation proteins to 3D organization. *Trends Cell Biol.*, 14(7), 359-368. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2004.05.009>
- Ancrile B., Lim K.-H., & Counter C. M. (2007). Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev.*, 21(14), 1714-1719. <https://doi.org/10.1101/gad.1549407>
- Apta-Smith M. J., Hernandez-Fernaund J. R., & Bowman A. J. (2018). Evidence for the nuclear import of histones H3.1 and H4 as monomers. *EMBO J.*, 37(19), e98714. <https://doi.org/10.15252/emboj.201798714>
- Atadja P., Wong H., Garkavtsev I., Veillette C., & Riabowol K. (1995). Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(18), 8348-8352. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.18.8348>
- Baar M. P., Brandt R. M. C., Putavet D. A., Klein J. D. D., Derks K. W. J., Bourgeois B. R. M., Stryeck S., Rijksen Y., van Willigenburg H., Feijtel D. A., van der Pluijm I., Essers J., van

- Cappellen W. A., van IJcken W. F., Houtsmuller A. B., Pothof J., de Bruin R. W. F., Madl T., Hoeijmakers J. H. J., ... de Keizer P. L. J. (2017). Targeted apoptosis of senescent cells restores tissue homeostasis in response to chemotoxicity and aging. *Cell*, 169(1), 132-147. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.031>
- Baker D. J., Childs B. G., Durik M., Wijers M. E., Sieben C. J., Zhong J., Saltness R., Jeganathan K. B., Versoza G. C., Pezeshki A.-M., Khazaie K., Miller J. D., & van Deursen J. M. (2016). Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 530(7589), 184-189. <https://doi.org/10.1038/nature16932>
- Baker D. J., Perez-Terzic C., Jin F., Pitel K. S., Niederländer N. J., Jeganathan K., Yamada S., Reyes S., Rowe L., Hiddinga H. J., Eberhardt N. L., Terzic A., & van Deursen J. M. (2008). Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nat. Cell Biol.*, 10(7), 825-836. <https://doi.org/10.1038/ncb1744>
- Ball L. J., Murzina N. V., Broadhurst R. W., Raine A. R. C., Archer S. J., Stott F. J., Murzin A. G., Singh P. B., Domaille P. J., & Laue E. D. (1997). Structure of the chromatin binding (chromo) domain from mouse modifier protein 1. *EMBO J.*, 16(9), 2473-2481. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2473>
- Bancaud A., Huet S., Daigle N., Mozziconacci J., Beaudouin J., & Ellenberg J. (2009). Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *EMBO J.*, 28(24), 3785-3798. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.340>
- Bandyopadhyay D., Okan N. A., Bales E., Nascimento L., Cole P. A., & Medrano E. E. (2002). Down-regulation of p300/CBP histone acetyltransferase activates a senescence checkpoint in human melanocytes. *Cancer Res.*, 62(21), 6231-6239.
- Bannister A. J., & Kouzarides T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.*, 21(3), 381-395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Bao Y., Konesky K., Park Y.-J., Rosu S., Dyer P. N., Rangasamy D., Tremethick D. J., Laybourn P. J., & Luger K. (2004). Nucleosomes containing the histone variant H2A.Bbd organize only 118 base pairs of DNA. *EMBO J.*, 23(16), 3314-3324. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600316>
- Barrero M. J., Sese B., Kuebler B., Bilic J., Boue S., Martí M., & Izpisua Belmonte J. C. (2013). Macrohistone variants preserve cell identity by preventing the gain of H3K4me2 during reprogramming to pluripotency. *Cell Rep.*, 3(4), 1005-1011. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.029>
- Barski A., Cuddapah S., Cui K., Roh T.-Y., Schones D. E., Wang Z., Wei G., Chepelev I., & Zhao K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4), 823-837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>
- 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 Res.*, 69(7), 2878-2886. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2857>
- Bartkova J., Rezaei N., Lontos M., Karakaidos P., Kletsas D., Issaeva N., Vassiliou L.-V. F., Kolettas E., Niforou K., Zoumpourlis V. C., Takaoka M., Nakagawa H., Tort F., Fugger K., Johansson F., Sehested M., Andersen C. L., Dyrskjot L., Ørntoft T., ... Gorgoulis V. G. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature*, 444(7119), 633-637. <https://doi.org/10.1038/nature05268>
- Basisty N., Kale A., Jeon O. H., Kuehnemann C., Payne T., Rao C., Holtz A., Shah S., Sharma V., Ferrucci L., Campisi J., & Schilling B. (2020). A proteomic atlas of senescence-associated secretomes for aging biomarker development. *PLoS Biol.*, 18(1), e3000599. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000599>
- Bassing C. H., Suh H., Ferguson D. O., Chua K. F., Manis J., Eckersdorff M., Gleason M., Bronson R., Lee C., & Alt F. W. (2003). Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic

- translocations and tumors. *Cell*, 114(3), 359-370. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00566-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00566-X)
- Beauséjour C. M., Krtolica A., Galimi F., Narita M., Lowe S. W., Yaswen P., & Campisi J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.*, 22(16), 4212-4222. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg417>
- Bellelli R., Belan O., Pye V. E., Clement C., Maslen S. L., Skehel J. M., Cherepanov P., Almouzni G., & Boulton S. J. (2018). POLE3-POLE4 is a histone H3-H4 chaperone that maintains chromatin integrity during DNA replication. *Mol. Cell*, 72(1), 112-126. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.043>
- Berghe W. V., Plaisance S., Boone E., De Bosscher K., Schmitz M. L., Fiers W., & Haegeman G. (1998). p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor- κ B p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.*, 273(6), 3285-3290. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.6.3285>
- Binet R., Ythier D., Robles A. I., Collado M., Larrieu D., Fonti C., Brambilla E., Brambilla C., Serrano M., Harris C. C., & Pedoux R. (2009). WNT16B is a new marker of cellular senescence that regulates p53 activity and the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Cancer Res.*, 69(24), 9183-9191. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1016>
- Birchler J. A., Bhadra M. P., & Bhadra U. (2000). Making noise about silence: repression of repeated genes in animals. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10(2), 211-216. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00065-4](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00065-4)
- Bodnar A. G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S. E., Chiu C.-P., Morin G. B., Harley C. B., Shay J. W., Lichtsteiner S., & Wright W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279(5349), 349-352. <https://doi.org/10.1126/science.279.5349.349>
- Boeger H., Griesenbeck J., Strattan J. S., & Kornberg R. D. (2004). Removal of promoter nucleosomes by disassembly rather than sliding in vivo. *Mol. Cell*, 14(5), 667-673. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.013>
- Bonasio R., Lecona E., & Reinberg D. (2010). MBT domain proteins in development and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 21(2), 221-230. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.09.010>
- Bonner W. M., Wu R. S., Panusz H. T., & Muneses C. (1988). Kinetics of accumulation and depletion of soluble newly synthesized histone in the reciprocal regulation of histone and DNA synthesis. *Biochemistry*, 27(17), 6542-6550. <https://doi.org/10.1021/bi00417a052>
- Borghesan M., Fafián-Labora J., Eleftheriadou O., Carpintero-Fernández P., Paez-Ribes M., Vizcay-Barrena G., Swisa A., Kolodkin-Gal D., Ximénez-Embún P., Lowe R., Martín-Martín B., Peinado H., Muñoz J., Fleck R. A., Dor Y., Ben-Porath I., Vossenkamper A., Muñoz-Espín D., & O'Loghlen A. (2019). Small extracellular vesicles are key regulators of non-cell autonomous intercellular communication in senescence via the interferon protein IFITM3. *Cell Rep.*, 27(13), 3956-3971. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.095>
- Botuyan M. V., Lee J., Ward I. M., Kim J.-E., Thompson J. R., Chen J., & Mer G. (2006). Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. *Cell*, 127(7), 1361-1373. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.043>
- Bowman A., Koide A., Goodman J. S., Colling M. E., Zinne D., Koide S., & Ladurner A. G. (2017). sNASP and ASF1A function through both competitive and compatible modes of histone binding. *Nucleic Acids Res.*, 45(2), 643-656. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw892>
- Braig M., Lee S., Loddenkemper C., Rudolph C., Peters A. H. F. M., Schlegelberger B., Stein H., Dörken B., Jenuwein T., & Schmitt C. A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*, 436(7051), 660-665. <https://doi.org/10.1038/nature03841>
- Brown J. P., Wei W., & Sedivy J. M. (1997). Bypass of senescence after disruption of

- p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science*, 277(5327), 831-834. <https://doi.org/10.1126/science.277.5327.831>
- Burma S., Chen B. P., Murphy M., Kurimasa A., & Chen D. J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.*, 276(45), 42462-42467. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100466200>
- Campisi J. (2003). Cancer and ageing: rival demons? *Nat. Rev. Cancer*, 3(5), 339-349. <https://doi.org/10.1038/nrc1073>
- Campisi J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*, 120(4), 513-522. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.003>
- Campisi J., & d'Adda di Fagagna F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(9), 729-740. <https://doi.org/10.1038/nrm2233>
- Campos E. I., Fillingham J., Li G., Zheng H., Voigt P., Kuo W.-H. W., Seepany H., Gao Z., Day L. A., Greenblatt J. F., & Reinberg D. (2010). The program for processing newly-synthesized histones H3.1 and H4. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17(11), 1343-1351. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1911>
- Campos E. I., Smits A. H., Kang Y.-H., Landry S., Escobar T. M., Nayak S., Ueberheide B. M., Durocher D., Vermeulen M., Hurwitz J., & Reinberg D. (2015). Analysis of the histone H3.1 interactome: a suitable chaperone for the right event. *Mol. Cell*, 60(4), 697-709. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.005>
- Camps J., Erdos M. R., & Ried T. (2015). The role of lamin B1 for the maintenance of nuclear structure and function. *Nucleus*, 6(1), 8-14. <https://doi.org/10.1080/19491034.2014.1003510>
- Capell B. C., Drake A. M., Zhu J., Shah P. P., Dou Z., Dorsey J., Simola D. F., Donahue G., Sammons M., Rai T. S., Natale C., Ridky T. W., Adams P. D., & Berger S. L. (2016). Mll1 is essential for the senescence-associated secretory phenotype. *Genes Dev.*, 30(3), 321-336. <https://doi.org/10.1101/gad.271882.115>
- Celeste A., Petersen S., Romanienko P. J., Fernandez-Capetillo O., Chen H. T., Sedelnikova O. A., Reina-San-Martin B., Coppola V., Meffre E., Difilippantonio M. J., Redon C., Pilch D. R., Orlaru A., Eckhaus M., Camerini-Otero R. D., Tessarollo L., Livak F., Manova K., Bonner W. M., ... Nussenzweig A. (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, 296(5569), 922-927. <https://doi.org/10.1126/science.1069398>
- Cesare A. J., & Reddel R. R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat. Rev. Genet.*, 11(5), 319-330. <https://doi.org/10.1038/nrg2763>
- Chadwick B. P., & Willard H. F. (2001a). A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J. Cell Biol.*, 152(2), 375-384. <https://doi.org/10.1083/jcb.152.2.375>
- Chadwick B. P., & Willard H. F. (2001b). Histone H2A variants and the inactive X chromosome: identification of a second macroH2A variant. *Hum. Mol. Genet.*, 10(10), 1101-1113. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.10.1101>
- Chakravarthy S., & Luger K. (2006). The histone variant macro-H2A preferentially forms "hybrid nucleosomes." *J. Biol. Chem.*, 281(35), 25522-25531. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602258200>
- Chandra T., Kirschner K., Thuret J.-Y., Pope B. D., Ryba T., Newman S., Ahmed K., Samarajiwa S. A., Salama R., Carroll T., Stark R., Janky R., Narita M., Xue L., Chicas A., N  nez S., Janknecht R., Hayashi-Takanaka Y., Wilson M. D., ... Narita M. (2012). Independence of repressive histone marks and chromatin compaction during senescent heterochromatic layer formation. *Mol. Cell*, 47(2), 203-214. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.010>
- Chang B.-D., Swift M. E., Shen M., Fang J., Broude E. V., & Roninson I. B. (2002). Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(1), 389-394. <https://doi.org/10.1073/pnas.012602599>

- Changolkar L. N., & Pehrson J. R. (2002). Reconstitution of nucleosomes with histone macroH2A1.2. *Biochemistry*, 41(1), 179-184. <https://doi.org/10.1021/bi0157417>
- Chen P., Zhao J., & Li G. (2013). Histone variants in development and diseases. *J. Genet. Genomics*, 40(7), 355-365. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.05.001>
- Chen P., Zhao J., Wang Y., Wang M., Long H., Liang D., Huang L., Wen Z., Li W., Li X., Feng H., Zhao H., Zhu P., Li M., Wang Q.-F., & Li G. (2013). H3.3 actively marks enhancers and primes gene transcription via opening higher-ordered chromatin. *Genes Dev.*, 27(19), 2109-2124. <https://doi.org/10.1101/gad.222174.113>
- Chen X., Song M., Zhang B., & Zhang Y. (2016). Reactive oxygen species regulate T cell immune response in the tumor microenvironment. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2016, 1580967. <https://doi.org/10.1155/2016/1580967>
- Chen Z., Trotman L. C., Shaffer D., Lin H.-K., Dotan Z. A., Niki M., Koutcher J. A., Scher H. I., Ludwig T., Gerald W., Cordon-Cardo C., & Pandolfi P. P. (2005). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, 436(7051), 725-730. <https://doi.org/10.1038/nature03918>
- Cheung W. L., Ajiro K., Samejima K., Kloc M., Cheung P., Mizzen C. A., Beeser A., Etkin L. D., Chernoff J., Earnshaw W. C., & Allis C. D. (2003). Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell*, 113(4), 507-517. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00355-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00355-6)
- Childs B. G., Baker D. J., Wijshake T., Conover C. A., Campisi J., & van Deursen J. M. (2016). Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science*, 354(6311), 472-477. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6659>
- Choo J. H., Kim J. D., Chung J. H., Stubbs L., & Kim J. (2006). Allele-specific deposition of macroH2A1 in imprinting control regions. *Hum. Mol. Genet.*, 15(5), 717-724. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi485>
- Chung H. Y., Cesari M., Anton S., Marzetti E., Giovannini S., Seo A. Y., Carter C., Yu B. P., & Leeuwenburgh C. (2009). Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. *Ageing Res. Rev.*, 8(1), 18-30. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.07.002>
- Churikov D., Siino J., Svetlova M., Zhang K., Gineitis A., Bradbury E. M., & Zalensky A. (2004). Novel human testis-specific histone H2B encoded by the interrupted gene on the X chromosome. *Genomics*, 84(4), 745-756. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.06.001>
- Cinti S. (2017). UCP1 protein: the molecular hub of adipose organ plasticity. *Biochimie*, 134, 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.09.008>
- Clapier C. R., & Cairns B. R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, 78(1), 273-304. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.062706.153223>
- Clapier C. R., Iwasa J., Cairns B. R., & Peterson C. L. (2017). Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 18(7), 407-422. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.26>
- Clément K., & Vignes S. (2009). Inflammation, adipokines and obesity. *Rev. Med. Interne*, 30(9), 824-832. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2009.03.363>
- Collado M., Gil J., Efeyan A., Guerra C., Schuhmacher A. J., Barradas M., Benguría A., Zaballos A., Flores J. M., Barbacid M., Beach D., & Serrano M. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, 436(7051), 642. <https://doi.org/10.1038/436642a>
- Collins N., Poot R. A., Kukimoto I., García-Jiménez C., Dellaire G., & Varga-Weisz P. D. (2002). An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nat. Genet.*, 32(4), 627-632. <https://doi.org/10.1038/ng1046>
- Contrepois K., Coudereau C., Benayoun B. A., Schuler N., Roux P.-F., Bischof O., Courbeyrette R., Carvalho C., Thuret J.-Y., Ma Z., Derbois C., Nevers M.-C., Volland H., Redon C. E., Bonner W. M., Deleuze J.-F., Wiel C., Bernard D., Snyder M. P., ... Mann C. (2017). Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. *Nat.*

- Commun.*, 8, 14995. <https://doi.org/10.1038/ncomms14995>
- Contrepois K., Ezan E., Mann C., & Fenaille F. (2010). Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry for the fast profiling of histone post-translational modifications. *J. Proteome Res.*, 9(10), 5501-5509. <https://doi.org/10.1021/pr100497a>
- Contrepois K., Thuret J.-Y., Courbeyrette R., Fenaille F., & Mann C. (2012). Deacetylation of H4-K16Ac and heterochromatin assembly in senescence. *Epigenetics Chromatin*, 5(1), 15. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-5-15>
- Cook P. J., Ju B. G., Telese F., Wang X., Glass C. K., & Rosenfeld M. G. (2009). Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature*, 458(7238), 591-596. <https://doi.org/10.1038/nature07849>
- Coppé J.-P., Desprez P.-Y., Krtolica A., & Campisi J. (2010). The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.*, 5, 99-118. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144>
- Coppé J.-P., Kauser K., Campisi J., & Beauséjour C. M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. *J. Biol. Chem.*, 281(40), 29568-29574. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603307200>
- Coppé J.-P., Patil C. K., Rodier F., Sun Y., Muñoz D. P., Goldstein J., Nelson P. S., Desprez P.-Y., & Campisi J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.*, 6(12), e301. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301>
- Coppé J.-P., Rodier F., Patil C. K., Freund A., Desprez P.-Y., & Campisi J. (2011). Tumor suppressor and aging biomarker p16INK4a induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *J. Biol. Chem.*, 286(42), 36396-36403. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.257071>
- Cornen S., Guille A., Adélaïde J., Addou-Klouche L., Finetti P., Saade M.-R., Manai M., Carbuccioni N., Bekhouche I., Letessier A., Raynaud S., Charafe-Jauffret E., Jacquemier J., Spicuglia S., de The H., Viens P., Bertucci F., Birnbaum D., & Chaffanet M. (2014). Candidate luminal B breast cancer genes identified by genome, gene expression and DNA methylation profiling. *PLoS One*, 9(1), e81843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081843>
- Costanzi C., & Pehrson J. R. (1998). Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome of female mammals. *Nature*, 393(6695), 599-601. <https://doi.org/10.1038/31275>
- Courtois-Cox S., Genter Williams S. M., Reczek E. E., Johnson B. W., McGillicuddy L. T., Johannessen C. M., Hollstein P., MacCollin M., & Cichowski K. (2006). A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell*, 10(6), 459-472. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.10.003>
- Cremer T., & Cremer C. (2001). Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. *Nat. Rev. Genet.*, 2(4), 292-301. <https://doi.org/10.1038/35066075>
- Cremer T., Kreth G., Koester H., Fink R. H. A., Heintzmann R., Cremer M., Solovei I., Zink D., & Cremer C. (2000). Chromosome territories, interchromatin domain compartment and nuclear matrix: an integrated view of the functional nuclear architecture. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.*, 10(2), 179-212.
- Criscione S. W., De Cecco M., Siranosian B., Zhang Y., Kreiling J. A., Sedivy J. M., & Neretti N. (2016). Reorganization of chromosome architecture in replicative cellular senescence. *Sci. Adv.*, 2(2), e1500882. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1500882>
- d'Adda di Fagagna F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer*, 8(7), 512-522. <https://doi.org/10.1038/nrc2440>
- d'Adda di Fagagna F., Reaper P. M., Clay-Farrace L., Fiegler H., Carr P., von Zglinicki T., Saretzki G., Carter N. P., & Jackson S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426(6963), 194-198. <https://doi.org/10.1038/nature02118>

- da Silva P. F. L., Ogrodnik M., Kucheryavenko O., Glibert J., Miwa S., Cameron K., Ishaq A., Saretzki G., Nagaraja-Grellscheid S., Nelson G., & von Zglinicki T. (2019). The bystander effect contributes to the accumulation of senescent cells in vivo. *Aging Cell*, 18(1), e12848. <https://doi.org/10.1111/acer.12848>
- Davey C. A., Sargent D. F., Luger K., Maeder A. W., & Richmond T. J. (2002). Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 319(5), 1097-1113. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00386-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00386-8)
- De Cecco M., Ito T., Petrashen A. P., Elias A. E., Skvir N. J., Criscione S. W., Caligiana A., Broccoli G., Adney E. M., Boeke J. D., Le O., Beauséjour C., Ambati J., Ambati K., Simon M., Seluanov A., Gorbunova V., Slagboom P. E., Helfand S. L., ... Sedivy J. M. (2019). L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature*, 566(7742), 73-78. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0784-9>
- de Wit N. J. W., Rijntjes J., Diepstra J. H. S., van Kuppevelt T. H., Weidle U. H., Ruiter D. J., & van Muijen G. N. P. (2005). Analysis of differential gene expression in human melanocytic tumour lesions by custom made oligonucleotide arrays. *Br. J. Cancer*, 92(12), 2249-2261. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602612>
- Debidda M., Williams D. A., & Zheng Y. (2006). Rac1 GTPase regulates cell genomic stability and senescence. *J. Biol. Chem.*, 281(50), 38519-38528. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604607200>
- Demaria M., Ohtani N., Youssef S. A., Rodier F., Toussaint W., Mitchell J. R., Laberge R.-M., Vijg J., Van Steeg H., Dollé M. E. T., Hoeijmakers J. H. J., de Bruin A., Hara E., & Campisi J. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell*, 31(6), 722-733. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012>
- Deng Q., Liao R., Wu B.-L., & Sun P. (2004). High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 279(2), 1050-1059. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308644200>
- Denoyelle C., Abou-Rjaily G., Bezrookove V., Verhaegen M., Johnson T. M., Fullen D. R., Pointer J. N., Gruber S. B., Su L. D., Nikiforov M. A., Kaufman R. J., Bastian B. C., & Soengas M. S. (2006). Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat. Cell Biol.*, 8(10), 1053-1063. <https://doi.org/10.1038/ncb1471>
- Di Leonardo A., Linke S. P., Clarkin K., & Wahl G. M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.*, 8(21), 2540-2551. <https://doi.org/10.1101/gad.8.21.2540>
- Di Micco R., Fumagalli M., Cicalese A., Piccinin S., Gasparini P., Luise C., Schurra C., Garré M., Nuciforo P. G., Bensimon A., Maestro R., Pelicci P. G., & d'Adda di Fagagna F. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature*, 444(7119), 638-642. <https://doi.org/10.1038/nature05327>
- Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E. E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., & Campisi J. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(20), 9363-9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>
- Dirac A. M. G., & Bernards R. (2003). Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. *J. Biol. Chem.*, 278(14), 11731-11734. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300023200>
- Doenecke D., Albig W., Bode C., Drabent B., Franke K., Gavenis K., & Witt O. (1997). Histones: genetic diversity and tissue-specific gene expression. *Histochem. Cell Biol.*, 107(1), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s004180050083>
- Dominski Z., & Marzluf W. F. (1999). Formation of the 3' end of histone mRNA. *Gene*, 239(1), 1-14. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(99\)00367-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00367-4)

- Dou Z., Ghosh K., Vizioli M. G., Zhu J., Sen P., Wangenstein K. J., Simithy J., Lan Y., Lin Y., Zhou Z., Capell B. C., Xu C., Xu M., Kieckhaefer J. E., Jiang T., Shoshkes-Carmel M., Al Tanim K. M. A., Barber G. N., Seykora J. T., ... Berger S. L. (2017). Cytoplasmic chromatin triggers inflammation in senescence and cancer. *Nature*, 550(7676), 402-406. <https://doi.org/10.1038/nature24050>
- Dou Z., Xu C., Donahue G., Shimi T., Pan J.-A., Zhu J., Ivanov A., Capell B. C., Drake A. M., Shah P. P., Catanzaro J. M., Ricketts M. D., Lamark T., Adam S. A., Marmorstein R., Zong W.-X., Johansen T., Goldman R. D., Adams P. D., & Berger S. L. (2015). Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature*, 527(7576), 105-109. <https://doi.org/10.1038/nature15548>
- Doyen C.-M., An W., Angelov D., Bondarenko V., Miettton F., Studitsky V. M., Hamiche A., Roeder R. G., Bouvet P., & Dimitrov S. (2006). Mechanism of polymerase II transcription repression by the histone variant macroH2A. *Mol. Cell. Biol.*, 26(3), 1156-1164. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.3.1156-1164.2006>
- Drané P., Ouararhni K., Depaux A., Shuaib M., & Hamiche A. (2010). The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev.*, 24(12), 1253-1265. <https://doi.org/10.1101/gad.566910>
- Duffy M. J., Synnott N. C., & Crown J. (2017). Mutant p53 as a target for cancer treatment. *Eur. J. Cancer*, 83, 258-265. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.06.023>
- Dunleavy E. M., Roche D., Tagami H., Lacoste N., Ray-Gallet D., Nakamura Y., Daigo Y., Nakatani Y., & Almouzni-Pettinotti G. (2009). HJURP is a cell-cycle-dependent maintenance and deposition factor of CENP-A at centromeres. *Cell*, 137(3), 485-497. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.040>
- Falk M., Lukášová E., & Kozubek S. (2008). Chromatin structure influences the sensitivity of DNA to γ-radiation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1783(12), 2398-2414. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.07.010>
- Fan Y., Nikitina T., Zhao J., Fleury T. J., Bhattacharyya R., Bouhassira E. E., Stein A., Woodcock C. L., & Skoultchi A. I. (2005). Histone H1 depletion in mammals alters global chromatin structure but causes specific changes in gene regulation. *Cell*, 123(7), 1199-1212. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.028>
- Fan Y., Sirotkin A., Russell R. G., Ayala J., & Skoultchi A. I. (2001). Individual somatic H1 subtypes are dispensable for mouse development even in mice lacking the H1o replacement subtype. *Mol. Cell. Biol.*, 21(23), 7933-7943. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.23.7933-7943.2001>
- Fei J., Torigoe S. E., Brown C. R., Khuong M. T., Kassavetis G. A., Boeger H., & Kadonaga J. T. (2015). The prenucleosome, a stable conformational isomer of the nucleosome. *Genes Dev.*, 29(24), 2563-2575. <https://doi.org/10.1101/gad.272633.115>
- Felsenfeld G., & Groudine M. (2003). Controlling the double helix. *Nature*, 421(6921), 448-453. <https://doi.org/10.1038/nature01410>
- Filion G. J., van Bommel J. G., Braunschweig U., Talhout W., Kind J., Ward L. D., Brugman W., de Castro Genebra de Jesus I., Kerkhoven R. M., Bussemaker H. J., & van Steensel B. (2010). Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in Drosophila cells. *Cell*, 143(2), 212-224. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.009>
- Filippakopoulos P., Picaud S., Mangos M., Keates T., Lambert J.-P., Barsyte-Lovejoy D., Felletar I., Volkmer R., Müller S., Pawson T., Gingras A.-C., Arrowsmith C. H., & Knapp S. (2012). Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family. *Cell*, 149(1), 214-231. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.013>
- Fink M., Imholz D., & Thoma F. (2007). Contribution of the serine 129 of histone H2A to chromatin structure. *Mol. Cell. Biol.*, 27(10), 3589-3600. <https://doi.org/10.1128/mcb.02077-06>

- Finkel T., & Holbrook N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Finkel T., Serrano M., & Blasco M. A. (2007). The common biology of cancer and ageing. *Nature*, 448(7155), 767-774. <https://doi.org/10.1038/nature05985>
- Finn R. M., Browne K., Hodgson K. C., & Ausió J. (2008). sNASP, a histone H1-specific eukaryotic chaperone dimer that facilitates chromatin assembly. *Biophys. J.*, 95(3), 1314-1325. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.130021>
- Fischle W., Wang Y., & Allis C. D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15(2), 172-183. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00013-9](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00013-9)
- Fischle W., Wang Y., Jacobs S. A., Kim Y., Allis C. D., & Khorasanizadeh S. (2003). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.*, 17(15), 1870-1881. <https://doi.org/10.1101/gad.1110503>
- Flanagan J. F., Mi L.-Z., Chruszcz M., Cymborowski M., Clines K. L., Kim Y., Minor W., Rastinejad F., & Khorasanizadeh S. (2005). Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature*, 438(7071), 1181-1185. <https://doi.org/10.1038/nature04290>
- Foltman M., Evrin C., De Piccoli G., Jones R. C., Edmondson R. D., Katou Y., Nakato R., Shirahige K., & Labib K. (2013). Eukaryotic replisome components cooperate to process histones during chromosome replication. *Cell Rep.*, 3(3), 892-904. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.028>
- Foltz D. R., Jansen L. E. T., Bailey A. O., Yates III J. R., Bassett E. A., Wood S., Black B. E., & Cleveland D. W. (2009). Centromere specific assembly of CENP-A nucleosomes is mediated by HJURP. *Cell*, 137(3), 472-484. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.039>
- Franklin S. G., & Zweidler A. (1977). Non-allelic variants of histones 2a, 2b and 3 in mammals. *Nature*, 266(5599), 273-275. <https://doi.org/10.1038/266273a0>
- Freund A., Laberge R.-M., Demaria M., & Campisi J. (2012). Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol. Biol. Cell*, 23(11), 2066-2075. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-10-0884>
- Freund A., Patil C. K., & Campisi J. (2011). P38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.*, 30(8), 1536-1548. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.69>
- Fukushima Y., Minato N., & Hattori M. (2018). The impact of senescence-associated T cells on immunosenescence and age-related disorders. *Inflamm. Regen.*, 38, 24. <https://doi.org/10.1186/s41232-018-0082-9>
- Fumagalli M., Rossiello F., Clerici M., Barozzi S., Cittaro D., Kaplunov J. M., Bucci G., Dobрева M., Matti V., Beauséjour C. M., Herbig U., Longhese M. P., & d'Adda di Fagagna F. (2012). Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA damage response activation. *Nat. Cell Biol.*, 14(4), 355-365. <https://doi.org/10.1038/ncb2466>
- Garfinkel S., Brown S., Wessendorf J. H. M., & Maciag T. (1994). Post-transcriptional regulation of interleukin 1a in various strains of young and senescent human umbilical vein endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(4), 1559-1563. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.4.1559>
- Gaspar-Maia A., Qadeer Z. A., Hasson D., Ratnakumar K., Leu N. A., Leroy G., Liu S., Costanzi C., Valle-Garcia D., Schaniel C., Lemischka I., Garcia B., Pehrson J. R., & Bernstein E. (2013). MacroH2A histone variants act as a barrier upon reprogramming towards pluripotency. *Nat. Commun.*, 4, 1565. <https://doi.org/10.1038/ncomms2582>
- Gautier T., Abbott D. W., Molla A., Verdel A., Ausio J., & Dimitrov S. (2004). Histone variant H2ABbd confers lower stability to the nucleosome. *EMBO Rep.*, 5(7), 715-720. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400182>
- Gil J., Bernard D., Martínez D., & Beach D. (2004). Polycomb CBX7 has a unifying role in cellular

- lifespan. *Nat. Cell Biol.*, 6(1), 67-72. <https://doi.org/10.1038/ncb1077>
- Gineitis A. A., Zalenskaya I. A., Yau P. M., Bradbury E. M., & Zalensky A. O. (2000). Human sperm telomere-binding complex involves histone H2B and secures telomere membrane attachment. *J. Cell Biol.*, 151(7), 1591-1597. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.7.1591>
- Gire V., & Dulić V. (2015). Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle*, 14(3), 297-304. <https://doi.org/10.1080/15384101.2014.1000134>
- Gire V., Roux P., Wynford-Thomas D., Brondello J.-M., & Dulic V. (2004). DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J.*, 23(13), 2554-2563. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600259>
- Glück S., Guey B., Gulen M. F., Wolter K., Kang T.-W., Schmacke N. A., Bridgeman A., Rehwinkel J., Zender L., & Ablasser A. (2017). Innate immune sensing of cytosolic chromatin fragments through cGAS promotes senescence. *Nat. Cell Biol.*, 19(9), 1061-1070. <https://doi.org/10.1038/ncb3586>
- Goldberg A. D., Banaszynski L. A., Noh K.-M., Lewis P. W., Elsaesser S. J., Stadler S., Dewell S., Law M., Guo X., Li X., Wen D., Chappier A., DeKolver R. C., Miller J. C., Lee Y.-L., Boydston E. A., Holmes M. C., Gregory P. D., Grealia J. M., ... Allis C. D. (2010). Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell*, 140(5), 678-691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.003>
- Gregory R. I., & Shiekhattar R. (2005). MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res.*, 65(9), 3509-3512. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0298>
- Grewal S. I. S., & Jia S. (2007). Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Genet.*, 8(1), 35-46. <https://doi.org/10.1038/nrg2008>
- Groth A., Corpet A., Cook A. J. L., Roche D., Bartek J., Lukas J., & Almouzni G. (2007). Regulation of replication fork progression through histone supply and demand. *Science*, 318(5858), 1928-1931. <https://doi.org/10.1126/science.1148992>
- Guelen L., Pagie L., Brasset E., Meuleman W., Faza M. B., Talhout W., Eussen B. H., de Klein A., Wessels L., de Laat W., & van Steensel B. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, 453(7197), 948-951. <https://doi.org/10.1038/nature06947>
- Guerra C., Mijimolle N., Dhawahir A., Dubus P., Barradas M., Serrano M., Campuzano V., & Barbacid M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell*, 4(2), 111-120. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00191-0](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00191-0)
- Hake S. B., & Allis C. D. (2006). Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the "H3 barcode hypothesis." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(17), 6428-6435. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600803103>
- Hake S. B., Garcia B. A., Duncan E. M., Kauer M., Dellaire G., Shabanowitz J., Bazett-Jones D. P., Allis C. D., & Hunt D. F. (2006). Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J. Biol. Chem.*, 281(1), 559-568. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509266200>
- Hansen J. C. (2012). Human mitotic chromosome structure: what happened to the 30-nm fibre? *EMBO J.*, 31(7), 1621-1623. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.66>
- Harley C. B., Futcher A. B., & Greider C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458-460. <https://doi.org/10.1038/345458a0>
- Harper J. W., Adami G. R., Wei N., Keyomarsi K., & Elledge S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75(4), 805-816. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90499-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90499-G)
- Harshman S. W., Young N. L., Parthun M. R., & Freitas M. A. (2013). H1 histones: current perspectives and challenges. *Nucleic Acids Res.*, 41(21), 9593-9609. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt700>

- Hayflick L., & Moorhead P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 25, 585-621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- Henson J. D., & Reddel R. R. (2010). Assaying and investigating Alternative Lengthening of Telomeres activity in human cells and cancers. *FEBS Lett.*, 584(17), 3800-3811. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.06.009>
- Herbert B.-S., Wright W. E., & Shay J. W. (2002). p16INK4a inactivation is not required to immortalize human mammary epithelial cells. *Oncogene*, 21(51), 7897-7900. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205902>
- Herbig U., Ferreira M., Condel L., Carey D., & Sedivy J. M. (2006). Cellular senescence in aging primates. *Science*, 311(5765), 1257. <https://doi.org/10.1126/science.1122446>
- Herbig U., Jobling W. A., Chen B. P. C., Chen D. J., & Sedivy J. M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Mol. Cell*, 14(4), 501-513. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00256-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00256-4)
- Herranz N., Gallage S., Mellone M., Wuestefeld T., Klotz S., Hanley C. J., Raguz S., Acosta J. C., Innes A. J., Banito A., Georgilis A., Montoya A., Wolter K., Dharmalingam G., Faull P., Carroll T., Martínez-Barbera J. P., Cutillas P., Reisinger F., ... Gil J. (2015). mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nat. Cell Biol.*, 17(9), 1205-1217. <https://doi.org/10.1038/ncb3225>
- Hill D. A. (2001). Influence of linker histone H1 on chromatin remodeling. *Biochem. Cell Biol.*, 79(3), 317-324. <https://doi.org/10.1139/bcb-79-3-317>
- Hirano T. (2006). At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7(5), 311-322. <https://doi.org/10.1038/nrm1909>
- Ho L., & Crabtree G. R. (2010). Chromatin remodelling during development. *Nature*, 463(7280), 474-484. <https://doi.org/10.1038/nature08911>
- Howman E. V., Fowler K. J., Newson A. J., Redward S., MacDonald A. C., Kalitsis P., & Choo K. H. A. (2000). Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(3), 1148-1153. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.3.1148>
- Huang H., Strømme C. B., Saredi G., Hödl M., Strandsby A., González-Aguilera C., Chen S., Groth A., & Patel D. J. (2015). A unique binding mode enables MCM2 to chaperone histones H3-H4 at replication forks. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 22(8), 618-626. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3055>
- Huang J., Gao X., Li S., & Cao Z. (1997). Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(24), 12829-12832. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.12829>
- Hwa V., Oh Y., & Rosenfeld R. G. (1999). The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr. Rev.*, 20(6), 761-787. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.6.0382>
- Itahana K., Zou Y., Itahana Y., Martinez J.-L., Beauséjour C. M., Jacobs J. J. L., van Lohuizen M., Band V., Campisi J., & Dimri G. (2003). Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the Polycomb protein Bmi-1. *Mol. Cell. Biol.*, 23(1), 389-401. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.1.389-401.2003>
- Ito T., Bulger M., Pazin M. J., Kobayashi R., & Kadonaga J. T. (1997). ACF, an ISWI-containing and ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor. *Cell*, 90(1), 145-155. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80321-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80321-9)
- Ito T., Teo Y. V., Evans S. A., Neretti N., & Sedivy J. M. (2018). Regulation of cellular senescence by Polycomb chromatin modifiers through distinct DNA damage- and histone methylation-dependent pathways. *Cell Rep.*, 22(13), 3480-3492. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.002>
- Ivanov A., Pawlikowski J., Manoharan I., van Tuyn J., Nelson D. M., Rai T. S., Shah P. P., Hewitt G., Korolchuk V. I., Passos J. F., Wu H., Berger S. L., & Adams P. D. (2013). Lysosome-mediated

- processing of chromatin in senescence. *J. Cell Biol.*, 202(1), 129-143.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201212110>
- Izquierdo-Bouldstridge A., Bustillos A., Bonet-Costa C., Aribau-Miralbés P., García-Gomis D., Dabad M., Esteve-Codina A., Pascual-Reguant L., Peiró S., Esteller M., Murtha M., Millán-Ariño L., & Jordan A. (2017). Histone H1 depletion triggers an interferon response in cancer cells via activation of heterochromatic repeats. *Nucleic Acids Res.*, 45(20), 11622-11642.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx746>
- Izzo A., Kamieniarz-Gdula K., Ramírez F., Noreen N., Kind J., Manke T., van Steensel B., & Schneider R. (2013). The genomic landscape of the somatic linker histone subtypes H1.1 to H1.5 in human cells. *Cell Rep.*, 3(6), 2142-2154.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.003>
- Izzo A., Kamieniarz K., & Schneider R. (2008). The histone H1 family: specific members, specific functions? *Biol. Chem.*, 389(4), 333-343. <https://doi.org/10.1515/BC.2008.037>
- Jackson V., Granner D. K., & Chalkley R. (1975). Deposition of histones onto replicating chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72(11), 4440-4444.
<https://doi.org/10.1073/pnas.72.11.4440>
- Jacobs J. J. L., Kieboom K., Marino S., DePinho R. A., & van Lohuizen M. (1999). The oncogene and Polycomb group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature*, 397(6715), 164-168. <https://doi.org/10.1038/16476>
- Jansen L. E. T., Black B. E., Foltz D. R., & Cleveland D. W. (2007). Propagation of centromeric chromatin requires exit from mitosis. *J. Cell Biol.*, 176(6), 795-805.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200701066>
- Janzen V., Forkert R., Fleming H. E., Saito Y., Waring M. T., Dombkowski D. M., Cheng T., DePinho R. A., Sharpless N. E., & Scadden D. T. (2006). Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature*, 443(7110), 421-426.
<https://doi.org/10.1038/nature05159>
- Jeanblanc M., Ragu S., Gey C., Contrepas K., Courbeyrette R., Thuret J.-Y., & Mann C. (2012). Parallel pathways in RAF-induced senescence and conditions for its reversion. *Oncogene*, 31(25), 3072-3085. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.481>
- Jeon O. H., Kim C., Laberge R.-M., Demaria M., Rathod S., Vasserot A. P., Chung J. W., Kim D. H., Poon Y., David N., Baker D. J., van Deursen J. M., Campisi J., & Elisei J. H. (2017). Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat. Med.*, 23(6), 775-781.
<https://doi.org/10.1038/nm.4324>
- Jin C., Zang C., Wei G., Cui K., Peng W., Zhao K., & Felsenfeld G. (2009). H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark "nucleosome-free regions" of active promoters and other regulatory regions in the human genome. *Nat. Genet.*, 41(8), 941-945.
<https://doi.org/10.1038/ng.409>
- Jun J.-I., & Lau L. F. (2010). Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *Aging*, 2(9), 627-631. <https://doi.org/10.18632/aging.100201>
- Jurk D., Wilson C., Passos J. F., Oakley F., Correia-Melo C., Greaves L., Saretzki G., Fox C., Lawless C., Anderson R., Hewitt G., Pender S. L. F., Fullard N., Nelson G., Mann J., van de Sluis B., Mann D. A., & von Zglinicki T. (2014). Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat. Commun.*, 5, 4172.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5172>
- Kachirskaja I., Shi X., Yamaguchi H., Tanoue K., Wen H., Wang E. W., Appella E., & Gozani O. (2008). Role for 53BP1 tudor domain recognition of p53 dimethylated at lysine 382 in DNA damage signaling. *J. Biol. Chem.*, 283(50), 34660-34666.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M806020200>
- Kamieniarz K., Izzo A., Dunder M., Tropberger P., Kirfel J., Scheer E., Tropel P., Wisniewski J. R.,

- Tora L., Viville S., Buettner R., & Schneider R. (2012). A dual role of linker histone H1.4 Lys 34 acetylation in transcriptional activation. *Genes Dev.*, 26(8), 797-802. <https://doi.org/10.1101/gad.182014.111>
- Karin M. (1999). How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene*, 18(49), 6867-6874. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203219>
- Katakura Y., Nakata E., Miura T., & Shirahata S. (1999). Transforming growth factor β triggers two independent-senescence programs in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255(1), 110-115. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0129>
- Katayama M. L. H., Vieira R. A. C., Andrade V. P., Roela R. A., Lima L. G. C. A., Kerr L. M., Campos A. P., Pereira C. A. B., Serio P. A. M. P., Encinas G., Maistro S., Petroni M. A. L., Brentani M. M., & Folgueira M. A. A. K. (2019). Stromal cell signature associated with response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Cells*, 8(12), e1566. <https://doi.org/10.3390/cells8121566>
- Kato D., Miyazawa K., Ruas M., Starborg M., Wada I., Oka T., Sakai T., Peters G., & Hara E. (1998). Features of replicative senescence induced by direct addition of antenapedia-p16(INK4A) fusion protein to human diploid fibroblasts. *FEBS Lett.*, 427(2), 203-208. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00426-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00426-8)
- Kato K., Ishii R., Goto E., Ishitani R., Tokunaga F., & Nureki O. (2013). Structural and functional analyses of DNA-sensing and immune activation by human cGAS. *PLoS One*, 8(10), e76983. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076983>
- Kefaloyianni E., Gaitanaki C., & Beis I. (2006). ERK1/2 and p38-MAPK signalling pathways, through MSK1, are involved in NF- κ B transactivation during oxidative stress in skeletal myoblasts. *Cell. Signal.*, 18(12), 2238-2251. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.05.004>
- Kim K. S., Kim M.-S., Seu Y. B., Chung H. Y., Kim J. H., & Kim J.-R. (2007). Regulation of replicative senescence by insulin-like growth factor-binding protein 3 in human umbilical vein endothelial cells. *Aging Cell*, 6(4), 535-545. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00315.x>
- Kim K. S., Seu Y. B., Baek S.-H., Kim M. J., Kim K. J., Kim J. H., & Kim J.-R. (2007). Induction of cellular senescence by insulin-like growth factor binding protein-5 through a p53-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell*, 18(11), 4543-4552. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-03-0280>
- Kipling D., & Cooke H. J. (1990). Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature*, 347(6291), 400-402. <https://doi.org/10.1038/347400a0>
- Klose R. J., & Zhang Y. (2007). Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(4), 307-318. <https://doi.org/10.1038/nrm2143>
- Kortlever R. M., Higgins P. J., & Bernards R. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat. Cell Biol.*, 8(8), 877-884. <https://doi.org/10.1038/ncb1448>
- Kosik K. S. (2010). MicroRNAs and cellular phenotype. *Cell*, 143(1), 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.008>
- Krishnamurthy J., Ramsey M. R., Ligon K. L., Torrice C., Koh A., Bonner-Weir S., & Sharpless N. E. (2006). p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature*, 443(7110), 453-457. <https://doi.org/10.1038/nature05092>
- Krizhanovsky V., Xue W., Zender L., Yon M., Hernandez E., & Lowe S. W. (2008). Implications of cellular senescence in tissue damage response, tumor suppression, and stem cell biology. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 73, 513-522. <https://doi.org/10.1101/sqb.2008.73.048>
- Krizhanovsky V., Yon M., Dickins R. A., Hearn S., Simon J., Miething C., Yee H., Zender L., & Lowe S. W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, 134(4), 657-667. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.049>
- Krtolica A., Parrinello S., Lockett S., Desprez P.-Y., & Campisi J. (2001). Senescent fibroblasts

- promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(21), 12072-12077. <https://doi.org/10.1073/pnas.211053698>
- Kuilman T., Michaloglou C., Vredeveld L. C. W., Douma S., van Doorn R., Desmet C. J., Aarden L. A., Mooi W. J., & Peeper D. S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*, 133(6), 1019-1031. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.039>
- Kuilman T., & Peeper D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat. Rev. Cancer*, 9(2), 81-94. <https://doi.org/10.1038/nrc2560>
- Kujovich J. L. (2016). Evaluation of Anemia. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, 43(2), 247-264. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2016.01.009>
- Kumar S., Millis A. J. T., & Baguoni C. (1992). Expression of interleukin 1-inducible genes and production of interleukin 1 by aging human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(10), 4683-4687. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4683>
- Kumazaki T., Kobayashi M., & Mitsui Y. (1993). Enhanced expression of fibronectin during in vivo cellular aging of human vascular endothelial cells and skin fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 205(2), 396-402. <https://doi.org/10.1006/excr.1993.1103>
- Kurat C. F., Yeeles J. T. P., Patel H., Early A., & Diffley J. F. X. (2017). Chromatin controls DNA replication origin selection, lagging-strand synthesis, and replication fork rates. *Mol. Cell*, 65(1), 117-130. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.016>
- Kwong J., Hong L., Liao R., Deng Q., Han J., & Sun P. (2009). P38alpha and p38gamma mediate oncogenic ras-induced senescence through differential mechanisms. *J. Biol. Chem.*, 284(17), 11237-11246. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808327200>
- Laberge R.-M., Sun Y., Orjalo A. V., Patil C. K., Freund A., Zhou L., Curran S. C., Davalos A. R., Wilson-Edell K. A., Liu S., Limbad C., Demaria M., Li P., Hubbard G. B., Ikeno Y., Javors M., Desprez P.-Y., Benz C. C., Kapahi P., ... Campisi J. (2015). MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat. Cell Biol.*, 17(8), 1049-1061. <https://doi.org/10.1038/ncb3195>
- Laberge R.-M., Zhou L., Sarantos M. R., Rodier F., Freund A., de Keizer P. L. J., Liu S., Demaria M., Cong Y.-S., Kapahi P., Desprez P.-Y., Hughes R. E., & Campisi J. (2012). Glucocorticoids suppress selected components of the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell*, 11(4), 569-578. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00818.x>
- Lawless C., Wang C., Jurk D., Merz A., von Zglinicki T., & Passos J. F. (2010). Quantitative assessment of markers for cell senescence. *Exp. Gerontol.*, 45(10), 772-778. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.018>
- Lazzerini Denchi E., Attwooll C., Pasini D., & Helin K. (2005). Deregulated E2F activity induces hyperplasia and senescence-like features in the mouse pituitary gland. *Mol. Cell. Biol.*, 25(7), 2660-2672. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.7.2660-2672.2005>
- Lee A. C., Fenster B. E., Ito H., Takeda K., Bae N. S., Hirai T., Yu Z.-X., Ferrans V. J., Howard B. H., & Finkel T. (1999). Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.*, 274(12), 7936-7940. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.7936>
- Lee H.-H., Lin C.-H., Lin H.-Y., Kuei C.-H., Zheng J.-Q., Wang Y.-H., Lu L.-S., Lee F.-P., Hu C.-J., Wu D., & Lin Y.-F. (2020). Histone 2A family member J drives mesenchymal transition and temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Cancers*, 12(1), e98. <https://doi.org/10.3390/cancers12010098>
- Lee H.-S., Park J.-H., Kim S.-J., Kwon S.-J., & Kwon J. (2010). A cooperative activation loop among SWI/SNF, γ-H2AX and H3 acetylation for DNA double-strand break repair. *EMBO J.*, 29(8), 1434-1445. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.27>
- Lee J., Thompson J. R., Botuyan M. V., & Mer G. (2008). Distinct binding modes specify the recognition of methylated histones H3K4 and H4K20 by JMJD2A-tudor. *Nat. Struct. Mol.*

- Biol.*, 15(1), 109-111. <https://doi.org/10.1038/nsmb1326>
- Lee K. K., & Workman J. L. (2007). Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8(4), 284-295. <https://doi.org/10.1038/nrm2145>
- Lewis D. A., Yi Q., Travers J. B., & Spandau D. F. (2008). UVB-induced senescence in human keratinocytes requires a functional insulin-like growth factor-1 receptor and p53. *Mol. Biol. Cell*, 19(April), 1346-1353. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-10-1041>
- Li A., Yu Y., Lee S.-C., Ishibashi T., Lees-Miller S. P., & Ausió J. (2010). Phosphorylation of histone H2A.X by DNA-dependent protein kinase is not affected by core histone acetylation, but it alters nucleosome stability and histone H1 binding. *J. Biol. Chem.*, 285(23), 17778-17788. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.116426>
- Lieberman-Aiden E., van Berkum N. L., Williams L., Imakaev M., Ragoczy T., Telling A., Amit I., Lajoie B. R., Sabo P. J., Dorschner M. O., Sandstrom R., Bernstein B. E., Bender M. A., Groudine M., Gnirke A., Stamatoyannopoulos J., Mirny L. A., Lander E. S., & Dekker J. (2009). Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, 326(5950), 289-293. <https://doi.org/10.1126/science.1181369>
- Lin A. W., Barradas M., Stone J. C., van Aelst L., Serrano M., & Lowe S. W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.*, 12(19), 3008-3019. <https://doi.org/10.1101/gad.12.19.3008>
- Liochev S. I. (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic. Biol. Med.*, 60, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011>
- Liu D., & Hornsby P. J. (2007). Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res.*, 67(7), 3117-3126. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3452>
- Liu J., Qiu W., Shen X., & Sun G. (2019). Bioinformatics analysis revealed hub genes and pathways involved in sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Math. Biosci. Eng.*, 16(6), 6319-6334. <https://doi.org/10.3934/mbe.2019315>
- Liu S., Xu Z., Leng H., Zheng P., Yang J., Chen K., Feng J., & Li Q. (2017). RPA binds histone H3-H4 and functions in DNA replication-coupled nucleosome assembly. *Science*, 355(6323), 415-420. <https://doi.org/10.1126/science.aah4712>
- Liu W. H., Roemer S. C., Zhou Y., Shen Z.-J., Dennehey B. K., Balsbaugh J. L., Liddle J. C., Nemkov T., Ahn N. G., Hansen K. C., Tyler J. K., & Churchill M. E. A. (2016). The Cac1 subunit of histone chaperone CAF-1 organizes CAF-1-H3/H4 architecture and tetramerizes histones. *ELife*, 5, e18023. <https://doi.org/10.7554/elife.18023>
- López-Bermejo A., Buckway C. K., Devi G. R., Hwa V., Plymate S. R., Oh Y., & Rosenfeld R. G. (2000). Characterization of insulin-like growth factor-binding protein-related proteins (IGFBP-rPs) 1, 2, and 3 in human prostate epithelial cells: potential roles for IGFBP-rP1 and 2 in senescence of the prostatic epithelium. *Endocrinology*, 141(11), 4072-4080. <https://doi.org/10.1210/endo.141.11.7783>
- Lossaint G., Besnard E., Fisher D., Piette J., & Dulić V. (2011). Chk1 is dispensable for G2 arrest in response to sustained DNA damage when the ATM/p53/p21 pathway is functional. *Oncogene*, 30(41), 4261-4274. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.135>
- Lu S.-Y., Chang K.-W., Liu C.-J., Tseng Y.-H., Lu H.-H., Lee S.-Y., & Lin S.-C. (2006). Ripe areca nut extract induces G1 phase arrests and senescence-associated phenotypes in normal human oral keratinocyte. *Carcinogenesis*, 27(6), 1273-1284. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi357>
- Luger K., Mäder A. W., Richmond R. K., Sargent D. F., & Richmond T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251-260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Lusser A., Urwin D. L., & Kadonaga J. T. (2005). Distinct activities of CHD1 and ACF in ATP-dependent chromatin assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12(2), 160-166.

- <https://doi.org/10.1038/nsmb884>
- Machida S., Takizawa Y., Ishimaru M., Sugita Y., Sekine S., Nakayama J. -i., Wolf M., & Kurumizaka H. (2018). Structural basis of heterochromatin formation by human HP1. *Mol. Cell*, 69(3), 385-397.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.011>
- Mackenzie K. J., Carroll P., Martin C.-A., Murina O., Fluteau A., Simpson D. J., Olova N., Sutcliffe H., Rainger J. K., Leitch A., Osborn R. T., Wheeler A. P., Nowotny M., Gilbert N., Chandra T., Reijns M. A. M., & Jackson A. P. (2017). cGAS surveillance of micronuclei links genome instability to innate immunity. *Nature*, 548(7668), 461-465. <https://doi.org/10.1038/nature23449>
- Maeshima K., Ide S., Hibino K., & Sasai M. (2016). Liquid-like behavior of chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 37, 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.11.006>
- Maier B., Gluba W., Bernier B., Turner T., Mohammad K., Guise T., Sutherland A., Thorner M., & Scrable H. (2004). Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev.*, 18(3), 306-319. <https://doi.org/10.1101/gad.1162404>
- Mallette F. A., Gaumont-Leclerc M.-F., & Ferbeyre G. (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev.*, 21(1), 43-48. <https://doi.org/10.1101/gad.1487307>
- Mannironi C., Bonner W. M., & Hatch C. L. (1989). H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic Acids Res.*, 17(22), 9113-9126. <https://doi.org/10.1093/nar/17.22.9113>
- Marcotte R., Lacelle C., & Wang E. (2004). Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. *Mech. Ageing Dev.*, 125(10-11), 777-783. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.007>
- Margueron R., Trojer P., & Reinberg D. (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 15(2), 163-176. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.01.005>
- Marzluff W. F., Gongidi P., Woods K. R., Jin J., & Maltais L. J. (2002). The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics*, 80(5), 487-498. <https://doi.org/10.1006/geno.2002.6850>
- Mason D. X., Jackson T. J., & Lin A. W. (2004). Molecular signature of oncogenic ras-induced senescence. *Oncogene*, 23(57), 9238-9246. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208172>
- Mattioli F., Gu Y., Yadav T., Balsbaugh J. L., Harris M. R., Findlay E. S., Liu Y., Radebaugh C. A., Stargell L. A., Ahn N. G., Whitehouse I., & Luger K. (2017). DNA-mediated association of two histone-bound complexes of yeast chromatin assembly factor-1 (CAF-1) drives tetrasome assembly in the wake of DNA replication. *ELife*, 6, e22799. <https://doi.org/10.7554/eLife.22799>
- McGinty R. K., & Tan S. (2015). Nucleosome Structure and Function. *Chem. Rev.*, 115(6), 2255-2273. <https://doi.org/10.1021/cr500373h>
- McKinley K. L., & Cheeseman I. M. (2016). The molecular basis for centromere identity and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 17(1), 16-29. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.5>
- McQuibban G. A., Gong J.-H., Wong J. P., Wallace J. L., Clark-Lewis I., & Overall C. M. (2002). Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. *Blood*, 100(4), 1160-1167. https://doi.org/10.1182/blood.v100.4.1160.h81602001160_1160_1167
- Mehta I. S., Figgitt M., Clements C. S., Kill I. R., & Bridger J. M. (2007). Alterations to nuclear architecture and genome behavior in senescent cells. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1100, 250-263. <https://doi.org/10.1196/annals.1395.027>
- Meissner A. (2010). Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat. Biotechnol.*, 28(10), 1079-1088. <https://doi.org/10.1038/nbt1684>
- Mello J. A., Silljé H. H. W., Roche D. M. J., Kirschner D. B., Nigg E. A., & Almouzni G. (2002).

- Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO Rep.*, 3(4), 329-334. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf068>
- Merkenschlager M., & Nora E. P. (2016). CTCF and cohesin in genome folding and transcriptional gene regulation. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 17, 17-43. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083115-022339>
- Michaloglou C., Vredevelde L. C. W., Soengas M. S., Denoyelle C., Kuilman T., van der Horst C. M. A. M., Majoor D. M., Shay J. W., Mooi W. J., & Peeper D. S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 436(7051), 720-724. <https://doi.org/10.1038/nature03890>
- Millán-Ariño L., Islam A. B. M. M. K., Izquierdo-Bouldstridge A., Mayor R., Terme J.-M., Luque N., Sancho M., López-Bigas N., & Jordan A. (2014). Mapping of six somatic linker histone H1 variants in human breast cancer cells uncovers specific features of H1.2. *Nucleic Acids Res.*, 42(7), 4474-4493. <https://doi.org/10.1093/nar/gku079>
- Millis A. J. T., Hoyle M., McCue H. M., & Martini H. (1992). Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 201(2), 373-379. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(92\)90286-H](https://doi.org/10.1016/0014-4827(92)90286-H)
- Milosevich N., & Hof F. (2016). Chemical inhibitors of epigenetic methyllysine reader proteins. *Biochemistry*, 55(11), 1570-1583. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01073>
- Minamino T., Orimo M., Shimizu I., Kunieda T., Yokoyama M., Ito T., Nojima A., Nabetani A., Oike Y., Matsubara H., Ishikawa F., & Komuro I. (2009). A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat. Med.*, 15(9), 1082-1087. <https://doi.org/10.1038/nm.2014>
- Minocha A., & Long B. H. (1984). Inhibition of the DNA catenation activity of type II topoisomerase by VP16-213 and VM26. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122(1), 165-170. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90454-6](https://doi.org/10.1016/0006-291X(84)90454-6)
- Misteli T. (2007). Beyond the sequence: cellular organization of genome function. *Cell*, 128(4), 787-800. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.028>
- Misteli T., Gunjan A., Hock R., Bustin M., & Brown D. T. (2000). Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature*, 408(6814), 877-881. <https://doi.org/10.1038/35048610>
- Mito Y., Henikoff J. G., & Henikoff S. (2005). Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat. Genet.*, 37(10), 1090-1097. <https://doi.org/10.1038/ng1637>
- Miyamoto S. (2011). Nuclear initiated NF- κ B signaling: NEMO and ATM take center stage. *Cell Res.*, 21(1), 116-130. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.179>
- Mizuguchi G., Shen X., Landry J., Wu W.-H., Sen S., & Wu C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science*, 303(5656), 343-348. <https://doi.org/10.1126/science.1090701>
- Moiseeva O., Bourdeau V., Roux A., Deschênes-Simard X., & Ferbeyre G. (2009). Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol. Cell. Biol.*, 29(16), 4495-4507. <https://doi.org/10.1128/mcb.01868-08>
- Moiseeva O., Mallette F. A., Mukhopadhyay U. K., Moores A., & Ferbeyre G. (2006). DNA damage signaling and p53-dependent senescence after prolonged β -interferon stimulation. *Mol. Biol. Cell*, 17(4), 1583-1592. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-09-0858>
- Molofsky A. V., Slutsky S. G., Joseph N. M., He S., Pardoll R., Krishnamurthy J., Sharpless N. E., & Morrison S. J. (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature*, 443(7110), 448-452. <https://doi.org/10.1038/nature05091>
- Montellier E., Boussouar F., Rousseaux S., Zhang K., Buchou T., Fenaille F., Shiota H., Debernardi A., Héry P., Curtet S., Jamshidikia M., Barral S., Holota H., Bergon A., Lopez F., Guardiola P., Pernet K., Imbert J., Petosa C., ... Khochbin S. (2013). Chromatin-to-nucleoprotamine

- transition is controlled by the histone H2B variant TH2B. *Genes Dev.*, 27(15), 1680-1692. <https://doi.org/10.1101/gad.220095.113>
- Morillo-Huesca M., Maya D., Muñoz-Centeno M. C., Singh R. K., Oreal V., Reddy G. U., Liang D., Géli V., Gunjan A., & Chávez S. (2010). FACT prevents the accumulation of free histones evicted from transcribed chromatin and a subsequent cell cycle delay in G1. *PLoS Genet.*, 6(5), e1000964. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000964>
- Mosammaparast N., Ewart C. S., & Pemberton L. F. (2002). A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *EMBO J.*, 21(23), 6527-6538. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf647>
- Moyzis R. K., Buckingham J. M., Crams L. S., Dani M., Deaven L. L., Jones M. D., Meyne J., Ratliff R. L., & Wu J.-R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85(18), 6622-6626. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.18.6622>
- Muñoz-Espín D., Cañamero M., Maraver A., Gómez-López G., Contreras J., Murillo-Cuesta S., Rodríguez-Baeza A., Varela-Nieto I., Ruberte J., Collado M., & Serrano M. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, 155(5), 1104-1118. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019>
- Muñoz-Espín D., Rovira M., Galiana I., Giménez C., Lozano-Torres B., Paez-Ribes M., Llanos S., Chaib S., Muñoz-Martín M., Uceró A. C., Garaulet G., Mulero F., Dann S. G., VanArsdale T., Shields D. J., Bernardos A., Murguía J. R., Martínez-Máñez R., & Serrano M. (2018). A versatile drug delivery system targeting senescent cells. *EMBO Mol. Med.*, 10(9), e9355. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809355>
- Muñoz-Espín D., & Serrano M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 15(7), 482-496. <https://doi.org/10.1038/nrm3823>
- Munro J., Barr N. I., Ireland H., Morrison V., & Parkinson E. K. (2004). Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Exp. Cell Res.*, 295(2), 525-538. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.01.017>
- Muthurajan U. M., McBryant S. J., Lu X., Hansen J. C., & Luger K. (2011). The linker region of macroH2A promotes self-association of nucleosomal arrays. *J. Biol. Chem.*, 286(27), 23852-23864. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.244871>
- Nardella C., Clohessy J. G., Alimonti A., & Pandolfi P. P. (2011). Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer*, 11(7), 503-511. <https://doi.org/10.1038/nrc3057>
- Narita M. (2007). Cellular senescence and chromatin organisation. *Br. J. Cancer*, 96(5), 686-691. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603636>
- Narita M., Narita M., Krizhanovsky V., Núñez S., Chicas A., Hearn S. A., Myers M. P., & Lowe S. W. (2006). A novel role for high-mobility group A proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell*, 126(3), 503-514. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.052>
- Narita M., Núñez S., Heard E., Narita M., Lin A. W., Hearn S. A., Spector D. L., Hannon G. J., & Lowe S. W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113(6), 703-716. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00401-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00401-X)
- Nativio R., Donahue G., Berson A., Lan Y., Amlie-Wolf A., Tuzer F., Toledo J. B., Gosai S. J., Gregory B. D., Torres C., Trojanowski J. Q., Wang L.-S., Johnson F. B., Bonini N. M., & Berger S. L. (2018). Dysregulation of the epigenetic landscape of normal aging in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.*, 21(4), 497-505. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0101-9>
- Nelson D. M., Jaber-Hijazi F., Cole J. J., Robertson N. A., Pawlikowski J. S., Norris K. T., Criscione S. W., Pchelintsev N. A., Piscitello D., Stong N., Rai T. S., McBryan T., Otte G. L.,

- Nixon C., Clark W., Riethman H., Wu H., Schotta G., Garcia B. A., ... Adams P. D. (2016). Mapping H4K20me3 onto the chromatin landscape of senescent cells indicates a function in control of cell senescence and tumor suppression through preservation of genetic and epigenetic stability. *Genome Biol.*, 17(1), 158. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1017-x>
- Nishida H., Suzuki T., Tomaru Y., & Hayashizaki Y. (2005). A novel replication-independent histone H2a gene in mouse. *BMC Genet.*, 6, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-6-10>
- Nishino Y., Eltsov M., Joti Y., Ito K., Takata H., Takahashi Y., Hihara S., Frangakis A. S., Imamoto N., Ishikawa T., & Maeshima K. (2012). Human mitotic chromosomes consist predominantly of irregularly folded nucleosome fibres without a 30-nm chromatin structure. *EMBO J.*, 31(7), 1644-1653. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.35>
- Nora E. P., Lajoie B. R., Schulz E. G., Giorgetti L., Okamoto I., Servant N., Piolot T., van Berkum N. L., Meisig J., Sedat J., Gribnau J., Barillot E., Blüthgen N., Dekker J., & Heard E. (2012). Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation center. *Nature*, 485(7398), 381-385. <https://doi.org/10.1038/nature11049>
- O'Neill L. A. J., & Dinarello C. A. (2000). The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol. Today*, 21(5), 206-209. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01611-X](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01611-X)
- Ogrodnik M., Miwa S., Tchkonja T., Tiniakos D., Wilson C. L., Lahat A., Day C. P., Burt A., Palmer A., Anstee Q. M., Grellscheid S. N., Hoeijmakers J. H. J., Barnhoorn S., Mann D. A., Bird T. G., Vermeij W. P., Kirkland J. L., Passos J. F., von Zglinicki T., & Jurk D. (2017). Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nat. Commun.*, 8, 15691. <https://doi.org/10.1038/ncomms15691>
- Ogryzko V. V., Hirai T. H., Russanova V. R., Barbie D. A., & Howard B. H. (1996). Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol. Cell. Biol.*, 16(9), 5210-5218. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.9.5210>
- Ohtani K., DeGregori J., & Nevins J. R. (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(26), 12146-12150. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.26.12146>
- Ohtani N., Zebedee Z., Huot T. J. G., Stinson J. A., Sugimoto M., Ohashi Y., Sharrocks A. D., Peters G., & Hara E. (2001). Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature*, 409(6823), 1067-1070. <https://doi.org/10.1038/35059131>
- Olsen C. L., Gardie B., Yaswen P., & Stampfer M. R. (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), 6328-6339. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205780>
- Orjalo A. V., Bhaumik D., Gengler B. K., Scott G. K., & Campisi J. (2009). Cell surface-bound IL-1α is an upstream regulator of the senescence-associated IL-6/IL-8 cytokine network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(40), 17031-17036. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905299106>
- Ovadya Y., Landsberger T., Leins H., Vadai E., Gal H., Biran A., Yosef R., Sagiv A., Agrawal A., Shapira A., Windheim J., Tsoory M., Schirmbeck R., Amit I., Geiger H., & Krizhanovsky V. (2018). Impaired immune surveillance accelerates accumulation of senescent cells and aging. *Nat. Commun.*, 9(1), 5435. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07825-3>
- Packer L., & Fuehr K. (1977). Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature*, 267(5610), 423-425. <https://doi.org/10.1038/267423a0>
- Palm W., & de Lange T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu. Rev. Genet.*, 42, 301-334. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130350>
- Palmer A. K., Xu M., Zhu Y., Pirtskhalava T., Weivoda M. M., Hachfeld C. M., Prata L. G., van Dijk T. H., Verkade E., Casaccia-Verzosa G., Johnson K. O., Cubro H., Doornebal E. J., Ogrodnik M., Jurk D., Jensen M. D., Chini E. N., Miller J. D., Matveyenko A., ... Kirkland J. L. (2019). Targeting senescent cells alleviates obesity-induced metabolic dysfunction. *Aging Cell*,

- 18(3), e12950. <https://doi.org/10.1111/ace1.12950>
- Pandey N. B., Chodchoy N., Liu T.-J., & Marzluft W. F. (1990). Introns in histone genes alter the distribution of 3' ends. *Nucleic Acids Res.*, 18(11), 3161-3170. <https://doi.org/10.1093/nar/18.11.3161>
- Parapuram S. K., Cojocaru R. I., Chang J. R., Khanna R., Brooks M., Othman M., Zarepari S., Khan N. W., Gotoh N., Cogliati T., & Swaroop A. (2010). Distinct signature of altered homeostasis in aging rod photoreceptors: implications for retinal diseases. *PLoS One*, 5(11), e13885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013885>
- Pardal A. J., Fernandes-Duarte F., & Bowman A. J. (2019). The histone chaperoning pathway : from ribosome to nucleosome. *Essays Biochem.*, 63(1), 29-43. <https://doi.org/10.1042/EBC20180055>
- Parhofer K. G. (2015). Interaction between glucose and lipid metabolism: more than diabetic dyslipidemia. *Diabetes Metab. J.*, 39(5), 353-362. <https://doi.org/10.4093/dmj.2015.39.5.353>
- Parrinello S., Coppé J.-P., Krtolica A., & Campisi J. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J. Cell Sci.*, 118(3), 485-496. <https://doi.org/10.1242/jcs.01635>
- Parrinello S., Samper E., Krtolica A., Goldstein J., Melov S., & Campisi J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.*, 5(8), 741-747. <https://doi.org/10.1038/ncb1024>
- Pasque V., Gillich A., Garrett N., & Gurdon J. B. (2011). Histone variant macroH2A confers resistance to nuclear reprogramming. *EMBO J.*, 30(12), 2373-2387. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.144>
- Patel D. J. (2016). A structural perspective on readout of epigenetic histone and DNA methylation marks. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 8(3), a018754. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018754>
- Paul M. K., Bisht B., Darmawan D. O., Chiou R., Ha V. L., Wallace W. D., Chon A. T., Hegab A. E., Grogan T., Elashoff D. A., Alva-Ornelas J. A., & Gomperts B. N. (2014). Dynamic changes in intracellular ROS levels regulate airway basal stem cell homeostasis through Nrf2-dependent Notch signaling. *Cell Stem Cell*, 15(2), 199-214. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.05.009>
- Pawson T., Gish G. D., & Nash P. (2001). SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol.*, 11(12), 504-511. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02154-7](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02154-7)
- Petersen S., Casellas R., Reina-San-Martin B., Chen H. T., Difilippantonio M. J., Wilson P. C., Hanitsch L., Celeste A., Muramatsu M., Pilch D. R., Redon C., Ried T., Bonner W. M., Honjo T., Nussenzweig M. C., & Nussenzweig A. (2001). AID is required to initiate Nbs1/γ-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature*, 414(6864), 660-665. <https://doi.org/10.1038/414660a>
- Platonova O., Akey I. V., Head J. F., & Akey C. W. (2011). Crystal structure and function of human nucleoplasmin (Npm2): a histone chaperone in oocytes and embryos. *Biochemistry*, 50(37), 8078-8089. <https://doi.org/10.1021/bi2006652>
- Price J. S., Waters J. G., Darrah C., Pennington C., Edwards D. R., Donell S. T., & Clark I. M. (2002). The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell*, 1(1), 57-65. <https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2002.00008.x>
- Prior C. P., Cantor C. R., Johnson E. M., & Allfrey V. G. (1980). Incorporation of exogenous pyrene-labeled histone into Physarum chromatin: a system for studying changes in nucleosomes assembled in vivo. *Cell*, 20(3), 597-608. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90306-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90306-2)
- Prowse K. R., & Greider C. W. (1995). Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(11), 4818-4822.

<https://doi.org/10.1073/pnas.92.11.4818>

- Raher M. J., Thibault H. B., Buys E. S., Kuruppu D., Shimizu N., Brownell A.-L., Blake S. L., Rieusset J., Kaneki M., Derumeaux G., Picard M. H., Bloch K. D., & Scherrer-Crosbie M. (2008). A short duration of high-fat diet induces insulin resistance and predisposes to adverse left ventricular remodeling after pressure overload. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 295(6), H2495-502. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00139.2008>
- Rai T. S., Cole J. J., Nelson D. M., Dikovskaya D., Faller W. J., Vizioli M. G., Hewitt R. N., Anannya O., McBryan T., Manoharan I., van Tuyn J., Morrice N., Pchelintsev N. A., Ivanov A., Brock C., Drotar M. E., Nixon C., Clark W., Sansom O. J., ... Adams P. D. (2014). HIRA orchestrates a dynamic chromatin landscape in senescence and is required for suppression of neoplasia. *Genes Dev.*, 28(24), 2712-2725. <https://doi.org/10.1101/gad.247528.114>
- Ramirez R. D., Morales C. P., Herbert B.-S., Rohde J. M., Passons C., Shay J. W., & Wright W. E. (2001). Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev.*, 15(4), 398-403. <https://doi.org/10.1101/gad.859201>
- Rasmussen T. P., Huang T., Mastrangelo M.-A., Loring J., Panning B., & Jaenisch R. (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 Res.*, 27(18), 3685-3689. <https://doi.org/10.1093/nar/27.18.3685>
- Rebbaa A., Zheng X., Chou P. M., & Mirkin B. L. (2003). Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene*, 22(18), 2805-2811. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206366>
- Richet N., Liu D., Legrand P., Velours C., Corpet A., Gaubert A., Bakail M., Moal-Raisin G., Guerois R., Compper C., Besle A., Guichard B., Almouzni G., & Ochsenbein F. (2015). Structural insight into how the human helicase subunit MCM2 may act as a histone chaperone together with ASF1 at the replication fork. *Nucleic Acids Res.*, 43(3), 1905-1917. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv021>
- Roberson R. S., Kussick S. J., Vallieres E., Chen S.-Y. J., & Wu D. Y. (2005). Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res.*, 65(7), 2795-2803. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1270>
- Robinson P. J. J., & Rhodes D. (2006). Structure of the "30 nm" chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 16(3), 336-343. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.05.007>
- Rodier F., Coppé J.-P., Patil C. K., Hoeijmakers W. A. M., Muñoz D. P., Raza S. R., Freund A., Campeau E., Davalos A. R., & Campisi J. (2009). Persistent DNA damage signaling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.*, 11(8), 973-979. <https://doi.org/10.1038/ncb1909>
- Rolef Ben-Shahar T., Castillo A. G., Osborne M. J., Borden K. L. B., Kornblatt J., & Verreault A. (2009). Two fundamentally distinct PCNA interaction peptides contribute to chromatin assembly factor 1 function. *Mol. Cell. Biol.*, 29(24), 6353-6365. <https://doi.org/10.1128/mcb.01051-09>
- Roninson I. B. (2003). Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res.*, 63(11), 2705-2715.
- Rosen N., Chalifa-Caspi V., Shmueli O., Adato A., Lapidot M., Stampnitzky J., Safran M., & Lancet D. (2003). GeneLoc: exon-based integration of human genome maps. *Bioinformatics*, 19(SUPPL. 1), 222-224. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg1030>
- Rosin L. F., Nguyen S. C., & Joyce E. F. (2018). Condensin II drives large-scale folding and spatial partitioning of interphase chromosomes in *Drosophila* nuclei. *PLoS Genet.*, 14(7), e1007393. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007393>
- Rossetto D., Avvakumov N., & Côté J. (2012). Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*, 7(10), 1098-1108.

- <https://doi.org/10.4161/epi.21975>
- Ruhl D. D., Jin J., Cai Y., Swanson S., Florens L., Washburn M. P., Conaway R. C., Conaway J. W., & Chrivia J. C. (2006). Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry*, 45(17), 5671-5677. <https://doi.org/10.1021/bi060043d>
- Ruiz-Carrillo A., Wang L. J., & Allfrey V. G. (1975). Processing of newly synthesized histone molecules. *Science*, 190(4210), 117-128. <https://doi.org/10.1126/science.1166303>
- 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 Differ.*, 14(5), 1020-1028. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402091>
- Sakabe K., Wang Z., & Hart G. W. (2010). β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(46), 19915-19920. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009023107>
- Sarkar D., Lebedeva I. V., Emdad L., Kang D.-C., Baldwin A. S., & Fisher P. B. (2004). Human polynucleotide phosphorylase (hPNPaseold-35): a potential link between aging and inflammation. *Cancer Res.*, 64(20), 7473-7478. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1772>
- Sarkisian C. J., Keister B. A., Stairs D. B., Boxer R. B., Moody S. E., & Chodosh L. A. (2007). Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.*, 9(5), 493-505. <https://doi.org/10.1038/ncb1567>
- Schafer M. J., White T. A., Iijima K., Haak A. J., Ligresti G., Atkinson E. J., Oberg A. L., Birch J., Salmonowicz H., Zhu Y., Mazula D. L., Brooks R. W., Fuhrmann-Stroissnigg H., Pirtskhalava T., Prakash Y. S., Tchkonja T., Robbins P. D., Aubry M. C., Passos J. F., ... LeBrasseur N. K. (2017). Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat. Commun.*, 8, 14532. <https://doi.org/10.1038/ncomms14532>
- Schmitt C. A., Fridman J. S., Yang M., Lee S., Baranov E., Hoffman R. M., & Lowe S. W. (2002). A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*, 109(3), 335-346. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00734-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00734-1)
- Schroder K., & Tschopp J. (2010). The Inflammasomes. *Cell*, 140(6), 821-832. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>
- Schwartz B. E., & Ahmad K. (2005). Transcriptional activation triggers deposition and removal of the histone variant H3.3. *Genes Dev.*, 19(7), 804-814. <https://doi.org/10.1101/gad.1259805>
- Seluanov A., Gorbunova V., Falcovitz A., Sigal A., Milyavsky M., Zurer I., Shohat G., Goldfinger N., & Rotter V. (2001). Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Mol. Cell. Biol.*, 21(5), 1552-1564. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.5.1552-1564.2001>
- Sen P., Lan Y., Li C. Y., Sidoli S., Donahue G., Dou Z., Frederick B., Chen Q., Luense L. J., Garcia B. A., Dang W., Johnson F. B., Adams P. D., Schultz D. C., & Berger S. L. (2019). Histone acetyltransferase p300 induces de novo super-enhancers to drive cellular senescence. *Mol. Cell*, 73(4), 684-698.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.01.021>
- Serrano M. (2014). Senescence helps regeneration. *Dev. Cell*, 31(6), 671-672. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.12.007>
- Serrano M., Hannon G. J., & Beach D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366(6456), 704-707. <https://doi.org/10.1038/366704a0>
- Serrano M., Lin A. W., McCurrach M. E., Beach D., & Lowe S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell*, 88(5), 593-602. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81902-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81902-9)
- Shah P. P., Donahue G., Otte G. L., Capell B. C., Nelson D. M., Cao K., Aggarwala V., Cruickshanks H. A., Rai T. S., McBryan T., Gregory B. D., Adams P. D., & Berger S. L. (2013). Lamin B1

- depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape. *Genes Dev.*, 27(16), 1787-1799.
<https://doi.org/10.1101/gad.223834.113>
- Shay J. W., & Bacchetti S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer*, 33(5), 787-791. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(97\)00062-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(97)00062-2)
- Shay J. W., & Roninson I. B. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*, 23(16), 2919-2933. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207518>
- Shelton D. N., Chang E., Whittier P. S., Choi D., & Funk W. D. (1999). Microarray analysis of replicative senescence. *Curr. Biol.*, 9(17), 939-945. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80420-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80420-5)
- Sherr C. J., & McCormick F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2(2), 103-112. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(02)00102-2)
- Shi X., Hong T., Walter K. L., Ewalt M., Michishita E., Hung T., Carney D., Peña P., Lan F., Kaadige M. R., Lacoste N., Cayrou C., Davrazou F., Saha A., Cairns B. R., Ayer D. E., Kutateladze T. G., Shi Y., Côté J., ... Gozani O. (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature*, 442(7098), 96-99.
<https://doi.org/10.1038/nature04835>
- Shimi T., Butin-Israeli V., Adam S. A., Hamanaka R. B., Goldman A. E., Lucas C. A., Shumaker D. K., Kosak S. T., Chandel N. S., & Goldman R. D. (2011). The role of nuclear lamin B1 in cell proliferation and senescence. *Genes Dev.*, 25(24), 2579-2593.
<https://doi.org/10.1101/gad.179515.111>
- Shukla M. S., Syed S. H., Goutte-Gattat D., Lalith J., Richard C., Montel F., Hamiche A., Travers A., Faivre-Moskalenko C., Bednar J., Hayes J. J., Angelov D., & Dimitrov S. (2011). The docking domain of histone H2A is required for H1 binding and RSC-mediated nucleosome remodeling. *Nucleic Acids Res.*, 39(7), 2559-2570. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1174>
- Shuster A., Patlas M., Pinthus J. H., & Mourtzakis M. (2012). The clinical importance of visceral adiposity: a critical review of methods for visceral adipose tissue analysis. *Br. J. Radiol.*, 85(1009), 1-10. <https://doi.org/10.1259/bjr/38447238>
- Simon M. M., Greenaway S., White J. K., Fuchs H., Gailus-Durner V., Wells S., Sorg T., Wong K., Bedu E., Cartwright E. J., Dacquin R., Djebali S., Estabel J., Graw J., Ingham N. J., Jackson I. J., Lengeling A., Mandillo S., Marvel J., ... Steel K. P. (2013). A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol.*, 14(7), R82.
<https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-7-r82>
- Simon M., Van Meter M., Ablaeva J., Ke Z., Gonzalez R. S., Taguchi T., De Cecco M., Leonova K. I., Kogan V., Helfand S. L., Neretti N., Roichman A., Cohen H. Y., Meer M. V., Gladyshev V. N., Antoch M. P., Gudkov A. V., Sedivy J. M., Seluanov A., & Gorbunova V. (2019). LINE1 derepression in aged wild-type and SIRT6-deficient mice drives inflammation. *Cell Metab.*, 29(4), 871-885.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.02.014>
- Skene P. J., & Henikoff S. (2013). Histone variants in pluripotency and disease. *Development*, 140(12), 2513-2524. <https://doi.org/10.1242/dev.091439>
- Slater L. M., Allen M. D., & Bycroft M. (2003). Structural variation in PWWP domains. *J. Mol. Biol.*, 330(3), 571-576. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00470-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00470-4)
- Smolle M., Venkatesh S., Gogol M. M., Li H., Zhang Y., Florens L., Washburn M. P., & Workman J. L. (2012). Chromatin remodelers Isw1 and Chd1 maintain chromatin structure during transcription by preventing histone exchange. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19(9), 884-892.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2312>
- Sparmann A., & Bar-Sagi D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell*, 6(5), 447-458.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.09.028>
- Stein G. H., Drullinger L. F., Soulard A., & Dulić V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent

- kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, 19(3), 2109-2117. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.3.2109>
- Storer M., Mas A., Robert-Moreno A., Pecoraro M., Ortells M. C., Di Giacomo V., Yosef R., Pilpel N., Krizhanovsky V., Sharpe J., & Keyes W. M. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, 155(5), 1119-1130. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041>
- Strahl B. D., & Allis C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403(6765), 41-45. <https://doi.org/10.1038/47412>
- Stucki M., Clapperton J. A., Mohammad D., Yaffe M. B., Smerdon S. J., & Jackson S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 123(7), 1213-1226. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.038>
- Stucki M., & Jackson S. P. (2006). γ H2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair*, 5(5), 534-543. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.01.012>
- Sun L., Wu J., Du F., Chen X., & Chen Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science*, 339(6121), 786-791. <https://doi.org/10.1126/science.1232458>
- Suto R. K., Clarkson M. J., Tremethick D. J., & Luger K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 7(12), 1121-1124. <https://doi.org/10.1038/81971>
- Suzuki K., Mori I., Nakayama Y., Miyakoda M., Kodama S., & Watanabe M. (2001). Radiation-induced senescence-like growth arrest requires TP53 function but not telomere shortening. *Radiat. Res.*, 155(1), 248-253. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2001\)155\[0248:rislga\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2001)155[0248:rislga]2.0.co;2)
- Takahashi A., Loo T. M., Okada R., Kamachi F., Watanabe Y., Wakita M., Watanabe S., Kawamoto S., Miyata K., Barber G. N., Ohtani N., & Hara E. (2018). Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat. Commun.*, 9(1), 1249. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03555-8>
- Takata H., Hanafusa T., Mori T., Shimura M., Iida Y., Ishikawa K., Yoshikawa K., Yoshikawa Y., & Maeshima K. (2013). Chromatin compaction protects genomic DNA from radiation damage. *PLoS One*, 8(10), e75622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075622>
- Talbert P. B., & Henikoff S. (2010). Histone variants - ancient wrap artists of the epigenome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11(4), 264-275. <https://doi.org/10.1038/nrm2861>
- Tamkun J. W., Deuring R., Scott M. P., Kissinger M., Pattatucci A. M., Kaufman T. C., & Kennison J. A. (1992). brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2. *Cell*, 68(3), 561-572. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90191-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90191-E)
- Tan M., Luo H., Lee S., Jin F., Yang J. S., Montellier E., Buchou T., Cheng Z., Rousseaux S., Rajagopal N., Lu Z., Ye Z., Zhu Q., Wysocka J., Ye Y., Khochbin S., Ren B., & Zhao Y. (2011). Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell*, 146(6), 1016-1028. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.008>
- Tanaka H., Sato S., Koyama M., Kujirai T., & Kurumizaka H. (2020). Biochemical and structural analyses of the nucleosome containing human histone H2A.J. *J. Biochem.*, 167(4), 419-427. <https://doi.org/10.1093/jb/mvz109>
- Tarutani M., Cai T., Dajee M., & Khavari P. A. (2003). Inducible activation of Ras and Raf in adult epidermis. *Cancer Res.*, 63(2), 319-323.
- Tasdemir N., Banito A., Roe J.-S., Alonso-Curbelo D., Camiolo M., Tschaharganeh D. F., Huang C.-H., Aksoy O., Bolden J. E., Chen C.-C., Fennell M., Thapar V., Chicas A., Vakoc C. R., & Lowe S. W. (2016). BRD4 connects enhancer remodeling to senescence immune surveillance. *Cancer Discov.*, 6(6), 612-629. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0217>

- Tchkonia T., Morbeck D. E., von Zglinicki T., van Deursen J., Lustgarten J., Scrable H., Khosla S., Jensen M. D., & Kirkland J. L. (2010). Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*, 9(5), 667-684. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00608.x>
- te Poele R. H., Okorokov A. L., Jardine L., Cummings J., & Joel S. P. (2002). DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, 62(6), 1876-1883.
- Ternacle J., Wan F., Sawaki D., Surenaud M., Pini M., Mercedes R., Ernande L., Audureau E., Dubois-Rande J.-L., Adnot S., Hue S., Czibik G., & Derumeaux G. (2017). Short-term high-fat diet compromises myocardial function: a radial strain rate imaging study. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging*, 18(11), 1283-1291. <https://doi.org/10.1093/ehjci/jew316>
- Teske K. A., & Hadden M. K. (2017). Methyllysine binding domains: structural insight and small molecule probe development. *Eur. J. Med. Chem.*, 136, 14-35. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.047>
- Thakar A., Gupta P., Ishibashi T., Finn R., Silva-Moreno B., Uchiyama S., Fukui K., Tomschik M., Ausio J., & Zlatanova J. (2009). H2A.Z and H3.3 histone variants affect nucleosome structure: biochemical and biophysical studies. *Biochemistry*, 48(46), 10852-10857. <https://doi.org/10.1021/bi901129e>
- Tolstorukov M. Y., Goldman J. A., Gilbert C., Ogryzko V., Kingston R. E., & Park P. J. (2012). Histone variant H2A.Bbd is associated with active transcription and mRNA processing in human cells. *Mol. Cell*, 47(4), 596-607. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.011>
- Torigoe S. E., Urwin D. L., Ishii H., Smith D. E., & Kadonaga J. T. (2011). Identification of a rapidly formed non-nucleosomal histone-DNA intermediate that is converted into chromatin by ACF. *Mol. Cell*, 43(4), 638-648. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.017>
- 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. *Exp. Gerontol.*, 35(8), 927-945. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00180-7](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00180-7)
- Tran T. T., Yamamoto Y., Gesta S., & Kahn C. R. (2008). Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab.*, 7(5), 410-120. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.04.004>
- Treinin I., Paterson H. F., Hooper S., Wilson R., & Marshall C. J. (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. *Mol. Cell. Biol.*, 19(1), 321-329. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.1.321>
- Tremethick D. J. (2007). Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell*, 128(4), 651-654. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.008>
- Trojer P., & Reinberg D. (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol. Cell*, 28(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.011>
- Tuveson D. A., Shaw A. T., Willis N. A., Silver D. P., Jackson E. L., Chang S., Mercer K. L., Grochow R., Hock H., Crowley D., Hingorani S. R., Zaks T., King C., Jacobetz M. A., Wang L., Bronson R. T., Orkin S. H., DePinho R. A., & Jacks T. (2004). Endogenous oncogenic K-ras(G12D) stimulates proliferation and widespread neoplastic and developmental defects. *Cancer Cell*, 5(4), 375-387. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(04\)00085-6](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00085-6)
- Tyner S. D., Venkatachalam S., Choi J., Jones S., Ghebranious N., Igelmann H., Lu X., Soron G., Cooper B., Brayton C., Park S. H., Thompson T., Karsenty G., Bradley A., & Donehower L. A. (2002). P53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*, 415(6867), 45-53. <https://doi.org/10.1038/415045a>
- van der Loo B., Labugger R., Skepper J. N., Bachschmid M., Kilo J., Powell J. M., Palacios-Callender M., Erusalimsky J. D., Quaschnig T., Malinski T., Gygi D., Ullrich V., & Lüscher T. F. (2000). Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J. Exp. Med.*, 192(12), 1731-1743. <https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1731>
- van Steensel B., & Belmont A. S. (2017). Lamina-associated domains: links with chromosome

- architecture, heterochromatin, and gene repression. *Cell*, 169(5), 780-791.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.022>
- VanDemark A. P., Blanksma M., Ferris E., Heroux A., Hill C. P., & Formosa T. (2006). The structure of the yFACT Pob3-M domain, its interaction with the DNA replication factor RPA, and a potential role in nucleosome deposition. *Mol. Cell*, 22(3), 363-374.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.025>
- Varga-Weisz P. D., Wilm M., Bonte E., Dumas K., Mann M., & Becker P. B. (1997). Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II. *Nature*, 388(6642), 598-602. <https://doi.org/10.1038/41587>
- Vaziri H., West M. D., Allsopp R. C., Davison T. S., Wu Y.-S., Arrowsmith C. H., Poirier G. G., & Benchimol S. (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 J.*, 16(19), 6018-6033.
<https://doi.org/10.1093/emboj/16.19.6018>
- Ventura A., Kirsch D. G., McLaughlin M. E., Tuveson D. A., Grimm J., Lintault L., Newman J., Reczek E. E., Weissleder R., & Jacks T. (2007). Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature*, 445(7128), 661-665. <https://doi.org/10.1038/nature05541>
- Vermeulen L., De Wilde G., Van Damme P., Vanden Berghe W., & Haegeman G. (2003). Transcriptional activation of the NF- κ B p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *EMBO J.*, 22(6), 1313-1324.
<https://doi.org/10.1093/emboj/cdg139>
- Vermeulen M., Mulder K. W., Denissov S., Pijnappel W. W. M. P., van Schaik F. M. A., Varier R. A., Baltissen M. P. A., Stunnenberg H. G., Mann M., & Timmers H. T. M. (2007). Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell*, 131(1), 58-69. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.016>
- Vogler C., Huber C., Waldmann T., Ettig R., Braun L., Izzo A., Daujat S., Chassignet I., Lopez-Contreras A. J., Fernandez-Capetillo O., Dundr M., Rippe K., Längst G., & Schneider R. (2010). Histone H2A C-terminus regulates chromatin dynamics, remodeling, and histone H1 binding. *PLoS Genet.*, 6(12), e1001234. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001234>
- von Zglinicki T., Saretzki G., Ladhoff J., d'Adda di Fagagna F., & Jackson S. P. (2005). Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech. Ageing Dev.*, 126(1), 111-117.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.09.034>
- Waddington C. H. (1942). Canalization of development and the inheritance of acquired characters. *Nature*, 150(3811), 563-565. <https://doi.org/10.1038/150563a0>
- Wajapeyee N., Serra R. W., Zhu X., Mahalingam M., & Green M. R. (2008). Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell*, 132(3), 363-374. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.032>
- Wang E. (1995). Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res.*, 55(11), 2284-2292.
- Wang H., Wang M., Yang N., & Xu R.-M. (2015). Structure of the quaternary complex of histone H3-H4 heterodimer with chaperone ASF1 and the replicative helicase subunit MCM2. *Protein Cell*, 6(9), 693-697. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0190-0>
- Wang T., Liu Y., Edwards G., Krzizike D., Scherman H., & Luger K. (2018). The histone chaperone FACT modulates nucleosome structure by tethering its components. *Life Sci. Alliance*, 1(4), e201800107. <https://doi.org/10.26508/lsa.201800107>
- Wang W., Yin Y., Xu L., Su J., Huang F., Wang Y., Boor P. P. C., Chen K., Wang W., Cao W., Zhou X., Liu P., van der Laan L. J. W., Kwekkeboom J., Peppelenbosch M. P., & Pan Q. (2017). Unphosphorylated ISGF3 drives constitutive expression of interferon-stimulated genes to protect against viral infections. *Sci. Signal.*, 10(476), eaah4248.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aah4248>

- Wang X., Ghareeb W. M., Lu X., Huang Y., Huang S., & Chi P. (2019). Coexpression network analysis linked H2AFJ to chemoradiation resistance in colorectal cancer. *J. Cell. Biochem.*, 120(6), 10351-10362. <https://doi.org/10.1002/jcb.28319>
- Ward I. M., Minn K., Jorda K. G., & Chen J. (2003). Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J. Biol. Chem.*, 278(22), 19579-19582. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300117200>
- Watson J. D., & Crick F. H. C. (1953). Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 248(5451), 737-738. <https://doi.org/10.1038/248765a0>
- 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. *Exp. Cell Res.*, 184(1), 138-147. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(89\)90372-8](https://doi.org/10.1016/0014-4827(89)90372-8)
- West M. D., Shay J. W., Wright W. E., & Linskens M. H. K. (1996). Altered expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during cellular senescence. *Exp. Gerontol.*, 31(1-2), 175-193. [https://doi.org/10.1016/0531-5565\(95\)02013-6](https://doi.org/10.1016/0531-5565(95)02013-6)
- West M. H. P., & Bonner W. M. (1980). Histone 2A, a heteromorphous family of eight protein species. *Biochemistry*, 19(14), 3238-3245. <https://doi.org/10.1021/bi00555a022>
- Weyand C. M., & Goronzy J. J. (2016). Aging of the immune system: mechanisms and therapeutic targets. *Ann. Am. Thorac. Soc.*, 13(SUPPL. 5), S422-S428. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201602-095AW>
- Widom J. (1992). A relationship between the helical twist of DNA and the ordered positioning of nucleosomes in all eukaryotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(3), 1095-1099. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.3.1095>
- Winzell M. S., Magnusson C., & Ahrén B. (2007). Temporal and dietary fat content-dependent islet adaptation to high-fat feeding-induced glucose intolerance in mice. *Metabolism*, 56(1), 122-128. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2006.09.008>
- Winzell M. S., Pacini G., Wollheim C. B., & Ahrén B. (2004). B-cell-targeted expression of a dominant-negative mutant of Hepatocyte Nuclear Factor-1alpha in mice. *Diabetes*, 53(Suppl 3), 92-96. https://doi.org/10.2337/diabetes.53.suppl_3.s92
- Wittmeyer J., & Formosa T. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* DNA polymerase alpha catalytic subunit interacts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a protein similar to an HMGI-like protein. *Mol. Cell. Biol.*, 17(7), 4178-4190. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.7.4178>
- Woo R. A., & Poon R. Y. C. (2004). Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes Dev.*, 18(11), 1317-1330. <https://doi.org/10.1101/gad.1165204>
- Woods D., Parry D., Cherwinski H., Bosch E., Lees E., & McMahon M. (1997). Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21CIP1. *Mol. Cell. Biol.*, 17(9), 5598-5611. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.9.5598>
- Wright W. E., Tesmer V. M., Huffman K. E., Levene S. D., & Shay J. W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.*, 11(21), 2801-2809. <https://doi.org/10.1101/gad.11.21.2801>
- Wu R. S., Tsai S., & Bonner W. M. (1982). Patterns of histone variant synthesis can distinguish G0 from G1 cells. *Cell*, 31(2), 367-374. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90130-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90130-1)
- Wu Z.-H., Shi Y., Tibbetts R. S., & Miyamoto S. (2006). Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science*, 311(5764), 1141-1146. <https://doi.org/10.1126/science.1121513>
- Xiao A., Li H., Shechter D., Ahn S. H., Fabrizio L. A., Erdjument-Bromage H., Ishibe-Murakami S., Wang B., Tempst P., Hofmann K., Patel D. J., Elledge S. J., & Allis C. D. (2009). WSTF regulates the function of H2AX via a novel tyrosine kinase activity. *Nature*, 457(7225), 57-62. <https://doi.org/10.1038/nature07668>

- Xie Z., Dai J., Dai L., Tan M., Cheng Z., Wu Y., Boeke J. D., & Zhao Y. (2012). Lysine succinylation and lysine malonylation in histones. *Mol. Cell. Proteomics*, 11(5), 100-107. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.015875>
- Xu D., Bai J., Duan Q., Costa M., & Dai W. (2009). Covalent modifications of histones during mitosis and meiosis. *Cell Cycle*, 8(22), 3688-3694. <https://doi.org/10.4161/cc.8.22.9908>
- Xu D., & Tahara H. (2013). The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(3), 368-375. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.010>
- Xu L., Glass C. K., & Rosenfeld M. G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9(2), 140-147. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(99\)80021-5](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(99)80021-5)
- Xu M., Bradley E. W., Weivoda M. M., Hwang S. M., Pirtskhalava T., Decklever T., Curran G. L., Ogrodnik M., Jurk D., Johnson K. O., Lowe V., Tchkonja T., Westendorf J. J., & Kirkland J. L. (2017). Transplanted senescent cells induce an osteoarthritis-like condition in mice. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 72(6), 780-785. <https://doi.org/10.1093/gerona/glw154>
- Xu M., Pirtskhalava T., Farr J. N., Weigand B. M., Palmer A. K., Weivoda M. M., Inman C. L., Ogrodnik M. B., Hachfeld C. M., Fraser D. G., Onken J. L., Johnson K. O., Verzosa G. C., Langhi L. G. P., Weigl M., Giorgadze N., LeBrasseur N. K., Miller J. D., Jurk D., ... Kirkland J. L. (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat. Med.*, 24(8), 1246-1256. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0092-9>
- Xu Y., Ayrappetov M. K., Xu C., Gursoy-Yuzugullu O., Hu Y., & Price B. D. (2012). Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Mol. Cell*, 48(5), 723-733. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.026>
- Xue W., Zender L., Miething C., Dickins R. A., Hernando E., Krizhanovsky V., Cordon-Cardo C., & Lowe S. W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, 445(7128), 656-660. <https://doi.org/10.1038/nature05529>
- Yamagami M., Otsuka M., Kishikawa T., Sekiba K., Seimiya T., Tanaka E., Suzuki T., Ishibashi R., Ohno M., & Koike K. (2018). ISGF3 with reduced phosphorylation is associated with constitutive expression of interferon-induced genes in aging cells. *NPJ Aging Mech. Dis.*, 4, 11. <https://doi.org/10.1038/s41514-018-0030-6>
- Yang G., Rosen D. G., Zhang Z., Bast R. C., Mills G. B., Colacino J. A., Mercado-Urbe I., & Liu J. (2006). The chemokine growth-regulated oncogene 1 (Gro-1) links RAS signaling to the senescence of stromal fibroblasts and ovarian tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(44), 16472-16477. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605752103>
- Yang H., Wang H., Ren J., Chen Q., & Chen Z. J. (2017). cGAS is essential for cellular senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114(23), E4612-E4620. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705499114>
- Yang N.-C., & Hu M.-L. (2005). The limitations and validities of senescence associated- β -galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp. Gerontol.*, 40(10), 813-819. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.07.011>
- Yang N., & Sen P. (2018). The senescent cell epigenome. *Aging*, 10(11), 3590-3609. <https://doi.org/10.18632/aging.101617>
- Yao J., Weremowicz S., Feng B., Gentleman R. C., Marks J. R., Gelman R., Brennan C., & Polyak K. (2006). Combined cDNA array comparative genomic hybridization and serial analysis of gene expression analysis of breast tumor progression. *Cancer Res.*, 66(8), 4065-4078. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4083>
- Yoda K., Ando S., Morishita S., Houmura K., Hashimoto K., Takeyasu K., & Okazaki T. (2000). Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(13), 7266-7271.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.130189697>
- Yoshitake R., Saeki K., Watanabe M., Nakaoka N., Ong S. M., Hanafusa M., Choisunirachon N., Fujita N., Nishimura R., & Nakagawa T. (2017). Molecular investigation of the direct anti-tumour effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in a panel of canine cancer cell lines. *Vet. J.*, 221, 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.02.001>
- Young A. P., Schlisio S., Minamishima Y. A., Zhang Q., Li L., Grisanzio C., Signoretti S., & Kaelin W. G. (2008). VHL loss activates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat. Cell Biol.*, 10(3), 361-369. <https://doi.org/10.1038/ncb1699>
- Yuan A., Chen J. J. W., Yao P.-L., & Yang P.-C. (2005). The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front. Biosci.*, 10, 853-865. <https://doi.org/10.2741/1579>
- Zalensky A. O., Siino J. S., Gineitis A. A., Zalenskaya I. A., Tomilin N. V., Yau P., & Bradbury E. M. (2002). Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B): molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem.*, 277(45), 43474-43480. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206065200>
- Zeng G., & Millis A. J. T. (1996). Differential regulation of collagenase and stromelysin mRNA in late passage cultures of human fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 222(1), 150-156. <https://doi.org/10.1006/excr.1996.0019>
- Zhang P., Kishimoto Y., Grammatikakis L., Gottimukkala K., Cutler R. G., Zhang S., Abdelmohsen K., Bohr V. A., Sen J. M., Gorospe M., & Mattson M. P. (2019). Senolytic therapy alleviates A β -associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nat. Neurosci.*, 22(5), 719-728. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0372-9>
- Zhang R., Poustovoitov M. V., Ye X., Santos H. A., Chen W., Daganzo S. M., Erzberger J. P., Serebriiskii I. G., Canutescu A. A., Dunbrack R. L., Pehrson J. R., Berger J. M., Kaufman P. D., & Adams P. D. (2005). Formation of macroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev. Cell*, 8(1), 19-30. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.10.019>
- Zhang Y., & Reinberg D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.*, 15(18), 2343-2360. <https://doi.org/10.1101/gad.927301>
- Zhou V. W., Goren A., & Bernstein B. E. (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat. Rev. Genet.*, 12(1), 7-18. <https://doi.org/10.1038/nrg2905>
- Zhu J., Woods D., McMahon M., & Bishop J. M. (1998). Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.*, 12(19), 2997-3007. <https://doi.org/10.1101/gad.12.19.2997>
- Zindy F., Quelle D. E., Roussel M. F., & Sherr C. J. (1997). Expression of the p16(INK4a) tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene*, 15(2), 203-211. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201178>

Annexes

Annexe 1 : Liste des histone-acétyltransférases (HAT)

Famille	Enzyme	Gène	Spécificité
GNAT	Histone acetyltransferase KAT2A	KAT2A	H3K9ac, H3K14ac, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac, H4K91ac
	Histone acetyltransferase KAT2B	KAT2B	
	Elongator complex protein 3	ELP3	H3K9ac, H3K18ac
	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	HAT1	H4K5ac, H4K12ac, H2AK5ac
MYST	Histone acetyltransferase KAT5	KAT5	H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H2AK5ac
	Probable histone acetyltransferase MYST1	MYST1	H4K16ac
	Histone acetyltransferase MYST2	MYST2	H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac
	Histone acetyltransferase MYST3	MYST3	H3K14ac
	Histone acetyltransferase MYST4	MYST4	
CBP/p300	CREB-binding protein	CREBBP	H3K27ac, H3K56ac, H3K18ac, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac
	Histone acetyltransferase p300	EP300	H3K27ac, H3K56ac, H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac, H3K18ac
TFIIIC	General transcription factor 3C polypeptide 4	GTF3C4	H3K14ac
SRC/p160	Nuclear receptor coactivator 1	NCOA1	
	Nuclear receptor coactivator 3	NCOA3	
	Bifunctional protein NCOAT	MGEA5	H4K8ac, H3K14ac
	Circadian locomotor output cycles protein kaput	CLOCK	H3K14ac
	Testis-specific chromodomain protein Y 1	CDY1B, CDY1	
	Chromodomain Y-like protein	CDYL	
	N-acetyltransferase 10	NAT10	

Annexe 2 : Liste des histone-désacétylases (HDAC)

Classe	Enzyme	Gène	Spécificité
Classe I	Histone deacetylase 1	HDAC1	H3K56ac
	Histone deacetylase 2	HDAC2	
	Histone deacetylase 3	HDAC3	H3K4ac
	Histone deacetylase 8	HDAC8	
Classe IIa	Histone deacetylase 4	HDAC4	
	Histone deacetylase 5	HDAC5	
	Histone deacetylase 7	HDAC7	
	Histone deacetylase 9	HDAC9	
Classe IIb	Histone deacetylase 6	HDAC6	
	Histone deacetylase 10	HDAC10	
Classe III	NAD-dependent deacetylase sirtuin-1	SIRT1	H4K16ac, H3K9ac, H1K25ac
	NAD-dependent deacetylase sirtuin-2	SIRT2	H4K16ac, H3K56ac
	NAD-dependent deacetylase sirtuin-3, mitochondrial	SIRT3	H3K56ac
	NAD-dependent deacetylase sirtuin-6	SIRT6	H3K9ac, H3K56ac
Classe IV	Histone deacetylase 11	HDAC11	

Annexe 3 : Liste des histone-méthyltransférases (HMT)

Groupe cible	Enzyme	Gène	Spécificité
Lysine	EZH1	EZH1	H3K27me1, H3K27me2
	EZH2	EZH2	H3K27me1, H3K27me2, H3K27me3, H1K25me1
	MLL	MLL	H3K4me3
	MLL2	MLL2	
	MLL3	MLL3	H3K4me3
	MLL4	Unknown	H3K4me3
	MLL5	MLL5	
	NSD3	WHSC1L1	H3K4me2, H3K27me2, H3K27me3
	PRDM9	PRDM9	H3K4me3
	SETD1A	SETD1A	H3K4me3
	SETD1B	SETD1B	H3K4me3
	SETD2	SETD2	H3K36me3
	SETD7	SETD7	H3K4me1
	SETD8	SETD8	H4K20me1, H4K20me2
	SETDB1	SETDB1	H3K9me3
	SETDB2	SETDB2	H3K9me3
	SETMAR	SETMAR	H3K36me2
	SUV39H1	SUV39H1	H3K9me3
	SUV39H2	SUV39H2	H3K9me3
	SUV420H1	SUV420H1	H4K20me2, H4K20me3
	SUV420H2	SUV420H2	H4K20me2, H4K20me3
	H3 lysine-36 and H4 lysine-20 specific	NSD1	H3K36me2, H4K20me2
	H3 lysine-79 specific	DOT1L	H3K79me1, H3K79me2, H3K79me3
	H3 lysine-9 specific 3	EHMT2	H3K9me1, H3K9me2, H3K27me1, H1K186me1, H1K25me1
	H3 lysine-9 specific 5	EHMT1	H3K9me2, H3K27me1, H1K25me1, H1K186me1
	SMYD2	SMYD2	H3K36me2
	PR domain zinc finger protein 2	PRDM2	H3K9me2
	Probable histone-lysine N-methyltransferase ASH1L	ASH1L	H3K36me1, H3K36me2
	Probable histone-lysine N-methyltransferase NSD2	WHSC1	H3K36me3, H4K20me1, H4K20me3
	SET and MYND domain-containing protein 3	SMYD3	H3K4me3
Arginine	CARM1	CARM1	H3R17me1, H3R17me2, H3R2me1, H3R26me1
	Protein arginine N-methyltransferase 1	PRMT1	H4R3me1, H4R3me2
	Protein arginine N-methyltransferase 2	PRMT2	
	Protein arginine N-methyltransferase 5	PRMT5	H3R8me2, H4R3me2
	Protein arginine N-methyltransferase 6	PRMT6	H3R2me2, H4R3me2, H2AR3me2
	Protein arginine N-methyltransferase 7	PRMT7	
	Protein arginine N-methyltransferase 8	PRMT8	

Annexe 4 : Liste des histone-déméthylases (HDM)

Groupe cible	Enzyme	Gène	Spécificité
Lysine	Histone lysine demethylase PHF8	PHF8	H3K9me2, H3K4me3, H4K20me1, H3K27me2
	Lysine-specific demethylase 2A	KDM2A	H3K36me2
	Lysine-specific demethylase 2B	KDM2B	H3K4me3, H3K36me2
	Lysine-specific demethylase 3A	KDM3A	H3K9me1, H3K9me2
	Lysine-specific demethylase 3B	KDM3B	H3K9me1, H3K9me2
	Lysine-specific demethylase 4A	KDM4A	H3K9me3, H3K36me3
	Lysine-specific demethylase 4B	KDM4B	H3K9me3
	Lysine-specific demethylase 4C	KDM4C	H3K9me2, H3K9me3
	Lysine-specific demethylase 4D	KDM4D	H3K9me3, H3K9me2, H1K25me1
	Lysine-specific demethylase 5A	KDM5A	H3K4me2, H3K4me3
	Lysine-specific demethylase 5B	KDM5B	H3K4me3
	Lysine-specific demethylase 5C	KDM5C	H3K4me3
	Lysine-specific demethylase 5D	KDM5D	H3K4me3, H3K4me2
	Lysine-specific demethylase 6A	KDM6A	H3K27me3
	Lysine-specific demethylase 6B	KDM6B	H3K27me3, H3K27me2
	Lysine-specific demethylase 7	JHDM1D	H3K9me2, H3K27me2
	Lysine-specific demethylase 8	JMJD5	H3K36me2
	Lysine-specific demethylase NO66	C14orf169	H3K4me3, H3K36me3
	Lysine-specific histone demethylase 1A	KDM1A	H3K4me1, H3K4me2, H3K9me1, H3K9me2
	Lysine-specific histone demethylase 1B	KDM1B	H3K9me2
Arginine	Bifunctional arginine demethylase and lysyl-hydroxylase JMJD6	JMJD6	H3R2me2, H4R3me1, H4R3me2

Annexe 5 : Liste des histone-kinases

Enzyme	Gène	Spécificité
Cyclin-dependent kinase 17	CDK17	
Cyclin-dependent kinase 3	CDK3	
Cyclin-dependent kinase 5	CDK5	
Death-associated protein kinase 3	DAPK3	H3T11ph
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC	H2AS139ph
Glycogen synthase kinase-3 beta	GSK3B	H1T10ph
Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha	CHUK	H3S10ph
LIM domain kinase 2	LIMK2	
Microtubule-associated serine/threonine-protein kinase-like	MASTL	
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	MAP3K8	H3S10ph
Mitogen-activated protein kinase kinase kinase MLT	Unknown	H3S28ph
Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1	BUB1	H2AT120ph
Protein kinase C beta type	PRKCB	H3T6ph
Protein kinase C delta type	PRKCD	H3T45ph
Ribosomal protein S6 kinase alpha-4	RPS6KA4	H3S28ph
Ribosomal protein S6 kinase alpha-5	RPS6KA5	H2AS1ph, H3S10ph, H3S28ph
Serine-protein kinase ATM	ATM	H2AS139ph
Serine/threonine-protein kinase 10	STK10	
Serine/threonine-protein kinase 12	AURKB	H3S10ph, H3S6ph, H3S28ph
Serine/threonine-protein kinase 4	STK4	H2BS14ph, H2AS139
Serine/threonine-protein kinase ATR	ATR	H2AS139ph
Serine/threonine-protein kinase haspin	GSG2	H3T3ph
Serine/threonine-protein kinase N1	PKN1	H3T11ph
Serine/threonine-protein kinase Nek6	NEK6	
Serine/threonine-protein kinase Nek9	NEK9	
Serine/threonine-protein kinase PAK 2	PAK2	H3S10ph
Serine/threonine-protein kinase tousled-like 1	TLK1	H3S10ph
Tyrosine-protein kinase BAZ1B	BAZ1B	H2AY142ph
Tyrosine-protein kinase JAK2	JAK2	H3Y41ph

Annexe 6 : Liste des histone-phosphatases

Enzyme	Gène	Spécificité
Dual specificity protein phosphatase 1	DUSP1	H3S10ph
Eyes absent homolog 1	EYA1	H2AY142ph
Eyes absent homolog 2	EYA2	H2AY142ph
Eyes absent homolog 3	EYA3	H2AY142ph
Protein phosphatase 1D	PPM1D	H2AS139ph
Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	PPP2CA	H2AS139ph
Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	PPP2CB	H2AS139ph
Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit	PPP4C	H2AS139ph
Serine/threonine-protein phosphatase 5	PPP5C	
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	PPP1CC	H3T11ph

Titre : Analyse fonctionnelle du variant d'histone H2A.J impliqué dans le développement d'un phénotype pro-inflammatoire en sénescence induite par des dommages à l'ADN

Mots clés : dommages à l'ADN, épigénétique, histone, sénescence

Résumé : La sénescence cellulaire est une réponse au stress des cellules caractérisée par un arrêt prolifératif stable accompagné, en outre, de la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires constituant ce que l'on appelle le SASP ainsi que d'un remodelage important de la chromatine.

Le laboratoire d'accueil de ce doctorat s'intéresse à l'identification de nouveaux régulateurs et biomarqueurs de la sénescence cellulaire. Des résultats récents ont permis de mettre en évidence l'accumulation spécifique d'un variant d'histone, H2A.J, en sénescence induite par des dommages à l'ADN et de montrer son implication dans l'expression de gènes pro-inflammatoires.

Le but de ce projet de doctorat est de comprendre les mécanismes par lesquels l'accumulation de H2A.J favorise l'expression de gènes pro-inflammatoires ainsi que d'identifier de nouvelles fonctions physiologiques ou organe/tissu/cellule spécifique de H2A.J.

Nous avons montré que l'accumulation de H2A.J contribue à affaiblir l'association de l'histone de liaison H1 avec la chromatine. La perte de H1 en sénescence a été corrélée avec une augmentation de l'expression de séquences ADN répétées et une activation de la voie interféron. De plus, cette perte de H1 en sénescence et ses conséquences ont pu être partiellement compensées par la déplétion de H2A.J par interférence ARN. Une analyse mutationnelle nous a également permis de montrer l'importance fonctionnelle des spécificités de séquence de H2A.J : une modération de son activité par la Val-11 et une potentiation par la phosphorylation de la Ser-123.

Par ailleurs, un modèle de souris H2A.J-KO a été développé et des résultats préliminaires indiquent une potentielle implication de H2A.J dans la prédisposition à l'obésité et les pathologies associées (diabète, inflammation chronique, etc.) ainsi que dans l'érythropoïèse.

Title: Functional analysis of the histone variant H2A.J implicated in the development of a pro-inflammatory phenotype in DNA damage induced senescence

Keywords: DNA damage, epigenetics, histone, senescence

Abstract: Cellular senescence is a stress response characterized by a stable proliferative arrest accompanied by, among others, the secretion of pro-inflammatory factors constituting what is called the SASP and an important chromatin remodelling.

This PhD hosting laboratory is interested in the identification of novel regulators and biomarkers of cellular senescence. Recent data showed a specific accumulation of the histone variant H2A.J in DNA damage induced senescence and its implication in the expression of pro-inflammatory genes.

This PhD project is aiming to understand the mechanisms by which H2A.J accumulation promotes the expression of pro-inflammatory genes and to identify novel physiological or organ/tissue/cell specific functions for H2A.J.

We showed that H2A.J accumulation contributes to weakening the association of linker histone H1 to chromatin. Decreased H1 in senescence was correlated with increased expression of some repeated DNA sequences and activation of the interferon signalling pathway. Moreover, this H1 loss in senescence and its consequences could be partially recovered by H2A.J depletion by RNA interference. A mutational analysis also showed the functional importance of H2A.J sequence specificities: a moderation of its activity by the Val-11 and a potentiation by the phosphorylation of the Ser-123.

Additionally, we developed a H2A.J-KO mouse model and preliminary results indicate a potential implication of H2A.J in the predisposition to obesity and the associated pathologies (diabete, chronic inflammation, etc.) and in erythropoiesis.