Université du Droit et de la Santé – Lille 2

Ecole Doctorale Biologie - Santé

Thèse

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

par

Joe Nassour

Le 28 Septembre 2015

Rôle du stress oxydant et des cassures de l'ADN dans l'émergence néoplasique post-sénescence

Jury

Pr Bruno Quesnel	Président
Dr Pascale Bertrand	Rapporteur
Dr David Bernard	Rapporteur
Pr Olivier Coqueret	Examinateur
Pr Corinne Abbadie	Directeur de thèse

A ma famille

Remerciements

Je tiens dans un premier temps à remercier les membres du jury, le **Dr Pascale Bertrand**, le **Dr David Bernard**, le **Pr Olivier Coqueret** et le **Pr Bruno Quesnel** pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse et d'assister à la présentation de ce travail. Je tiens à vous exprimer ma respectueuse considération.

Merci à **Yvan de Launoit**, directeur de l'UMR8161, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir soutenu dans mes diverses demandes de financements.

Je voudrais également remercier les membres de mon comité de thèse, le **Pr Philippe Marchetti** et le **Dr Janet Hall**, qui se sont réunis à trois reprises pour évaluer mon travail et ainsi m'apporter de précieux conseils.

Un grand merci évidemment à **Corinne**, ma directrice de thèse, pour m'avoir guidé tout au long de cette thèse et pour avoir su m'apporter des réponses précises aux questions « parfois vagues » que je me suis posées. Merci pour ta rigueur scientifique envers mon apprentissage et pour la confiance que tu m'as accordé depuis mes premières manips d'essais comète jusqu'à aujourd'hui. Merci surtout d'avoir entretenu ma curiosité scientifique, supporté mon côté « Monsieur Plus » et encouragé ma détermination et mon exigence. Ceci m'a été crucial pour progresser, me dépasser et d'atteindre ces résultats originaux. En tous cas, je garderai un excellent souvenir de ces cinq années passées.

Cette thèse est, par ailleurs, le fruit d'un travail effectué au sein de l'équipe **ICE** où j'ai pris énormément de plaisir à travailler. Merci à **Nathalie**, ma voisine de paillasse et ma formatrice au L3. Merci pour ces bons moments en ta compagnie, pour tes nombreux coups de main et pour les fous rires. Ta bonne humeur (variable selon la journée) restera inoubliable ! Prends soin du p'tit

Erwan (Parki) et attends qu'il soit en thèse avant de t'embarquer dans des paris (jamais perdus) ! Merci à **Fatima,** une personne humainement incomparable. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et ton soutien. **Claire**, j'aurais aimé travailler plus longtemps avec toi ! Bienvenue dans le monde des cellules épithéliales et j'espère que ton avenir au sein de l'équipe sera fructueux et enrichissant. **Nuria**, tu es dans l'équipe depuis peu aussi, mais tu y as déjà toute ta place dans mon cœur ☺. **Maxime**, je te souhaite bon courage pour la suite de la thèse. Tu dois assurer la relève de l'équipe et continuer à faire des belles manips d'irradiations! **Laur(a)**, merci d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions, de discuter et de participer à l'ambiance conviviale de l'équipe. Merci pour ta bonne humeur quotidienne et surtout de m'avoir laissé envahir ton bureau avec mes paquets de café ! **Olivier**, merci pour ton dynamisme contagieux et les conseils indispensables que tu m'as abondamment fournis. **Albin**, merci pour ton soutien et les échanges scientifiques et moins scientifiques.

Sur un plan plus personnel, je tiens à citer le nom de ces collègues devenus mes amis : **Jeremy**, **Sabrina**, **Sonia, Rasha**, **Hana** et **Remy,** sans oublier les plus anciens **Emeric** et **Nico**. Et bien sûr, une pensée particulière pour **Marion** avec qui j'ai partagé toutes les galères du master 2 et de la thèse. J'ai pu compter sur ton soutien au laboratoire et sur ton amitié dehors. Je te souhaite beaucoup de bonheur et bon courage pour la suite.

Je remercie mes amis au Liban, notamment **Christine**, **Christelle**, **Mikel, Tracy** et **Rony,** que j'ai peu vus durant ces années de thèse. Veuillez m'excusez pour les anniversaires et les fêtes manqués ainsi que mes rares apparitions. Après m'avoir toujours posé des questions les plus compliquées (Tu soutiens quand et tu reviens quand ?), je peux enfin vous donner des réponses claires. Un grand merci à mes amis qui ont rendu bien agréable mon séjour à Lille : **Faten**, **Rabih**, **Hijazi**, **Thomas**, **Clara** et **Rayan.**

Je remercie enfin ma famille, mon père, ma mère ainsi que mon adorable sœur **Joyce**. Sans vous, je n'aurai jamais eu l'opportunité de poursuivre mes études et de débuter cette thèse. Merci d'avoir toujours cru en moi et j'espère avoir été à la hauteur de vos attentes.

Résumé

La sénescence est un état d'arrêt prolifératif mis en place par les cellules en réponse à des dommages à l'ADN. Elle est considérée comme un mécanisme de protection qui s'oppose à l'initiation et au développement d'un cancer. Or, les mécanismes de sénescence et la capacité des cellules à s'échapper de cet état et à générer des cellules transformées semblent varier selon les types cellulaires. Chez les kératinocytes humains normaux de peau (NHEKs), la sénescence est transitoire et débouche pour la plupart des cellules sur une mort par autophagie et, pour environ une sur dix mille, sur une émergence néoplasique post-sénescence. Les cellules émergentes présentent des caractères de transformation et ont accumulé des mutations. Cet échappement néoplasique de la sénescence n'est jamais observé chez les fibroblastes normaux de peau (NHDFs) qui, au contraire, une fois en sénescence sont arrêtés irréversiblement dans le cycle cellulaire.

J'ai cherché à caractériser les dommages oxydants mutagènes impliqués dans l'échappement néoplasique. Ma stratégie a été d'analyser de façon comparative les NHEKs par rapport aux NHDFs, puisque les uns mais non les autres développent une émergence néoplasique. J'ai ainsi pu constater que le taux de cassures de l'ADN augmente à la sénescence dans les deux types cellulaires, mais que ces cassures sont de nature différente, uniquement des SSBs (*Single Strand Breaks*) pour les NHEKs et principalement des DSBs (*Double Strand Breaks*) pour les NHDFs. L'accumulation de DSBs à la sénescence des NHDFs s'accompagne d'une induction robuste de la voie DDR (*DNA Damage Response*), d'une activation la voie p53-$p21^{WAF1}$ et d'un arrêt stable dans le cycle cellulaire. Dans le cas des NHEKs, l'augmentation du taux de SSBs est la conséquence de l'augmentation du niveau de stress oxydant et d'un déclin de l'expression et de l'activité de la PARP1, l'enzyme qui reconnait ces cassures et initie leur réparation. Ceci contribue à une agglomération aberrante de XRCC1 au niveau des cassures engendrant une induction de la voie p38MAPK-$p16^{INK4a}$ et un arrêt dans le cycle cellulaire caractéristique de la sénescence. D'une manière paradoxale, l'échappement néoplasique de la sénescence dépend également de cette accumulation de SSBs non réparées.

Ainsi, j'ai montré que le devenir des cellules sénescentes est influencé par la nature de leurs dommages à l'ADN. Les DSBs renforcent la stabilité de l'arrêt du cycle cellulaire alors que les SSBs promeuvent l'acquisition de mutations et l'échappement néoplasique.

Abstract

Senescence is a permanent cell-cycle arrest activated in response to DNA damage. If a cell escapes from this state, it should inherit mutations and could potentially initiate a tumor. NHDFs (Normal Human Dermal Fibroblasts) display a classical irreversible and stable senescence plateau. In contrast, senescent NHEKs (Normal Human Epidermal Keratinocytes) experience two different outcomes. Most of them undergo autophagic cell death and about one on 10^4 spontaneously resumes mitosis and generates clones of transformed, mutated and tumorigenic cells.

Since oxidative stress is the motor of the post-senescence neoplastic emergence in NHEKs, I wondered whether oxidative stress could operate through the generation of some mutagenic DNA damage. I took advantage of the comparison of senescent NHEKs to NHDFs. I have shown that unlike NHDFs, NHEKs do not suffer from significantly shortened telomeres, nor accumulate DSBs, do not activate a DDR (*DNA Damage Response*) pathway and in consequence do not significantly activate the p53-$p21^{WAF1}$ pathway. Instead, they suffer from a decrease in PARP1 expression, which compromises the repair of SSBs generated by oxidative stress. In consequence, SSBR foci, precisely XRCC1 foci, become persistent. These persistent foci initiate a signalization, through p38MAPK, which leads to up-regulation of $p16^{INK4a}$ and to cell cycle arrest. Notably, the accumulation of unrepaired SSBs is sufficient for the post-senescence neoplastic emergence phenomenon, in addition, paradoxically to its involvement in the onset of senescence.

In conclusion, senescence results from the persistence of a DNA damage signalization, but the exact nature of the damages could vary in different cell types depending on their repair capacities and could dictate completely different outcomes. Namely, persistent DSBs, including telomeric ones, dictate a permanent tumor-suppressor cell cycle arrest, whereas persistent SSBs are permissive to mutation and senescence evasion.

Sommaire

Remerciements 3

Résumé 5

Abstract 6

Abréviations 10

Introduction 13

Chapitre 1: La signalisation des cassures de l'ADN 14

1.1 La voie SSBR 15

1.1.1 Détection des SSBs par la PARP1 15

1.1.2 Recrutement de la protéine d'échafaudage XRCC1 18

1.1.3 Réparation des extrémités 20

1.1.4 Néo-synthèse du fragment d'ADN manquant 21

1.1.5 Ligation de l'ADN 22

1.1.6 Impact des SSBs sur la biologie de la cellule 22

1.2 La voie DDR 23

1.2.1 Détection des DSBs et des fragments ssDNA 25

1.2.2 Modification de la chromatine environnante 26

1.2.3 Signalisation des DSBs et des fragments ssDNA 27

1.2.4 Activation des points de contrôle du cycle cellulaire 29

1.2.5 Mécanismes de réparation des DSBs 30

1.2.6 Impact des DSBs sur la biologie de la cellule 34

Chapitre 2: La sénescence 35

2.1 Les caractéristiques des cellules sénescentes 35

2.1.1 Arrêt dans le cycle cellulaire 35

2.1.2 Changement morphologique 39

2.1.3 Augmentation de l'activité SA-β-Galactosidase 41

2.1.4 Augmentation de l'activité autophagique 41
2.1.5 Augmentation du stress du réticulum endoplasmique 43
2.1.6 Apparition d'un sécrétome spécifique 44
2.1.7 Résistance à l'apoptose 45
2.1.8 Modification de l'architecture chromatinienne 47
2.2 Les mécanismes inducteurs de sénescence 48
2.2.1 Perte de fonctionnalité des télomères 48
2.2.2 Augmentation du niveau de stress oxydant 52
2.2.3 Activation aberrante de la voie de signalisation oncogénique 62
2.3 Acteurs clés de l'initiation et du maintien de la sénescence 63
2.3.1 Stress oxydant / stress oncogénique et régulation de $p16^{INK4a}$ 63
2.3.2 Signalisation DDR et régulation de p53 66
2.3.3 L'intervention de p53-$p21^{WAF1}$ et $p16^{INK4a}$-Rb dans la sénescence 68
Chapitre 3: Liens entre sénescence et tumorigenèse 71
3.1 La sénescence est un mécanisme anti-tumoral 71
3.2 La sénescence est un mécanisme pro-tumoral 73
Chapitre 4 : Projet de thèse 75
Résultats 77
Partie 1: Recherche de dommages oxydants associés à la sénescence et impliqués dans la génération de cellules néoplasiques 78
Article N°1: *A defective DNA single-strand break repair pathway is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells* 92
Partie 2: Rôle des SSBs et des fourches de réplication bloquées dans les phases initiales de carcinogenèse par échappement de la sénescence 93
Partie 3: Rôle du stress oxydant sur l'activité autophagique des NHEKs sénescents et sur leur emergence neoplasique. 101
Article N°2: *Level of macroautophagy drives senescent keratinocytes into cell death or neoplastic evasion* 103

Discussion générale 104

La sénescence s'établit en conséquence de l'accumulation de cassures de l'ADN non réparées dont la nature diffère d'un type cellulaire à l'autre 105

Pourquoi l'expression de la PARP1 diminue-t-elle à la sénescence chez les cellules épithéliales ? 109

Mise en évidence d'une nouvelle voie de signalisation XRCC1 → p38-MAPK → $p16^{INK4a}$ 110

Pourquoi et comment les cellules sénescentes ré-entrent dans le cycle ? 111

Comment les cellules PSNE acquièrent-elles des caractères de transformation ? 113

Existe-t-il des liens entre SSBs et autophagie ? 114

La double face de la sénescence : intrinsèquement suppresseur ou promoteur de tumeur selon la nature des dommages à l'ADN accumulés 115

Références bibliographiques 118

Annexes 148

Article N°3: *DNA double-strand breaks lead to activation of hypermethylated in cancer 1 (HIC1) by SUMOylation to regulate DNA repair* 149

Abréviations

A	ADN:	Acide désoxyribonucléique
	AP:	Apurinic/Apyrimidinic
	ARF:	Alternative reading frame
	ARN:	Acide ribonucléique
	ASF1:	Anti-Silencing Function Protein 1 Homolog A
	ATF2:	Activating Transcription Factor 2
	ATM:	Ataxia telangiectasia mutated
	ATF3:	Activating Transcription Factor 3
	ATR:	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
	ATF3:	Activating Transcription Factor 3
	ATP:	Adénosine triphosphate
B	Bcl2:	B-cell lymphoma 2
	BER:	Base excision repair
	Bhlh:	Basic helix-loop-helix
	BIR:	Break induce repair
	BMI1:	B cell-specific Moloney murine leukaemia virus integration site 1
	BRCA1:	Breast cancer type 1
	BRAF:	B-Raf proto-oncogene
	BRCT:	BRCA1 C Terminus
C	Cdks:	Cyclin-Dependent Kinases
	Chk1:	Checkpoint kinase 1
	Chk2:	Checkpoint kinase 2
	CKI:	Cyclin-dependent kinase inhibitor
	CMA:	Chaperone mediated autophagy
	CPB:	CREB-binding protein
	CtIP:	CTBP-interacting protein
	CuZnSOD:	Copper zinc superoxide dismutase
	CXCR2:	C-X-C Chemokine receptor type 2
D	DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindole
	DDR:	DNA damage response
	DSBs:	Double-strand breaks
	DNA-PK:	DNA-dependent protein kinase
	dHJ:	Double holliday junction
	DDR:	DNA damage response
E	4EBP1:	4E-Binding protein 1
	EIF4:	Eukaryotic initiation factor 4
	E2F1:	E2F Transcription Factor 1
	EGF:	Epidermal growth factor
	ERAD:	ER-Associated protein degradation
F	FOX1:	Forkhead box protein M1
G	Gro-1:	Growth-regulated oncogene 1
H	H_2DCFDA:	2,7-dichloro-dihydro-fluorescin diacetate

	HDM2:	Mouse double minute 2 homolog
	HGF/SF:	Hepatocyte growth factor/scatter factor
	HIRA:	Histone Cell Cycle Regulator A
	HIP1:	Huntingtin Interacting Protein 1
	HMECs:	Human mammary epithelial cells
	HMGA:	High mobility group proteins
	HR:	Homologous recombination
	hTERT:	Human telomerase reverse transcriptase
	hTR:	Human telomerase RNA component
I	Id:	Inhibitor of DNA binding
	IL6/8:	Interleukin 6 /8
	IGFBP7:	Insuline growth factor binding protein 7
L	LPR:	Long patch repair
M	MAPK:	Mitogene activated protein kinases
	MAPKAPK2:	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2
	MacroD1:	Macro domain-containing protein 1
	MacroD2:	Macro domain-containing protein 2
	MDC1:	Mediator of DNA-damage checkpoint 1
	MEFs:	Mouse epidermal fibroblasts
	MEF2:	Myocyte enhancer factor 2
	MIF:	Migration inhibitory factor
	MMPs:	Matrix metalloproteinases
	MnK:	Mitogen-activated protein kinase (MAPK) interacting protein kinases
	MnSOD:	Manganese superoxide dismutase
	Mre11:	Meiotic Recombination 11 Homolog 1
	MRN:	MRE11–RAD50–NBS1
	mTOR:	Mammalian target of rapamycin
N	NADPH:	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
	NAD^+:	Nicotinamide adenine dinucleotide
	Nbs1:	Nijmegen breakage syndrome
	NF-κB:	Nuclear factor-κB
	NHDFs:	Normal human epidermal fibroblasts
	NHEJ:	Non-homologous end joining
	NHEKs:	Normal human epidermal keratinocytes
	NOX:	NADPH oxidase
O	8-oxoG:	8-Oxoguanine
	OCDL:	Oxidative clusterd DNA lesion
	OIS:	Oncogene-induced senescence
P	53BP1:	p53-binding protein 1
	$P16^{INK4a}$:	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A
	$P21^{WAF1}$:	Wild-type p53-activated fragment 1
	PAR:	Poly (ADP) ribose
	PARP1:	Poly (ADP) ribose polymerase 1
	PARG:	Poly (ADP) ribose glycohydrolase
	PML:	Promyelocytic Leukemia
	POT1:	Protection of telomeres 1
	PTEN:	Phosphatase and tensin homolog
R	RAP1:	Ras-proximate-1

	Rb :	Retinoblastoma
	RE:	Réticulum endoplasmique
	RER:	Ribonucleotide excision repair
	RNF8:	Ring finger protein 8
	RNF168:	Ring finger protein 168
	ROS:	Reactive oxygen species
	RPA:	Replication protein A
S	SASP:	Senescence-associated secretory phenotype
	SAHF:	Senescence-associated heterochromatin foci
	SDSA:	Synthesis dependent strand annealing
	SMC:	Structural Maintenance of Chromosomes
	SPR:	Short patch repair
	SSBs:	Single-strand breaks
	SSBR:	Single-strand break repair
	ssDNA:	Single-strand DNA
	SSA:	Single strand annealing
T	TARG1:	Terminal ADP-ribose protein glycohydrolase 1
	TIN2:	TRF1-Interacting Nuclear Factor 2
	TPP1:	Tripeptidyl Peptidase I
	TRF1:	Telomeric Repeat Binding Factor 1
	TRF2:	Telomeric Repeat Binding Factor 2
	TRIP12:	Thyroid Hormone Receptor Interactor 12
U	UBR5:	Ubiquitin Protein Ligase E3 Component N-Recognin 5
	UPR:	Unfold protein response
	ULK3:	Unc-51 Like Kinase 3
V	VEGF:	Vascular endothelial growth factor
X	XRCC1:	X-ray repair cross-complementing protein 1
	XRCC4:	X-ray repair cross-complementing protein 4

Introduction

Chapitre 1: La signalisation des cassures de l'ADN

Parmi les différents types de dommage à l'ADN, les cassures simple- et double-brin (respectivement SSBs et DSBs pour *Single-Strand Breaks* et *Double-Strand Breaks*) sont considérées comme les plus dommageables pour la cellule car elles menacent l'intégrité et la stabilité du génome. La maintenance du génome est assurée grâce à l'existence de réseaux de signalisation spécifiques à chaque type de cassures. Ces réseaux comprennent des protéines senseurs permettant la détection et l'identification du dommage, des protéines de signalisation intermédiaire, et des protéines effectrices permettant d'une part l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire ou des voies apoptotiques et d'autre part l'induction de la machinerie de réparation.

La majorité des protéines de signalisation s'accumulent d'une manière extrêmement massive de part et d'autre des sites endommagés sur 100 kb jusqu'à quelques méga-bases. Elles deviennent ainsi visualisables par microscopie sous forme d'agrégats ou foyers nucléaires (Lukas et al., 2011; Rogakou et al., 1998). Ces foyers de signalisation sont des structures très dynamiques sujettes à des régulations spatiotemporelles très précises. En effet, l'assemblage des protéines aux foyers dépend d'un large spectre de modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations, des sumoylations et des poly(ADP)ribosylations. Ces modifications affectent l'architecture de la chromatine, facilitent les interactions protéine-protéine et facilitent l'accessibilité à l'ADN endommagé (Price and Andrea, 2013).

La signalisation des cassures de l'ADN engendre un ralentissement de la progression du cycle cellulaire permettant aux cellules une réparation des dommages. Toutefois, il existe des situations conduisant à une absence de réparation, à une réparation inefficace ou à une réparation inappropriée. Un très grand nombre de cassures générées simultanément conduit à une absence de réparation et mène à la mort cellulaire par apoptose ou catastrophe mitotique. Une réparation inefficace peut entrainer une persistance des voies de signalisation et un arrêt définitif du cycle cellulaire couplé à la mise en place d'un programme de sénescence. Ces deux réponses 'suppresseurs de tumeur' sont susceptibles de freiner la prolifération des cellules endommagées, d'empêcher la transmission de mutations aux cellules filles et donc de neutraliser les effets carcinogéniques. Une réparation inappropriée, quant à elle, conduit à des réarrangements

chromosomiques, des fusions, des délétions et des pertes de chromosomes. Les conséquences consistent en un échappement de la sénescence, une résistance à l'apoptose, une transmission des mutations aux cellules filles et probablement à l'initiation tumorale (Houtgraaf et al., 2006).

1.1 La voie SSBR

Les SSBs sont définies comme étant une discontinuité affectant un seul des deux brins de l'ADN accompagnée par une perte d'un seul nucléotide avec des extrémités 3'et 5' endommagées. Une source majeure de SSBs correspond à l'attaque oxydante du squelette sucre-phosphate de l'ADN par les espèces réactives de l'oxygène (ROS- *Reactive Oxygen Species*) endogènes. Une activité inadéquate de la topo-isomérase 1, enzyme de la réplication, induit également une genèse de SSBs. On parle dans les deux cas de SSBs directes. Mais les SSBs peuvent aussi être induites indirectement comme une étape de la réparation des bases oxydées par la voie BER (*Base Excision Repair*). De plus, une incorporation erronée de ribonucléotides (rNTPs) durant la phase de réplication de l'ADN engendre une production de SSBs. En effet, des ribonucléotides mal-incorporés sont convertis en SSBs intermédiaires par la voie de réparation RER (*Ribonucleotide Excision Repair*) (Caldecott, 2014a). La voie *SSBR (Single Stand Break Repair*) met en jeu une activation cruciale de la protéine PARP1 ((Poly (ADP-Ribose) Polymérase 1) et des réactions de Poly(ADP)Ribosylation (Caldecott, 2014b).

1.1.1 Détection des SSBs par la PARP1

Les SSBs directes sont détectées principalement par la PARP1 (Caldecott, 2014a). PARP1 est le membre fondateur de la famille des PARPs et c'est sur la base d'homologie avec son domaine catalytique que les 16 autres membres ont été identifiés. Ce domaine présente une structure particulière lui permettant de lier le NAD^+ (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide*), une étape critique pour effectuer son activité catalytique de PARylation ou synthèse de Polymères d'ADP-Ribose (PAR) (Gibson and Kraus, 2012; Hottiger et al., 2010).

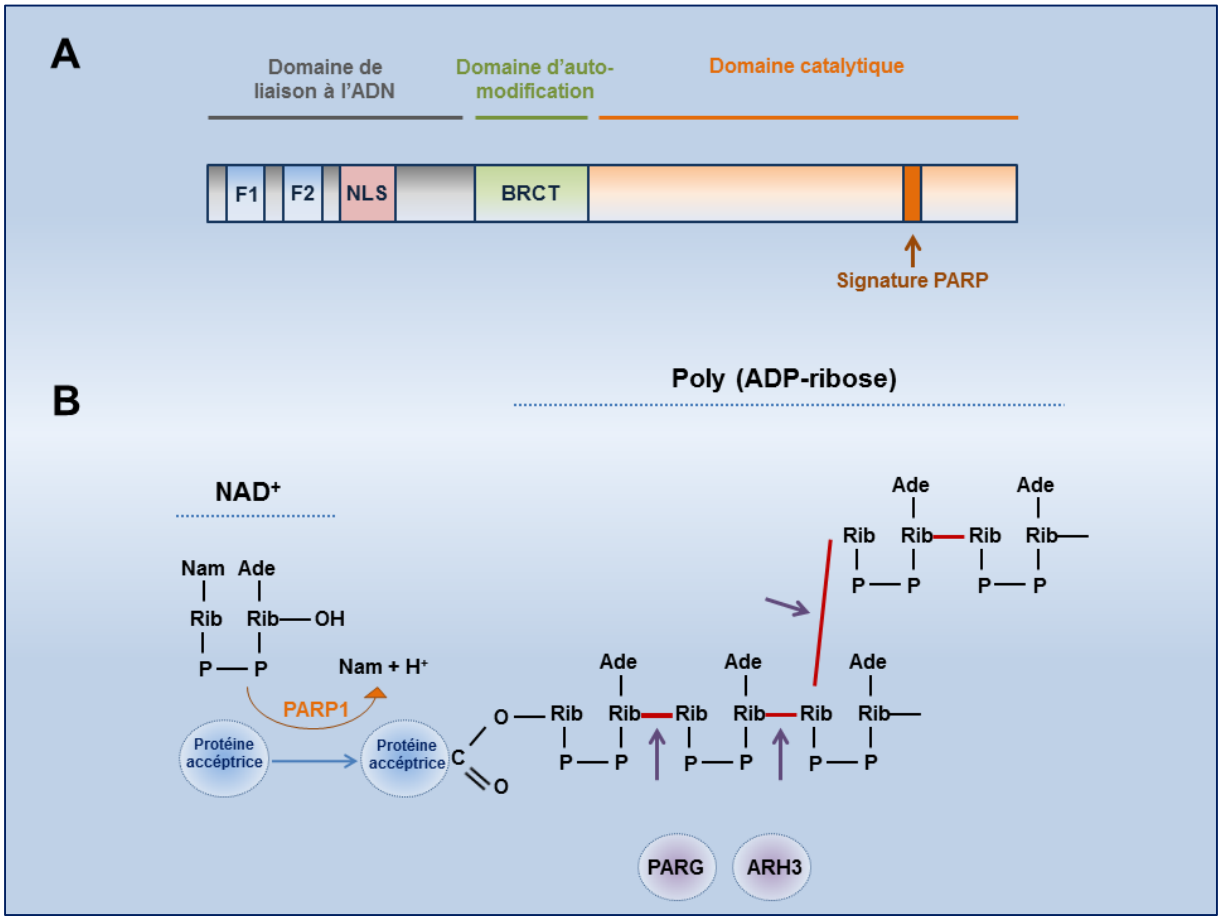


Figure 1 : (A) Représentation schématique des différents domaines de la PARP-1 (adaptée de Kim et al, 2005).

(B) Représentation schématique de la PARylation. NAD^+: Nicotinamide adenine dinucleotide, Nam: Nicotinamide, Ade: adenine, Rib: ribose
Les traits rouges représentent les liaisons O-glycosidiques entre les riboses (adaptée de Hakmé et al, 2008).

PARP1 est le senseur principal des SSBs directes et intervient dans la production de 80 à 90% des PAR. Il se lie aux SSBs, s'auto-PARyle et PARyle plusieurs protéines cibles par l'ajout de chaînes branchées de PAR formées d'une centaine d'unités ADP-Ribose. L'activité catalytique de PARP1 s'accroit 10 à 500 fois après sa fixation à l'ADN cassé et la synthèse de PAR se réalise très rapidement en 15 à 30 secondes après formation de la cassure (Haince et al., 2008; Hassa and Hottiger, 2008).

PARP1 comporte trois domaines fonctionnels (Figure 1A). Le domaine N-terminal englobe principalement deux motifs en doigts de zinc (F1/Zn1 et F2/Zn2). Ces motifs confèrent à la PARP1 le potentiel d'interagir et de se lier fortement à différentes structures aberrantes de l'ADN. Le motif F1 présente une affinité pour les DSBs tandis que F2 se fixe fortement aux fragments d'ADN présentant des SSBs. Le domaine N-terminal comprend également un signal de localisation nucléaire (NLS) renfermant un site de clivage par la caspase 3 reconnu lors de la mort cellulaire par apoptose. Le domaine central comprend le motif BRCT nécessaire pour les interactions PARP1-protéines. De plus, il englobe des résidus d'acides aminés glutamate et lysine, sites de PARylation. Ce domaine intervient ainsi dans la régulation de l'activité de PARP1 par auto-PARylation. Le domaine C-terminal, quant à lui, intervient dans l'activité catalytique de la PARP1. Il est constitué de deux sous-domaines : un premier qui intervient dans la liaison du NAD^+ et un autre adoptant une structure en hélice alpha et qui interagit avec la protéine qui va être PARylée (Amé et al., 2004; Hakmé et al., 2008; Woodhouse and Dianov, 2008).

La PARylation se déroule en trois étapes : une étape d'initiation durant laquelle la PARP1 transfère un ADP-ribose sur un acide aminé d'une protéine cible, une étape d'élongation qui met en jeu des liaisons entre riboses de type O-glycosidique 1'' vers 2' et une étape de branchement qui repose sur l'établissement des liaisons O-glycosidiques 1''' vers 2''. Les PAR se développent ainsi pour atteindre une taille de 200 unités répétitives d'ADP-riboses avec une réaction de branchement chaque 20 à 50 réactions d'élongations (Figure 1B) (Kim et al., 2005).

Les PAR ont une demie-vie très courte de quelques minutes. La destruction catabolique des PAR se réalise immédiatement après l'initiation de leur synthèse. Ceci permet une régulation temporelle des complexes protéines-PAR et une signalisation transitoire. La synthèse de PAR est contrebalancée essentiellement via l'activité des PARG (Figure 1B). Ce sont des endo et exo-glycohydrolases impliquées dans la dégradation des

liaisons O-glycosidiques établies entre les unités d'ADP-riboses. L'enzyme ARH3 intervient également, dans une moindre mesure, dans le catabolisme des PAR (Figure 1B). Toutefois, ces deux enzymes ne possèdent pas le potentiel de cliver les liens entre l'ADP-Ribose en position terminale et le résidu acide de la protéine modifiée. Cette tâche est effectuée par les trois enzymes MacroD1, MacroD2 et TARG1(Leung, 2014; Meyer-Ficca et al., 2004; Oka et al., 2006).

Des approches de protéomique ont permis de mettre en évidence des motifs de liaison aux PAR composés de 20 acides aminés et présents chez un ensemble de protéines de réparation telles que PARP1, XRCC1 et ligase 3. L'auto-PARylation de la PARP-1 entraine une accumulation massive de charges négatives. Ceci aboutit à sa dissociation, par répulsion de charge, de l'ADN (Davidovic et al., 2001; Gibson and Kraus, 2012; Kim et al., 2005). Parmi les cibles de PARylation se trouvent également les histones nucléosomales. La PARylation des histones H2B et H1 entraine une modulation locale de la compaction de la chromatine. Celle-ci se retrouve sous une forme décondensée favorisant l'accès des protéines de réparation aux sites des lésions (Caldecott, 2007; Mathis and Althaus, 1987; Poirier et al., 1982; Tulin et al., 2002; Ziv et al, 2006).

1.1.2 Recrutement de la protéine d'échafaudage XRCC1

Le rôle majeur de PARP1 dans l'accélération de la SSBR repose essentiellement sur le recrutement et la stabilisation de la protéine XRCC1 (*X-ray Repair Cross-Complementing protein 1*) (Figure 2) (Brem and Hall, 2005; El-Khamisy et al., 2003a; Masson et al., 1998). XRCC1 est une protéine d'assemblage ne possédant pas d'activité enzymatique. Elle favorise le recrutement et la stabilisation de la plupart des complexes enzymatiques impliqués dans la réparation des SSBs et accélère ce processus de 5 fois (Brem and Hall, 2005; Hanssen-Bauer et al., 2011).

L'importance de XRCC1 dans la voie SSBR s'illustre principalement par la sensibilité accrue des cellules XRCC1$^{-/-}$ à de nombreux agents génotoxiques. De plus, ces cellules présentent des aberrations chromosomiques, des délétions et des échanges de chromatides sœurs (Thompson et al., 1982; Op het Veld et al., 1998; Zdzienicka et al., 1992).

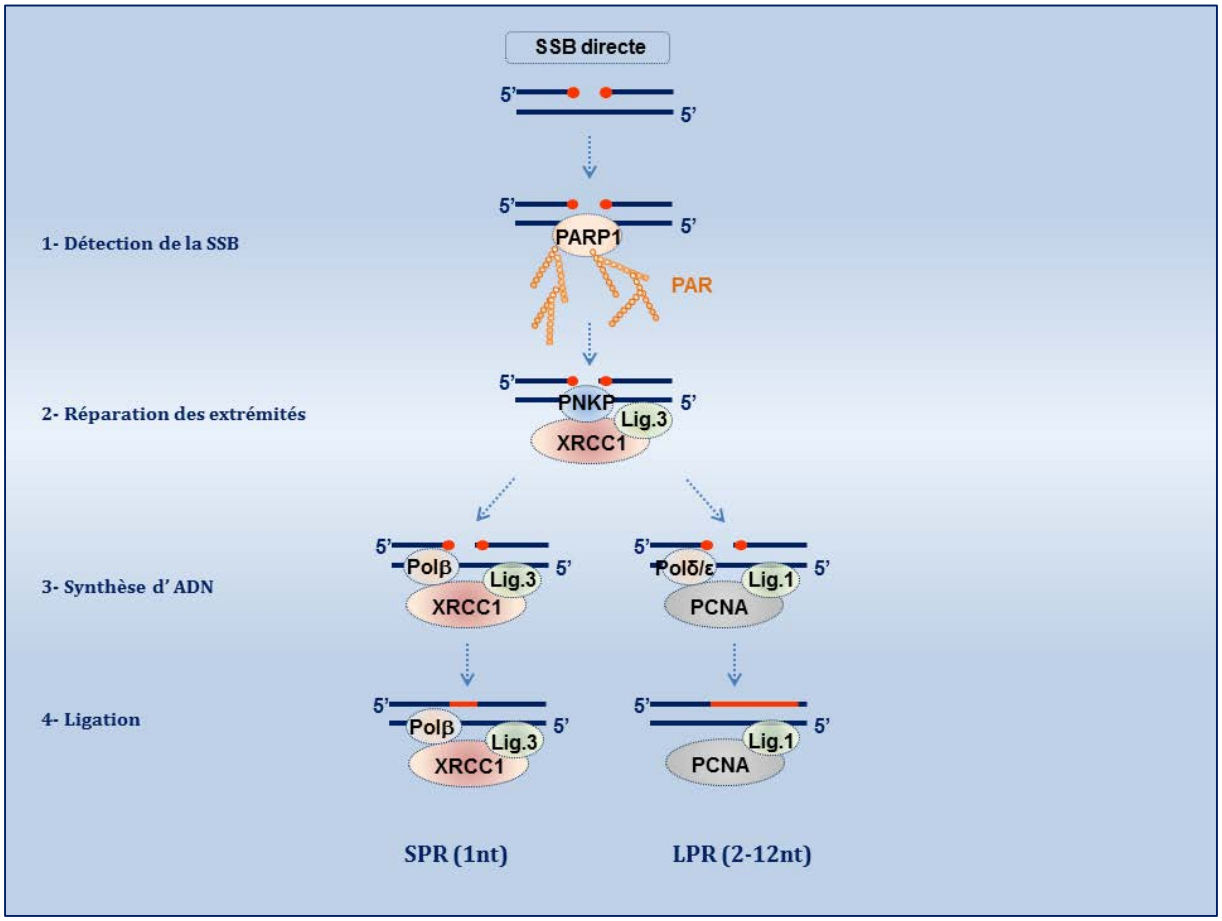


Figure 2 : Schéma simplifié de la voie de réparation des SSBs directes (*SSBR – Single Strand Break Repair*) (adapté de Caldecott, 2008).

De nombreuses observations suggèrent que le recrutement de XRCC1 sur les sites SSBs repose principalement sur la production de PAR. En effet, XRCC1 interagit physiquement à la fois avec les PAR et les deux enzymes PARP1 et PARP2 via son domaine BRCT1 localisé dans sa région centrale (Caldecott et al., 1996; Pleschke et al., 2000; Schreiber et al., 2002). L'inhibition pharmacologique de la synthèse de PAR réduit considérablement l'accumulation de XRCC1 sur les SSBs induits par du H_2O_2 (El-Khamisy et al., 2003a; Lan et al., 2004; Okano et al., 2003). De plus, des mutations affectant son domaine BRCT1 restreignent le recrutement de XRCC1 sur les lésions (El-Khamisy et al., 2003a; Fisher et al., 2007; Li et al., 2013). Enfin, une déplétion de la PARG intensifie l'accumulation de PAR et augmente la persistance des foyers XRCC1. PARP1 a été ainsi considéré comme le seul senseur des SSBs (Fisher et al., 2007).

Des données récentes ont permis de nuancer cette affirmation. En effet, l'inhibition de PARP1 ne fait que retarder la réparation mais ne l'empêche pas. Ceci a été expliqué par l'intervention d'autres protéines de la famille des PARPs, notamment la PARP2 (Ding et al., 1992; Fisher et al., 2007; Le Page et al., 2003; Trucco et al., 1998). De plus, le recrutement de XRCC1 aux sites de SSBs n'est que très légèrement affecté par l'inhibition de la PARP1 (Hanssen-Bauer et al., 2011). Ceci a été justifié par l'existence de senseurs alternatifs à la PARP1. A l'appui de cette idée, une étude intéressante a mis en évidence un rôle clé de la ligase 3 dans la détection des SSBs et le recrutement de XRCC1 indépendamment de la présence de PARP1 (Abdou et al., 2015).

1.1.3 Réparation des extrémités

Les extrémités terminales 3' et/ou 5' de la majorité des SSBs sont anormales. Une étape préalable à la néo-synthèse du fragment d'ADN manquant consiste en une restauration des extrémités conventionnelles 3'-hydroxyle (3'-OH) et 5'-phosphate (5'-P) (Caldecott, 2014a). Les extrémités endommagées associées à des SSBs sont de nature diverse : les SSBs générées directement par le stress oxydant possèdent des extrémités 3'-phosphate et 3'-phosphoglycolate et les SSBs indirectes issues de la voie BER présentent plutôt des extrémités 3'-phosphate, 3' bloquées par un aldéhyde α, β insaturé et 5'-désoxyribose phosphate (5'-dRP). La réparation par RER produit des SSBs avec des

extrémités 5’ altérées. Enfin, la topoisomérase 1 (TOP1) contribue à la production de SSBs tout en restant fixée par des liaisons covalentes à leurs extrémités 3’ et 5’.

La réparation des extrémités des SSBs fait intervenir de multiples acteurs enzymatiques spécifiques à chaque type de lésions. La poly-nucléotide kinase/phosphatase (PNPK) intervient dans la réparation des extrémités 3’-phosphate (Jilani et al., 1999; Karimi-Busheri et al., 1999; Whitehouse et al., 2001). L’enzyme APE1 intervient dans la réparation des extrémités 3'-phosphoglycolate et celles associées à un aldéhyde α, β-insaturé (Chen et al., 1991; Izumi et al., 2000; Winters et al., 1994). L’ADN polymérase β (Pol β) répare les extrémités 5’-dRP et l’enzyme TDP1 celles associées aux topoisomérases 1 (TOP1-SSB) (Boulé et al., 2005; Cheng et al., 2002; Kubota et al., 1996).

XRCC1 joue un rôle particulièrement important durant cette étape de restauration des extrémités 3’ et 5’ en recrutant PNKP (Whitehouse et al., 2001) , Pol β (Kubota et al., 1996) et, indirectement,TDP1 (Whitehouse et al., 2001; Plo et al., 2003).

1.1.4 Néo-synthèse du fragment d’ADN manquant

L’étape de néo-synthèse du fragment d’ADN manquant consiste le plus souvent en une insertion d’un seul nucléotide au niveau de la lésion. On parle alors de réparation par brêche courte (SPR - *Short Patch Repair*). Cependant, la réparation de certaines SSBs nécessite l’insertion de deux ou plusieurs nucléotides et l’activation de la réparation par brêche longue (LPR - *Long Patch Repair*) (Figure 2) (Caldecott, 2007).

Plusieurs types d’ADN polymérases participent à cette étape. La synthèse d’ADN est accomplie principalement par la Pol β. L’intervention des polymérases δ et ε a été également mise en évidence. Le choix de l’ADN polymérase dépend principalement de l’origine des SSBs et de la nature de leurs extrémités. Par exemple, la Pol β intervient essentiellement dans la réparation des SSBs indirectes. En revanche, son implication dans la réparation des SSBs directes ne semble pas être très importante. Celle-ci est effectuée par les polymérases δ et ε. Des protéines auxiliaires participent à l’accomplissement de cette étape. Les protéines PARP1 stimulent la voie SPR en activant la Pol β. D’une autre part, la protéine PCNA active les Pol δ et ε et favorise la voie LPR. Cette voie nécessite

l'intervention de l'enzyme FEN-1 (*Flap Structure-specific Endonuclease 1*) possédant une activité 5'-3'exonucléase (Caldecott, 2007).

1.1.5 Ligation de l'ADN

L'étape finale de la réparation de la SSB consiste en la liaison de l'extrémité du fragment de l'ADN néo-synthétisé à celle de la cassure. Ceci est établi par l'activité des ligases 1 et 3α qui interviennent dans les voies LPR et SPR respectivement. La ligase 3α est en interaction constitutive avec XRCC1. Ceci est essentiel pour sa stabilité et son accumulation sur les sites de la SSB (Caldecott et al., 1995; Mortusewicz et al., 2006). La ligase 1, pour sa part, est recrutée via son interaction avec PCNA (Figure 2) (Mortusewicz et al., 2006).

1.1.6 Impact des SSBs sur la biologie de la cellule

Comme on vient de le voir, les cellules de mammifères sont munies de systèmes de réparation efficaces des SSBs et sont donc tolérantes à une production spontanée de SSBs. De ce fait, il est communément admis que les SSBs n'ont pas de conséquences majeures affectant l'intégrité du génome ou l'intégrité cellulaire. De plus, la réparation des SSBs est très rapide et il ne semble pas que la voie SSBR entraine un arrêt du cycle cellulaire durant le temps de réparation (El-Khamisy et al., 2003b).

Toutefois, la réparation des SSBs est génératrice de mutations ponctuelles via les erreurs des polymérases. Par ailleurs, une non-réparation de SSBs pourrait altérer le fonctionnement cellulaire de plusieurs façons. Chez les cellules en état de prolifération, l'impact majeur concerne le blocage des fourches de réplication pendant la phase S et probablement la formation de cassures double-brin atypiques avec une seule extrémité (*one-ended DSB*). L'accumulation excessive de SSBs peut entrainer la mort cellulaire. Par exemple, dans le cas de cellules en arrêt de profération comme les neurones, les SSBs sont susceptibles d'altérer la progression des ARN polymérases aboutissant à une altération du profil de transcription et la mort cellulaire (Caldecott, 2007, 2008).

1.2 La voie DDR

La voie DDR (pour *DNA Damage Response)* est activée en réponse à deux grands types de dommages à l'ADN : les cassures double-brin (DSBs - *Double Strand Breaks*) et les fragments d'ADN simple-brin (ssDNA - *Single Strand DNA*).

Les DSBs sont des lésions complexes résultant de la cassure des deux brins de l'ADN à moins de 10 pb. Elles sont le plus souvent induites par des agents exogènes tels que les radiations ionisantes. Toutefois, elles peuvent être aussi générées via des stress endogènes. C'est le cas lorsque les fourches de réplication rencontrent des SSBs non réparées. Les fourches de réplication se bloquent et le complexe de réplication se dissocie (*collapsed replication fork*), ce qui conduit à la génération de DSBs atypiques appelés *one-ended* DSBs (Pfeiffer et al., 2000) .

Les ssDNA sont des structures aberrantes associées à des réplications défectueuses de l'ADN. En effet, lors de la phase S du cycle cellulaire, la progression du complexe de réplication est susceptible d'être ralentie ou arrêtée (*stalled replication fork*) par de nombreux évènements tels que des hybrides ARN/ADN, des sites abasiques, des *cross-links* ou des structures secondaires. Il peut y avoir également ralentissement ou arrêt des fourches de réplication en cas d'activation d'un nombre anormalement élevé d'origines de réplication et/ou de déficit en nucléotides. Ces situations sont globalement appelées stress réplicatif. Dans ce cas, il y a désynchronisation entre l'activité de l'ADN polymérase, qui s'arrête, et l'activité de l'hélicase qui continue à catalyser l'ouverture de la double hélice engendrant la formation des fragments ssDNA (Byun et al., 2005). Il est intéressant de savoir que les DSBs et les *one-ended* DSBs participent également à la formation de fragments ssDNA. En effet, la réparation des DSBs par recombinaison homologue entraine une résection et une élimination d'une section d'ADN autour de l'extrémité 5' de la cassure. Ceci provoque la génération de fragments ssDNA de part et d'autre de la cassure (Grabarz et al., 2012; Zou and Elledge, 2003). De même, les *one-ended* DSBs subissent une résection qui génère une extrémité simple-brin 3'sortante (Helleday et al., 2007).

Ainsi, la signalisation et la réparation des DSBs et des fourches de réplication bloquées sont des mécanismes qui se ressemblent et s'entremêlent.

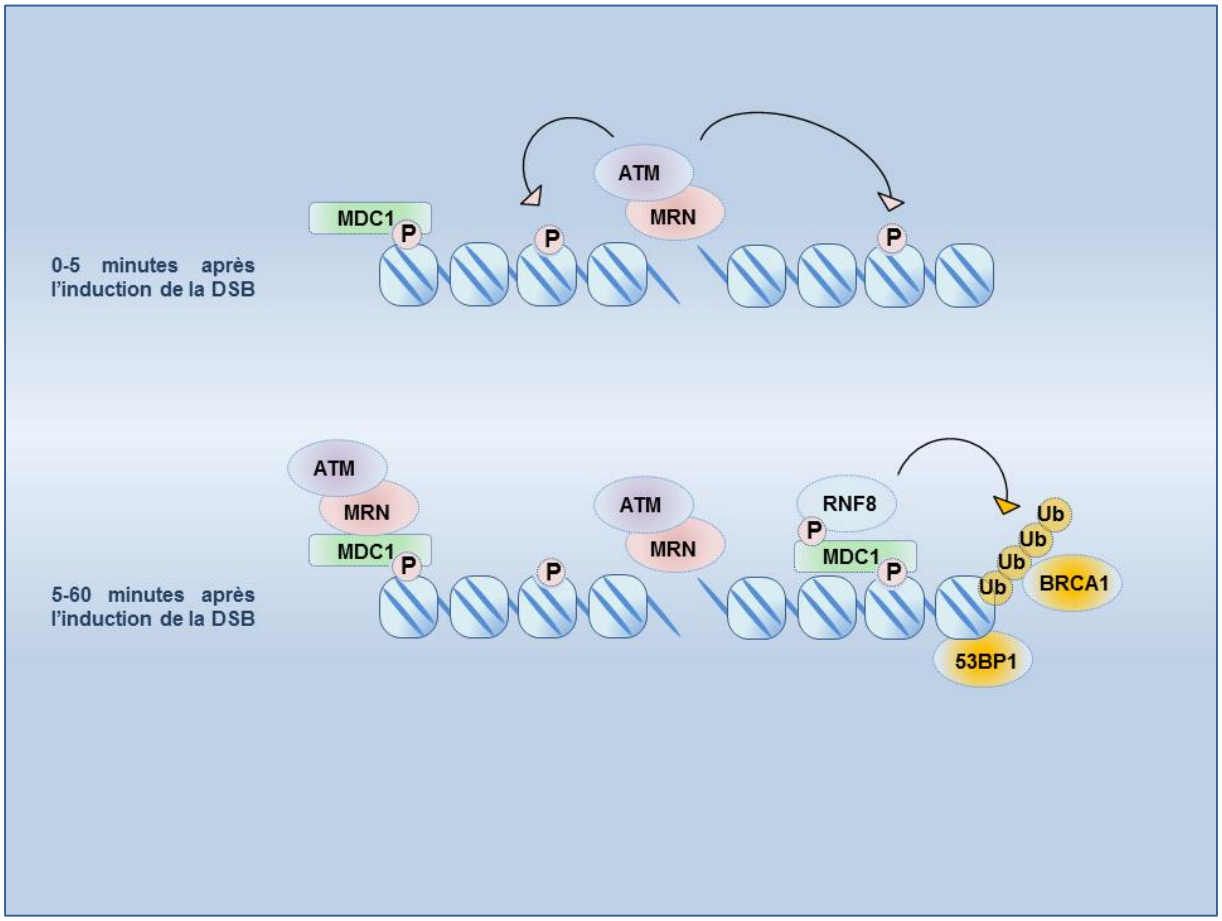


Figure 3 : Schéma simplifié récapitulant les étapes initiales de l'organisation des foyers DDR au niveau d'une DSB (adapté de Price and D'Andrea, 2013).

1.2.1 Détection des DSBs et des fragments ssDNA

L'accumulation des protéines de la voie DDR au niveau des sites de dommages est initiée par des protéines senseurs capables de reconnaitre et d'identifier les lésions de l'ADN. Des expériences menées sur des cellules de levures et de mammifères ont montré que la présence des protéines senseurs sur la chromatine est suffisante pour activer la voie DDR, même en absence de cassures (Bonilla et al., 2008; Misteli and Soutoglou, 2009).

La détection des DSBs se fait très rapidement par le complexe MRN composé des trois protéines Mre11, Rad50 et Nbs1. Ce complexe intervient dans le recrutement et l'activation de la kinase ATM (Figure 3) (Lavin, 2008; Sun et al., 2010). Une fois activée, ATM phosphoryle une centaine de protéines, notamment celles qui activent des points de contrôle du cycle cellulaire (Chk2 et p53) et les voies de réparation (53BP1 et BRCA1) (Ciccia and Elledge, 2010; Jackson and Bartek, 2009). Une cible prédominante de la phosphorylation par ATM est le domaine C terminal de la variante H2AX de l'histone H2A. La forme phosphorylée de H2AX (communément appelée γH2AX) constitue un des sites de fixation des domaines BRCT des protéines MDC1 (Lou et al., 2006; Stucki et al., 2005). Les protéines MDC1 se positionnent sur la chromatine et constituent des plateformes de recrutement de protéines DDR supplémentaires, notamment les complexes MRN-ATM. Cette boucle d'autoamplification contribue à la propagation de la signalisation sur une centaine de kilobases de part et d'autre de la cassure (Figure 3). Les protéines MDC1 interviennent également dans le recrutement des deux protéines ubiquitine ligases RNF8 et RNF168 impliquées dans l'ubiquitination des histones sur une dizaine de kilo-bases sur la chromatine. Ces modifications sont indispensables pour le recrutement des protéines 53BP1 et BRCA1 (Figure 3) (Doil et al., 2009; Gudjonsson et al., 2012).

La détection des fragments ssDNA est réalisée par les protéines RPA qui couvrent l'ADN simple-brin immédiatement après sa formation (Zou and Elledge, 2003). Les protéines RPA sont organisées en complexes hétérotrimériques composés des sous-unités RPA70, RPA32 et RPA14. Elles se fixent avec une affinité très élevée sur les fragments ssDNA par l'intermédiaire de multiples domaines de liaison à l'ADN appelés OB (pour *Oligonucleotide/Oligosaccharide-Binding*). La fonction majeure des complexes RPA consiste en une protection de l'ADN simple-brin contre la dégradation. Ils constituent

également des plateformes de recrutement de protéines de signalisation (Fanning et al., 2006; Maréchal and Zou, 2015).

1.2.2 Modification de la chromatine environnante

Le remodelage de la structure de la chromatine en réponse à des DSBs est sous l'influence de plusieurs facteurs notamment la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones et le repositionnement des nucléosomes (Bernstein and Hake, 2006; Clapier and Cairns, 2009; Kulis and Esteller, 2010; Price and Andrea, 2013). Le changement le mieux caractérisé concerne la formation de domaines de chromatine décondensée sur les sites de DSBs. Ce processus est associé à l'acétylation des histones H2A et H4 situées à proximité des DSBs par l'acétyl-transférase Tip60 (Downs et al., 2004; Jha et al., 2008; Kusch et al., 2004). En effet, la queue N-terminale de l'histone H4 interagit avec un domaine acide (chargé négativement) du dimère H2A-H2B du nucléosome adjacent. En présence de DSBs, Tip60 est rapidement recruté aux DSBs où elle acétyle un large spectre de substrats, particulièrement les histones H4. Ceci altère les interactions histones-histones et aboutit à la décompaction de la chromatine (Luger et al., 2012; Robinson et al., 2008). Plusieurs études ont mis en évidence une transition de la chromatine vers une conformation moins compactée sur le site de la cassure. Par exemple, la sensibilité de la chromatine à la fragmentation par les nucléases augmente après l'induction des cassures reflétant une meilleure accessibilité à l'ADN situé entre les nucléosomes (Smerdon et al., 1978; Ziv et al., 2006).

Un autre changement consiste en une substitution des histones H2A par les variantes d'histones H2A.Z au niveau des DSBs. Cet échange nécessite l'intervention de l'ATPase de la famille SWI/SNF p400 et précède l'acétylation des histones H4. En effet, le dépôt de H2A.Z atténue la stabilité du nucléosome et favorise l'acétylation des histones H4 (Fuchs et al., 2001; Gévry et al., 2007; Price and Andrea, 2013). Ces modifications sont nécessaires pour une réparation efficace des DSBs. A l'appui de cette idée, des cellules invalidées pour le variant H2A.Z deviennent sensibles aux radiations ionisantes et présentent des défauts de signalisation des DSBs s'illustrant par un défaut de recrutement de la protéine BRCA1 et du complexe KU70/KU80 aux sites de la lésion (Downs et al., 2004; Ikura et al., 2000; Murr et al., 2007).

1.2.3 Signalisation des DSBs et des fragments ssDNA

Deux voies de signalisation DDR ont été décrites chez les vertébrés. Il s'agit des voies ATM-Chk1 et ATR-Chk2 (Sancar et al., 2004). Celles-ci s'activent pour induire un ralentissement ou un arrêt du cycle cellulaire à la transition G1/S, en intra-S ou à la transition G2/M. Ceci empêche la transmission d'éventuelles mutations aux cellules filles.

Les deux kinases ATM et ATR appartiennent, avec la protéine DNA-PK, à la famille des kinases apparentées aux phosphatidylinositol-3-OH kinases (PIKK - *Phosphatidylinositol 3 Kinase related Kinase*). Ce sont de grosses protéines capables de phosphoryler une vaste gamme de substrats protéiques au niveau des résidus sérine et thréonine. Malgré la similarité de leur structure, les trois kinases effectuent des tâches différentes au cours de la voie DDR (Yang et al., 2003).

La kinase ATM s'active principalement par la présence de DSBs (Figure 4). Elle subit une autophosphorylation, change de conformation et se relocalise vers la lésion via le complexe MRN. Elle intervient ensuite dans la phosphorylation de multiples substrats, notamment les histones H2AX, le complexe MRN, la cohésine SMC, la kinase effectrice Chk2 et la protéine p53 (Lavin and Kozlov, 2007; Lee and Paull, 2007; Shiloh and Ziv, 2013). La phosphorylation de Chk2 par ATM a lieu sur un résidu spécifique de thréonine (T68) positionné en N-terminal. Une fois activée, Chk2 module l'activité et l'expression d'un ensemble de régulateurs du cycle cellulaire comme par exemple p53, la famille des phosphatases Cdc25A, le suppresseur de tumeurs BRCA1 et le facteur de transcription FOXM1 (Stolz et al., 2011; Ward et al., 2001; Zannini et al., 2014).

Contrairement à la voie ATM-Chk2, ATR-Chk1 ne s'active que par la présence de fragments simple-brin d'ADN (Figure 4) (Abraham, 2001). La présence des protéines RPA sur l'ADN simple brin favorise le recrutement de la protéine ATR via son partenaire ATRIP (*ATR Interacting Protein*). Le médiateur TopBP1 est ensuite recruté au niveau du complexe ssDNA-RPA. Il interagit avec la protéine médiatrice claspine et contribue à sa phosphorylation via ATR. Ces évènements sont cruciaux pour le recrutement de Chk1 et pour l'activation complète des points de contrôle intra-S (Cortez et al., 2001; Flynn and Zou, 2011; Liu et al., 2011; Zou and Elledge, 2003).

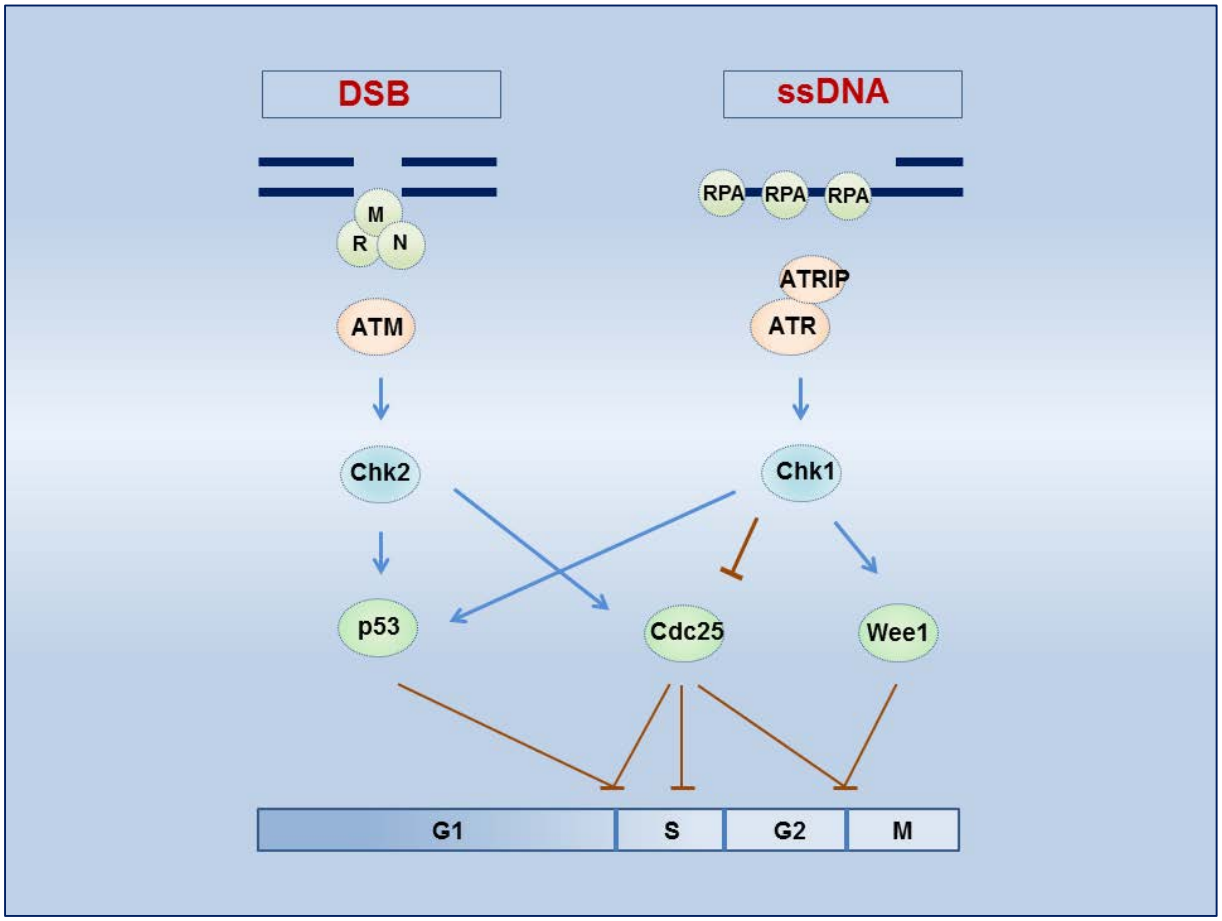


Figure 4 : Schéma simplifié récapitulant les voies d'activation des points de contrôle du cycle cellulaire par la voie DDR (adapté de Bouwman and Jonkers, 2012).

La phosphorylation de Chk1 par ATR s'établit préférentiellement au niveau des sérines S317 et S345 de ses domaines régulateurs (Zhao and Piwnica-Worms, 2001). Ces modifications sont communément utilisées comme des marqueurs d'activation de la voie ATR-Chk1. La phosphorylation de Chk1 par ATR stimule son activité kinase et favorise son relargage de la chromatine pour agir *en trans* sur des cibles nucléaires et cytoplasmiques, notamment les régulateurs du cycle cellulaire Cdc25A, Cdc25C et Wee1 (Figure 4). La protéine Chk1 intervient également dans l'inhibition de la transcription en phosphorylant les histones H3. Chk1 semble être également impliqué dans la réparation par recombinaison homologue en phosphorylant les deux acteurs clés BRCA1 et RAD51. Enfin, une proportion de Chk1 active est présente au niveau des centrosomes où elle participe à la régulation du complexe cycline B / Cdk1 et l'entrée en mitose (Abraham, 2001; Gruber et al., 2011; Yu, 2007; Shimada et al., 2008).

Les deux kinases Chk1 et Chk2 participent activement à l'induction de l'arrêt dans le cycle face à la présence de structures aberrantes de l'ADN. Elles coopèrent dans le transfert des signaux vers les effecteurs de l'arrêt dans le cycle notamment la phosphotyrosine phosphatase Cdc25A, la kinase Wee1 et la protéine p53 (Figure 4) (Bartek and Lukas, 2003).

1.2.4 Activation des points de contrôle du cycle cellulaire

La réaction qui initie l'arrêt en G1 consiste en une phosphorylation de Cdc25A par Chk2 aboutissant à son expulsion du noyau et à sa dégradation. L'inactivation de Cdc25A entraine une accumulation de la forme phosphorylée (inactive) de Cdk2. Cette dernière se retrouve ainsi incapable de phosphoryler la Cdc45 et d'initier la réplication de l'ADN. Cette réponse immédiate est suivie par l'activation d'une voie complémentaire mettant en jeu l'activation de p53 et de son gène cible $p21^{WAF1}$. Comme nous l'avons vu précédemment, la voie ATM-Chk2 entraine une phosphorylation de p53 sur les résidus sérine 15 et 20. Ceci aboutit à sa stabilisation, à son activation et à l'induction de son gène cible $p21^{WAF1}$ qui désactive les complexes cyclines E / Cdk2 impliqués dans la transition G1/S (Bartek and Lukas, 2001; Falck et al., 2001; Mailand et al., 2000).

L'arrêt en G2 implique une inactivation des complexes cyclines B / Cdk1. En fonction de la nature du dommage, les deux voies ATM-Chk2 et ATR-Chk1 s'activent et

contribuent à la phosphorylation et à l'inactivation des Cdc25A. De plus, Chk1 inhibe l'activité de la kinase Wee1 conduisant à l'inactivation de la Cdk1 (Boutros et al., 2007; O'Connell et al., 2000).

Les points de contrôle intra-S sont les moins décrits. Ils s'activent à la fois en présence de dommages générés durant la phase S ou de dommages préexistants ayant échappé aux points de contrôle G1/S. L'activation des points de contrôle intra-S n'aboutit pas à un arrêt total du cycle cellulaire comme celui obtenu suite à l'activation des *checkpoints* G1/S et G2/M (Rhind and Russell, 2000). Toutefois, elle provoque une réduction de la synthèse d'ADN par l'intermédiaire de deux mécanismes interdépendants: (1) l'inhibition de l'organisation des origines de réplication et (2) la réduction de la vitesse de progression des fourches de réplication. La suppression des origines de réplication est assurée par l'activation de la voie ATR-Chk1, la phosphorylation de Cdc25A, l'inactivation des complexes cycline E / Cdk2 et l'enrayement de l'accumulation de Cdc45 et de l'ADN polymérase α au niveau des complexes de pré-réplication. L'atténuation de la vitesse de progression des fourches de réplication, quant à elle, semble être un phénomène local affectant uniquement les fourches rencontrant le dommage (Grallert and Boye, 2008; Seiler et al., 2007; Willis and Rhind, 2009).

1.2.5 Mécanismes de réparation des DSBs

Les cellules utilisent trois stratégies différentes pour réparer les DSBs : La recombinaison homologue (HR- *Homologous Recombination*) nécessitant la présence d'une séquence d'ADN homologue à la séquence endommagée et la jonction des extrémités non-homologues (NHEJ- *Non-Homologous End Joining*) permettant la ligature des deux extrémités d'ADN de part et d'autre de la DSB. La réparation par SSA (*Single Strand-Annealing*) partage des évènements communs avec la RH et la NHEJ et consiste en une recherche d'homologie entre des séquences non-alléliques situées de part et d'autre de la lésion (Figure 5) (Aguilera and Gómez-González, 2008). Les mécanismes de NHEJ et HR sont abordés dans les paragraphes suivants.

Réparation par NHEJ

La NHEJ est la voie de réparation la plus simple et la plus rapide. Néanmoins, elle est considérée comme étant fortement mutagène dans le sens où elle s'accompagne systématiquement d'une perte de nucléotides au niveau de la lésion (Figure 5).

La réparation par NHEJ implique la participation d'un ensemble de protéines dont les senseurs (Ku), les transducteurs (DNA-PK) et les effecteurs (ligase IV - XRCC4). Elle s'initie par l'assemblage des deux protéines Ku70 et Ku80 et la formation d'un hétérodimère Ku au niveau des deux extrémités de la lésion. Les protéines Ku possèdent une structure tridimensionnelle particulière leur conférant la propriété d'encercler l'ADN et de stabiliser sa structure. Elles interviennent également dans le recrutement de la kinase DNA-PK qui phosphoryle un large spectre de substrats au niveau de la DSB tels que le complexe effecteur DNA ligase IV - XRCC4. L'activation de celui-ci est capitale pour la ligature des extrémités (Deriano and Roth, 2013; van Gent and van der Burg, 2007; Weterings and Chen, 2008).

Réparation par HR

La réparation par HR est communément considérée comme la voie de réparation la plus fidèle parce qu'elle met en jeu des séquences d'ADN homologues au brin lésé présentes au niveau de la chromatide sœur ou du chromosome homologue. Toutefois, cette vision simpliste ne reflète pas la réalité d'autant plus qu'elle ne prend pas en considération l'existence de plusieurs variantes de HR aboutissant à des conséquences diverses. Des études moléculaires et génétiques ont mis en évidence trois versions différentes de HR : la voie classique de réparation (*DSBR - Double-Strand Break Repair*), l'appariement des brins dépendants de la synthèse de l'ADN (SDSA - *Synthesis-Dependent Strand Annealing*) et la réplication induite par les cassures (BIR – *Break Induced Replication*). Ces trois variantes de HR partagent les mêmes phases initiales (Krejci et al., 2012; Li and Heyer, 2008; Aguilera and Gómez-González, 2008).

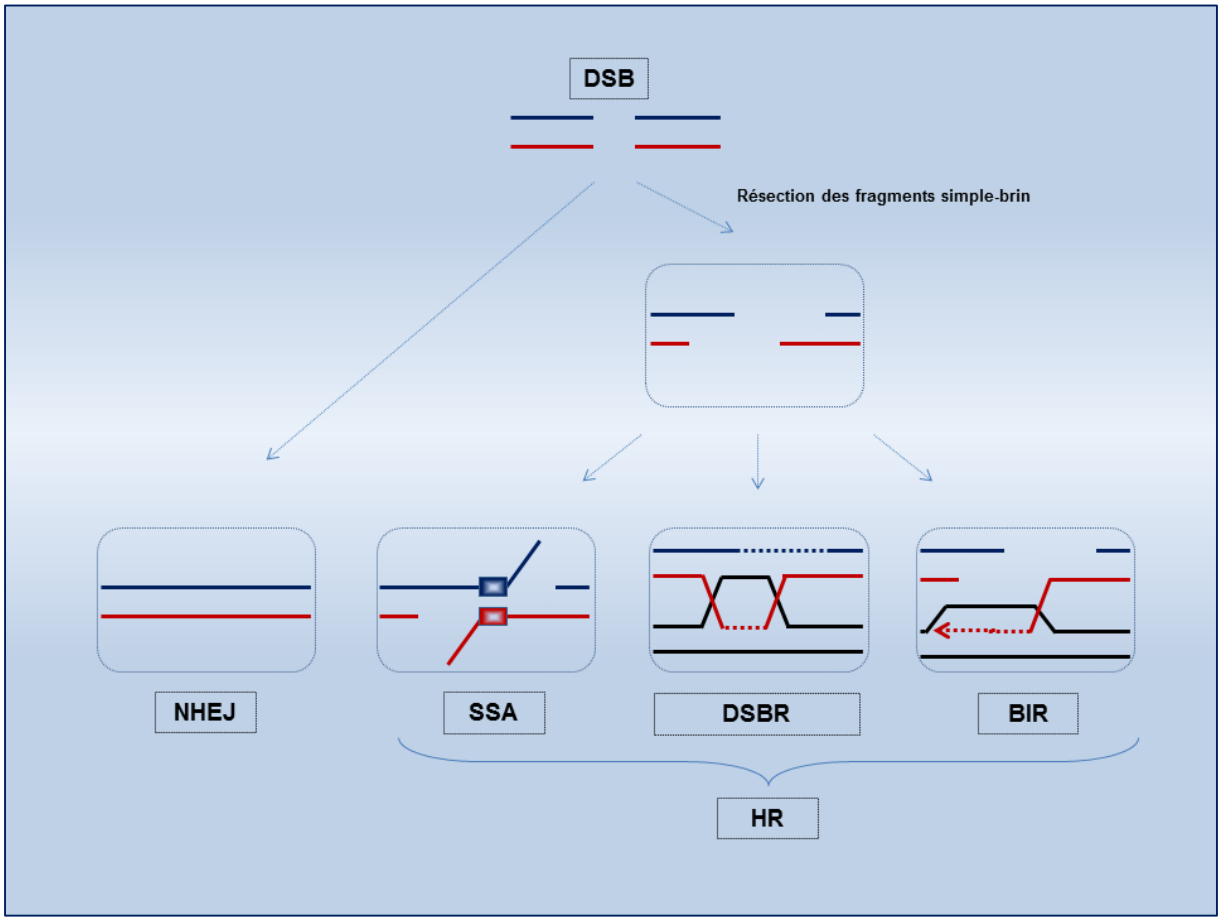


Figure 5 : Schéma simplifié récapitulant les différentes voies de réparation des DSBs (adapté de Aguilera and Gómez-González, 2008).

La phase initiale de pré-synapse aboutit à la formation d'un filament nucléoprotéique composé du fragment d'ADN simple brin et des protéines RPA et RAD51. Cette phase commence par la résection de 5'en 3' de fragments simple-brin d'ADN de part et d'autre de la DSB (Figure 5). Plusieurs acteurs participent à la régulation de cette étape dont les principaux sont le complexe MRN, la protéine CtIP et l'endonucléase MRE11 (Huertas, 2010; Mimitou and Symington, 2009). Les deux protéines 53BP1 et BRCA1 y interviennent également. Elles exercent des effets opposés sur la résection des fragments d'ADN. La protéine 53BP1 se fixe sur l'ADN au niveau des extrémités et les protège contre la dégradation. La protéine BRCA1, quant à elle, empêche l'accumulation de 53BP1 et stimule ainsi le démarrage de la résection (Bouwman et al., 2010; Bunting et al., 2010). L'étape de résection se poursuit par l'action des nucléases Exo1 et des hélicases BLM responsables de la formation des extrémités sortantes d'ADN simple brin en 3' (Gravel et al., 2008; Nimonkar et al., 2008). Une fois formés, les fragments ssDNA sont recouverts par les protéines RPA et RAD51. L'étape de synapse consiste en une ouverture de l'ADN double-brin homologue et l'invasion par le brin lésé. Les protéines RAD51 renforcent l'intégration de la séquence d'ADN et contribuent à la formation d'une structure hétéro-duplex d'ADN appelée la boucle D (*D-Loop*) (Krejci et al., 2012).

A partir de cette étape, les trois branches de réparation par HR divergent (Figure 5). La voie de réparation classique DSBR implique un appariement par complémentarité de l'ADN simple-brin à celui du fragment double-brin. Une fois que la séquence nucléotidique perdue est restaurée, le brin d'ADN de l'autre extrémité de la DSB rejoint le fragment néo-synthétisé et la boucle D se déstabilise. Cette étape nécessite un deuxième évènement d'invasion et la formation d'une phase intermédiaire de double jonction de Holliday (dHJ - *double Holliday Junction*) (Figure 5) (Bizard and Hickson, 2014; Krejci et al., 2012) .

La réparation par SDSA, de son coté, ne nécessite par la formation d'une structure en dHJ. En effet, le fragment d'ADN intégré se déplace et s'hybride avec la séquence d'ADN simple-brin de l'autre côté de la lésion. Ce mécanisme de réparation provoque des réarrangements génomiques et des pertes d'hétérozygotie (Aguilera and Gómez-González, 2008; Sung and Klein, 2006).

Le mécanisme de BIR ressemble à ce que l'on observe dans la réparation des fourches de réplication bloquées par HR. C'est un moyen efficace pour la réparation des *one-ended* DSBs. Il procède par une invasion du fragment simple-brin dans la molécule

d'ADN homologue et d'une synthèse d'ADN jusqu'à la rencontre d'une deuxième fourche de réplication ou même jusqu'à l'extrémité du chromosome (Figure 5). A la différence des deux autres versions de HR, la synthèse d'ADN associée à la voie BIR ne s'effectue pas directement après l'étape d'invasion. Il a été constaté qu'après l'invasion du brin, la progression s'arrête et la synthèse de l'ADN est repoussée d'au moins 4 heures. Les raisons à l'origine de ce retard sont inconnues mais des auteurs suggèrent que ceci pourrait être lié à l'existence des points de contrôle de recombinaison (Costantino et al., 2014; Haber, 1999; Michel, 2000). Bien que la réparation des *one-ended* DSBs par BIR soit efficace, elle aboutit le plus souvent à des conséquences délétères affectant l'intégrité du génome, notamment des pertes d'hétérozygotie, des délétions, des duplications et des translocations (Costantino et al., 2014; Hastings et al., 2009; Iraqui et al., 2012; Payen et al., 2008; Sakofsky et al., 2014).

1.2.6 Impact des DSBs et des fourches de réplication bloquées sur la biologie de la cellule

Les DSBs et le stress réplicatif sont considérés comme les lésions les plus toxiques pour la cellule puisqu'elles menacent directement l'intégrité du génome. L'aspect délétère majeur repose sur le fait qu'il n'existe pas de brin complémentaire intact utilisable comme matrice pour la restauration des séquences nucléotidiques perdues. Ainsi, leur réparation est susceptible d'engendrer divers types de mutations associées à des anomalies du développement, des maladies neurodégénératives et au cancer (Aguilera and Gómez-González, 2008; Jackson and Bartek, 2009).

Par ailleurs, une non-réparation des DSBs et des fourches de réplication bloquées contribue à une persistance et à une amplification de la signalisation DDR. En conséquence, les cellules s'orientent vers la mort cellulaire par apoptose ou déclenchent le programme de sénescence. Le choix de l'une ou l'autre des deux réponses biologiques reste à explorer. Il semblerait que le type cellulaire, l'intensité et la nature du dommage soient des facteurs déterminants.

Chapitre 2: La sénescence

Contrairement aux lignées cellulaires tumorales, les cellules normales ne sont capables d'effectuer en culture qu'un nombre de divisions limité. Cette limitation du potentiel prolifératif a été originalement décrite par Léonard Hayflick et Paul Moorhead en 1961 (Hayflick and Moorhead, 1961). Ils observèrent que des fibroblastes extraits d'embryons humains présentaient en culture une phase de croissance exponentielle suivie d'une phase terminale caractérisée par un arrêt de la prolifération cellulaire. Ils nommèrent cette phase sénescence. Ils attribuèrent ensuite à la sénescence un rôle fondamental dans les mécanismes du vieillissement (Hayflick, 1965).

2.1 Les caractéristiques des cellules sénescentes

L'établissement de la sénescence est un processus complexe et dynamique qu'accompagnent des changements morphologiques et moléculaires. Ces modifications sont utilisées comme biomarqueurs de l'état de sénescence *in vitro* comme *in vivo*. Toutefois, la chronologie de mise en place de ces biomarqueurs et leur universalité pourrait être fluctuante selon les types cellulaires. Il n'existe donc pas de marqueurs distinctifs de sénescence et le listage déclaré dans la partie suivante ne reflète en réalité que les effecteurs impliqués dans l'induction du phénotype sénescent.

2.1.1 Arrêt dans le cycle cellulaire

Un événement nécessaire mais pas suffisant permettant d'identifier des cellules en état de sénescence concerne l'arrêt dans le cycle cellulaire. Le cycle de division cellulaire comporte les phases G1, S (synthèse de l'ADN), G2 et M (Mitose). Ces 4 phases constituent l'horloge classique du cycle cellulaire. Il existe une 5ème phase dite G0 de sortie du cycle cellulaire dans laquelle sont les cellules en différenciation terminale et en quiescence. La majorité des cellules dans l'organisme humain sont en fait dans cet état et ne se divisent pas.

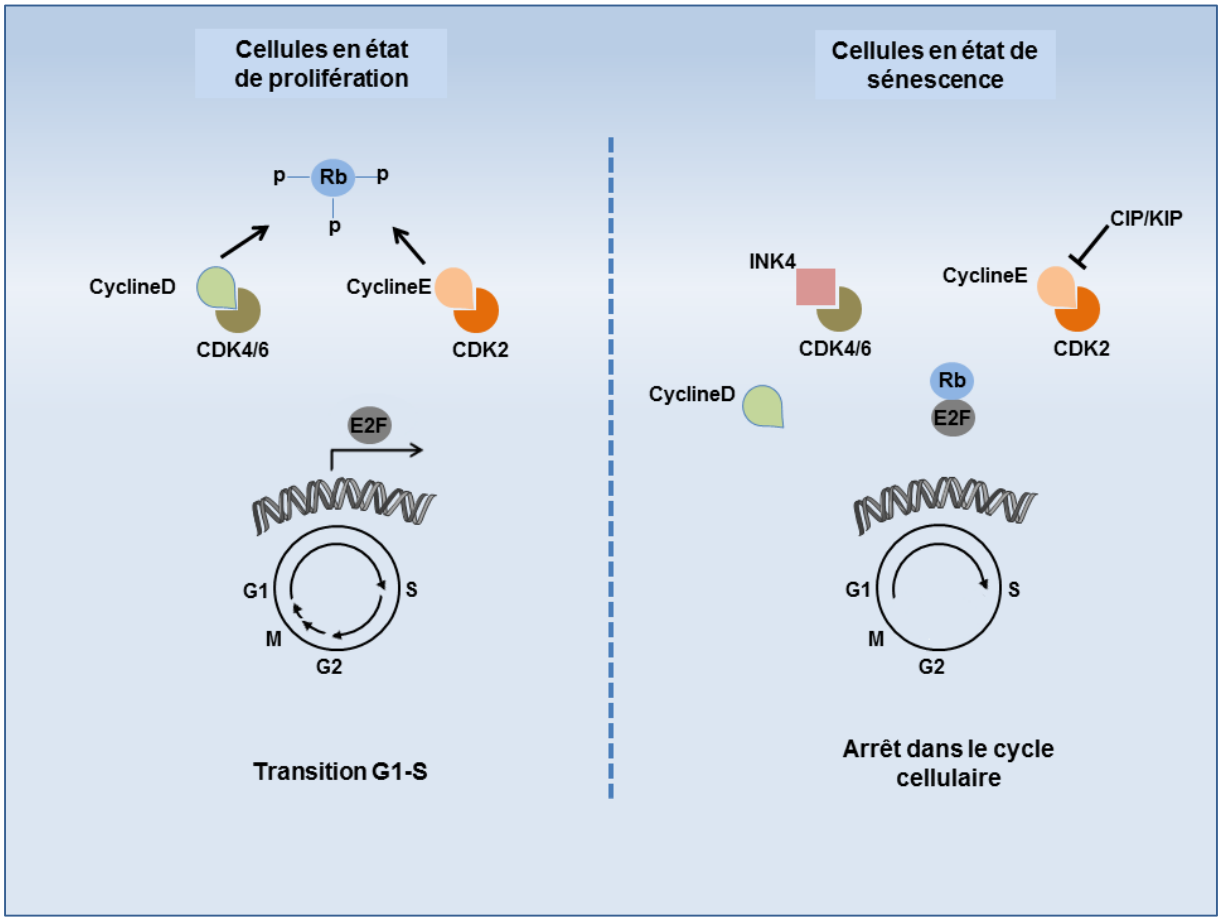


Figure 6 : Schéma simplifié de la régulation de la transition G1-S du cycle cellulaire à la sénescence (adapté de Chandler and Peters, 2013).

Les cellules ont établi un processus de contrôle sophistiqué pour assurer un bon déroulement du cycle cellulaire. La transition d'une phase vers une autre est sous le contrôle des protéines Cdks (*Cyclin dependent kinases)*. Ce sont des sérines/thréonines kinases qui interviennent à des phases spécifiques du cycle cellulaire : Cdk4, 6 et 2 durant la phase G1 ; Cdk2 durant la phase S et Cdk1 durant les phases G2 et M.

Les niveaux de Cdks ne varient pas au cours du cycle cellulaire. Leur activation dépend de protéines partenaires, les cyclines, s'exprimant d'une manière cyclique et permettant l'activation, elle-même cyclique, des complexes Cycline/Cdks. L'activité kinase des Cdks est également régulée par des modifications de type phosphorylation/déphosphorylation. Les protéines Wee1 et Myt1 inhibent leur activité en les phosphorylant sur des résidus thréonine et tyrosine. En revanche, les phosphatases Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B and Cdc25C) exercent des effets opposés en les dé-phosphorylant. La régulation de leur activité se fait également par l'intervention d'une classe supplémentaire de protéines appelées CKI pour *Cyclin dependent Kinase Inhibitors*. Ces dernières sont classées en deux familles en fonction de leurs homologies de séquences et leurs spécificités d'action : INK4 et KIP/CIP. L'inhibition s'exerce soit en enrayant la liaison de la cycline à sa Cdk, soit en enrayant l'interaction du complexe cycline/Cdk avec son substrat. Les membres de la famille des INK4 comprennent les protéines $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b,}$ $p18^{INK4c}$ et $p19^{INK4d}$ et inhibent les complexes cycline D/Cdk4 et cycline D/Cdk6. Les inhibiteurs de la famille KIP/CIP, quant à eux, comprennent $p21^{WAF1}$, $p27^{KIP1}$ et $p57^{KIP2}$. Ils possèdent un spectre d'activité étendu et le potentiel d'inhiber tous les complexes Cycline/Cdk de la phase G1 mais également le complexe cycline B/Cdk1 de la phase G2 (Cánepa et al., 2007; Sherr and Roberts, 1999).

L'arrêt dans le cycle cellulaire associé à la sénescence implique l'intervention des CKI $p16^{INK4a}$ et $p21^{WAF1}$ (Ben-Porath and Weinberg, 2005). La protéine $p27^{KIP1}$ pourrait également y participer (Alexander and Hinds, 2001). L'activation de ces CKI aboutit à une inactivation des complexes cycline D/Cdk4 ou 6 et cycline E/Cdk2 impliqués dans la transition G1/S. En conséquence, la protéine Rb se retrouve sous une forme hypophosphorylée et active. Ceci entraine une séquestration des facteurs de transcription de la famille E2F et une répression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire comme PCNA. Il en résulte un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 caractéristique de l'état de sénescence (Vidal and Koff, 2000) (Figure 6).

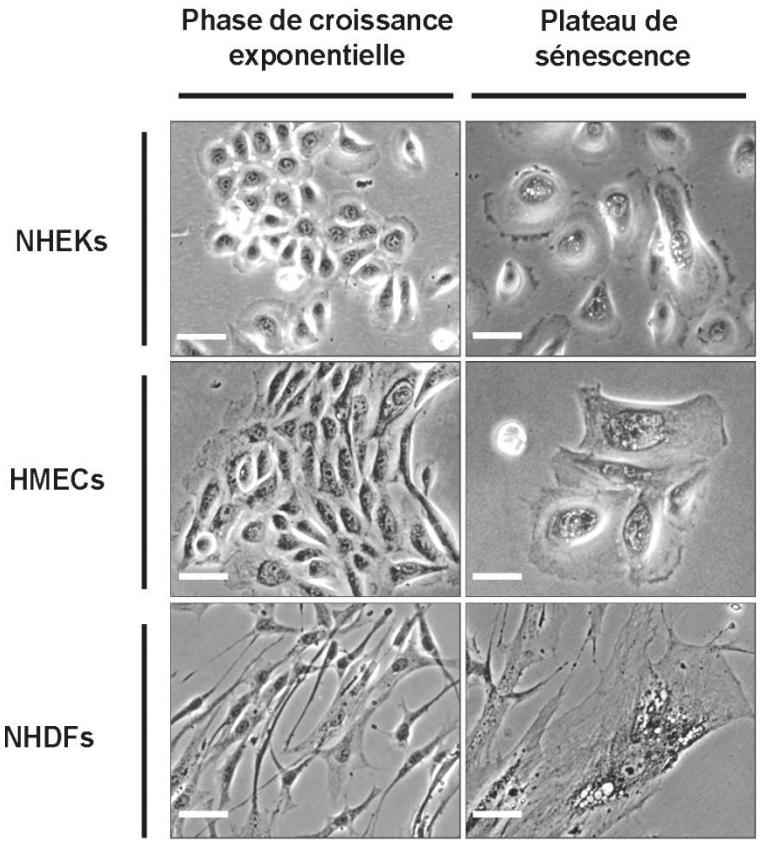


Figure 7 : Morphologie de différents types de cellules primaires en phase de croissance exponentielle et au plateau de sénescence :

NHEKs – *Normal Human Epidermal Keratinocytes*

HMECs – *Human Mammary Epithelial Cells*

NHDFs – *Normal Human Dermal Fibroblasts*

La barre d'échelle représente 50 µm. (Nassour et al; *non publié*).

2.1.2 Changement morphologique

A la différence des cellules en état de quiescence, l'arrêt dans le cycle cellulaire des cellules sénescentes s'accompagne de l'acquisition d'une morphologie particulière. Il s'agit principalement d'un changement de forme, d'une augmentation globale du volume nucléaire et cytoplasmique et d'une vacuolisation nette du cytoplasme (Figure 7). Nous observons également une polynucléation affectant un nombre non négligeable de cellules. A titre d'exemple, environ 20% des kératinocytes humains sénescents sont polynucléés (Gosselin et al., 2009a).

Les voies moléculaires à l'origine des remaniements morphologiques associés à la sénescence ne sont que très peu établies. L'augmentation globale de la synthèse protéique semble être un mécanisme effecteur. En effet, des données expérimentales ont montré des liens entre l'augmentation de l'activation de la protéine mTOR (*Target Of Rapamycin*) d'une part et la libération du facteur d'initiation de la traduction protéique eIF4E (*Eukaryotic Initiation Factor 4E*) d'autre part. Le modèle proposé consiste en une phosphorylation du répresseur traductionnel 4EBP1 (*4E-Binding Protein 1*) par mTOR, contribuant à sa dissociation du facteur eIF4E. Celui-ci se retrouve ainsi libre de recruter la protéine de pontage eIF4G et d'induire un accroissement de la synthèse protéique et du volume cellulaire. D'une manière intéressante, l'inhibition de la voie mTOR par un traitement avec de la rapamycine ou l'expression d'un mutant non-phosphorylable de 4EBP1 atténuent l'initiation de la traduction et empêchent l'extension de la taille cellulaire (Fingar et al., 2002; Fingar et al., 2004; Mamane et al., 2006).

Un autre mécanisme concerne des modifications du cytosquelette à la sénescence. Dans ce cadre, l'instauration du phénotype sénescent des fibroblastes humains a été associé à une formation d'un réseau condensé de vimentine, d'un assemblage de fibres de stress d'actine et d'une redistribution sporadique des protéines d'adhérence, notamment la vinculine et la paxilline (Chen et al., 2000; Nishio and Inoue, 2005).

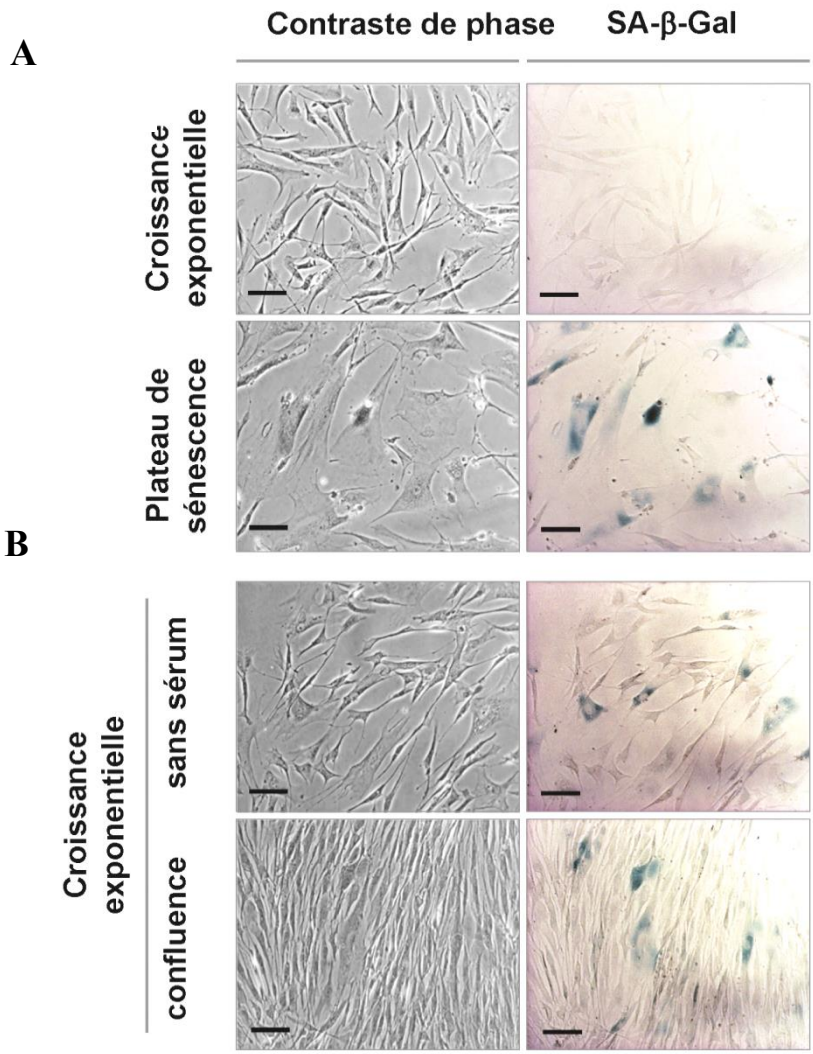


Figure 8 : Activité *SA-β-Gal* de fibroblastes normaux de derme humain (NHDFs – *Normal Human Dermal Fibroblasts*).

(A) NHDFs en phase de croissance exponentielle et plateau de sénescence.
(B) NHDFs en phase de croissance exponentielle cultivés dans un milieu de culture dépourvu de sérum ou jusqu'à la confluence**.**
La barre d'échelle représente 50 µm. (Nassour et al; *non publié*).

2.1.3 Augmentation de l'activité SA-β-Galactosidase

Depuis que la sénescence a été décrite *in vitro*, les études ont visé à identifier des marqueurs spécifiques permettant de discriminer les cellules dans cet état. Les travaux de *Dimri et al*. ont permis d'identifier une enzyme lysosomale, la *β-galactosidase*, dont l'activité augmente et devient détectable à pH 6 dans des cellules sénescentes *in vitro* et *in vivo* (Dimri et al., 1995). L'activité de cette enzyme est détectable par ajout du substrat galactoside X-gal dont le produit forme un précipité bleu cytoplasmique visible par microscopie (Figure 8A).

Malgré sa popularité et sa bonne réputation en tant que marqueur universel de sénescence, l'activité *SA-β-Galactosidase*, considérée individuellement, ne suffit pas pour caractériser des cellules en sénescence. En effet, des privations prolongées en sérum et des cultures de cellules non-sénescentes maintenues à confluence plusieurs jours, peuvent induire une accumulation massive de lysosomes. Celles-ci peuvent ainsi apparaître bleues au test de la *SA-β-Galactosidase* (Figure 8B).

2.1.4 Augmentation de l'activité autophagique

L'autophagie consiste en un programme catabolique finement régulé durant lequel les cellules digèrent leurs constituants. Il permet à la cellule la dégradation et le renouvellement de ses constituants cytoplasmiques altérés ou en excès via l'intervention de la machinerie lysosomale. Contrairement au protéasome qui ne prend en charge et n'élimine que les protéines solubles, les cibles de dégradation par autophagie englobent des protéines mal-conformées, des protéines agrégées non-solubles et des organites endommagés ou non. L'ensemble de ces substrats est dégradé dans la lumière des lysosomes via l'intervention des enzymes lysosomales actives à pH acide.

Il existe trois formes d'autophagie : la macroautophagie (fréquemment appelée simplement autophagie), la microautophagie et l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes ou CMA *(Chaperone Mediated Autophagy)*. Elles diffèrent essentiellement par la nature du substrat qu'elles visent et son processus de transport vers les lysosomes (He and Klionsky, 2009; Mariño et al., 2014).

Existant à un niveau basal, l'autophagie assure le maintien de l'homéostasie cellulaire en permettant la dégradation et le recyclage de composants cytoplasmiques de natures diverses. Elle représente également un moyen de protection permettant aux cellules de résister à plusieurs situations de stress (carence en nutriments et facteurs de croissance, hypoxie, stress oxydant, infections bactériennes et parasitaires, …). Cependant, un paradoxe de l'autophagie tient au fait qu'elle est également considérée comme un mécanisme de mort cellulaire programmée de type II. Le devenir cellulaire semble diverger selon que les cellules subissent une activité autophagique modérée contribuant à une élimination sélective favorisant la survie, ou en revanche, une activité autophagique excessive contribuant à une dégradation brutale et à la mort (Galluzzi et al., 2014; Green and Levine, 2014; He and Klionsky, 2009; Mariño et al., 2014; Ryter et al., 2014).

Bien que de nombreuses situations associant l'autophagie à la sénescence aient été décrites, l'existence de liens causaux potentiels entre ces deux réponses biologiques n'a été que partiellement démontrée. Il a été observé que l'entrée en sénescence des cellules endothéliales et de cellules de pulpe dentaire humaine s'accompagne d'une accumulation massive de vésicules autophagiques (Li et al., 2012; Patschan et al., 2008). Il a été également montré que le traitement des cellules épithéliales biliaires de souris avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou de l'étoposide entraine une augmentation simultanée de marqueurs d'autophagie et de sénescence (Sasaki et al., 2010). Les travaux de notre équipe ont également mis en évidence une sur-activation de l'activité macro-autophagique au plateau de sénescence chez les kératinocytes d'épiderme humain (Gosselin et al., 2009a).

L'ensemble de ces études décrivent une corrélation sénescence – autophagie mais ne démontrent pas de liens de causalité. L'équipe de Narita a présenté des données quant au rôle effecteur de l'autophagie dans la sénescence. Ces travaux, réalisés avec des fibroblastes humains de poumon IMR90, indiquent que l'augmentation de l'activité autophagique à la sénescence facilite l'établissement et la mise en place du phénotype sénescent. Une surexpression stable de la kinase ULK3 induit l'autophagie et accélère la survenue du plateau de sénescence. Inversement, l'inhibition de l'autophagie par des approches génétiques ou pharmacologiques accroit le nombre de divisions cellulaires opérées par les cellules avant d'atteindre le plateau de sénescence (Young et al., 2009). L'autophagie est également impliquée dans l'accélération de la sénescence induite par chimiothérapie chez des cellules tumorales de sein (MCF-7) et du colon (HCT-116) (Goehe et al., 2012).

D'une manière intéressante, l'inhibition de l'autophagie repousse la sénescence mais n'empêche pas sa survenue. Il semblerait donc que l'induction de l'autophagie ne soit pas une étape préalable et nécessaire à la survenue de la sénescence. Elle pourrait cependant accélérer et faciliter son établissement. Il est intéressant de souligner que l'inhibition de l'autophagie dans des cellules sénescentes n'engendre pas une réversion du phénotype (Young et al., 2009). Le maintien du phénotype sénescent serait donc indépendant de l'activité autophagique.

2.1.5 Augmentation du stress du réticulum endoplasmique

Le Réticulum Endoplasmique (RE) est un organite intracellulaire composé d'un réseau membranaire en continuité avec la membrane nucléaire. Il est le premier compartiment de la voie de sécrétion et intervient dans la biosynthèse de la majorité des protéines sécrétées, des protéines de la membrane plasmique et des protéines de plusieurs organites intracellulaires. La lumière du RE constitue un environnement optimal permettant un bon repliement et une maturation correcte des protéines.

De nombreuses situations de stress (hypoxie, stress oxydant, infection virale,…) sont susceptibles d'altérer le fonctionnement du RE et de provoquer en conséquence une accumulation de protéines agrégées dans sa lumière. Face à cette situation, les cellules activent des systèmes leur permettant de rétablir l'homéostasie du RE. Un premier système s'appelle ERAD (*ER-Associated protein Degradation)*. Il stimule la dégradation des protéines mal-repliées par le protéasome en favorisant leur transfert du RE au cytosol. Une autre voie activée est la voie UPR (*Unfold Protein Response)*. Elle intervient en atténuant la synthèse protéique globale, en stimulant la synthèse de protéines spécifiques comme les chaperonnes et en activant le système ERAD.

Une recherche approfondie dans la littérature permet de dégager des données quant à l'existence de liens causaux entre sénescence et stress du RE. Le groupe de Maria Soengas a montré en 2006 que l'induction de la sénescence chez les cellules de mélanocytes humains s'accompagne d'une expansion et d'une vacuolisation nette du RE. D'une manière intéressante, l'inhibition de la voie UPR réduit le pourcentage de cellules sénescentes et protège contre la désorganisation structurale du RE (Denoyelle et al., 2006). Des altérations du RE ont été également observées à la sénescence chez les cellules

lymphatiques (Dörr et al., 2013). De plus, l'inhibition de la voie UPR conduit à la réduction du nombre de cellules positives à la *SA-β-Gal* chez les cellules épithéliales tubulaires (Liu et al., 2014). Les travaux non publiés de notre équipe ont également mis en évidence des liens fonctionnels associant le phénotype sénescent chez les fibroblastes de derme humain et l'altération de la taille et du contenu du RE (Olivier Pluquet *et al*).

Ces données suggèrent que le stress du RE est un effecteur intrinsèque de l'acquisition du phénotype sénescent. Cependant, les voies moléculaires engagées restent à élucider. L'activité autophagique pourrait être à l'interface de ces deux réponses biologiques. En effet, une activité défectueuse de l'UPR est capable d'engager une sur-activation de l'autophagie (Kouroku et al., 2007; Ogata et al., 2006; Pike et al., 2013).

2.1.6 Apparition d'un sécrétome spécifique

Bien qu'elles soient arrêtées dans le cycle cellulaire, les cellules sénescentes demeurent viables et métaboliquement actives. Néanmoins, elles subissent de profonds remaniements affectant l'expression et la sécrétion d'un ensemble de protéines. Elles développent en conséquence un profil de sécrétion particulier qui porte le nom de SASP (*Senescence Associated Secretory Phenotype*). Ce sécrétome est fortement pro-inflammatoire et riche en cytokines (IL6, IL8, Gro-α, MIF,…), facteurs de croissance (EGF, HGF/SF, VEGF,…), protéases (MMPs) et composants de la matrice extracellulaire (fibronectine,…) (Coppé et al., 2010; Kuilman and Peeper, 2009). Ses composants majeurs sont retrouvés dans plusieurs types cellulaires (Coppé et al., 2008). Le SASP n'est pas l'aboutissement d'une augmentation générale de la sécrétion associée à la sénescence. En effet, le niveau d'expression de plusieurs facteurs sécrétés ne varie pas à la sénescence.

Plusieurs voies moléculaires concourant à la synthèse du sécrétome chez les cellules sénescentes ont été décryptées. Une première résulte de l'activation persistante de la voie DDR et plus précisément de la voie ATM→NBS1→Chk2. Une induction robuste de cette voie est cruciale pour la sécrétion d'IL6 chez les fibroblastes humains sénescents (Rodier et al., 2009). Il a été également montré que la PARP1 et le facteur de transcription NF-κB (*Nuclear Factor-κB*) interviennent dans la production du SASP chez les cellules sénescentes de mélanome (Ohanna et al, 2011). Une autre étude indique que la synthèse du

SASP peut avoir lieu indépendamment des dommages à l'ADN via l'activation des voies p38-MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) et NF-κB (Freund et al., 2011).

Le sécrétome des cellules sénescentes influence non seulement les cellules voisines et le microenvironnement, mais également les cellules sénescentes qui le produisent. La complexité du SASP tient au fait qu'il se comporte à la fois comme pro- et anti-tumoral. Ce rôle dual du SASP est abordé plus en détail dans le chapitre 3 « Liens entre sénescence et tumorigenèse ».

2.1.7 Résistance à l'apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmé de type I qui permet une élimination rapide de cellules en excès ou endommagées. Elle s'accompagne d'une série de modifications moléculaires aboutissant à des altérations cellulaires diverses. Les cellules subissent une externalisation des phosphatidyl-sérines au niveau des membranes plasmiques, une condensation du noyau et du cytoplasme, une dégradation massive de l'ADN et un clivage de protéines par les caspases.

Contrairement aux cellules en phase de croissance exponentielle, les cellules sénescentes résistent à la mort par apoptose (Marcotte et al., 2004; Ryu et al., 2007; Seluanov et al., 2001; Wang, 1995). Les mécanismes moléculaires impliqués sont peu décrits. Une étude suggère que ceci serait dû à un défaut de régulation de la protéine inhibitrice de l'apoptose Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) à la sénescence (Ryu et al., 2007). En effet, les cellules sénescentes maintiennent un niveau élevé et stable de Bcl-2 les rendant incapables d'induire l'apoptose. L'inhibition de l'expression de Bcl-2 par des approches de siRNA promeut leur mort par apoptose (Ryu et al, 2007). Il a été également montré que la sénescence est accompagnée d'une diminution considérable de l'expression et de l'activité des caspases (Marcotte et al., 2004).

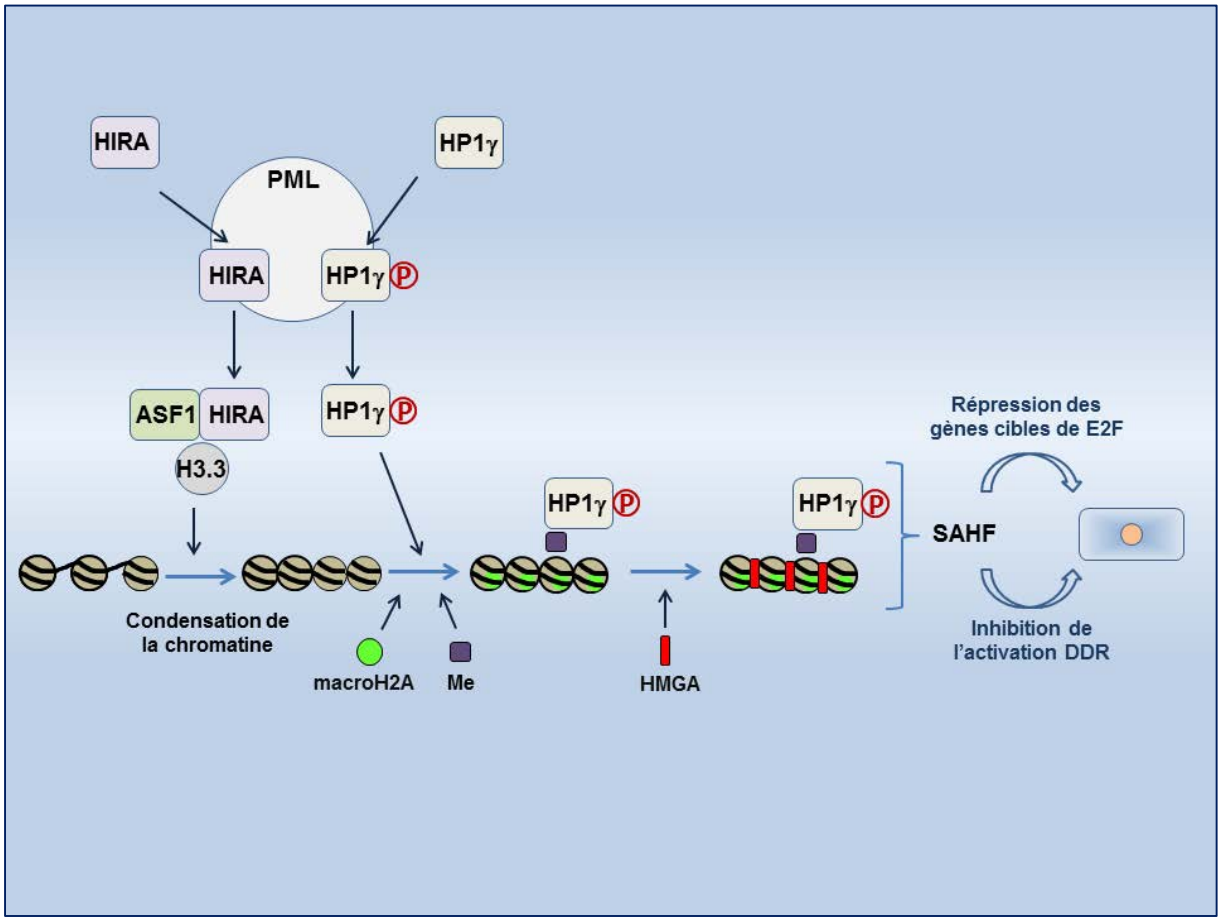


Figure 9 : Modèle simplifié de la formation des foyers SAHF chez les cellules sénescentes (adapté de Zhang et al, 2007).

2.1.8 Modification de l'architecture chromatinienne

Un autre aspect de la sénescence consiste en une réorganisation globale de la chromatine aboutissant à l'apparition de structures particulières appelées SAHF (*Senescence-Associated Heterochromatin Foci*). Les SAHF sont définis comme étant des domaines d'hétérochromatine facultative pouvant être visualisés sous forme de foyers nucléaires marqués au DAPI (*4',6-Diamidino-2-Phenylindole*). Chaque foyer SAHF résulte de la condensation d'une région d'un chromosome unique. Ils sont pourvus en protéines caractéristiques de l'hétérochromatine telles que les histones H3 di- et tri-méthylées sur la lysine 9 (H3K9me 2/3), les protéines HP1γ (*Heterochromatin Protein 1 γ*) et les variantes d'histones macro-H2A (Chandra et al., 2012; Narita et al., 2003).

Les évènements moléculaires impliqués dans la formation des SAHF ne sont toujours pas complètement déterminés. Néanmoins, sur la base des données de la littérature, il est possible de proposer un modèle selon lequel les protéines HIRA (*Histone Regulating Protein A*), HP1γ et ASF1 (*Anti-Silencing Function 1*) interviennent. Une première étape consiste en un recrutement des deux régulateurs de la chromatine HIRA et HP1γ aux corps nucléaires PML (*ProMyelocytic Leukemia*). Ces derniers sont des complexes multi-protéiques et des sites d'assemblage de nombreuses macromolécules. Les protéines HIRA forment des complexes avec ASF1 et interviennent dans le transport et le dépôt des variantes d'histones H3.3 au niveau de la chromatine (Figure 9). L'activité du complexe ASF1/HIRA engendre ainsi une augmentation de la charge en histones nucléosomiques et une compaction de la chromatine caractéristique des SAHF. La protéine HP1γ, quant à elle, est phosphorylée sur la sérine 93 et recrutée ensuite avec la variante d'histone macroH2A à la chromatine (Ferbeyre et al., 2000; Zhang et al., 2007). Narita *et al* ont également montré que la protéine HMGA est indispensable pour la mise en place des SAHF. En effet, HMGA se retrouve accumulée sur la chromatine et plus particulièrement au niveau des SAHF. Elle participe à l'organisation structurale des SAHF et à l'arrêt dans le cycle faisant intervenir la protéine $p16^{INK4a}$ (Narita et al., 2006) (Figure 9).

Deux voies concourent à l'établissement de la sénescence en réponse au SAHF : une première met en jeu une répression des gènes cibles du facteur E2F. En effet, le remodelage chromatinien provoque une inclusion et une incorporation du gène codant la cycline A2 dans les domaines SAHF contribuant ainsi à l'inhibition de son expression et à l'arrêt de la

progression du cycle cellulaire (Narita et al., 2003). La deuxième voie consiste en une réduction de la signalisation des voies DDR. En effet, les domaines SAHF ne contiennent jamais de protéines DDR, notamment ATM, NBS1 et RAD50 (Di Micco et al., 2011). D'une manière intéressante, l'inhibition de la formation des SAHF engendre une augmentation du nombre de foyers DDR dans les cellules et une induction de la mort par apoptose. La présence de SAHF semble donc favoriser la sénescence plutôt que l'apoptose en présence des dommages à l'ADN (Di Micco et al., 2011). Il est intéressant de noter que l'apparition des SAHF à la sénescence n'a pas été observée chez tous les types cellulaires (Kosar et al., 2011). Ceci remet en cause le rôle fonctionnel des SAHF dans l'établissement et le maintien du phénotype sénescent.

2.2 Les mécanismes inducteurs de sénescence

La sénescence est un programme mis en œuvre par les cellules en réponse à de nombreux types de stress. Les inducteurs les mieux décrits se répartissent en trois catégories. Il s'agit de la perte de fonctionnalité des télomères, du stress oxydant et du stress oncogénique. Ces voies interviennent d'une manière interdépendante et engendrent principalement des dommages à l'ADN capitaux pour l'établissement de la sénescence. La sénescence a ainsi été considérée comme étant une réponse aux dommages à l'ADN.

2.2.1 Perte de fonctionnalité des télomères

Les télomères sont des régions de l'ADN correspondant aux extrémités terminales des chromosomes. Ils sont formés de séquences nucléotidiques répétitives de type TTAGGG (Moyzis et al., 1988) et présentent un fragment d'ADN simple-brin de 50 à 300 nucléotides débordant en 3' (Henderson and Blackburn, 1989) (Figure 10A). L'utilisation de la microscopie électronique a permis de mettre en évidence une structure en boucle (boucle T) de la chromatine télomérique (Griffith et al., 1999). Celle-ci est créée par le repliement et l'insertion du fragment 3' simple-brin dans l'ADN double-brin télomérique où il s'hybride avec la séquence nucléotidique qui lui est complémentaire. L'organisation en boucle permet de masquer et de protéger ce fragment contre la dégradation par les exonucléases et sa reconnaissance par des mécanismes de réparation de l'ADN.

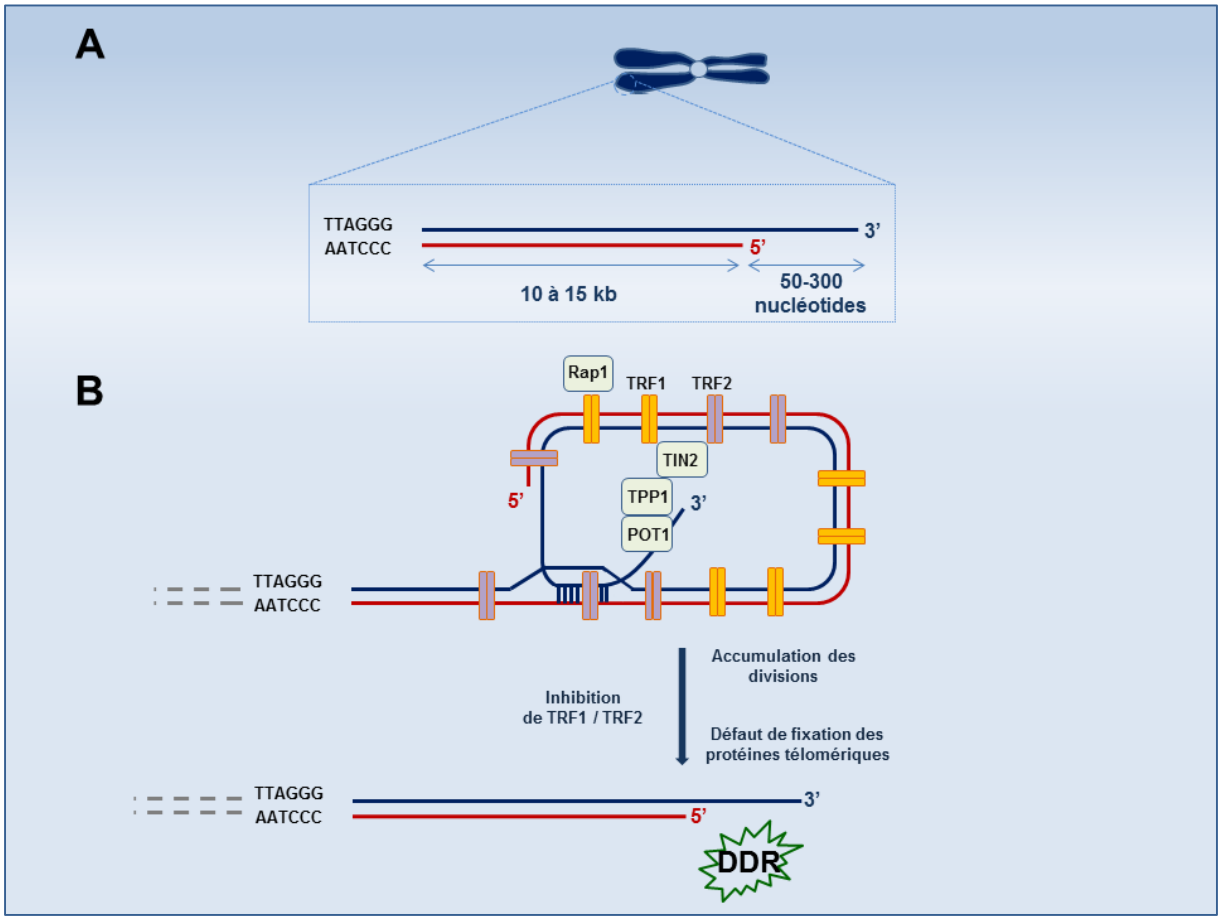


Figure 10 : Organisation des télomères humains et dysfonctionnement télomérique.

(A) Représentation linéaire d'un télomère.
(B) Organisation du télomère en boucle T associée à des complexes protéiques (Télosome).

La boucle T est associée à un complexe protéique qui porte le nom de *shelterin* ou télosome. Ce dernier est constitué de six sous-unités TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, RAP1 et POT1. Les deux protéines TRF2 et TRF1 se fixent à l'ADN télomérique double-brin et POT1 au fragment simple-brin. Les liaisons avec l'ADN sont renforcées par les actions de TPP1 et TIN2. L'assemblage de ces protéines au niveau de l'ADN télomérique confère une stabilité à la boucle (Liu et al., 2004; Xin et al., 2008, Palm and de Lange, 2008) (Figure 10B).

Une raison physiologique contribuant au dysfonctionnement des télomères est le mécanisme de réplication, notamment du brin retardé. En effet, un défaut de disponibilité d'amorces d'ARN à l'extrémité 3' du brin retardé provoque un raccourcissement de celui-ci de 100 à 200 paires de bases après chaque phase S (Levy et al., 1992; Olovnikov, 1973; Harley et al., 1990; Georgin-Lavialle et al., 2010)

La perte des séquences télomériques peut être compensée par l'activité d'une transcriptase inverse présente dans les cellules de l'embryon, les cellules souches et les cellules cancéreuses : la télomérase (Greider and Blackburn, 1985; Morin, 1989). C'est une ribonucléoprotéine formée d'une sous-unité enzymatique, hTERT (*Human Telomerase Reverse Transcriptase*), et d'une longue matrice d'ARN, hTR (*Human Telomerase RNA component*). Cette sous-unité contient une séquence nucléotidique complémentaire à la séquence de l'extrémité 3' du fragment simple-brin (Cohen et al., 2007). La télomérase agit en hybridant son ARN sur les extrémités 3' et néo-synthétisant des séquences complémentaires. L'extrémité 3' ainsi rallongée sert ensuite de matrice pour la synthèse du brin complémentaire par le mécanisme conventionnel (Feng et al., 1995; Nakamura and Cech, 1998) (Figure 11).

A la différence des cellules germinales, l'activité télomérase chez les cellules somatiques est faible. En conséquence, leurs télomères se raccourcissent après chaque division. Après avoir subi plusieurs cycles de raccourcissements, les télomères atteignent une longueur critique au-delà de laquelle la boucle T se retrouve désorganisée. Le fragment d'ADN simple-brin se retrouve déprotégé et exposé aux mécanismes de surveillance de l'intégrité du génome. Ceci entraîne une activation robuste de la signalisation DDR et enclenche le programme de sénescence réplicative. En accord avec ce modèle, il a été montré que l'entrée en sénescence s'accompagne d'une activation et d'une accumulation des protéines de la voie DDR au niveau des télomères (Adda di Fagagna et al., 2003).

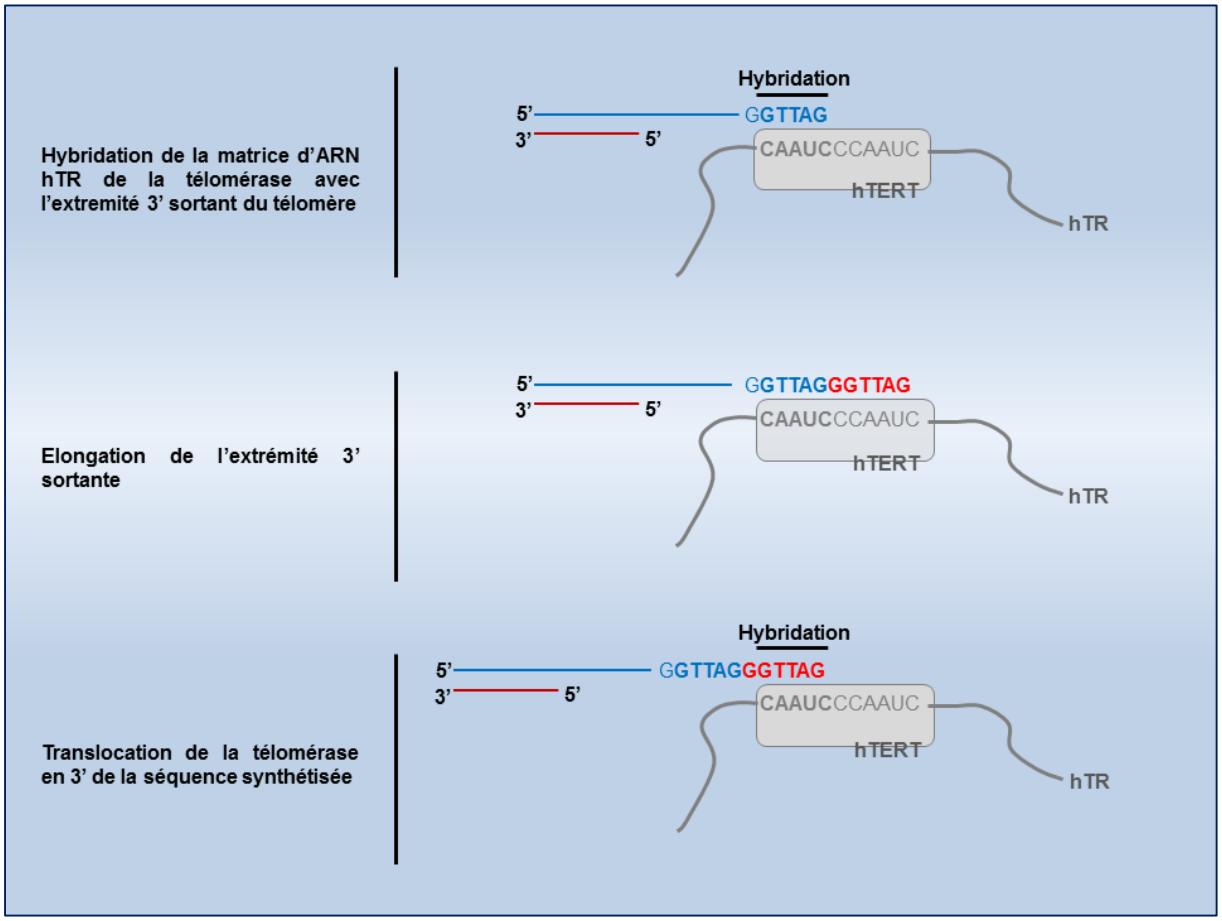


Figure 11 : Représentation schématique de l'allongement d'un télomère par le complexe télomérase (adaptée de Georgin-Lavialle et al, 2010).

L'expression de la sous-unité catalytique de la télomérase dans des fibroblastes primaires rend ces derniers immortels. Ces cellules maintiennent ainsi une longueur de télomères stable et échappent à la sénescence. Néanmoins, ces cellules ne sont pas transformées et ne présentent pas d'aberrations chromosomiques. La surexpression de la télomérase n'a donc pas d'effets oncogéniques et ne suffit pas à transformer les cellules. Elle pourrait cependant participer à la progression tumorale en accordant l'immortalisation aux cellules prétransformées (Bodnar et al., 1998; Morales et al., 1999).

Il est nécessaire de souligner qu'un petit nombre de télomères dysfonctionnels est suffisant pour induire la sénescence. A l'appui de cette idée, il a été montré que l'introduction d'un chromosome présentant un télomère dysfonctionnel chez la levure engendre la sénescence (Abdallah et al., 2009). La taille minimale qu'un télomère peut tolérer tout en maintenant sa fonctionnalité est controversée. En effet, on détecte toujours la présence de répétitions télomériques chez les cellules sénescentes reflétant que ce n'est pas la disparition complète du télomère qui déclenche l'activation de la voie DDR (Karlseder et al., 2002). La désorganisation de la boucle T est probablement causée par un défaut de fixation des protéines du télosome sur l'ADN télomérique. A l'appui de cette idée, l'inactivation expérimentale de la protéine télomérique TRF2 entraine une déstabilisation de la boucle T, une activation de la voie DDR et une induction du phénotype sénescent (Karlseder et al., 2002).

2.2.2 Augmentation du niveau de stress oxydant

Une conséquence majeure de l'utilisation métabolique de l'oxygène chez les organismes aérobies consiste en une production de sous-produits partiellement réduits qui portent le nom d'espèces réactives de l'oxygène (*ROS – Reactive Oxygen Species*) capables d'altérer la plupart des constituants cellulaires. Une protection contre ces ROS est assurée par une variété de systèmes antioxydants. Toutefois, la balance entre production de ROS et dégradation par les systèmes antioxydants est susceptible d'être rompue en faveur d'une augmentation de la concentration intracellulaire en ROS. Les cellules se retrouvent alors dans une situation baptisée stress oxydant (Mailloux et al., 2013).

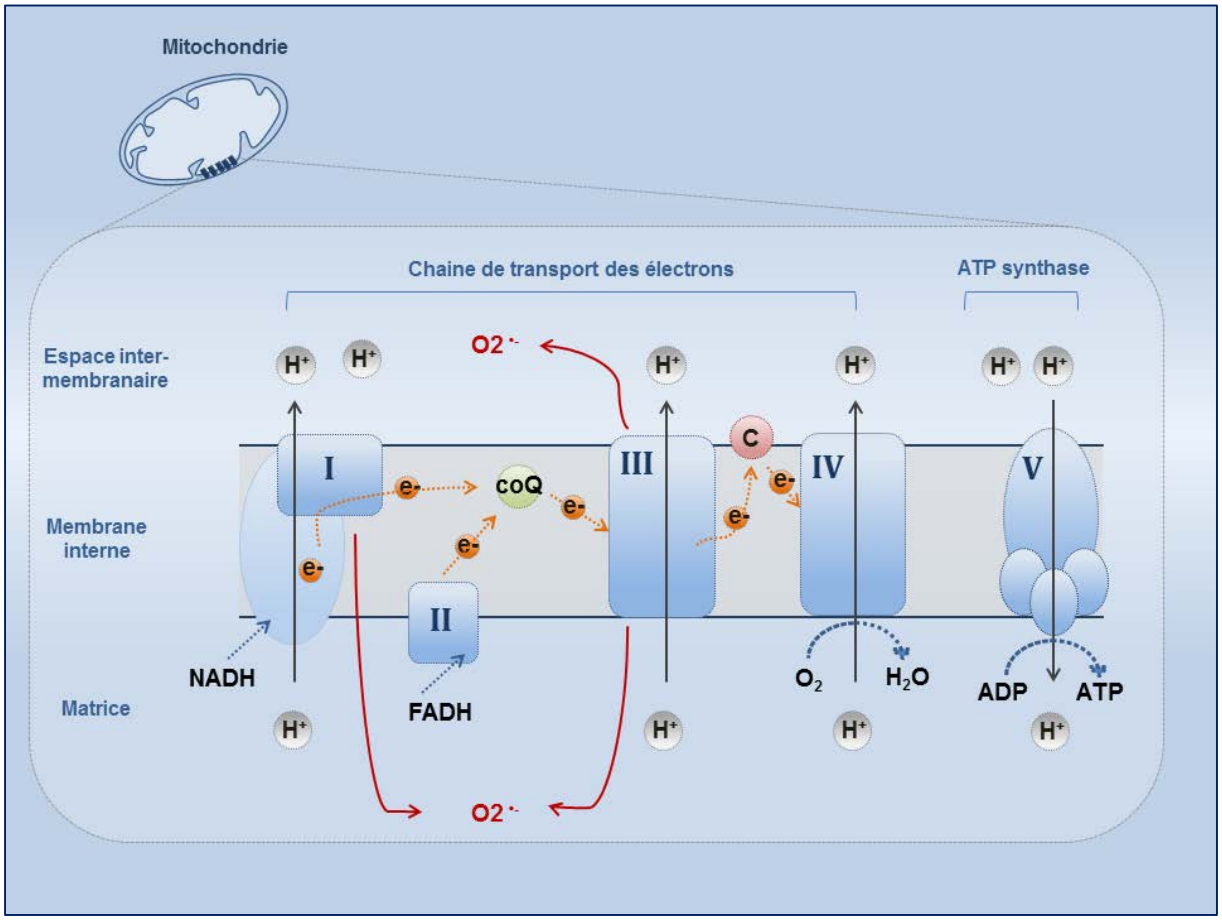


Figure 12 : Représentation schématique mettant en évidence la production de ROS par la chaîne respiratoire mitochondriale (adaptée de Mailloux et al, 2013).

2.2.2.1 Espèces réactives de l'oxygène

Les ROS englobent des entités moléculaires et radicalaires. Un radical libre se définit comme étant une espèce chimique possédant un ou plusieurs électrons célibataires (non appariés) sur sa couche périphérique. Cette particularité lui confère une instabilité et un potentiel de réactivité importants. Afin de se stabiliser, il réagit avec d'autres atomes en leur arrachant des électrons, créant ainsi de nouveaux radicaux libres (Beckman and Ames, 1998; Wallace, 2002).

Depuis la découverte des ROS dans les organismes vivants, des études ont essayé d'en déterminer les sources. Celles-ci comprennent des sites de production endogènes tels que les mitochondries, la membrane plasmique, le réticulum endoplasmique et les peroxysomes (Chen et al., 2003; Lenaz and Genova, 2010) ainsi que des sources exogènes comme les radiations ionisantes, des radiations UV, des infections pathogènes et des agents environnementaux carcinogènes (Klaunig et al., 2010).

Parmi les facteurs endogènes, les mitochondries sont responsables de 90% de la production de ROS. En effet, l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale conduit à la production d'anions superoxyde ($O2^{\bullet -}$) (Balaban et al., 2005; Chen et al., 2003, 2003; Lenaz and Genova, 2010). Les quatre complexes multiprotéiques intégrés dans la membrane mitochondriale interne qui constituent la chaîne respiratoire effectuent un transfert d'électrons jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène, qui est réduit complètement en H_2O (complexe IV). Ce flux d'électrons génère un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale qui rend active l'ATP synthase (complexe V). Une proportion non négligeable d'oxygène (2 à 5 %) échappe à la réduction complète en H_2O et subit une mono-réduction au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire. Ceci aboutit à la génération d'$O2^{\bullet -}$ et à son accumulation au niveau de la matrice et de l'espace inter-membranaire mitochondrial (Figure 12) (Chen et al., 2003; Kushnareva et al., 2002).

L'anion superoxyde est peu réactif mais très instable. Il peut subir une réaction de dismutation, spontanément ou via des superoxyde dismutases, pour générer du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Bienert et al., 2006). La production de H_2O_2 est estimée équivalente à 2% du total de l'oxygène consommé par les mitochondries. Le H_2O_2 ne possède pas d'électrons non appariés et ne présente donc pas les propriétés des radicaux libres. Il est plus stable que l'anion superoxyde et sa surproduction est néfaste pour les cellules. Son

potentiel toxique repose sur le fait qu'il est capable de diffuser partout dans la cellule et de donner naissance, via des réactions de type «Fenton », à la plus délétère des ROS, le radical hydroxyle $^{\bullet}OH$ (Valko et al., 2007).

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + Fe^{3+}$$

$$H_2O_2 + Cu^{2+} \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + Cu^{3+}$$

Le radical hydroxyle $^{\bullet}OH$ est très réactif et très toxique. Il réagit d'une manière non spécifique avec différentes biomolécules localisées moins de quelques nanomètres de son site de production. A la différence du $O2^{\bullet-}$ et du H_2O_2, il n'existe pas d'enzymes capables de l'éliminer (Valko et al., 2007).

2.2.2.2 Défenses contre le stress oxydant

Afin de maintenir un niveau non cytotoxique de ROS et d'éviter une situation de stress oxydant chronique, les cellules ont recours à différents systèmes antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques. Les systèmes non enzymatiques comprennent les vitamines C (acide ascorbique) et E (tocophérol), les caroténoïdes, les polyphénols, l'acide urique et l'anthocyanoside. La plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et sont importés par l'alimentation. Cependant, un antioxydant important produit par la plupart des organismes vivants est le glutathion (GSH). Il contrôle le niveau de stress oxydant en agissant à la fois comme piègeur de ROS et comme cofacteur nécessaire pour l'activité des enzymes antioxydantes. Les antioxydants enzymatiques, quant à eux, comprennent les superoxyde dismutases (SOD), la catalase et les glutathion peroxydases (GPx). Ils sont considérés comme la première ligne de défense des cellules contre les ROS (Balaban et al., 2005; Nordberg and Arnér, 2001; Valko et al., 2007).

Une fois généré, l'anion superoxyde est éliminé par une première réaction chimique faisant intervenir l'enzyme SOD. Il existe chez l'homme deux SOD qui se distinguent par leur localisation intracellulaire ainsi que par le cofacteur métallique qu'elles utilisent : la Cu/Zn-SOD (SOD1), présente dans le cytosol est associée aux ions cuivre et zinc et la MnSOD (SOD2) présente dans les mitochondries est associée au manganèse.

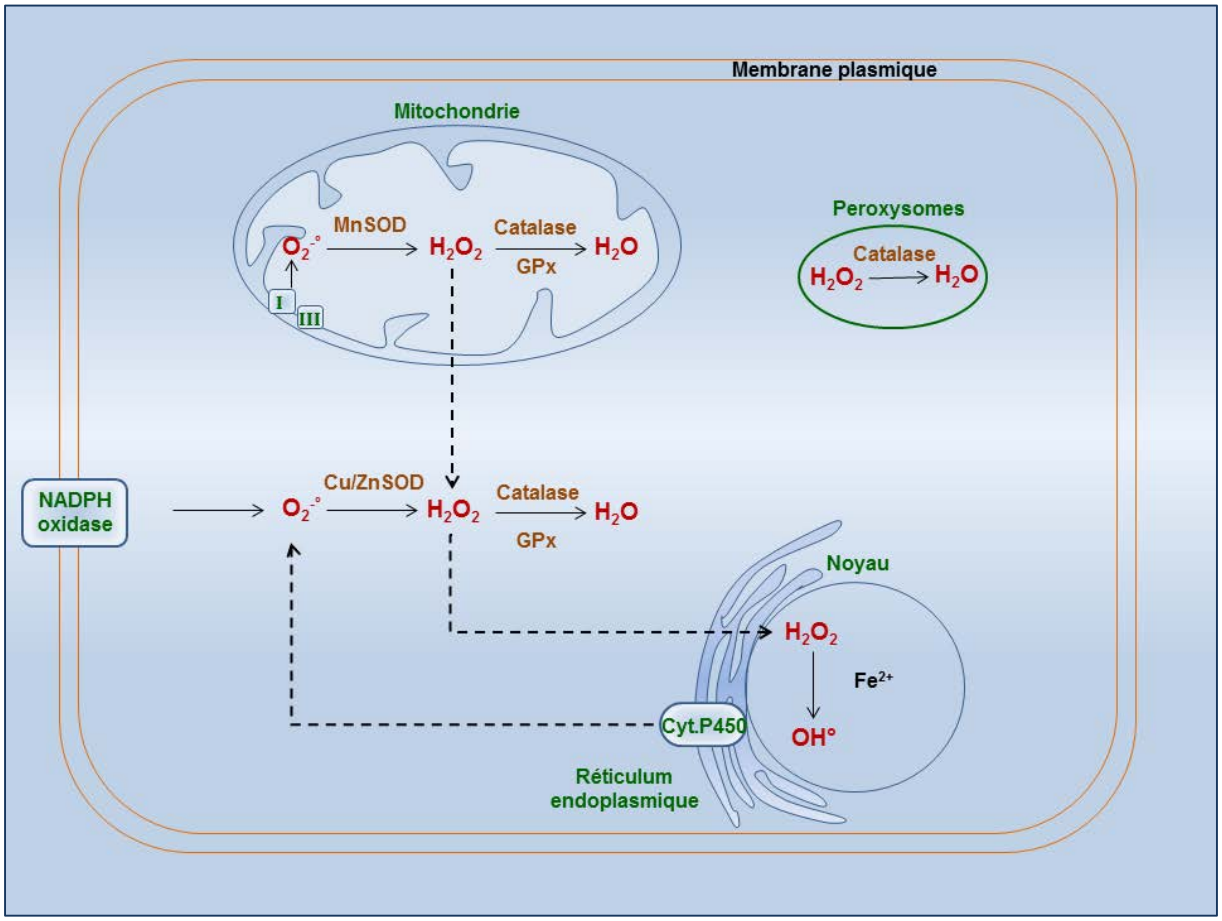


Figure 13: Schéma simplifié récapitulant les principaux sites de production et de dégradation des ROS endogènes.

Elles catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en H_2O_2 (Figure 13) (Djordjević, 2004; Fridovich, 1998).

$$2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Le peroxyde d'hydrogène subit à son tour une autre réaction aboutissant à sa réduction en eau. Cette réaction est catalysée par une dismutase qui porte le nom de catalase. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle adopte une structure tétramérique où chaque sous-unité présente une molécule d'hème et une molécule de NADPH. A l'échelle cellulaire, elle se trouve localisée particulièrement au niveau des sites de production de H_2O_2, notamment les peroxysomes et les mitochondries (Figure 13).

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Le taux de H_2O_2 est également régulé par les GPx. Ces enzymes sont abondantes dans le cytosol et les mitochondries et interviennent dans la réduction du H_2O_2 en eau. Les GPx ont une affinité générale pour le H_2O_2 et utilisent le glutathion comme cofacteur. Elles interviennent en oxydant deux molécules de GSH en glutathion disulfite (GSSG) et réduisant le H_2O_2 en molécule d'eau (Figure 13) (Arthur, 2000; Espinoza et al., 2008; Vertuani et al., 2004)

$$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + H_2O$$

2.2.2.3 Dommages oxydants à l'ADN

Les ROS ont le potentiel d'oxyder différentes macromolécules de la cellule notamment la molécule d'ADN. Le radical hydroxyle représente l'espèce radicalaire qui réagit le plus avec l'ADN (Pogozelski and Tullius, 1998; Winterbourn, 1995). L'attaque oxydante s'établit à la fois au niveau des bases et des désoxyriboses, engendrant une grande variété de lésions telles que des sites abasiques, des bases oxydées, des cassures simple-brin (SSBs) et, indirectement, des adduits et des pontages protéines-ADN (Cooke et al., 2003). On estime avoir jusqu'à 10^4 lésions par cellule et par jour (Figure 14) (De Bont and van Larebeke, 2004; Nakamura and Swenberg, 1999).

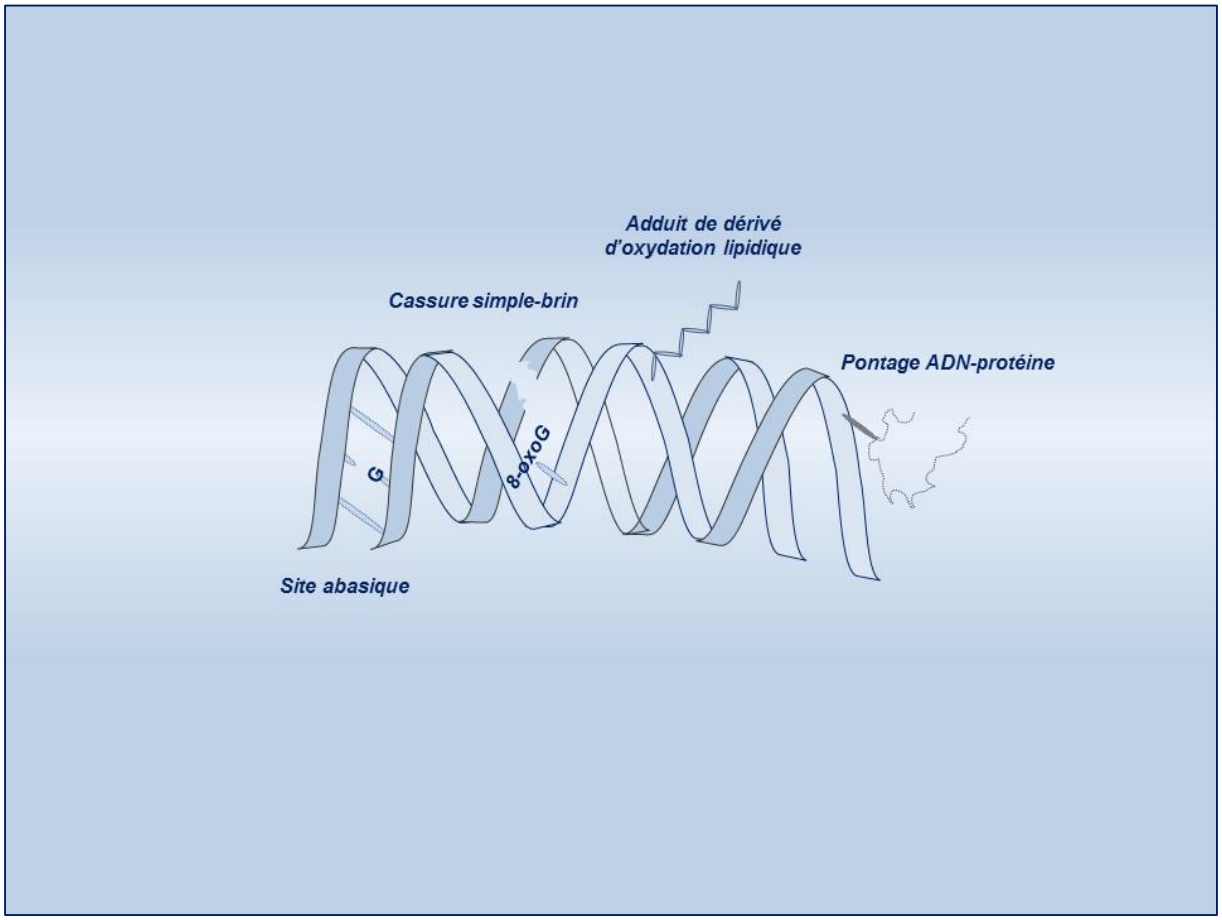


Figure 14 : Schéma simplifié récapitulant les différents types de dommages à l'ADN formés par l'attaque radicalaire.

Le dommage oxydant le plus fréquent correspond aux bases oxydées. Plus de 20 types d'oxydation de bases ont été identifiées. La mieux caractérisée concerne la dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG). La modification de la guanine est initiée par la liaison d'un radical hydroxyle sur le carbone en position 8 de la structure cyclique de la guanine et la formation d'un adduit radicalaire C8-OH. Celui-ci subit ensuite une oxydation pour générer la 8-oxoG (Jiranusornkul and Laughton, 2008; Spassky and Angelov, 1997). Le taux de 8-oxoG détecté au sein de plusieurs systèmes biologiques est utilisé comme un marqueur du niveau de stress oxydant (Altieri et al., 2008). Il est intéressant de noter que les modifications de bases induites par le stress oxydant ne sont pas létales pour la cellule. Néanmoins, elles présentent un potentiel mutagène très puissant. En effet, la 8-oxoG est capable de s'apparier à une cytosine comme à une adénine lors de la réplication. Ceci engendre des transversions G : C en T : A au cours de la réplication (Cheng et al., 1992).

L'oxydation de la molécule d'ADN contribue également à la rupture des liaisons N-glycosidiques établies entre le carbone en position 1 des désoxyriboses et les bases. Le désoxyribose ayant perdu la base se retrouve avec un site qualifié de abasique ou AP (apurinique/apyrimidinique) (Pogozelski and Tullius, 1998). Comme pour les bases oxydées, la présence de sites AP dans le génome n'est pas cytotoxique. Ils exercent cependant des effets clastogéniques en créant des SSBs. De plus, ils ont des effets mutagènes. En effet, les ADN polymérases vont insérer arbitrairement une adénine en face du site AP de telle sorte que le site AP sera substitué par une thymine lors de la réplication suivante (Eoff et al., 2010; Obeid et al., 2010).

L'interaction des radicaux hydroxyles avec la molécule d'ADN aboutit également à la génération de nombreuses SSBs (Dianov and Parsons, 2007). Le mécanisme à l'origine consiste en une élimination d'un atome d'hydrogène du carbone en position 3, 4 ou 5 du désoxyribose. Ceci entraine la formation d'un radical ADN (DNA°) qui, en présence d'oxygène, génère des produits secondaires, les radicaux peroxyles (DNAOO°). Ces réactions ne sont pas réversibles. Une fois formé, le radicale peroxyle arrache un atome d'hydrogène d'un carbone en C4 d'un sucre voisin. Cette étape d'auto-oxydation provoque la scission de la liaison phosphodiester liant deux nucléotides et la création en conséquence d'une SSB (Dedon, 2008). La progression de l'auto-oxydation de l'ADN est interrompue par l'intervention des antioxydants comme la vitamine E qui fournissent des atomes d'hydrogène aux radicaux peroxyles en générant des hydroperoxydes (DNAOOH) (Lim et al., 2004).

Face à un niveau de stress oxydant chronique, les différents types de dommages énumérés ci-dessus sont susceptibles de se positionner à proximité l'un de l'autre. L'induction de deux ou plusieurs lésions localisées à un intervalle de moins de 10 paires de bases crée des clusters de dommage appelés « OCDL » (*Oxidative Clustered DNA Lesion*) (Bennett et al., 2004; Hada and Georgakilas, 2008; Sutherland et al., 2000). A la différence des lésions simples, les dommages complexes sont réparés moins efficacement et persistent (Nowsheen et al., 2009 ; Eccles et al., 2011).

2.2.2.4 Rôle du stress oxydant dans l'induction de la sénescence

Le potentiel réplicatif des cellules *in vitro* est sous l'influence de la teneur en oxygène de l'environnement dans lequel elles sont cultivées. Des expériences menées par le groupe de Packer ont montré que la culture de fibroblastes humains à 10% d'O_2 entraine une augmentation de 20 à 30% du nombre de doublements par rapport à celles qui ont été placées à 20% d'O_2. Inversement, une culture à 50% d'O_2 réduit le nombre de divisions subies par les cellules avant d'atteindre la sénescence (Packer and Fuehr, 1977).

Des études réalisées sur des mitochondries isolées ont permis de montrer que le taux de libération de ROS par le processus respiratoire mitochondrial dépend de la teneur en oxygène ambiant (Balaban et al., 2005). Il a donc été déduit que ce ne sont pas les effets directs de l'oxygène, mais plutôt les ROS qui moduleraient l'entrée en sénescence (Lu and Finkel, 2008; Moiseeva et al., 2009). En effet, un traitement pro-oxydant tel que le H_2O_2 est suffisant pour induire la sénescence chez différents types de cellules primaires (Chen and Ames, 1994; Chen et al., 1995). Inversement, des traitements antioxydants repoussent la survenue du plateau de sénescence (Bodnar et al., 1998; Chen et al., 1995; Serra et al., 2003; Yuan et al., 1995).

De nombreuses études ont tenté ensuite de déchiffrer les mécanismes associant le stress oxydant et l'acquisition du phénotype sénescent. Une de ces voies implique le raccourcissement télomérique. Assurément, des cellules cultivées en hyperoxie (40% d'O_2) subissent un niveau de raccourcissement télomérique 5 fois plus important que celles placées en normoxie (5% d'O_2) (Zglinicki et al., 1995). Ceci a été expliqué par l'accumulation de dommages oxydants au niveau de l'ADN télomèrique et par une réduction de la fixation des deux protéines du télosome TRF1 et TRF2. En conséquence, la

boucle T se déstabilise et l'ADN télomérique se retrouve exposé à l'action des nucléases (Opresko et al., 2005; Vallabhaneni et al., 2013; Zglinicki et al., 2000).

Cependant, le raccourcissement des télomères ne semble pas être primordial pour l'induction de la sénescence en réponse au stress oxydant. A l'appui de cette idée, la survenue du plateau de sénescence chez les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs – *Mouse Embryonic Fibroblasts*) engage une augmentation du niveau de stress oxydant sans raccourcissement télomérique apparent (Busuttil et al., 2003; Parrinello et al., 2003).

Les dommages oxydants à l'ADN s'avèrent y être impliqués. En effet, un accroissement du taux en bases oxydées a été observé à la sénescence chez les MEFs (Parrinello et al., 2003). De plus, l'établissement de la sénescence des NHEKs s'accompagne d'une accumulation de 8-oxoG et de SSBs (Gosselin et al., 2009b). L'augmentation des dommages oxydants à l'ADN découlerait de l'augmentation du taux de ROS et de la diminution de l'efficacité des mécanismes de réparation (Kang et al., 2005).

Bien qu'il n'y ait pas de doute sur le rôle fondamental du stress oxydant dans la survenue de la sénescence, les voies moléculaires associées ne sont pas complètement identifiées. Dans ce cadre, il existe des données quant au rôle clé de la voie p38-MAPK dans l'induction de la sénescence en réponse au stress oxydant. Une première voie implique l'activation de $p16^{INK4a}$. En effet, un traitement H_2O_2 provoque une activation de p38-MAPK (Volonté et al., 2001, Wang et al. 2002) et une augmentation de l'ARN messager de $p16^{INK4a}$ (Wang et al., 2002; Naka et al., 2004). L'augmentation de $p16^{INK4a}$ via p38-MAPK met en jeu les facteurs de transcription ATF3, ETS1 et ETS2. Une deuxième voie consiste en une accumulation de la lamine B1 en réponse à un stress oxydant provoquant une altération de l'architecture nucléaire et une induction du programme de sénescence (Barascu et al., 2012). Enfin, l'induction de la voie p38-MAPK participe également à l'activation du facteur TGFβ (*Tumor Growth Factor β*) capital pour l'induction du phénotype sénescent (Frippiat et al., 2002).

2.2.3 Activation aberrante de la voie de signalisation oncogénique

Les travaux menés par Emmanuel Serrano ont montré que la surexpression d'une version mutée de l'oncogène HRAS ($HRAS^{V12}$) dans des fibroblastes primaires induisait des changements remarquables de leur comportement *in vitro* (Serrano et al., 1997). Les cellules subissent une première phase de prolifération accélérée suivie d'un arrêt irréversible de prolifération associé à des changements de phénotype et une apparition de marqueurs de sénescence. Ils nommèrent cette réponse cellulaire OIS pour *Oncogene Induced Senescence*. Une capacité à induire la sénescence a été ensuite attribuée à plusieurs autres oncogènes de la voie RAS tels que RAF et MEK (Bartkova et al., 2006; Campaner et al., 2010; Lin et al., 1998; Michaloglou et al., 2005; Xu et al., 2008). L'invalidation des gènes suppresseurs de tumeurs comme par exemple PTEN est également capable d'induire les cellules en état de sénescence (Chen et al., 2005b).

Les voies de signalisation engagées dans l'induction de l'OIS sont diversifiées et complexes. Le raccourcissement des télomères ne semble pas y intervenir. En effet, la surexpression de la télomérase n'empêche pas l'entrée en sénescence induite par le surexpression de HRAS (Wei et al., 1999). Il existe en revanche des données quant à un rôle moteur du stress oxydant. Il a été constaté que la survenue de l'OIS est associée à une augmentation du niveau de stress oxydant (Lee et al., 1999). La réduction des taux de ROS chez les MEFs empêche l'OIS (Lee et al., 1999). La source majeure de ROS lors d'une OIS semble impliquer les NADPH oxydases membranaires NOX 1 et 4 (Kodama et al., 2013). Un dysfonctionnement et une perte du potentiel membranaire mitochondrial conduisant à une surproduction de ROS lors d'une OIS ont été également mis en évidence (Moiseeva et al., 2009).

Un autre mécanisme impliqué dans l'OIS consiste en une augmentation excessive de la réplication et une altération de la progression des fourches de réplication. L'arrêt des fourches de réplication entraine une activation de la voie DDR nécessaire à l'arrêt dans le cycle (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006). Une autre voie met en jeu la formation des SAHFs. En effet, une inhibition de la protéine HMGA, un composé essentiel des SAHFs, empêche la survenue de l'OIS (Zhang et al., 2007).

La relevance physiologique de l'OIS a été sujette à discussion due à la présence d'une expression non physiologique d'oncogènes dans les cellules. Cependant, quelques

études ont démontré l'existence de l'OIS *in vivo*. Les travaux du groupe de Manuel Serrano ont montré que l'expression conditionnelle de KRAS provoque l'émergence de tumeurs bénignes (adénocarcinome pulmonaire et néoplasie du pancréas) (Collado et al., 2005). D'une manière intéressante, des marqueurs de cellules sénescentes ont été détectés au sein de ces tissus bénins mais pas au niveau des stades tumoraux avancés. Des cellules sénescentes ont été également observées dans des lésions bénignes de peau (*naevi*) avec des mutations des oncogènes BRAF (Michaloglou et al., 2005). De même, il a été montré que la perte de PTEN dans des modèles de souris induisait une accumulation de cellules sénescentes dans les tissus néoplasiques de prostate (Chen et al., 2005b).

2.3 Acteurs clés de l'initiation et du maintien de la sénescence

Deux voies moléculaires concourent à l'induction de l'arrêt dans le cycle associé à la sénescence. Il s'agit des voies p53 - $p21^{WAF1}$ et de $p16^{INK4a}$ - Rb. Elles agissent soit en parallèle soit d'une manière interconnectée autorisant l'initiation et/ou le maintien de l'arrêt dans le cycle. L'implication de l'une ou l'autre des deux voies dépend principalement des mécanismes effecteurs de la sénescence.

2.3.1 Stress oxydant / stress oncogénique et régulation de $p16^{INK4a}$

La protéine $p16^{INK4a}$ est un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines Cdk4 et Cdk6. Elle intervient dans la régulation de la transition G1-S du cycle cellulaire en empêchant l'organisation en complexes des cyclines D et Cdk4 et 6 (Serrano et al., 1993). La protéine Rb se retrouve ainsi sous une forme hypophosphorylée active. Elle se lie au facteur de transcription E2F1, le séquestre dans le cytoplasme et réduit la transcription de ses gènes cibles.

Bien que des modifications post-traductionnelles de $p16^{INK4a}$ aient été mises en évidence, la régulation de son expression s'effectue principalement à l'échelle transcriptionnelle (Hara et al., 1996; Li et al., 1994). Chez l'homme, le locus INK4a-ARF est localisé sur le chromosome 9p21 et constitué de deux gènes *INK4a* et *ARF*. Ces derniers

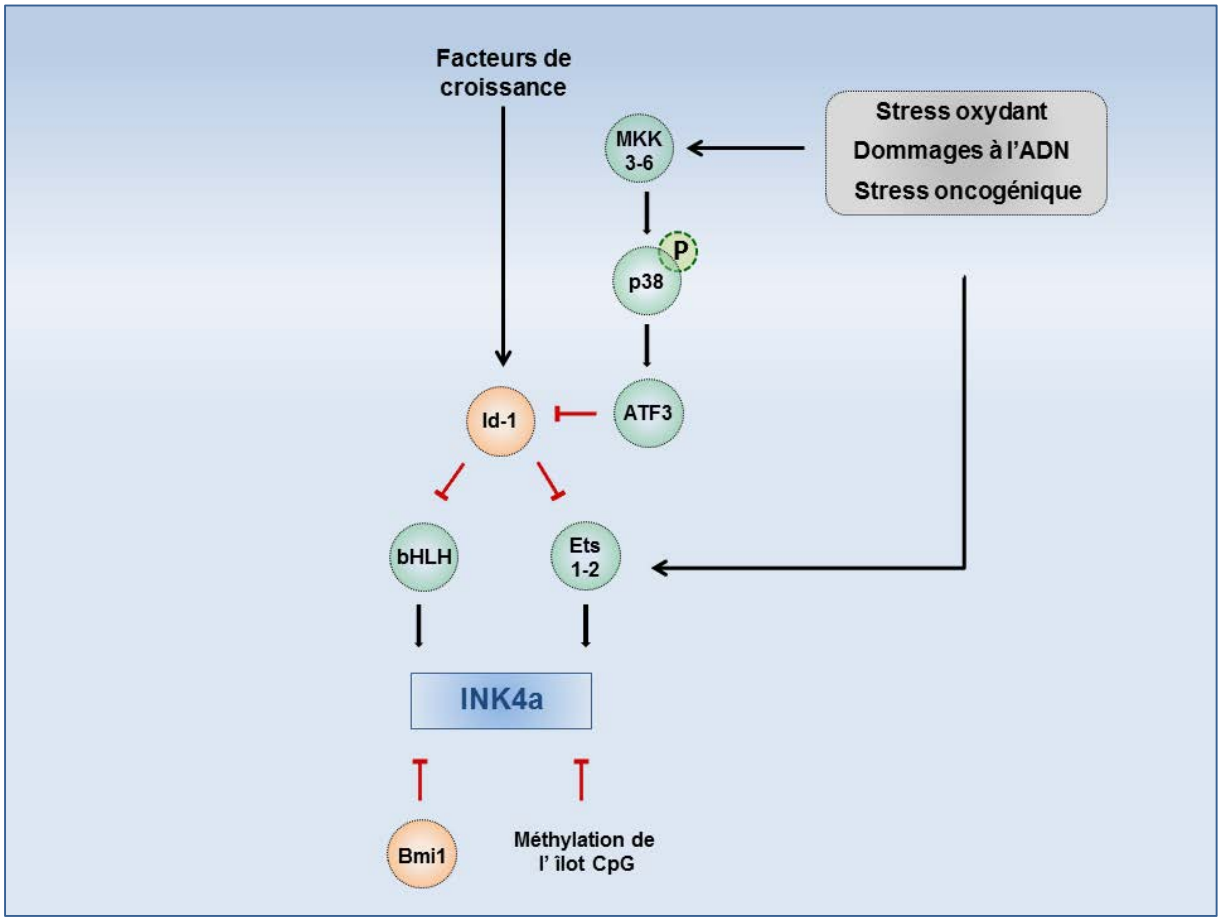


Figure 15 : Schéma simplifié récapitulant les différentes voies de régulation du gène *INK4a* à la sénescence.

codent respectivement les deux protéines $p16^{INK4a}$ et $p14^{ARF}$ de structures et de fonctions différentes (Sharpless and DePinho, 1999). L'étude de promoteur du gène *INK4a* a révélé la présence de sites consensus pour la fixation de facteurs de transcription, notamment Ets1, Ets2 et SP1.

Un ilot CpG englobant plusieurs sites consensus a été également identifié au niveau du promoteur et de l'exon 1 de *INK4a*. Il est important de noter que la méthylation du promoteur contribue à une extinction épigénétique de $p16^{INK4a}$ associée à de nombreux types de cancers (Merlo et al., 1995).

Les protéines Ets1 et 2 activent la transcription de $p16^{INK4a}$ en se fixant sur leurs sites consensus Ets (Ohtani et al., 2001). La liaison des deux protéines Ets1 et 2 à l'ADN est modulée par la voie de signalisation Ras/Raf/MEK. De fait, une sur-activation des oncogènes Ras ou Raf provoque une surexpression des facteurs Ets, une augmentation de l'activité transcriptionelle de $p16^{INK4a}$ et en conséquence un arrêt de la progression du cycle cellulaire en phase G1 (Figure 15).

Les facteurs de transcription à motif hélice-boucle-hélice basique (bHLH) interviennent également dans l'induction de l'expression de $p16^{INK4a}$. Ils sont constitués d'un domaine riche en acides aminés basiques permettant la liaison à l'ADN et d'un domaine HLH de dimérisation protéique. Il existe deux classes de protéines bHLH A et B. A la sénescence, le facteur E47, membre de la famille des bHLH-A, se dimérise et se fixe sur une séquence spécifique du promoteur de *INK4a* appelée boite E et composée des séquences CANNTG (Figure 15) (Ellenberger et al., 1994; Ma et al., 1994; Zheng et al., 2004).

L'activité des facteurs de transcription Ets2 et bHLH est régulée par une famille de protéines HLH-Id (Figure 15). Contrairement aux bHLH, les protéines HLH-Id ne présentent pas de domaines d'interaction avec l'ADN. Elles sont cependant capables d'interagir et de former des hétérodimères avec les protéines Ets2 et bHLH, de réduire leur fixation à l'ADN et d'inhiber la transcription du gène *INK4a*. C'est grâce à cette activité qu'elles portent le nom de facteurs Id (*Inhibitor of DNA binding*). Les travaux réalisés à ce sujet ont mis en évidence un rôle capital de la protéine Id-1 pour la transition G1-S (Hara et al., 1994). Des corrélations inverses d'expression de $p16^{INK4a}$ et de Id-1 ont été mises en exergue (Ohtani et al., 2001; Zheng et al., 2004). En effet, l'entrée en état de sénescence des fibroblastes humains est associée à une diminution du facteur Id-1 et à une

augmentation de $p16^{INK4a}$. De plus, des fibroblastes embryonnaires de souris Id-1 $^{+/+}$ présentent des faibles niveaux de $p16^{INK4a}$. En revanche, ceux issus de souris Id-1 $^{-/-}$ l'expriment fortement (Alani et al., 2001).

La protéine p38-MAPK intervient également dans l'induction de $p16^{INK4a}$. C'est une kinase qui appartient à la famille des MAPKs. En réponse à de nombreuses situations de stress telles qu'une sur-production de ROS, une sur-activation oncogénique et une induction de dommages à l'ADN, p38-MAPK se retrouve phosphorylée et activée par les MAPK Kinases 3 et 6 (Wang et al., 2002). Des données expérimentales suggèrent qu'une telle activation est cruciale pour l'induction de $p16^{INK4a}$ et du phénotype sénescent (Naka et al., 2004). En effet, p38-MAPK induit l'expression du facteur de transcription ATF3. Ce dernier intervient en inhibant l'expression de Id-1 et stimulant par conséquent l'activité transcriptionelle de $p16^{INK4a}$ (Figure 15) (Hai et al., 1999; Ohtani et al., 2001).

Le répresseur transcriptionnel Bmi1 intervient lui aussi dans la régulation de la transcription de *INK4a*. C'est un facteur qui appartient au groupe polycomb (PcG) et régule négativement l'expression du gène *INK4a* en se liant à une région de son promoteur (Jacobs et al., 1999). Des données expérimentales montrent que l'augmentation de l'expression de $p16^{INK4a}$ à la sénescence des fibroblastes humains est accompagnée d'une diminution de l'expression de Bmi1 (Itahana et al., 2003). Des fibroblastes embryonnaires de souris invalidés pour Bmi1 subissent en culture une sénescence prématurée associée à une surexpression de $p16^{INK4a}$ (Figure 15) (Jacobs et al., 1999).

2.3.2 Signalisation DDR et régulation de p53

Le suppresseur de tumeur p53, appelé gardien du génome, régule l'expression d'un large spectre de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose et la sénescence (Beckerman and Prives, 2010). Des pertes de fonctionnalité de p53, liées à une inactivation de la protéine ou à une mutation affectant le gène *TP53,* ont été associées à de nombreux types de cancers (Petitjean et al., 2007). Des souris déficientes en p53 sont susceptibles de développer des tumeurs spontanées (Donehower, 2009; Donehower et al., 1992). De plus, des patients atteints du syndrome de Li Fraumeni (LFS) portant des mutations de *TP53* sont prédisposés à une survenue précoce de divers types de cancers (Malkin et al., 1990; Srivastava et al., 1990).

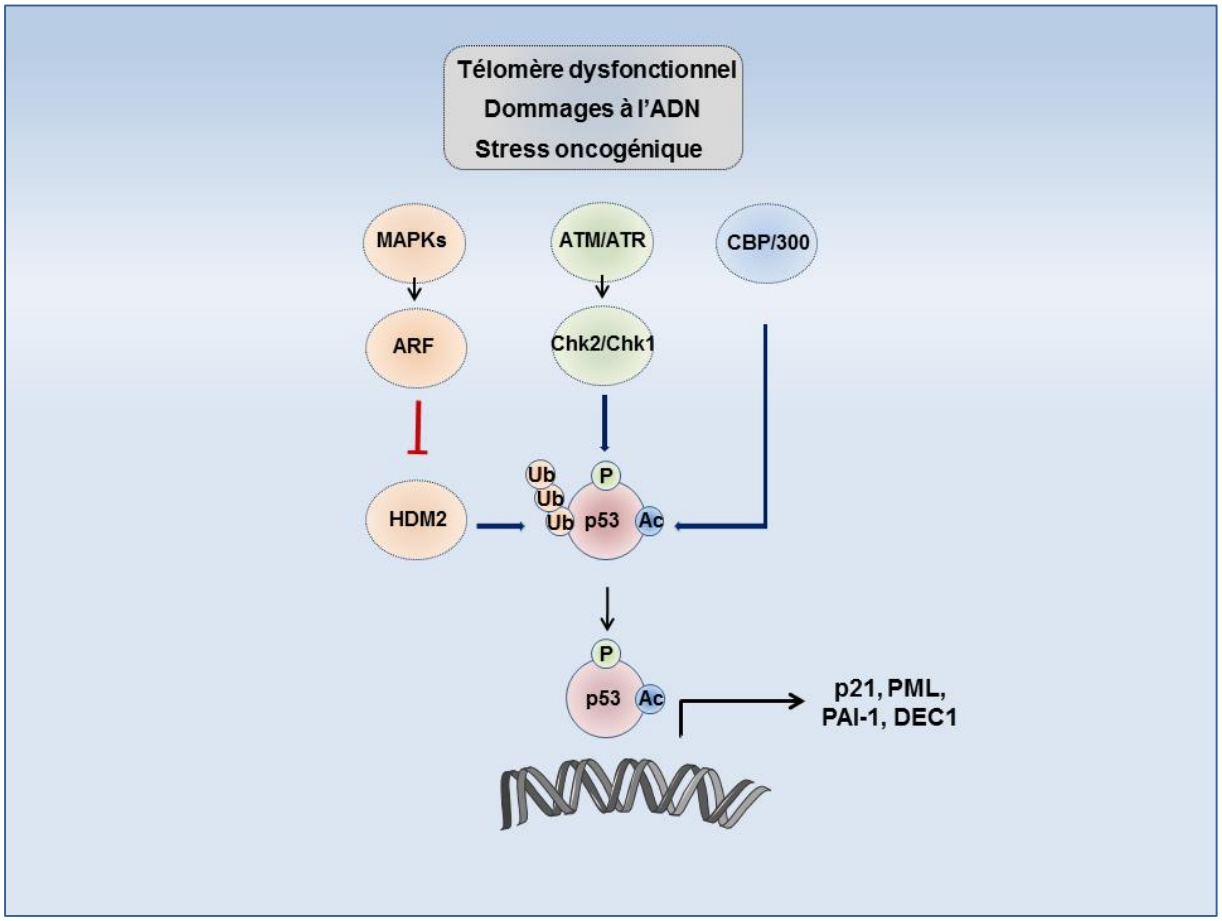


Figure 16 : Schéma simplifié récapitulant les différentes voies de régulation de p53 à la sénescence.

La protéine p53 est soumise à un large spectre de modifications post-traductionnelles, notamment des phosphorylations, des acétylations et des ubiquitinations. En conditions normales, p53 est faiblement exprimé et possède une demi-vie relativement courte car constamment ubiquitiné par l'E3 ubiquitine ligase HDM2 (MDM2 chez la souris) ce qui promeut la dégradation de p53 par le protéasome (Kubbutat et al., 1997).

L'induction de p53 à la sénescence est principalement une conséquence de l'activation de la voie DDR, elle-même activée par la présence de télomères dysfonctionnels, de DSBs non télomériques ou par un stress réplicatif. p53 est rapidement phosphorylée par les kinases ATM et Chk2 sur les sérines 15 et 20 respectivement. p53 se retrouve ainsi dissociée de HDM2 et protégée contre la dégradation par le protéasome (Figure 16). p53 ainsi stabilisé induit l'expression de la protéine $p21^{WAF1}$ qui elle-même inhibe la formation des complexes cycline E/Cdk2 (Dulić et al., 1993; Herbig et al., 2003).

La protéine p53 est également sujette à des modifications par acétylation par le complexe CBP/P300. Ces modifications ont lieu sur les mêmes sites que l'ubiquitination. Ceci favorise la stabilité de p53, sa liaison à l'ADN et l'induction de ses gènes cibles $p21^{WAF1}$ et PML (Figure 16) (Tang et al., 2008).

L'augmentation de la stabilité de p53 à la sénescence s'effectue également via l'intervention de la protéine $p14^{ARF}$ (ARF, *Alternative Reading Frame*, l'équivalent de $p19^{ARF}$ chez la souris). Celle-ci est codée par le même locus INKa/Arf que $p16^{INK4a}$, mais sa traduction ne respecte pas le même cadre de lecture. $p14^{ARF}$ agit en inhibant l'activité E3 ubiquitine ligase de HDM2 favorisant sa séquestration et dégradation dans le cytoplasme (Figure 16) (Pomerantz et al., 1998; Tao and Levine, 1999).

2.3.3 L'intervention des voies p53-$p21^{WAF1}$ et $p16^{INK4a}$-Rb dans la sénescence

L'induction de la voie p53-$p21^{WAF1}$ suite à l'activation de la voie DDR est primordiale pour la survenue de la sénescence réplicative. En effet, la surexpression de *hTERT*, qui abolit le raccourcissement télomérique et l'activation de la voie DDR, s'avère être suffisante pour diminuer l'activation de la voie p53-$p21^{WAF1}$ et retarder la survenue de

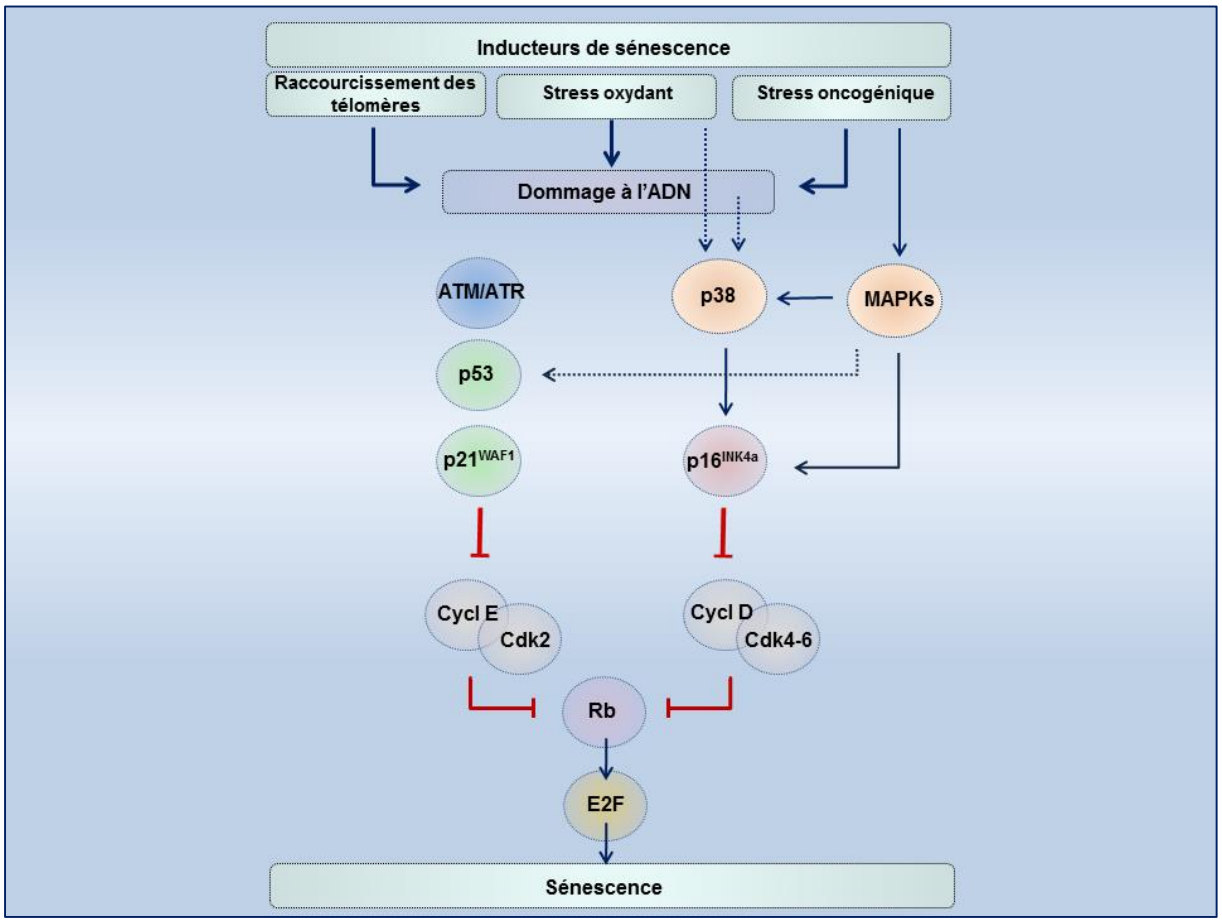


Figure 17 : Schéma simplifié récapitulant les différentes voies de signalisation associées à la sénescence.

la sénescence (Herbig et al., 2003; Wei et al., 2001). Des données expérimentales montrent que p53-p21^{WAF1} et Rb interviennent selon un modèle linéaire (Figure 17). Ceci a été observé chez les fibroblastes embryonnaires de souris où la seule inhibition de p53 empêche l'entrée en sénescence et immortalise les cellules (Dirac and Bernards, 2003).

De plus, l'inactivation de p53 chez les cellules sénescentes promeut la reprise du cycle cellulaire (Sage et al., 2003). Toutefois, ce modèle ne semble pas être fonctionnel chez les cellules humaines (Smogorzewska and de Lange, 2002).

L'inactivation de Rb peut ne dépendre que de l'intervention de p16^{INK4a} (Figure 17) (Sherr and Roberts, 1999). Les taux de p16^{INK4a} augmentent à la sénescence réplicative selon une cinétique plus tardive de celle de p21^{WAF1} (Alcorta et al., 1996; Hara et al., 1996; Stein et al., 1999). L'implication de p16^{INK4a} dans l'établissement de la sénescence réplicative est controversée. D'une part, l'expression de p16^{INK4a} est très hétérogène dans la population de cellules sénescentes, et d'autre part, les cellules sénescentes possédant des télomères dysfonctionnels ne présentent pas des niveaux importants de p16^{INK4a} (Beauséjour et al., 2003; Herbig et al., 2004; Itahana et al., 2003). L'augmentation de p16^{INK4a} à la sénescence serait donc indépendante du raccourcissement télomérique. A l'appui de cette idée, une surexpression de *hTERT* ne réduit pas les niveaux de p16^{INK4a} (Forsyth et al., 2003). En revanche, l'intervention de p16^{INK4a} est capitale pour la sénescence induite par le stress oxydant et oncogénique. Par exemple, des fibroblastes humains avec un défaut de p16^{INK4a} résistent et échappent à la sénescence induite par H-Ras (Drayton et al., 2003) (Figure 17).

L'activation de p16^{INK4a} est cruciale pour l'induction de la sénescence chez plusieurs types de cellules épithéliales, notamment les kératinocytes de peau, les cellules épithéliales mammaires et prostatiques (Alani et al., 1999; Foster et al., 1998; Jarrard et al., 1999; Kiyono et al., 1998; Tang et al., 2002). En effet, la seule expression de *hTERT* ne suffit pas pour empêcher l'entrée en sénescence et immortaliser les cellules épithéliales. Ceci nécessite en plus une invalidation de p16^{INK4a} (Kiyono et al., 1998).

Chapitre 3: Liens entre sénescence et tumorigenèse

Des études épidémiologiques ont mis en évidence des corrélations positives reliant cancer et vieillissement. En effet, chez l'homme, l'incidence de la survenue des cancers augmente exponentiellement après l'âge de la maturité sexuelle, et plus particulièrement dans les dernières décennies. Toutefois, la nature exacte des liens associant cancérogenèse et vieillissement n'est toujours pas établie. Il semblerait que l'accumulation séquentielle de mutations soit à l'origine de la malignité. En outre, l'augmentation du nombre de cellules sénescentes dans les tissus avec l'âge pourrait influer ou modifier les mécanismes d'initiation tumorale, soit en conséquence des propriétés intrinsèques des cellules tumorales, notamment leur arrêt dans le cycle cellulaire et leurs dommages à l'ADN, soit en conséquence des effets du SASP.

3.1 La sénescence est un mécanisme anti-tumoral

Il est fortement admis que la sénescence est une réponse cellulaire à effet suppresseur de tumeur empêchant les cellules à risque de se multiplier et de développer une tumeur. Cette notion dérive essentiellement des données montrant que la sénescence s'établit en réponse à un endommagement de l'ADN et que l'arrêt dans le cycle cellulaire qui est induit est irréversible. De plus, le fait qu'une surexpression oncogénique aberrante soit inductrice de sénescence renforce considérablement cette notion de mécanisme de défense anti-tumoral. *In vivo*, des cellules sénescentes ont été mises en évidence dans des lésions pré-malignes de poumon, du sein et du pancréas dans des modèles de souris en association avec des mutations affectant les oncogènes Ras ou Braf (Braig et al., 2005; Dankort et al., 2007; Dhomen et al., 2009; Morton et al., 2010; Sarkisian et al., 2007). Chez l'homme, des cellules sénescentes ont été détectées dans des lésions bénignes de peau avec des mutations de BRAF, et dans des neurofibromes présentant des niveaux élevés d'activité RAS (Courtois-Cox et al., 2006; Michaloglou et al., 2005). D'une manière fascinante, une dérégulation de la mise en place du programme de sénescence par des défauts de p53 ou de SUV39H1 (*Suppressor of variegation 3-9 homolog 1*) dans les tumeurs bénignes favorise leur évolution vers le stade malin (Braig et al., 2005; Dankort et al., 2007; Majumder et al., 2008; Morton et al., 2010; Goel et al., 2009).

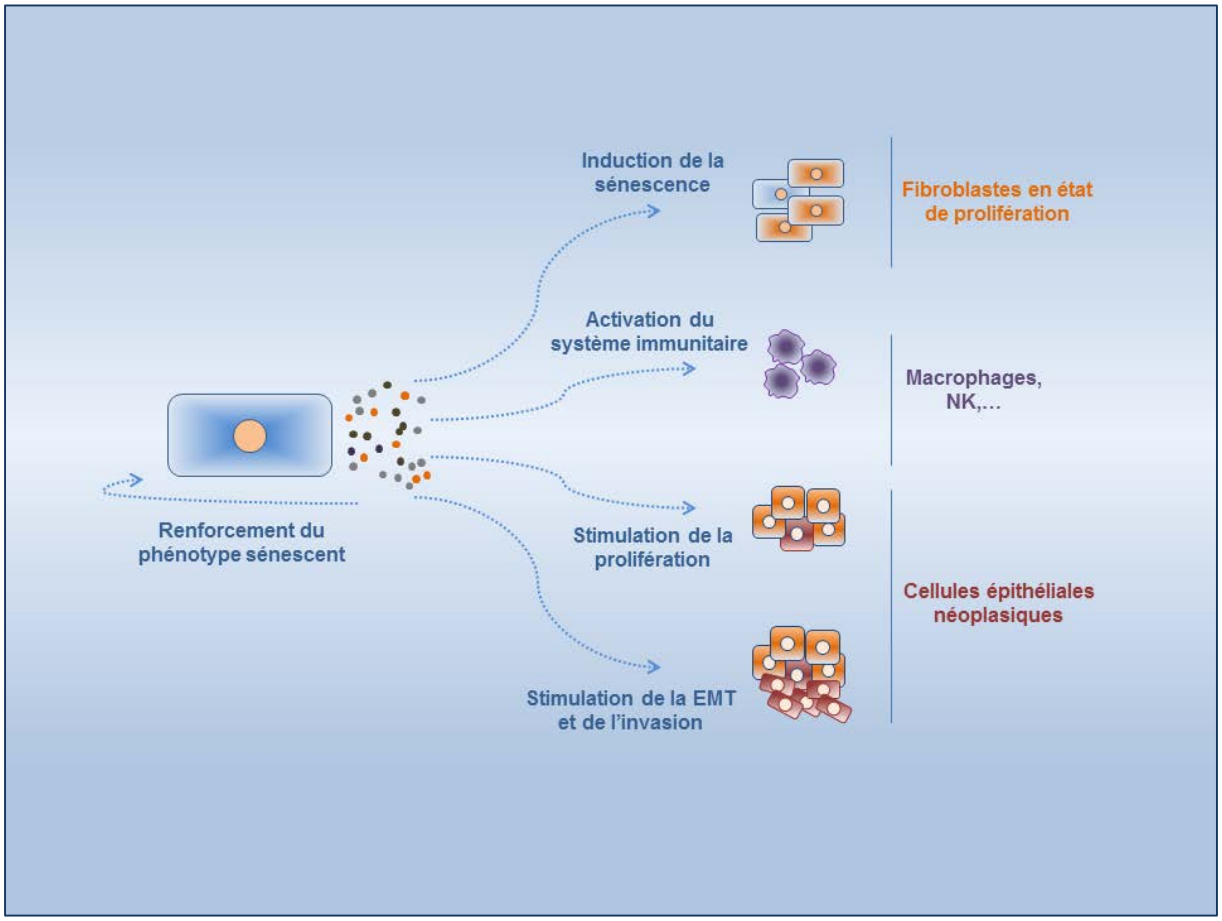


Figure 18 : Schéma récapitulatif des différents effets du SASP sur les cellules normales et néoplasiques.

Le sécrétome des cellules sénescentes assure également un rôle de suppresseur de tumeur. De par ses propriétés inflammatoires, il contribue à la signalisation et l'activation des systèmes immunitaires innés et adaptatifs leur permettant d'éliminer les cellules sénescentes pré-malignes présentes au sein d'un tissu cancéreux (Figure 18) (Kang et al., 2011; Xue et al., 2007).

Par ailleurs, le SASP joue aussi un rôle antitumoral en renforçant de manière autocrine le phénotype sénescent. Des travaux menés par le groupe de Jesus Gil ont démontré un rôle crucial des chimiokines IL-8 et Gro-α dans l'établissement de la sénescence. Ces cytokines, abondantes dans le SASP, sont capables de se lier aux récepteurs membranaires CXCR2 (*C-X-C* - *chemokine Receptor type 2*), d'amplifier la voie d'activation de p53 et de renforcer ainsi l'arrêt de prolifération cellulaire associé à la sénescence (Acosta et al., 2008). Les résultats de l'équipe de Michael R. Green confirment eux aussi le rôle clé qu'exerce le SASP dans l'implantation du programme de sénescence. Ils ont mis en évidence un rôle effecteur de la cytokine IGFBP7 (*Insuline Growth Factor Binding Protein 7*), sécrétée par les cellules sénescentes, dans l'induction d'un arrêt dans le cycle et dans l'amorçage de la sénescence chez des mélanocytes primaires (Wajapeyee et al., 2008). Les cellules sénescentes sont susceptibles de transférer le phénotype sénescent à des cellules voisines non-sénescentes (Figure 18). Cette transmission est établie par l'intermédiaire de certains composants du SASP et plus particulièrement le TGF-β (*Tumor Growth Factor β*). En effet, la liaison du TGF-β à son récepteur active des voies de signalisation intracellulaire aboutissant à une induction des CKI $p15^{INK4b}$ et $p21^{WAF1}$ et en conséquence à un arrêt dans le cycle cellulaire (Acosta et al., 2013). Il apparaît donc, à la vue de ces observations, que la sénescence soit une réponse suppresseur de tumeur efficace.

3.2 La sénescence est un mécanisme pro-tumoral

A contrario de son rôle dans la clairance des cellules sénescentes et dans le renforcement du phénotype sénescent, il a été montré que le sécrétome des cellules sénescentes impulse le développement tumoral via le potentiel de certains de ses composants à exacerber la transformation de cellules pré-néoplasiques voisines (Figure 18). A l'appui de cette idée, il a été montré par le groupe de Judith Campisi que le SASP stimule la prolifération de différents types de cellules épithéliales pré-malignes (kératinocytes

d'épiderme humain, cellules mammaires d'humain et de souris) (Krtolica et al., 2001). Il a été ensuite montré que la présence d'IL-6 et IL-8 dans le SASP induit une transition épithélium-mésenchyme (EMT - *Epithelial-Mesenchymal Transition*) de cellules précancéreuses mammaires humaines (Coppé et al., 2008). Des résultats récents de notre équipe indiquent que les métallo-protéinases MMP-1 et MMP-2 sécrétées par les fibroblastes sénescents de derme humain aggravent l'EMT de kératinocytes pré-transformés (Malaquin et al., 2013).

Parallèlement à ce mécanisme paracrine contribuant à la formation d'un microenvironnement permissif au développement tumoral, des mécanismes intrinsèques aux cellules sénescentes pourraient participer à la génération de cellules néoplasiques. En effet, les fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs - *Mouse Embryonic Fibroblasts*) sont capables d'échapper spontanément de la sénescence pour donner naissance à des cellules immortalisées (Parrinello et al., 2003). Les cellules épithéliales mammaires (HMEC*s* - *Human Mammary Epithelial Cells*), quant à elles, effectuent *in vitro* une phase de croissance exponentielle suivie par un plateau de sénescence transitoire duquel des cellules échappent. Ces cellules présentent des altérations chromosomiques (Romanov et al., 2001). De manière similaire, les kératinocytes (NHEKs - *Normal Humal Epidermal Keratinocytes*) effectuent en culture une phase de croissance exponentielle suivie d'un plateau de sénescence, duquel des clones de cellules ayant réacquis un potentiel prolifératif en émergent systématiquement (Gosselin et al., 2009b). La sénescence semble être donc une phase préparatoire à la transformation maligne.

Une étude élégante a récemment mis en évidence des modifications de l'épigénome associées à la sénescence. En effet, les cellules sénescentes adoptent un profil de méthylation très différent de celui observé chez les cellules en phase de croissance exponentielle. Il consiste en une hypo-méthylation des régions peri-centromériques et hyper-méthylation des régions contenant des ilots CpG. D'une manière intéressante, le profil de méthylation des cellules sénescentes ressemble à celui des cellules cancéreuses. Les auteurs proposent ainsi un modèle pouvant expliquer l'augmentation de l'incidence des cancers avec le vieillissement. Ils suggèrent que les cellules cancéreuses pourraient dériver de cellules sénescentes tout en gardant comme trace l'épigénome altéré (Cruickshanks et al., 2013).

Chapitre 4 : Projet de thèse

Mon équipe d'accueil s'applique depuis quelques années à comprendre les phases initiales de la carcinogenèse par échappement de la sénescence. Nous utilisons deux modèles de cellules primaires humaines normales, les kératinocytes d'épiderme (NHEKs - *Normal Human Epidermal Keratinocytes*) et les fibroblastes de derme (NHDFs – *Normal Human Dermal Fibroblasts*) qui présentent des caractéristiques de sénescence et de devenir post-sénescence différentes. Les NHDFs atteignent, comme classiquement décrit dans la littérature, un plateau de sénescence après une soixantaine de doublements de population. Il a été montré que ce plateau de sénescence s'accompagne d'une augmentation du niveau du stress oxydant et d'un raccourcissement des télomères résultant en une signalisation DDR permanente contribuant à un arrêt irréversible dans le cycle cellulaire. Dans le cas des NHEKs, l'équipe a montré que la sénescence s'accompagne aussi d'une augmentation du niveau de stress oxydant, mais d'un raccourcissement télomérique négligeable, et surtout que cet état sénescent est transitoire, débouchant pour la majorité des cellules sur une mort par autophagie (Gosselin et al., 2009a) et pour environ une cellule sénescente sur 10 000 sur une ré-entrée en mitose qui génére des clones de cellules proliférantes que nous avons baptisées cellules PSNE pour *Post-Senescence Neoplastic Emergence* (Gosselin et al., 2009b).

L'équipe a établi, notamment sur la base d'études transcriptomiques, que ces cellules PSNE sont transformées. En effet, des analyses approfondies de bio-informatique ont mis en évidence une signature de gènes chez les cellules PSNE approchant de celle des carcinomes colorectaux, du sein, de la peau et surtout de lésions prénéoplasiques de la peau (Martin et al., 2014). Les cellules PSNE acquièrent des caractéristiques de transition épithélium - mésenchyme quand elles sont soumises au sécrétome des NHDFs sénescents (Malaquin et al., 2013). De plus, elles génèrent des hyperplasies et des petits carcinomes disséminées de la peau après xénogreffe en souris *nude* (Gosselin et al., 2009b). Des analyses par CGH-array montrent qu'elles présentent un grand nombre de micro-délétions monoalléliques réparties aléatoirement dans le génome (données non publiées). Enfin, il a été démontré que les cellules émergentes ne sont pas la progénie de cellules déjà transformées, ou de cellules souches, qui auraient pu être présentes dans l'explant de départ, mais sont issues de la division de cellules pleinement sénescentes, par un

mécanisme de mitose atypique par bourgeonnement appelé néose. Ce mécanisme de PSNE des NHEKs révèle donc un potentiel pro-carcinogène de la sénescence.

Mon projet de thèse était de contribuer à l'étude des mécanismes de l'initiation cancéreuse des NHEKs par échappement de la sénescence.

Le stress oxydant joue un rôle primordial dans la survenue de la sénescence des NHEKs et de leur devenir. En effet, des résultats antérieurs de l'équipe montrent que les facteurs NF-κB sont activés au cours de la sénescence des NHEKs, ce qui induit l'expression de la MnSOD et, en absence d'une co-activation de la catalase et des GPXs, d'une accumulation de H_2O_2. Un traitement oxydant de cellules jeunes entraine un plateau de sénescence prématuré, suivi par une PSNE. Inversement, un traitement antioxydant repousse la survenue de la sénescence et diminue la fréquence de PSNE (Gosselin et al., 2009b). Le stress oxydant est donc un déterminant clé de l'entrée en sénescence mais aussi de l'échappement post-sénescent. Cet effet dual pourrait résulter d'une part des propriétés délétères du stress oxydant favorisant la sénescence et la mort par macroautophagie, et d'autre part, de ses propriétés mutagènes exacerbant l'échappement néoplasique.

J'ai donc cherché à déterminer si les ROS associés à la sénescence des NHEKs étaient susceptibles d'induire des dommages mutagènes impliqués dans la PSNE. Des taux élevés d'espèces réactives de l'oxygène entrainent des altérations structurales et fonctionnelles des organites et des macromolécules de la cellule, notamment de l'ADN. Les cassures simple-brin représentent un des dommages mutagènes majeurs résultant du stress oxydant. Le stress oxydant peut également générer des cassures double-brin soit directement, soit en conséquence de SSBs non réparées.

Les conséquences en termes de devenir cellulaire - prolifération, arrêt dans le cycle ou mort cellulaire- peuvent être très différentes selon que les cellules subissent principalement des SSBs *versus* des DSBs. Dans ce cadre, j'ai cherché à déterminer si le rôle moteur que joue le stress oxydant dans la sénescence des NHEKs et la PSNE passe par la génération de SSBs et/ou DSBs, puis à comprendre le mode d'action de ces dommages en termes de progression dans le cycle cellulaire et d'acquisition de mutations. **La stratégie globale a été d'analyser de façon comparative les NHEKs par rapport aux NHDFs, puisque les uns mais non les autres développent une PSNE.**

Résultats

Partie 1: Recherche de dommages oxydants associés à la sénescence et impliqués dans la génération de cellules néoplasiques

L'objectif de mon projet de thèse était d'évaluer l'implication des cassures de l'ADN résultant du stress oxydant dans l'émergence néoplasique post-sénescence. La stratégie suivie a été de comparer la nature et la quantité des cassures associées à la sénescence de deux types cellulaires qui diffèrent quant à leurs capacités à générer des cellules transformées : les kératinocytes (NHEKs) et les fibroblastes (NHDFs) de peau. L'ensemble des expériences a été réalisé de façon comparative sur des couples de NHEKs et NHDFs issus d'un même prélèvement, c'est-à-dire isogéniques, afin d'éviter tout biais résultant de polymorphismes éventuels.

Evaluation du niveau du stress oxydant à la sénescence des NHEKs et NHDFs

Le stress oxydant jouant un rôle moteur dans la survenue du plateau de sénescence et la PSNE des NHEKs, la première hypothèse de l'équipe a été que les NHEKs et les NHDFs sénescents n'étaient pas soumis à un niveau similaire de stress oxydant. Une expérience préalable à ce projet a donc été d'évaluer les niveaux du stress oxydant à la sénescence des NHEKs et NHDFs. Les expériences ont été réalisées en utilisant le H_2DCFDA, une sonde fluorescente ayant une affinité préférentielle pour H_2O_2. Les résultats ont révélé que les NHDFs, qui pourtant ne présentent pas de PSNE, voient leur taux de ROS à la sénescence augmenter du même facteur que dans les NHEKs (S. Martien, non publié). J'ai ensuite cherché à déterminer les valeurs absolues des concentrations de H_2O_2 présentes à la sénescence chez les deux types cellulaires. Pour ce faire, j'ai construit une gamme étalon H_2O_2 en traitant des NHEKs en phase de croissance exponentielle avec des concentrations croissantes de H_2O_2 préalablement à l'incubation avec la sonde H_2DCFDA. Les résultats obtenus indiquent que le stress oxydant associé à la sénescence est équivalent à une concentration de H_2O_2 d'environ 4 µM pour les NHEKs et 8 µM pour les NHDFs (Figure 20A).

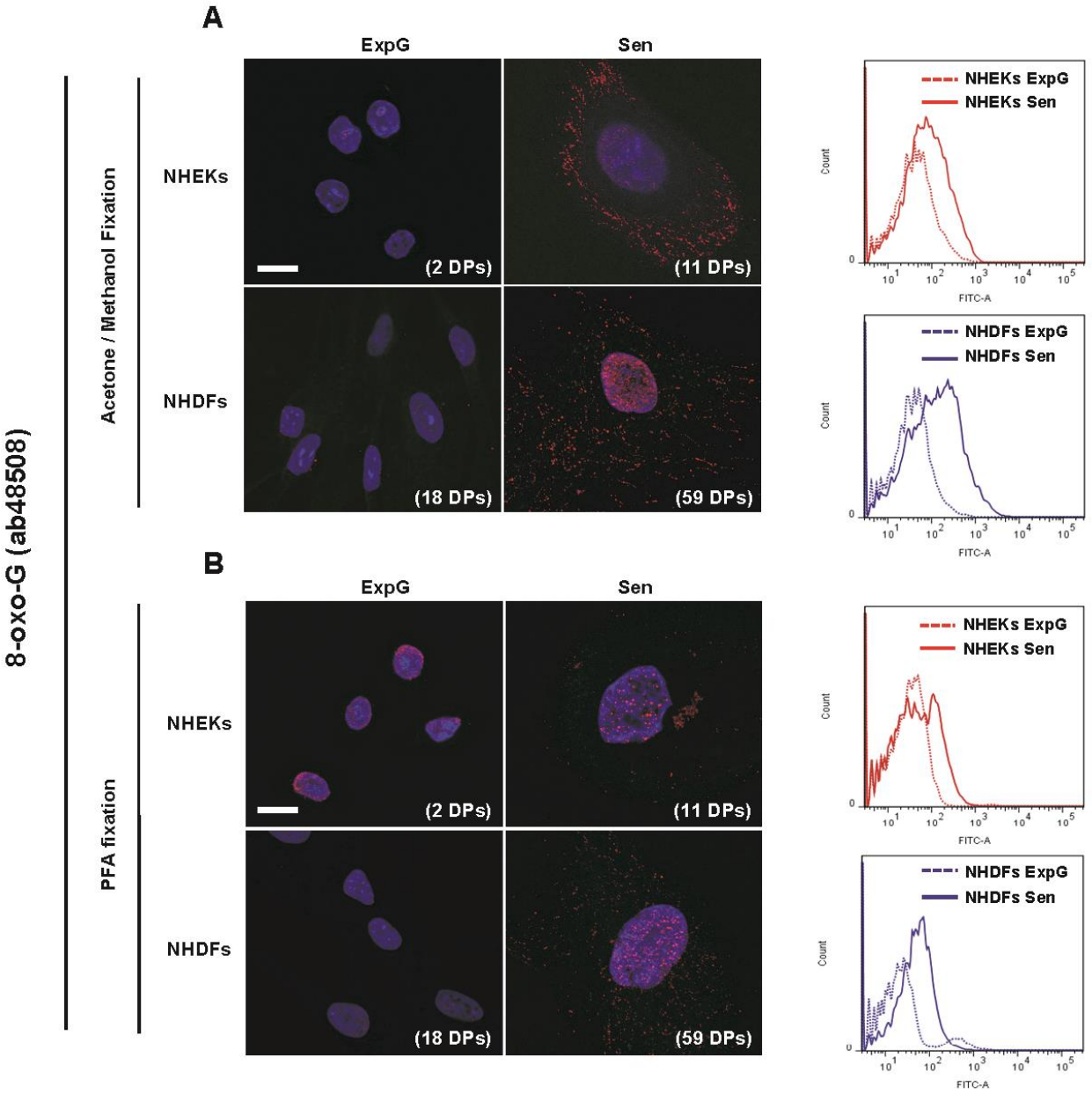


Figure 19: Les niveaux de 8-oxoG augmentent d'une manière similaire à la sénescence chez les NHEKs et NHDFs.

Panels de gauche : Immunodétection de 8-oxoG réalisée sur des NHEKs et NHDFs en phase de croissance exponentielle (ExpG) et au plateau de sénescence (Sen). Deux protocoles de fixation ont été utilisés : (A) Fixation avec de l'acétone/méthanol ; (B) Fixation avec du para-formaldéhyde (PFA). La barre d'échelle représente 20 µm.

Panels de droite : Quantification du marquage 8-oxoG réalisée par cytométrie en flux. L'axe des abscisses des histogrammes représente l'intensité du marquage FITC - L'axe des ordonnées des histogrammes représente le nombre d'évènements.

N'ayant pas détecté de différences quantitatives de ROS entre les NHEKs et les NHDFs sénescents, nous avons alors supposé que les différences pouvaient se situer au niveau de la nature des dommages engendrés.

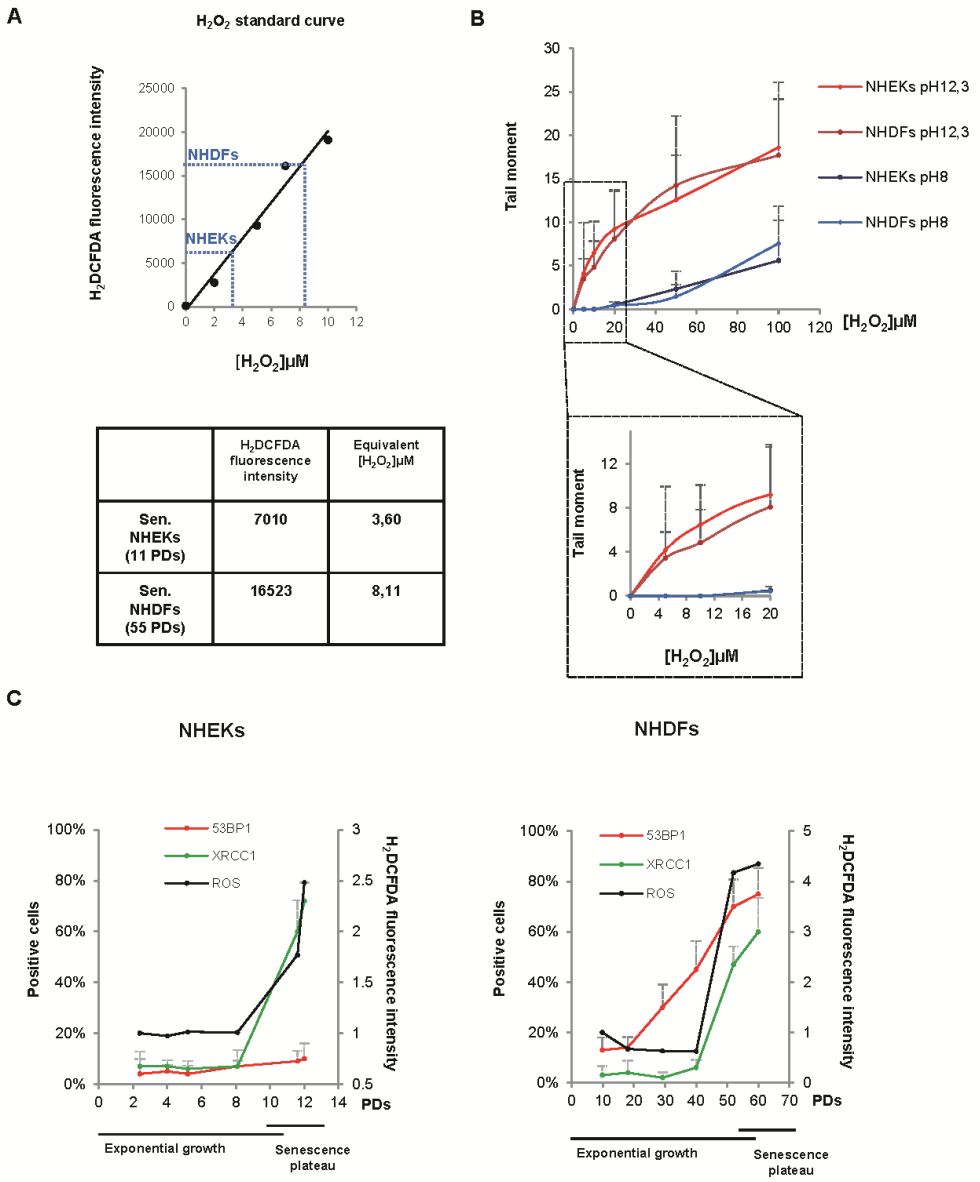
Recherche de bases oxydées associés à la sénescence des NHEKs et des NHDFs

Le dommage oxydant le plus fréquent étant les bases oxydées, j'ai commencé mes recherches par les 8-oxoguanines (8-oxoG). Des immunofluorescences anti-8-oxoG ont été ainsi réalisées en parallèle sur des NHEKs et NHDFs. De plus, afin d'obtenir des valeurs quantitatives crédibles, j'ai mesuré l'intensité du signal 8-oxoG par cytométrie en flux. Les résultats révèlent une augmentation globale (nucléaire et cytoplasmique) de l'intensité de marquage 8-oxoG à la sénescence chez les NHEKs et NHDFs, sans différences quantitatives ou de localisations subcellulaires perceptibles entre les deux types cellulaires (Figure 19 A et B).

Recherche de SSBs et DSBs associées à la sénescence des NHEKs et NHDFs

Nous avons ciblé ensuite nos recherches sur les cassures de l'ADN, les SSBs et DSBs. Leur recherche a été réalisée en premier lieu par des essais comète. Il s'agit d'une électrophorèse sur cellule unique perméabilisée. Quand la migration électrophorétique est effectuée à pH 8, l'ADN reste natif, et seuls les fragments issus de DSBs migrent pour former la queue de la comète. Quand la migration est effectuée à pH 12,3, l'ADN se dénature, ce qui libère en plus les fragments issus des SSBs. Les résultats ont été analysés en mesurant le Tail Moment (TM) de 50 à 100 cellules par condition. Celui-ci est défini comme étant le rapport entre le produit de la longueur de la queue par l'intensité de fluorescence de la queue sur l'intensité de fluorescence totale de la cellule. J'ai ainsi pu montrer que la quantité de DSBs et SSBs augmente dans les NHDFs sénescents par rapport à ceux en phase de croissance exponentielle. En revanche, dans les NHEKs, le nombre de DSBs reste constant et très faible et seuls les SSBs augmentent à la sénescence à un niveau légèrement supérieur à celui des NHDFs (Figure 3A de l'article N°1).

J'ai également analysé les SSBs et DSBs en recherchant les foyers DDR et SSBR par immunofluorescence. Comme déjà mis en évidence par d'autres équipes (Adda di Fagagna et al., 2003; Herbig et al., 2004), nos résultats montrent que la sénescence des



	H_2DCFDA fluorescence intensity	Equivalent $[H_2O_2]$µM
Sen. NHEKs (11 PDs)	7010	3,60
Sen. NHDFs (55 PDs)	16523	8,11

Figure 20: Le stress oxydant associé à la sénescence ne génère que des SSBs et non des DSBs.

(A) Mesure du niveau de stress oxydant chez les NHEKs et NHDFs au plateau de sénescence par cytométrie en flux à l'aide de la sonde H_2DCFDA. Des NHEKs en phase de croissance exponentielle (3 PDs - *Population Doublings*) ont été utilisés pour construire une courbe étalon H_2O_2 (graphe du haut). Les valeurs de fluorescence obtenues avec des NHEKs et NHDFs sénescents ont été reportées sur la courbe étalon afin d'en déduire les concentrations en H_2O_2 (tableau du bas) Les doublements de population (PDs) des NHEKs et NHDFs sénescents sont indiqués dans le tableau.

(B) Essais comète à pH alcalin (12,3) et neutre (8) réalisés en parallèle sur des NHEKs (PDs 4) et NHDFs (PDs 15) en phase de croissance exponentielle traités pendant 10 minutes à 4°C par des doses croissantes de H_2O_2.

(C) Quantification des foyers DDR et SSBR et mesure du niveau de stress oxydant sur plusieurs points de la cinétique de croissance des NHEKs et NHDFs. Des immunofluorescences XRCC1 (foyer SSBR) et 53BP1 (foyer DDR) ont été réalisées. Les mesures de fluorescence de la sonde H_2DCFDA ont été réalisées en spectrofluorimétrie.

NHDFs est accompagnée par une accumulation significative de foyers DDR : 80 à 90% de NHDFs sénescents sont positifs pour ces foyers. De façon contrastée, seuls 20% des NHEKs sénescents présentent des foyers DDR et ce nombre est constant entre les cellules en phase de croissance exponentielle et au plateau de sénescence (Figure 2C de l'article N°1). Des immunofluorescences anti-XRCC1, révélatrices des foyers de signalisation des SSBs, montrent que 70% des NHEKs sénescents accumulent des SSBs versus 40% des NHDFs, ce qui confirme les résultats des essais comètes (Figure 3B de l'article N°1).

Analyse des capacités de réparation des SSBs chez les NHEKs et NHDFs

Nous nous sommes attachés par la suite à comprendre pourquoi, à niveau de ROS équivalent, les SSBs sont accumulés à la sénescence chez les NHEKs mais pas chez les NHDFs. Pour cela, j'ai engagé une analyse des capacités de réparation des SSBs. Mes résultats, basés sur des immunofluorescences et des Western Blots anti-PARP1, PAR, XRCC1, ligase 1, ligase 3, PCNA et BrdU montrent que les NHEKs sénescents présentent un défaut d'expression et d'activité de la PARP1, un défaut de recrutement des ligases 1, 3 et PCNA et un défaut d'incorporation de BrdU aux sites des SSBs. Les NHEKs sénescents ont donc perdu la capacité de réparer les SSBs. Les foyers XRCC1 qu'ils présentent sont donc persistants. En revanche, dans les NHDFs, la signalisation des SSBs est normale et ces cassures sont réparées (Figure 3C-D de l'article N°1).

Détermination de l'origine des SSBs accumulées à la sénescence des NHEKs

Dans le but de déterminer le rôle du stress oxydant dans la génération des cassures de l'ADN associées à la sénescence, j'ai réalisé des essais comète sur des NHEKs et NHDFs en phase de croissance exponentielle traités pendant 10 minutes avec des doses croissantes de H_2O_2. A des doses comprises entre 5 et 20 µM, équivalentes à ce que nous avons mesuré à la sénescence, seules des SSBs sont générées. Pour obtenir des DSBs, il faut utiliser des concentrations de 100 µM ou plus, qui sont létales pour les cellules. Ces résultats suggèrent donc que le stress oxydant associé à la sénescence ne générerait que des SSBs. Ainsi, les DSBs accumulées à la sénescence des fibroblastes ne seraient pas d'origine oxydante (Figure 20B).

Afin de valider cette conclusion, j'ai étudié la cinétique d'apparition des DSBs et des SSBs chez les NHEKs et les NHDFs. J'ai également mesuré en parallèle le niveau de stress oxydant. Les NHDFs commencent à accumuler les DSBs très précocement, avant l'établissement du plateau de sénescence et avant que les niveaux de SSBs et d'H_2O_2 s'accentuent. Dans le cas des NHEKs, l'accumulation des SSBs ne commence aussi qu'au début du plateau de sénescence. Le taux de DSBs reste stable tout au long de la cinétique de croissance. D'une manière très intéressante, l'augmentation du taux de SSBs chez les deux types cellulaires est étroitement corrélée avec celle du niveau de stress oxydant (Figure 20C).

Mise en évidence du rôle causal du stress oxydant dans la génération des SSBs

Dans le but de renforcer les résultats précédents, j'ai réalisé des traitements oxydants et antioxydants sur des NHEKs en phase de croissance exponentielle. Un traitement oxydant de 10 µM de H_2O_2 répété chaque jour induit une sénescence prématurée au bout de 4 jours, associée à une accumulation de SSBs mais pas de DSBs, suivie par une PSNE. Inversement, des traitements antioxydants par de la catalase, de la catalase-PEG ou de la N-acétylcystéine (NAC) repoussent le plateau de sénescence, suppriment la PSNE et, corrélativement, réduisent les SSBs sans affecter les DSBs. Dans leur ensemble, ces résultats nous amènent à conclure que seuls les SSBs et pas les DSBs sont d'origine oxydante. De plus, ils pointent un rôle du stress oxydant et des SSBs qu'il génère dans la sénescence et la PSNE des NHEKs (Figure 8 de l'article N°1).

Analyse de l'arrêt dans le cycle cellulaire des NHEKs et NHDFs sénescents

J'ai réalisé ensuite une analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux. J'ai également étudié par Western-Blot l'activation de deux voies moléculaires engagées dans l'induction de l'arrêt dans le cycle associé à la sénescence, la voie p53-$p21^{WAF1}$ et $p16^{INK4a}$-Rb. Comme déjà publié, les NHDFs sénescents sont arrêtés principalement en phase G1 *via* l'activation de la voie p53-$p21^{WAF1}$. Les NHEKs sénescents, quant à eux, présentent un arrêt en G1 accompagné d'une activation de la voie $p16^{INK4a}$-Rb, sans activation détectable de la voie p53-$p21^{WAF1}$ (Figure 1B et C de l'article N°1).

Mise en évidence du rôle causal des SSBs dans la sénescence et la PSNE des NHEKs

Le fait que les traitements antioxydants repoussent la sénescence et inhibent la PSNE tout en diminuant la quantité de SSBs suggère que les SSBs jouent un rôle moteur dans ces deux processus. Pour démontrer ce point, j'ai invalidé la PARP1 par siRNA ou inhibé son activité par un inhibiteur pharmacologique (3-amino-benzamide) chez des NHEKs en phase de croissance exponentielle.

Les NHEKs accumulent ainsi des SSBs mais pas de DSBs et entrent dans un plateau de sénescence prématurée suivie d'une PSNE. D'une manière intéressante, les NHEKs induits en sénescence prématurée présentent une polynucléation très marquée et un profil d'arrêt dans le cycle cellulaire similaire à celui observé en sénescence normale, c'est-à-dire un arrêt en G1 associé à une activation de la voie $p16^{INK4a}$-Rb (Figure 7 et supplemental Figure 9 de l'article N°1).

Etude de la formation des foyers nucléaires XRCC1 à la sénescence chez les NHEKs

Contrairement aux NHDFs, le plateau de sénescence des NHEKs s'accompagne d'une décroissance de l'expression et de l'activité de la PARP1 et d'une accumulation massive de foyers nucléaires XRCC1.

PARP1 étant reconnue comme impliquée dans le recrutement de XRCC1 aux sites des SSBs, nous avons cherché à expliquer le mécanisme à l'origine d'un tel paradoxe. J'ai tout d'abord traité des NHEKs en phase de croissance exponentielle et au plateau de sénescence par 20 µM de H_2O_2. J'ai étudié ensuite par immunofluorescence la formation des foyers PAR et XRCC1. Comme attendu, les NHEKs en phase de croissance exponentielle synthétisent fortement PAR et recrutent efficacement XRCC1. Les NHEKs sénescents, quant à eux, répondent moins bien au traitement H_2O_2 et produisent très faiblement des PAR. Toutefois, ils apparaissent capables de recruter XRCC1 d'une manière similaire aux cellules en phase de croissance exponentielle (Figure 5A de l'article N°1).

J'ai étudié ensuite la cinétique de disparition des foyers XRCC1 néo-induits par le traitement H_2O_2 précédant. Chez les NHEKs en phase de croissance exponentielle, les

foyers XRCC1 disparaissent très rapidement 10 minutes après leur formation. De façon opposée, chez les NHEKs sénescents, les foyers XRCC1 demeurent et persistent. Ces résultats suggèrent que le déclin de l'activité de PARP1 à la sénescence n'affecte pas la relocalisation et le recrutement de XRCC1 mais plutôt perturbe la dynamique de son relargage (Figure 5A de l'article N°1).

Afin d'éprouver cette hypothèse, j'ai surexprimé PARP1 chez les NHEKs sénescents par une infection adénovirale et analysé par immunofluorescence les foyers XRCC1. D'une manière très intéressante, la restauration des niveaux de PARP1 réduit très rapidement le nombre de foyers XRCC1 (Figure 5B de l'article N°1). Ainsi, la décroissance de PARP1 à la sénescence des NHEKs est à l'origine de l'accentuation du nombre de foyers XRCC1 et de leur persistance.

Etude de la voie moléculaire associant les foyers XRCC1 persistants à l'arrêt dans le cycle cellulaire

J'ai cherché ensuite à comprendre le mécanisme par lequel les SSBs persistants induisent l'arrêt dans le cycle chez les NHEKs. Nous avons émis l'hypothèse que les foyers XRCC1 seraient à l'origine de l'induction de la voie $p16^{INK4a}$-Rb. J'ai tout d'abord inhibé par siRNA l'expression de XRCC1 chez les NHEKs sénescents et examiné par Western Blot le statut de la voie $p16^{INK4a}$-Rb. D'une manière très intéressante, l'inhibition de XRCC1 réduit drastiquement l'activation de $p16^{INK4a}$-Rb (Figure 6A de l'article N°1).

Je me suis intéressé par la suite à identifier des acteurs intermédiaires reliant les foyers XRCC1 à la voie $p16^{INK4a}$-Rb. Mes recherches bibliographiques m'ont amené à m'intéresser à la p38-MAPK. Comme nous l'avons vu dans la partie introduction, la kinase p38 intervient dans l'induction de $p16^{INK4a}$. En effet, en réponse à de nombreuses situations de stress telles qu'une sur-production de ROS, une sur-activation oncogénique et une induction de dommages à l'ADN, p38 est phosphorylée et activée par les MAPK Kinases 3 et 6 et tonifie ensuite la transcription du gène *INK4a.* J'ai cherché dans un premier temps à déterminer si la voie p38-MAPK est activée au plateau de sénescence chez les NHEKs. Les résultats obtenus mettent en évidence une augmentation nette de la forme phosphorylée de p38-MAPK à la sénescence (Figure 6B de l'article N°1). J'ai réalisé ensuite des siXRCC1 et étudié par Western Blot la voie p38-MAPK $\rightarrow$ $p16^{INK4a}$.

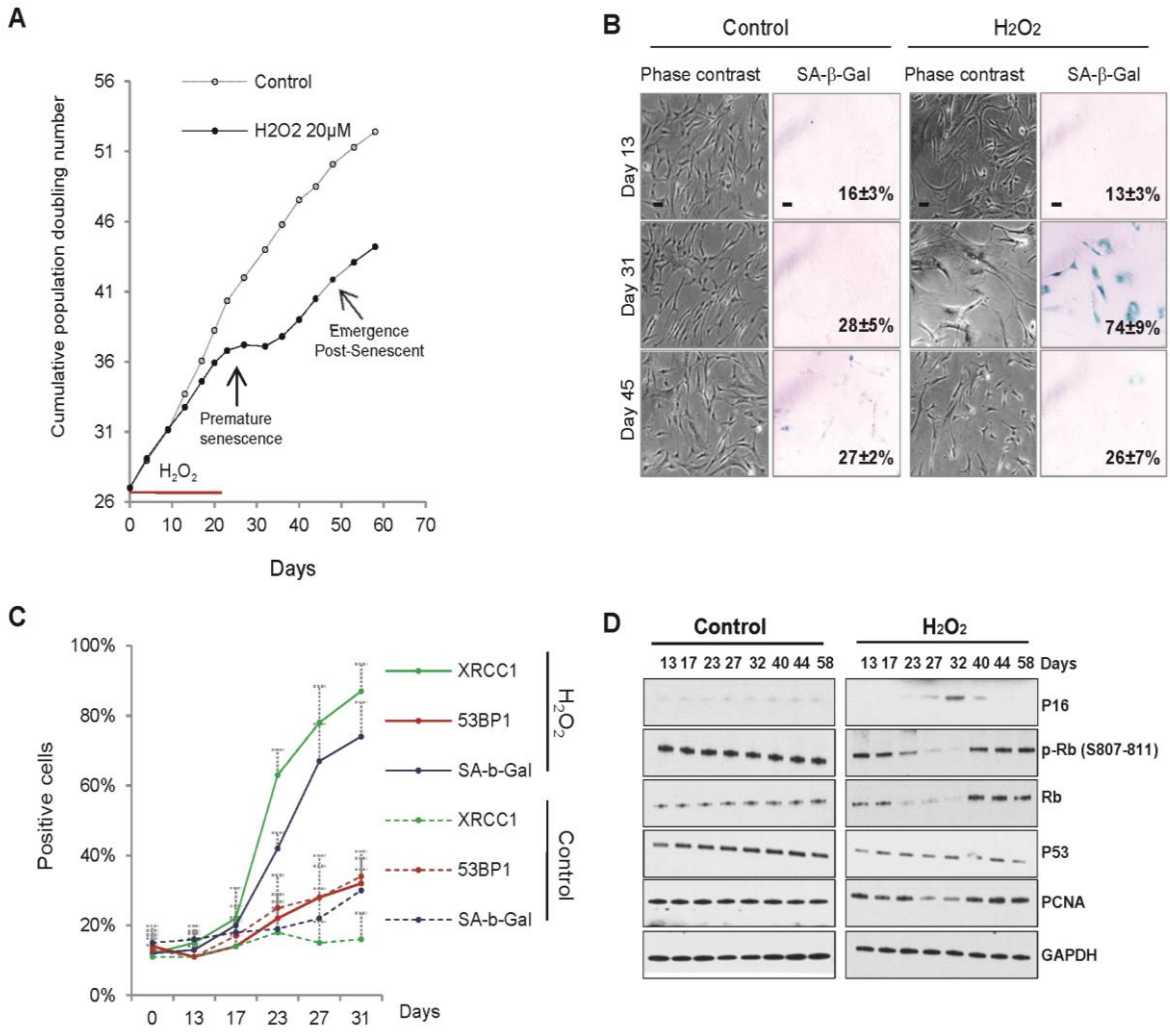


Figure 21: Rôle causal des SSBs dans l'induction de la sénescence et de l'émergence néoplasique chez les NHDFs.

(A) Courbe de croissance des NHDFs traités ou non avec 20 µM de H_2O_2. Le trait rouge indique la durée du traitement.

(B) Morphologie cellulaire (contraste de phase) et activité SA-β-Gal (champ clair) des NHDFs aux jours 13, 31 et 45 de l'expérience. Le pourcentage de cellules positives au marquage *SA-β-Gal* est inséré dans les images. Les cellules ont été comptées manuellement sur 3 à 5 champs aléatoires comprenant une vingtaine de cellules. La barre d'échelle représente 50 µm.

(C) Des immunofluorescences XRCC1 (foyers SSBR) et 53BP1 (foyers DDR) ont été réalisées sur des NHDFs traités ou non avec du H_2O_2 aux jours 0, 13, 17, 23, 27 et 31 de l'expérience. Une quantification des cellules positives au marquage SA-β-Gal a été également réalisée.

(D) Analyse par Western Blot des niveaux de $p16^{INK4a}$, Rb (forme totale), Rb phosphorylée et p53 sur des extraits protéiques de NHDFs aux jours 13, 17, 23, 27, 32, 40, 44 et 53 de l'expérience. PCNA est utilisé comme marqueur de prolifération et GAPDH comme témoin de charge

Ceci aboutit à une réduction simultanée des niveaux des deux protéines (Figure 6C de l'article N°1). L'ensemble de ces résultats met en évidence une voie inédite initiée par les foyers XRCC1 persistants et menant à une activation de la voie p38MAPK→$p16^{INK4a}$→Rb, à l'arrêt dans le cycle et à l'acquisition du phénotype sénescent (Figure 6C de l'article N°1).

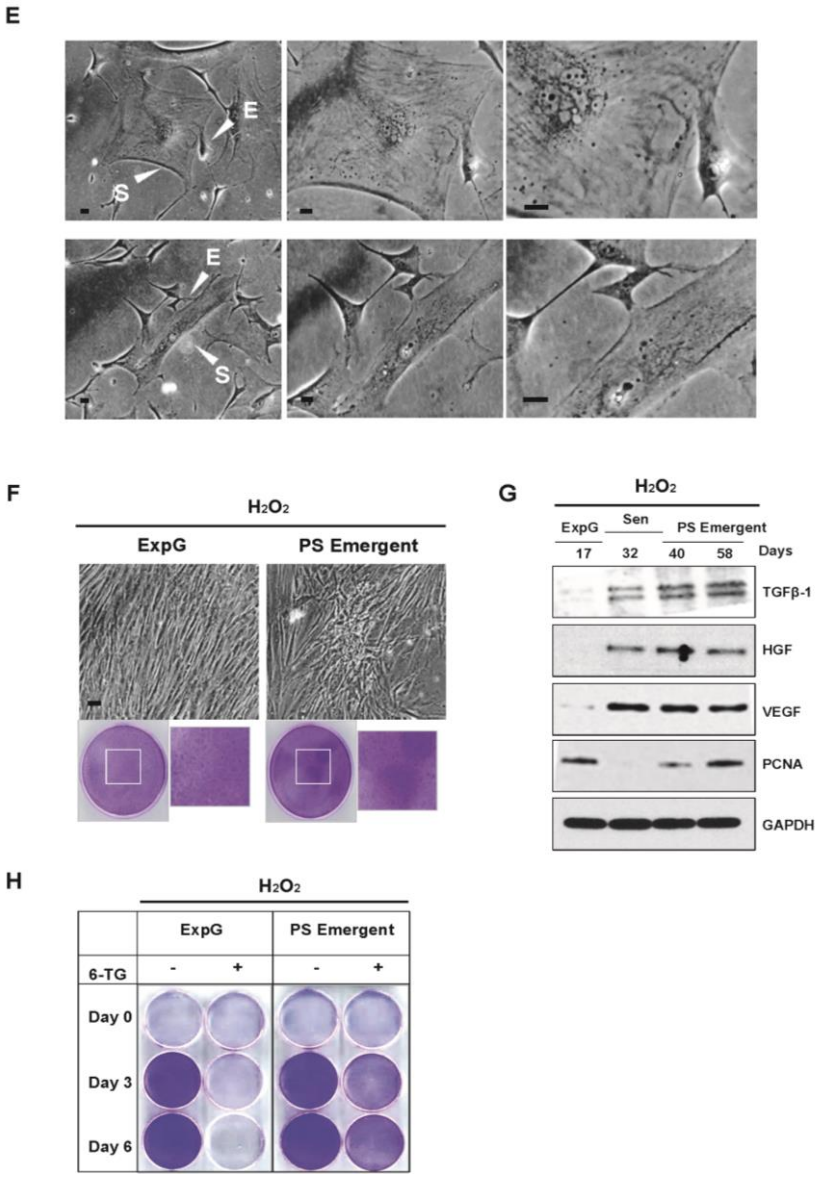
Reproduire la situation des NHEKs sénescents dans le modèle des NHDFs

Les résultats précédents nous permettent de suggérer qu'une phase de sénescence associant d'une part une forte accumulation de SSBs qui pourraient être mutagènes, et d'autre part une faible accumulation de DSBs et de foyers DDR qui n'entrainerait pas un arrêt irréversible dans le cycle, serait permissive à un échappement néoplasique.

Pour appuyer ce paradigme, il était intéressant de déterminer si le fait de transposer ce mécanisme dans des NHDFs leur permettrait de développer une PSNE. Pour ce faire, j'ai cherché à induire une accumulation de SSBs dans des NHDFs en phase de croissance exponentielle avant qu'ils n'aient accumulé des DSBs. J'ai étudié ensuite la cinétique de croissance et analysé les cassures de l'ADN.

D'une manière similaire à ce que j'ai réalisé sur les NHEKs, j'ai commencé par inhiber l'expression de la PARP1 chez des NHDFs par ARN interférence. L'efficacité de la transfection a été vérifiée par Western-Blot. Les analyses de la cinétique de croissance ont révèlé un léger ralentissement de la vitesse de prolifération sans que ceci soit accompagné d'une apparition de marqueurs de sénescence. De plus, les expériences d'immunofluorescence anti-XRCC1 n'ont pas mis en évidence d'accumulation de SSBs. Ainsi, la seule inhibition de PARP1 chez les NHDFs n'est pas suffisante pour induire ni des SSBs ni le programme de sénescence. Nous devrons prochainement examiner l'effet de la double inhibition des PARP1 et 2 sur la génération des SSBs et l'établissement de la sénescence.

J'ai ensuite tenté d'induire des SSBs par des traitements de 20 µM de H_2O_2 renouvelés chaque jour. Après trois semaines de traitement, les NHDFs ont atteint un plateau de prolifération et acquit des caractéristiques de cellules sénescentes, notamment des changements morphologiques (augmentation du volume cellulaire, polynucléation,…)



En complément à la figure 21: Rôle causal des SSBs dans l'induction de la sénescence et de l'émergence néoplasique chez les NHDFs.

(E) Aspect morphologique au microscope à contraste de phase de fibroblastes émergents post-sénescents issus du bourgeonnement d'un fibroblaste sénescent à trois grossissements différents (S : cellule sénescente ; E : cellule émergente). La barre d'échelle représente 20 µm.

(F) Des fibroblastes en phase de croissance exponentielle et émergence post-sénescence ont été mis en culture jusqu'à la confluence. Les cellules ont été ensuite fixées et colorées au crystal violet. Notez que les fibroblastes post-sénescents émergents poussent, à confluence, en amas.

(G) Analyses par Western Blot des niveaux de TGFβ, HGF et VEGF sur des extraits protéiques de NHDFs traités avec du H_2O_2 en phase de croissance exponentielle, sénescence et post-sénescence. PCNA est utilisé comme marqueur de prolifération et GAPDH comme témoin de charge.

(H) Essai *hprt* réalisés sur des fibroblastes traités avec du H_2O_2 en phase de croissance exponentielle et émergence post-sénescence. Les cellules ont été fixées et colorées au crystal violet aux jours 0, 3 et 6 de l'expérience.

et une augmentation de l'activité *SA-β-galactosidase* (Figure 21A et B). D'une manière très intéressante, l'établissement du phénotype sénescent était accompagné d'une augmentation nette de $p16^{INK4a}$ et d'une perte de la forme phosphorylée de Rb reflétant l'activation de la voie $p16^{INK4a}$-Rb (Figure 21D). De plus, une augmentation drastique du taux de SSBs et non de celui des DSBs a été également mise en évidence (Figure 21C).

Le plateau de sénescence prématurée a été suivi d'une reprise de prolifération. Des observations microscopiques ont révèlé un processus de division similaire à celui des NHEKs sénescents. En effet, nous avons observé des fibroblastes sénescents polynucléés produisant des quantités variables de petites cellules mononucléées actives sur le plan mitotique par un mécanisme de division asymétrique par bourgeonnement (Figure 21E).

Afin de déterminer si les cellules émergentes présentent des caractéristiques de cellules transformées, j'ai tout d'abord étudié par Western-Blot l'expression des facteurs de croissance HGF (*Human Growth Factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et TGFβ (*Transforming Growth Factor β).* D'une manière surprenante, les niveaux de ces facteurs augmentent considérablement au plateau de sénescence et se maintiennent chez les cellules émergentes (Figure 21G).

De plus, les NHDFs émergents semblent être insensibles à l'inhibition de contact puisqu'elles continuent à proliférer même après confluence. Ceci engendre des zones de multicouches cellulaires mises en évidence avec un marquage au crystal violet (Figure 21F). Enfin, l'essai *in vitro* de mutation génique *HPRT (Hypoxanthine Phospho-Rybosyl Transferase)* révèle que les cellules émergentes sont résistantes à la présence de la 6-TG (*6-Thio-Guanine*) et présentent donc des mutations perte de fonction affectant le gène *hprt* (Figure 21H). L'ensemble de ces données montre que les fibroblastes ayant repris la prolifération sont transformés et présentent des mutations.

Evaluation de la pertinence physiologique de l'accumulation différentielle de SSBs et de DSBs dans les NHEKs versus les NHDFs sénescents.

J'ai cherché ensuite à déterminer si, *in vivo*, les kératinocytes et les fibroblastes accumulent des SSBs et des DSBs de façon différentielle avec le vieillissement, comme ils le font *in vitro* avec la sénescence. Pour cela, j'ai cherché la présence de foyers SSBR et DDR dans des coupes histologiques de peau humaine de différents âges par des

immunohistofluorescences anti-XRCC1 et 53BP1. J'ai également étudié et comparé les niveaux de la PARP1.

Nous disposons au laboratoire d'échantillons de peau humaine issus de 15 donneurs différents dont 5 jeunes (29-38 ans) et 10 âgés (60-85 ans) provenant du service d'anatomo-pathologie de l'Université de Bonn (Dr Nicolas Wernert). Les expériences réalisées sur 3 donneurs jeunes et 4 âgés révèlent une augmentation significative du pourcentage de cellules positives aux foyers XRCC1 dans les kératinocytes d'épiderme chez les individus âgés. Corrélativement, le nombre de cellules positives à la PARP1 diminue drastiquement. Le nombre de cellules positives aux foyers 53BP1 n'augmente que très légèrement et d'une manière non significative chez les individus âgés (Figure 9 de l'article N°1).

En ce qui concerne les fibroblastes de derme (mis en évidence par un co-marquage vimentine), ils présentent peu de foyers XRCC1 et maintiennent un niveau de PARP1 similaire entre les individus jeunes et âgés. En revanche, une augmentation significative du pourcentage des fibroblastes positifs aux foyers 53BP1 (DSBs) est observée chez les donneurs âgés. Ces résultats confirment ainsi ce que nous avons observé *in vitro* chez les NHEKs et NHDFs sénescents (Figure 9 de l'article N°1).

Mise en évidence du rôle causal des SSBs dans la sénescence et la PSNE des HMECs.

Afin de déterminer si le rôle des SSBs dans l'accélération du plateau de sénescence et la génération de cellules néoplasiques est valide chez d'autres types de cellules épithéliales, j'ai cherché leur présence à la sénescence des cellules épithéliales mammaires humaines normales (HMECs). Ces dernières possèdent le potentiel d'échapper à l'arrêt dans le cycle associé à la sénescence et de produire en conséquence des cellules présentant des altérations chromosomiques (Romanov et al., 2001). Nos expériences révèlent que la survenue du plateau de sénescence des HMECs s'accompagne d'une accumulation massive de foyers XRCC1 et d'une activation nette de la voie $p16^{INK4a}$-Rb. A l'inverse, nous ne détectons pas d'augmentation de foyers DDR ni d'activation de la voie p53-$p21^{WAF1}$. D'une manière similaire à ce que nous observons chez les NHEKs, l'accroissement du taux de SSBs chez les HMECs sénescents s'accompagne d'une diminution remarquable de l'expression et de l'activité de la PARP1 (Figure 10 de l'article N°1).

A travers cette étude, nous avons pu mettre en évidence que la nature des dommages à l'ADN influence le devenir des cellules sénescentes. Les DSBs associées au plateau de sénescence des NHDFs activent la voie p53-p21^{WAF1} et renforcent la stabilité de l'arrêt du cycle cellulaire. En revanche, les SSBs accumulées à la sénescence des cellules épithéliales promeuvent l'acquisition de mutations et l'échappement néoplasique.

Cette étude fait l'objet de l'article N°1 intitulé "*A defective DNA single-strand break repair pathway is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells*". Cet article est actuellement en révision à Nature Communications.

Article N°1: ***A defective DNA single-strand break repair pathway is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells***

Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells

Joe NASSOUR[1], Sébastien MARTIEN[1], Nathalie MARTIN[1], Emeric DERUY[1], Elisa TOMELLINI[1], Nicolas MALAQUIN[1], Fatima BOUALI[1], Laure SABATIER[2], Nicolas WERNERT[3], Sébastien PINTE[4,1], Eric GILSON[4], Albin POURTIER[1], Olivier PLUQUET[1] and Corinne ABBADIE[1 *].

[1] Univ. Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR8161, Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, F 59 000 Lille, France

[2] CEA Life Science Division, Fontenay-aux-Roses, France

[3] Institute of Pathology, University of Bonn, Bonn, Germany

[4] CNRS, UMR7284, INSERM U108, University of Nice Sophia Antipolis, Institute for Research on Cancer and Aging, Nice, Nice 06107, France

*Corresponding author. Mailing address: UMR8161, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, CS 50447, 59021 Lille Cedex, France. Phone: 33-3-20-87-11-02. Fax: 33-3-20-87-11-11.

e-mail: corinne.abbadie@ibl.cnrs.fr

Running title: SSBs and senescence

Key words: senescence, cancer initiation, DNA Single-Strand Breaks, PARP1, p16 keratinocytes, oxidative stress, HMEC.

Abstract

The main characteristic of senescence is its stability which relies on the persistence of DNA damage. We show that unlike fibroblasts, senescent epithelial cells do not activate an ATM/ATR-dependent DNA Damage Response (DDR), but accumulate oxidative-stress induced DNA Single-Strand Breaks (SSBs). These breaks remain unrepaired because of a decrease in PARP1 expression and activity. This leads to the persistence of XRCC1 foci that engage a signaling cascade involving the p38MAPK and leading to p16 up-regulation and cell cycle arrest. Importantly, the default in SSB repair also leads to the emergence of post-senescent transformed and mutated precancerous cells. In human tissues such as skin, XRCC1 foci accumulate with age in the epidermal cells in correlation with a loss of PARP1, whereas DDR foci accumulate mainly in dermal fibroblasts. These findings point SSBs as a DNA damage encountered by epithelial cells with aging which could fuel the very first steps of carcinogenesis.

Introduction:

All normal human cells display a limited proliferative life span, at the end of which they enter a state known as senescence [1]. Cell senescence occurs in vivo as well as in vitro [2–4] and is primarily characterized by a cell cycle arrest. The senescent phenotype also includes cell enlargement, increase in Senescence Associated-β-Galactosidase (SA-β-Gal) activity reflecting an expansion of the lysosomal compartment [2,5], increase in autophagic activity [6,7], altered chromatin organization [8] and a specific inflammatory secretome [9–12]. Senescence is triggered by various cellular stresses including telomere erosion or dysfunction [13], persistent DNA damage [14], strong mitogenic signals [15] and oxidative stress [16]. The robustness and irreversibility of the senescent cell cycle arrest and the presence of numerous senescent cells in pre-neoplastic lesions [17–20] suggest that senescence is an onco-suppressive safeguard mechanism that opposes the development of malignant cancer. The underlying molecular mechanisms were established using mainly normal human fibroblasts in which it was shown that senescence is accompanied by telomere shortening and accumulation of irreparable DNA double strand breaks (DSBs) which both induce a robust and persistent DNA Damage Response (DDR) orchestrated by the ATM/ATR kinases, and a sustained activation of the p53/p21(TP53/CDKN1A) pathway followed by permanent cell cycle arrest [13–15]. This is in accordance with the fact that sarcomas (fibroblast-originating tumors) are very rare in humans (less than 1% of total human cancers) with an incidence which does not vary with age. In contrast, this is in opposition with the fact that carcinomas (epithelial cell-originating tumors), that are the most prevalent cancers in humans, have an incidence which dramatically increases with advancing age. One presently proposed explanation for the increase in carcinoma incidence with age is the

senescing of the fibroblasts of the microenvironment whose secretome was shown to promote the tumoral development of already premalignant cells. However, this senescent secretome was found to have no transforming effect on normal cells [21]. This suggests that the very first steps of carcinogenesis at advanced age are activated by some other unknown mechanisms. These mechanisms could potentially be intrinsic to epithelial cell senescence. Indeed, we and others have provided evidence that in vitro cultured Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEKs) and Human Mammary Epithelial Cells (HMECs) spontaneously overcome senescence and give rise to transformed or genetically unstable cells [22–24]. We have shown that the post-senescent NHEKs are generated from a few fully senescent mother cells [24], suggesting that NHEKs undergo some modification during senescence, including potentially mutagenic DNA damage that predispose them for neoplastic transformation.

In the NHEKs model, we have established that senescence is induced, at least in part, by a NF-κB→MnSOD→H_2O_2 pro-oxidant pathway [25]. This pathway has deleterious consequences and leads to the final death of most senescent NHEKs by autophagic programmed cell death [24,26]. Paradoxically, this pathway also has the capacity to promote post-senescence neoplastic evasion, in correlation to its ability to induce oxidative DNA damage [24]. The most abundant oxidative-stress induced DNA lesions are Single-Strand Breaks (SSBs). They arise either directly via the fragmentation by oxidation of the phosphate-deoxyribose backbone or indirectly during the repair of oxidized bases by the mechanism of Base Excision Repair (BER), at the step of the enzymatic excision of the damaged base [27,28]. Mammalian cells have evolved SSB repair (SSBR) pathways and are assumed to be relativity tolerant to these oxidative DNA damages which are not lethal. However, oxidized

bases are reported as highly mutagenic [29], and unrepaired SSBs can become clastogenic through the generation of one-ended DSBs resulting from collapsed replication forks [27]. Hence, oxidative DNA damages could be discreet but potent inducers of tumorigenesis.

We report here that in contrast to fibroblasts which undergo an irreversible senescence associated with accumulation of persistent telomeric and non telomeric DDR foci, epithelial cells such as NHEKs and HMECs accumulate persistent SSBR foci which drive the establishment of a transient senescent plateau followed by emergence of clones of transformed and mutated cells.

Results:

NHEKs exhibit a transient senescence plateau followed by neoplastic escape

To find out senescence-associated molecular mechanisms that could be involved in tumor initiation, we took advantage of comparing two cell types which differ in their ability to spontaneously evade senescence and generate neoplastic cells: Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDFs) and Normal Human Epidermal Keratinocytes (NHEKs). Isogenic NHDFs and NHEKs were used in all experiments in order to avoid any difference due to individual polymorphism. Cells were grown at the atmospheric O_2 tension which is nearly normoxic for cells from the epidermis and partially hyperoxic for cells from the dermis [47,48] . NHDFs reach senescence after an exponential growth phase lasting 50 to 70 PDs (Fig.1A). The senescence plateau is associated with cell-size enlargement (Fig.1A), cell flattening (Fig.1A), increase in SA-β-Gal activity (sup Fig.1A) and cell cycle arrest in G1 (Fig.1B, sup Fig.1B) associated with activation of the p53/p21 pathway (Fig.1C). NHDFs stay in this stage for a very long period, up to several months, without significantly dividing or dying (data not shown). In comparison, NHEKs enter senescence after only 10 to 15 PDs (Fig.1A). NHEKs display the same senescence markers as NHDFs including a flattened and enlarged morphology (Fig.1A), an increase in SA-β-Gal activity (sup Fig.1A) and a cell cycle arrest (Fig.1B, sup Fig.1A and B). However, their cell cycle arrest is not associated with activation of the p53/p21 pathway but of p16/Rb (CDKN2A/RB1) pathway instead (Fig.1C, sup Fig. 2). Moreover, in contrast to NHDFs, their senescence plateau is transient. While most senescent NHEKs die by autophagic programmed cell death [26], about 1 out of every 10,000 cells escapes autophagic cell death [30] and undergoes an unusual budding mitosis which generates clones of standard-sized cells that have lost the SA-β-Gal staining, re-proliferate and

rapidly supplant senescent cells in the culture dishes (Fig.1A, sup Fig.3 and [24]). A transcriptomic analysis revealed that these cells display a gene signature of pre-transformation [31]. Moreover, these cells exhibit a partial Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), with an increase in expression of TWIST and SLUG, two transcription factors involved in the regulation of EMT [32] (Fig.1D), a decrease in expression of the epithelial markers MET (Fig.1E), a slight decrease in expression of E-cadherin (CDH1) (Fig.1E), an increase in expression of F2R (TR, PAR1) (Fig.1D and E), a protease-activated receptor involved in migration, invasion and metastasis [33], and an increase in expression of ADAM10, a transmembrane metalloproteinase which has numerous substrates involved in cancer progression [34] (Fig.1E). This partial EMT is drastically exacerbated when these cells are exposed to the secretome of senescent NHDFs, with acquisition of a fibroblastoid morphology and increase in migratory capacities [35]. Post-senescence emergence might occur in vivo with aging since rare small islets of keratinocytes of the basal layer of the epidermis expressing F2R were detected in aged skin [33]. Remarkably, post-senescent cells have accumulated mutations as assessed by *hprt* assays (Fig.1F) and were shown to be able to form disseminated skin hyperplasia and small carcinomas when xenografted into nude mice [24]. Due to of all these properties of transformation and tumorigenicity, we called these cells Post-Senescent Neoplastic Emergent (PSNE) cells. This ability of NHEKs to produce PSNE cells was systemically obtained with each cell donor regardless of sex, age or race (sup Fig.4 and [24,30,31,35]).

Senescent NHEKs do not activate the DDR pathway

Since one of the most potent inducer of senescence is telomere shortening, we investigated the telomere status at senescence in the two cell types by FISH

performed on interphasic cells as well as on metaphase chromosome spreads. As expected, we observed a drastic decrease in telomeric signal in NHDFs at senescence. In contrast, most of the chromosomes remained telomere-positive in senescent NHEKs (Fig.2A and B), although the telomerase is not reactivated [24]. Therefore, most NHEKs have still a doubling potential when reaching the senescence plateau.

Since senescence was shown to be induced by a DDR signalization emanating from shortened telomeres but also from DSBs elsewhere in the genome [34], we investigated DDR activation by immunofluorescence and western-blotting experiments in the two cell types. Nuclei of almost all senescent NHDFs displayed three to five large foci of phosphorylated ATM, H_2AX, CHEK2, and 53BP1 (Fig.2C and D) and were positive for the activated form of p53 phosphorylated on serine 15 (Fig.2D and E). To determine whether the DDR foci of senescent NHDFs were telomere-induced foci (TIFs), we performed a co-detection of 53BP1 and the telomeric protein TRF2. We found that some, but not all, 53BP1 foci detected at senescence were located at telomeres (sup Fig.5). In striking contrast to NHDFs, NHEKs did not activate DDR signaling pathway at senescence plateau and most of them were negative for activated p53 (Fig.2C-E).

Senescent NHEKs have a dysfunctional SSBR pathway

Since senescent NHEKs do not accumulate any telomeric or non-telomeric DDR foci, we wondered what could induce their cell cycle arrest. We examined whether they accumulate SSBs and activate the SSBR pathway. To quantify SSBs, we performed in tandem neutral (pH8) and alkaline (pH12.3) comet assays that are indicative of DSBs and of the sum of SSBs+DSBs respectively. The results were analyzed by

calculating the tail moments, which reflect the extent of DNA breaks per comet-positive cell. The tail moments at pH8 increased at senescence only in NHDFs, whereas at pH12.3 they increased in both NHEKs and NHDFs (Fig.3A and sup Fig.6A), indicating that NHEKs accumulate only SSBs at senescence, whereas NHDFs accumulate both SSBs and DSBs.

To examine the activation of the SSBR pathway, we performed immunofluorescence assays directed against XRCC1, a protein recruited at the sites of SSBs to function as a scaffolding platform for SSBR [37, 38]. For the specificity of the antibodies used, see sup Fig.6B and C. We observed an increase in XRCC1 foci at senescence in both cell types, but more prominently in NHEKs than in NHDFs (Fig.3B and sup Fig.6B). Since XRCC1 also functions during BER, we wanted to distinguish the XRCC1-containing SSBR foci from the XRCC1-containing BER foci. To accomplish this, we performed double immunofluorescences against XRCC1 and hOGG1, the DNA glycosylase responsible for the excision of damaged bases [39, 40]. Most of both senescent NHEKs and NHDFs displayed XRCC1 foci but no hOGG1 foci (sup Fig.7A). Therefore, senescence is accompanied by an accumulation of direct SSBs and activation of the SSBR pathway, more prominently in NHEKs than in NHDFs.

To understand why NHEKs accumulate more SSBs than NHDFs, we investigated their repair capacities. We examined in a first step the expression of PARP1, a key enzyme for SSB recognition and efficient repair [41]. RT-PCR, western-blot and immunofluorescence analyses revealed that the PARP1 level dramatically decreased in NHEKs at senescence, whereas levels remained nearly stagnant in senescent NHDFs (Fig.3C and D and sup Fig.7C; see sup Fig.7B for the specificity of the PARP1 antibody). We further investigated PARP1 activity by checking the production of Poly(ADP)Ribose (PAR). To achieve this, NHEKs and NHDFs were treated with

100µM H_2O_2, to induce numerous SSBs, and subsequently, the production of PAR was analyzed by western-blot and immunofluorescence (see sup Fig.7B for the specificity of the antibody). The results show that exponentially growing versus senescent NHDFs respond to H_2O_2 by producing PAR nearly equally, whereas senescent NHEKs were almost completely unable to produce PAR (Fig.3D and sup Fig.7C).

With diminished PARP1 expression and activity, senescent NHEKs should be unable to repair their SSBs. To test this assumption, we processed cells for BrdU incorporation to mark the foci undergoing repair. Senescent NHDFs displayed foci of BrdU incorporation that co-localized with XRCC1 foci, whereas senescent NHEKs did not show any BrdU foci despite the presence of numerous XRCC1 foci (Fig.3E). We then analyzed by immunofluorescence the recruitment of the main enzymes implicated in the DNA ligation step of the SSBR process, ligases 1 and 3 and the ring-shaped DNA clamp protein PCNA [42–45]. In about 20% of senescent NHDFs, ligase 1 and 3 and PCNA were found to be recruited at foci that partially co-localize with XRCC1 foci. In contrast, senescent NHEKs did not show any ligase 1 and 3 foci (Fig.3E).

Taken together, these results evidence that the SSBR pathway in senescent NHEKs is compromised by a decrease in PARP1 expression and activity, leading to an accumulation of unrepaired SSBs. NHDFs also displays numerous SSBs at senescence, but with a functional SSBR pathway, these SSBs are continuously repaired.

Persistent XRCC1 foci engage a p38MAPK-p16/Rb cell cycle arrest pathway

Since senescent NHEKs do not undergo significant telomere shortening nor accumulate non-telomeric DSBs and therefore do not activate a DDR pathway, we wondered whether their unrepaired SSBs could signal for their cell cycle arrest. To address this question, we first restored PARP1 expression in pre-senescent NHEKs by infecting them with an adenoviral vector encoding PARP1 (AdPARP1-V5). This delayed the onset of senescence by 9 days and 3 PDs (Fig.4A-D) in correlation with a drastic decrease in XRCC1 foci but no change in 53BP1 foci (Fig.4E). We then restored PARP1 expression in already senescent NHEKs. P16 up-regulation and Rb hypophosphorylation were abrogated upon the re-expression of PARP1, whereas the expression of p21 remained unchanged (Fig.4F). This demonstrates that the p16-dependent cell cycle arrest of senescent NHEKs occurs in consequence to the accumulation of unrepaired SSBs.

We then investigated the pathway leading from unrepaired SSBs to p16 up-regulation. We first wondered how XRCC1 foci establish with a decreased expression and activity of PARP1 since it is established that PARP1 serves to recruit XRCC1 [46]. To answer to this question, we treated exponentially growing and senescent NHEKs with H_2O_2 and measured by confocal microscopy the formation of PAR and XRCC1 foci. The results indicate that PAR foci were generated in senescent NHEKs, but their intensity was very faint compared to that in exponentially growing cells. In contrast, XRCC1 foci were generated at a similar intensity in exponentially growing and senescent NHEKs (Fig.5A), showing that the decrease in PARP1 expression and activity at senescence does not impair the formation of XRCC1 foci. We then examined the dynamics of the XRCC1 foci. Again we treated exponentially growing and senescent NHEKs with H_2O_2 and followed the appearance/disappearance of XRCC1 foci. The results indicate that in contrast to exponentially growing NHEKs in

which XRCC1 foci were dissociated in 10min, in senescent NHEKs XRCC1 foci persisted for more than 2hrs (Fig.5A). Therefore, the decrease in PARP1 expression and activity could impair the dynamics of XRCC1 and make the XRCC1 foci becoming persistent. To confirm this last point, we restored PARP1 expression in senescent NHEKs, using an adenoviral vector, and we inhibited or not its activity using two chemical inhibitors, 3-aminobenzamide (3AB) or Veliparib (ABT-888). Twenty four hours post-infection, we observed the formation of PARP1 foci and, concomitantly, the disappearance of XRCC1 foci. This disappearance was abolished when PARP1 activity was inhibited by 3AB or ABT-888 (Fig.5B). This demonstrates that the persistence of XRCC1 foci is caused by the poor PARP1 expression and activity.

We then hypothesized that these persistent XRCC1 foci could be the starting point of a signaling cascade leading to p16 up-regulation. To investigate this hypothesis, we invalidated XRCC1 with siRNAs in pre-senescent NHEKs. This led to an abrogation of p16 up-regulation and Rb hypophosphorylation (Fig.6A). Since p38MAPK (MAPK14) was reported to be involved in stress-induced senescence [47–51], we hypothesized that it could be involved in the signalization emanating from the XRCC1 foci. We first compared the expression and activation of p38MAPK in exponentially growing and senescent NHEKs. The results indicate that p38MAPK is activated at senescence in NHEKs (Fig.6B). Then, we invalidated XRCC1 in senescent NHEKs and examined the impact on the activation of p38MAPK. The results indicate that it was almost completely abrogated, whereas phosphorylation of ERK1/2 was unaffected (Fig.6C).

Altogether, these results indicate that a decrease in PARP1 expression and activity stabilizes XRCC1 at the SSBR foci and engages in consequence a signaling

pathway involving p38MAPK. This pathway ends up in the up-regulation of p16 and in the onset of senescence in keratinocytes.

Accumulation of unrepaired SSBs is sufficient for inducing post-senescence neoplastic escape

The persistence of unrepaired SSBs at senescence could induce mutations and genetic instability and consequently PSNE. To test this hypothesis, we invalidated PARP1 by RNA interference in exponentially growing NHEKs and monitored them for senescence and PSNE. Premature senescence associated with p16/Rb activation occurred 3 days post-transfection, in correlation with a huge accumulation of XRCC1 foci and unrepaired SSBs (Fig.7A-C, sup Fig.8). Importantly, this premature senescence plateau was followed by the emergence of clones of cells that reproliferated (Fig.7A, sup Fig8A-C). The emergence frequency, measured as the number of clones by initially plated senescent cells, was 1.6 fold higher than the frequency of normal PSNE of control cells (Fig.7D). To verify that these clones were generated by fully senescent progenitors, we performed a filiation tracer assay: cells at the (premature) senescence plateau were analyzed by flow cytometry according to their size and granularity. About thirty percent of the largest and most granular cells, i.e. fully senescent cells, were sorted, plated at low density, stained with CFDA SE to stain their membranes and monitored for PSNE. Emerging clones appeared around senescent cells about one week later; the emerging cells were stained with the filiation tracer, proving they came from the division of a stained mother senescent cell (Fig.7E). Finally, to examine whether siPARP1-induced PSNE cells were transformed and mutated as normal PSNE cells, we examined the expression of F2R and MET. They were expressed in siPARP1-induced emergent cells as in control PSNE cells

(Fig.7F). Moreover, *hprt* assays indicate that the siPARP1-induced emergent cells were mutated as the control PSNE cells (Fig.7G).

To verify that these effects on senescence and PSNE were due to the decrease in PARP1 activity and not only to the decrease in PARP1 expression, we treated exponentially growing NHEKs with 3-AB. This induced, in a dose-dependent manner, a p16-dependent premature senescence associated with a massive accumulation of SSBs (sup Fig.9A-E). Despite continuing the inhibitory treatment, the premature senescence was followed by an emergence of transformed cells (sup Fig.9F and G). Therefore, the sole decrease in PARP1 expression and activity recapitulates SSB persistence, senescence onset and PSNE.

SSB accumulation, senescence and PSNE are subsequent to oxidative stress

We next hypothesized that the SSBs involved in senescence and PSNE were generated by oxidative stress. Indeed, kinetics records of SSBs, DSBs and ROS levels revealed that SSBs and ROS are simultaneously accumulated at just the beginning of the senescent plateau (sup Fig. 10A). To formally determine whether the SSBs involved in senescence and PSNE are generated by oxidative stress, exponentially growing NHEKs were treated with antioxidants, namely catalase, an enzyme which specifically dismutates H_2O_2, catalase-PEG, a modified form of catalase designed to enter into cells, or N-acetylcysteine (NAC) a general antioxidant (see sup Fig.10B for the checking of their efficacy). All three antioxidants delayed the occurrence of plateau by at least 9 days and 3.5 PDs (Fig.8A and B, sup Fig.10C and D) and induced a clear decrease in SSB level without affecting DSBs which remained rare (Fig.8C and D). Importantly, no PSNE clones appeared in the antioxidant-treated

cultures that remained at the senescence plateau for 10 days (Fig.8A) and finally died (data not shown).

In parallel, exponentially growing NHEKs were treated every day with 20µM H_2O_2. This treatment induced premature senescence after three days (Fig.8A, sup Fig.10C and D). Comet assays and XRCC1/53BP1 immunofluorescences revealed that this H_2O_2-induced premature senescence was accompanied by a significant increase in SSB level, whereas no DSB were generated (Fig.8E and F). Once the premature senescence plateau was established, we stopped the H_2O_2 treatment and monitored the culture for PSNE. Emergence clones appeared seven days later (Fig.8G, sup Fig.10C and D). These clones expressed transformation markers (Fig.8H) and contained mutations (Fig. 8I).

Therefore, these results indicate that the SSBs at the origin of senescence and PSNE in NHEKs are generated by oxidative stress.

SSBR and DDR foci accumulate in aged skin, in epidermis and dermis respectively

To assess the relevance of the above results to aging, we investigated the presence of DDR and SSBR foci, as well as the expression of PARP1 in skin sections taken from healthy young *versus* aged human donors. Immunohistodetections of PARP1, XRCC1, 53BP1, and Vimentin (to highlight the fibroblasts within the dermal extracellular matrix) were performed on sections from 3 young and 4 old donors (sup Table 2). The results indicate that PARP1 is present in the nucleus of 55% of epidermal cells of young donors, but only in 10% of epidermal cells of aged donors. In correlation, more than 30% of epidermal cells displayed XRCC1 foci in aged skins compared to about 10% in young skins. In contrast, less than 10% of epidermal cells

displayed 53BP1 foci, without any significant change with age (Fig.9). Conversely, almost all fibroblasts of the dermis were positive for PARP1 and only about 5% displayed XRCC1 foci, without any significant change with age (Fig.9). Regarding DDR foci, about 20% of dermal cells displayed one or two 53BP1 foci in aged skins compared to only 5% in young skins (Fig.9).

Subsequently, we wondered whether the epidermis would suffer from an oxidative stress that could increase with aging and contribute to SSB accumulation. Since we had previously shown that, in keratinocytes, senescence is induced by NF-κB activation, MnSOD (SOD2) upregulation and H_2O_2 overproduction [24,25], we investigated the staining pattern of MnSOD in skin sections from 3 young and 3 old donors (Sup Table 2). In aged skin, almost all epidermal cells displayed an increment in MnSOD intensity (Fig.9). In contrast, we did not detect any apparent change regarding MnSOD staining with aging in dermal fibroblasts (Fig.9).

Therefore, the skin acquires the same oxidative stress, the same decrease in PARP1 expression and the same DNA breaks during the process of aging in vivo as during senescence in vitro.

As NHEKs, senescent HMECs activate a dysfunctional SSBR pathway and are able to generate post-senescent transformed and mutated cells

In order to determine whether the role of SSBs in senescence and PSNE is specific to NHEKs or can be generalized to other epithelial cell types, we investigated some of the key results in HMECs which were shown to display a growth plateau, referred in the literature as senescence, selection, M0 or stasis, followed by an emergence of cells having acquired genomic changes [22].

We first verified that, in our hands, HMECs were able to enter a bona fide senescence plateau and then generate post-senescence emergent cells (Fig.10A-C). We then examined which cell cycle arrest pathway was activated at senescence. We show that, as NHEKs, HMECs at senescence up-regulate p16 and hypophosphorylate Rb. P53 level remained unchanged (Fig.10B). We characterized the post-senescent emerging cells and show that they express the same transformation markers as NHEKs, i.e. an increase in TR and vimentin expression and a decrease in E-cadherin and MET (Fig.10D). Moreover, using *hprt* assays, we show that, as NHEKs, post-senescent HMECs are indeed mutated (Fig.10E).

We then examined the expression and activity of PARP1 at senescence and searched for the potential accumulation of XRCC1 foci. We found that, as NHEKs, senescent HMECs down-regulate PARP1 and are unable to synthesize PAR upon H_2O_2 challenge (Fig.10F). In consequence, they massively accumulate persistent XRCC1 nuclear foci (Fig.10G). As NHEKs, they do not significantly accumulate DDR foci (Fig.10G).

Discussion:

Senescence is known as a state of irreversible cell cycle arrest resulting from the accumulation of persistent telomeric and non-telomeric DDR foci that activate the p53/p21 tumor suppressor genes. In this report, we confirm these results for fibroblasts but present new *in vitro* and *in vivo* data concerning keratinocytes and mammary epithelial cells. We show that epithelial cells at senescence do not suffer from significantly shortened telomeres, do not accumulate DSBs, nor do they activate the DDR pathway and therefore do not significantly activate the p53/p21 pathway. Instead, they suffer from a decrease in PARP1 expression, which compromises the repair of SSBs generated by oxidative stress. In consequence, the SSBR foci freeze at the stage of XRCC1 aggregation and become persistent. These persistent XRCC1 foci initiate a signalization, through p38MAPK activation, which leads to up-regulation of p16 and to cell cycle arrest. These results qualify the paradigm on the role of DNA damage in senescence: they confirm the persistence of unrepaired DNA damages as a universal cause of senescent cell cycle arrest; however, the nature of the damage, the nature of the persistent foci and, down-stream, the nature of the activated cell cycle arrest pathway would be cell-type specific. This cell-type specificity is also observed in aged tissues, at least in aged skin. Therefore, it becomes appropriate to use XRCC1 foci in parallel to 53BP1 or γH_2AX foci as *in vitro* and *in vivo* markers of senescence.

It is known for several years that the p16/Rb pathway plays a central role in inducing senescence in keratinocytes and other epithelial cells, independently of the telomere status [52–54]. Some studies had suggested that oxidative stress is one trigger for the activation of the p16/Rb pathway at senescence through the MAP kinase pathway [55,56], but the mechanism of oxidative damage sensing and the composition of the

signaling cascade up to p16 remained to be determined. Here, we demonstrate the causal links between the accumulation of ROS, the accumulation of SSBs, the activation of the p16/Rb pathway, and the cell-cycle arrest. Moreover, we evidence for the first time the major steps of the pathway: unrepaired SSBs accumulate upon the synergistic increase in ROS level and decrease in PARP1 expression and activity; the remaining expression and activity of PARP1 is enough to recruit XRCC1 at the foci but is inadequate to ensure the proper subsequent events of the SSBR pathway; consequently, XRCC1 foci persist and become a nucleating point for a new pathway leading first to the activation of the p38MAPK and then to the up-regulation of p16. Interestingly, the sole invalidation of PARP1 in proliferating keratinocytes is sufficient to induce a premature senescence plateau, including not only the activation of the p16/Rb pathway but also all the other major characteristics of senescence, i.e. cell enlargement and SA-β-Gal activity. This suggests that not only the cell cycle arrest, but some of the other changes characteristic of senescence may be the consequence of this XRCC1/p38MAPK signalization. Therefore, the decrease in PARP1 expression and the increase in oxidative stress are the key initiating events of senescence in epithelial cells. Persistent XRCC1 foci function as sensors of unrepaired oxidative SSBs, and p38MAPK as a mediator protein common to several downstream effector pathways. All these events also take place during aging, in most epidermal cells.

Senescence is recognized as an intrinsic tumor suppressor mechanism. This assumption relies on the stability of the cell cycle arrest which is itself the consequence of the persistence of the DDR foci [9]. However, with respect to epithelial cells, our past and present results suggest that senescence is intrinsically both tumor suppressor and tumor promoter. These two properties, although opposite, rely on the

same characteristic of epithelial cell senescence: its transience. Indeed, in one side, for most cells in a population of epithelial cells, senescence ends up in autophagic programmed cell death [7,26], hence making this senescence a tumor suppressor mechanism very effective, more effective than an irreversible cell cycle arrest. In another side, for a small subpopulation, senescence is followed by an entry in an atypical mechanism of cell division by budding mitosis which generates mutated, transformed and tumorigenic cells. The accumulation of unrepaired SSBs is sufficient for the occurrence of this phenomenon, in addition paradoxically to its involvement in the onset of senescence. How unrepaired SSBs contribute to neoplastic emergence has to be investigated. One can speculate on the initiation of a mutagenic repair pathway. Since decrease in PARP1 expression is at the origin of both senescence and post-senescence neoplastic emergence, PARP1 could be viewed as both a tumor promoter and a tumor-suppressor gene. In support, it was shown that a PARP1 pharmacological inhibitor was able to induce senescence in cancer cells when used in conjunction with ionizing radiations [57–60]; in contrast, PARP-1 deficient mice were shown to be healthy after birth but develop signs of accelerated aging, epidermal hyperplasia, and several types of carcinomas and are prone to develop tumors upon exposition to base damaging agents [61–65].

In conclusion, senescence results from the persistence of a DNA damage signalization, but the exact nature of the damages could vary in different cell types depending on their repair capacities and could dictate completely different outcomes. Namely, persistent DSBs, including telomeric ones, dictate a permanent tumor-suppressor cell cycle arrest, whereas persistent SSBs are permissive to mutation and senescence evasion.

Material and Methods

Cell culture, reagents, calculation of population doublings, SA-β-Gal assays

Normal Human Dermal Fibroblasts (NHDFs) and Epidermal Keratinocytes (NHEKs) were purchased from Promocell, Tebu – bio, GIBCO or Cambrex. Human Mammary Epithelial Cells (HMECs) were purchased from Bio-Whittaker. For details, see sup Table 1.

Cells were grown at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 and at the atmospheric O_2 tension. NHEKs were cultured in the KGM-Gold bulletkit medium (Clonetics). It consists of modified MCBD153 with 0.15mM calcium, supplemented with bovine pituitary extract, epidermal growth factor, insulin, hydrocortisone, transferrin, and epinephrine. Such a serum-free low-calcium medium has been shown to minimize keratinocyte terminal differentiation [66]. NHDFs were cultured in FGM-2 bulletkit medium. HMECs were cultured in MEGM bullekit medium.

Cells were seeded as recommended by the supplier and subcultured at 70% confluence. The number of population doublings (PDs) was calculated at each passage by using the following equation: PD=ln (number of collected cells/number of plated cells)/ln2.

SA-β-Gal assays were performed as described by Dimri et al. [2]. SA-β-Gal-positive cells were counted in 5 to 10 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells for each case in all experiments.

Catalase (C1345), catalase-PEG (C4963) and N-acetylcysteine (A7250) were purchased from Sigma and diluted in PBS.

PARP inhibitors used were 3-aminobenzamide (A0788, Sigma Aldrich) and ABT-888 (Veliparib) (A3002, ApexBio).

Calculation of PSNE frequency, filiation tracer assay

The PSNE frequency was calculated as follows: senescent NHEKs were plated at low density (350 cells per cm^2) and monitored for PSNE clone appearance by carefully scanning each culture dish under a phase contrast microscope at least twice and at different days after plating. The frequency of PSNE was calculated as the ratio of the number of recorded clones to the number of initially seeded senescent cells.

Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit was purchased from Life technologies (V12883, Molecular Probes). Filiation tracer assays were performed as recommended by the supplier. Briefly, sorted senescent cells were incubated with 10µM of CFDA SE probe for 30min at 37°C. After that, cells were fixed 15min at room temperature using 3.7% formaldehyde, washed with PBS and mounted in Glycergel® (Dako).

Western-Blotting

Cells were lysed in SDS–polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) sample buffer (50mM Tris pH6,8; 4% SDS; 20% glycerol; 5% β-mercaptoethanol and bromophenol blue). Proteins were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C Extra, Amersham). Primary antibodies used were: mouse anti-PCNA (M0879, Dako), rabbit anti-53BP1 (sc-22760, Santa Cruz), rabbit anti-phospho53BP1(S25) (A300-652A, Bethyl Labroratories), rabbit anti-ATM (sc7230, Santa Cruz), rabbit anti-phosphoATM (Ser1981) (sc-47739, Santa Cruz), mouse anti-CHK2 (3440, Cell Signaling), rabbit anti-phosphoCHK2 (Thr68) (2661, Cell Signaling), mouse anti-p53 (sc126, Santa Cruz), rabbit anti-phosphop53 (Ser15) (ab1431, Abcam), mouse anti-p21 (CIP1) (sc-6246, Santa Cruz), goat anti-ATR (sc-1887, Santa Cruz), rabbit anti-phospho ATR (Ser 428) (sc-109912, Santa Cruz), rabbit anti- phosphoCHK1 (Ser345) (abcam, ab47318), mouse anti-CHK1 (sc-8408,

Santa Cruz), rabbit anti-p38MAPK (9218, Cell singaling), rabbit anti-phosphop38MAPK (Thr180/Tyr182) (9211, Cell signaling), mouse anti-p16 (sc1661, Santa Cruz), mouse anti-p16 (550834, BD Pharmingen), mouse anti-PAR (AM80, clone 10H, Merck Chemicals), rabbit anti-PARP1 (ab6079, Abcam), mouse anti-XRCC1 (ab47920, Abcam), rabbit anti-XRCC1 (2735, Cell Signaling), rabbit anti-XRCC1 (sc-11429; Santa Cruz), mouse anti-γH2AX (NB100-78356, Novus Biologicals), mouse anti-Rb (9309, Cell Signaling), rabbit anti-phosphoRb (S807-811) (9308, Cell Signaling), mouse anti-V5 (961-25, Invitrogen), mouse anti-GFP (sc-9996, Santa Cruz), mouse anti-F2R (sc-13503, Santa Cruz), mouse anti-MET (clone 3D4, Invitrogen), mouse anti-vimentin (sc-6260; Santa Cruz) and mouse anti-GAPDH (sc-32233, Santa Cruz).

Secondary antibodies were peroxidase-conjugated anti-mouse IgG, anti-rabbit IgG or anti-goat IgG (715-035-151, 711-035-152 and 705-035-003 Jackson-ImmunoResearch Laboratories). Peroxidase activity was revealed using an ECL kit (RPN2106, Amersham Biosciences) or ECL Prime kit (RPN2236, Amersham Biosciences) or SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (34076, Thermo Scientific).

Immunofluorescence on cells and tissue sections

Cells were fixed in cold methanol/acetone (vol/vol) or PFA 4% in PBS for 10min, and washed in PBS. Non-specific binding was blocked by incubation in 5% non-fat milk in PBS. Human skin samples were obtained from the Bonn University (Germany) anatomopathology department. They were fixed in formalin, paraffin embedded, and sectioned at 10µm. Sections were dewaxed and rehydrated according to standard procedure. Non-specific binding was blocked by incubation in 5% BSA in PBS.

Primary antibody was incubated for 1hr at 37°C or overnight at 4°C. Primary antibodies used were: mouse anti-γH2AX (NB100-78356, Novus Biologicals), rabbit anti-53BP1 (sc-22760, Santa Cruz), mouse anti-53BP1 (NBP2-25028, Novus Biologicals), mouse anti-DNA ligase3 (GTX70147; GeneTex), mouse anti-DNA ligase1 (K0190-3. Medical and Biological Laboratories), mouse anti-XRCC1 (ab47920, Abcam), rabbit anti-XRCC1 (2735, Cell Signaling), rabbit anti-XRCC1 (sc-11429; Santa Cruz), rabbit anti-phosphoATM (Ser1981) (sc-47739, Santa Cruz), mouse anti-p53 (sc126, Santa Cruz), rabbit anti-phosphop53 (Ser15) (ab1431, Abcam), mouse anti-CHK2 (3440, Cell Signaling), rabbit anti-phospho CHK2 (Thr68) (2661, Cell Signaling), mouse anti-PAR (AM80, clone 10H, Merck Chemicals), rabbit anti-PARP1 (ab6079, Abcam), mouse anti-PARP1 (4338-MC-50, Trevigen), mouse anti-vimentin (sc-6260; Santa Cruz), mouse anti-GFP (sc-9996, Santa Cruz) and sheep anti-MnSOD (574596, Calbiochem). After washings in PBS, cells or sections were incubated with Rhodamine anti-IgG Mouse (715-296-150, Jackson Immuno Research Laboratories), AlexaFluor 488 anti-IgG Rabbit (A21206; Molecular Probes), AlexaFluor 488 anti-IgG Mouse (A-21202, Molecular Probes) or AlexaFluor 555 anti-IgG Sheep (A-21436; Molecular Probes) for 60min at room temperature. For double immunofluorescence, the two primary and two secondary antibodies were co-incubated. Finally, cells or sections were washed in PBS, nuclei were stained for 5min with Hoechst (33258, Sigma-Aldrich) at 1µg/mL, and mounted in Glycergel® (Dako). Optical sectioning images were taken using LSM 780 Confocal Microscope or AxioImager Z1-Apotome (Zeiss, Germany). AxioVision® or ZEN softwares were used for microscope image analysis (Zeiss).

BrdU-incorporation assays

For staining cells in S-phase, BrdU (10 280 879 001, Roche) was added to cell cultures at 10μM for 4hrs. For staining SSB foci undergoing repair, BrdU was added overnight. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, permeabilized with 0.2% Triton X-100, and incubated with 40U/mL DNase I (M6101, Promega) and 20U/mL Exonuclease III (M1811, Promega) for 30min at 37°C. BrdU was revealed with anti-BrdU mouse IgG (M 0744, Dako) and Rhodamine Red-conjugated anti-mouse IgG (715-296-150, Jackson Immunoresearch laboratories) or AlexaFluor 488 anti-IgG Mouse (A-21202, Molecular Probes).

hprt assay

Cells were plated a low density (700-1,500 cells per cm^2). They were exposed to 100μM of 6-thioguanine (6-TG) (A4882, sigma) twice per day. Cells were fixed in PFA 4% in PBS on days 0, 3 and 6 post-treatment and then stained with 0.05% crystal violet in distilled water. For quantifying the results, the crystal violet was re-dissolved in 2% SDS in distilled water. The color intensity was then quantified by measuring the absorbance at 570nm.

RNA Interference

For PARP1 knockdown, 3 different siRNAs from the on-target plus set of 4 siRNA (J-006656-00-0005, Dharmacon®) were used. The target sequences were: GAUUUCAUCUGGUGUGAUA; GAAAACAGGUAUUGGAUAU; GUUCUUAGCGCACAUCUUG. For XRCC1 knockdown, a pool of 4 different siRNAs (L-009394-00, Dharmacon®) was used. The target sequences are: AAACUCAUCCGAUACGUCA; CCGCAAGCCUGAAGUAUGU; GGAAUGAUGGCUCAGCUUU and AGGCAGACACUUACCGAAA. For p16

knockdown, a pool of 4 different siRNAs (L-009394-00, Dharmacon®) was used. The target sequences were: GAUCAUCAGUCACCGAAGG; AAACACCGCUUCUGCCUUU; UAACGUAGAUAUAUGCCUU and CAGAACCAAAGCUCAAAUA.

In all cases, a non-targeting siRNA pool (siGENOME RISC-Free Control siRNA, Dharmacon®) was used as control. Cells were transfected with 25nM siRNAs using the Lipofectamine™ RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen) in optiMEM (Gibco). After 6hrs of incubation at 37°C, the transfection medium was replaced with fresh culture medium.

Adenoviral infection

Adenovirus encoding V5-tagged PARP1 (SL101030) and non-tagged PARP1 (SL100927) were purchased from SignaGen Laboratories. The generation of a recombinant adenovirus encoding green fluorescence protein (AdGFP) was described in [67]. AdGFP viral titer was determined by a plaque assay on 293 cells and defined as plaque-forming units/mL. Cells were infected by adding virus stocks directly to the culture medium at an input multiplicity of 400 viral particles/cell. After 4hrs of incubation at 37°C, the infection medium was replaced with fresh culture medium.

Cell-cycle analysis by flow cytometry

BrdU (10 280 879 001, Roche) was added to cell cultures at 20μM for 1hr. Cells were fixed with 90% ethanol overnight at 4°C, rinsed in PBS and incubated with 2N HCl/0,5% Triton X-100 at room temperature for 30min. After that, cells were suspended in 0,1M Sodium Tetraborate for 2min. Cells were incubated with anti-

BrdU mouse IgG (M 0744, Dako) for 1hr at 37°C, washed with PBS and incubated with AlexaFluor 488 anti-IgG Mouse (A-21202, Molecular Probes) for 1hr at room temperature. Cells were finally incubated with PBS containing 10µg/mL RNase A and 20µg/mL propidium iodide for 30min at 37°C and then analyzed by flow cytometry on a Facscalibur II. The results were analyzed with the FACSDiva 7.0 software.

Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization (Q-FISH)

Q-FISH experiments were performed either on metaphases or interphasic nuclei.

Metaphase spreads were obtained using a standard method. Briefly, cells were incubated 1hr in Karyomax Colcemid (Invitrogen Corporation), trypsinised, and incubated in a 60mM KCl hypotonic buffer. Cells were fixed with freshly made methanol/acetic acid solution (3:1 v/v), spread onto frozen slides and air dried overnight. Then slides were post-fixed in 4% formaldehyde in PBS for 2min, washed 3 times in PBS, and treated with pepsin (P-7000, Sigma) at 1mg/mL for 10min at 37^{o}C at pH2.0. After a brief wash in PBS, formaldehyde fixation and washes were repeated and the slides were dehydrated with ethanol and air dried. The hybridization mixture, containing 70% formamide, the nucleic acid probes labelled with Cy3 at 0.3µg/µL (Perceptive Biosystems, Ramsey, MN), 1% (W/V) blocking reagent (Boehringer-Mannheim, Gmbh) in 10mM Tris pH7.2, was laid down, a coverslip was added and DNA was denatured for 3min at 80^{o}C. After 2hr-hybridization at room temperature, slides were washed with 70% formamide/10mM Tris pH7.2 (2*15min) and with 0.05M Tris 0.15M NaCl pH 7.5 containing 0.05% Tween-20 (3*5min). Slides were then counterstained with 1µg/mL DAPI and mounted in antifade solution (VectaShield, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA).

Cells grown on sterile coverslips were fixed with 4% formaldehyde, washed three times in PBS and incubated with RNase solution (100µg/ml) for 1hr at 37°C. After that, they were washed three time in SSC 2% and dehydrated by 75%, 95%, and 100% ethanol bathes and finally air-dried for 5 min. Coverslips were incubated with 200 nM TelG-Cy3 probe (F1006, Panagene Inc.) in hybridization buffer (60% formamide, 20 mM Tris-HCl, 20 mM Na2HPO4, 2% SSC, and 0.1µg/ml of salmon sperm DNA) at 80°C for 5min, followed by 2hrs in dark at RT. Cells were then washed three times for 10min with washing buffer (formamide 60%, SSC 2% and Tris-HCl20 mM) and three times for 5min with (SSC 2% and Tween 0.05%). Finally, nuclei were stained for 5min with Hoechst (33258, Sigma-Aldrich) at 1µg/mL, and mounted in Glycergel® (Dako). Optical sectioning images were taken with an Axioplan2 (Zeiss, Germany) microscope equipped with an Apotome device. Telo-PNA fluorescence of more than 50 nuclei for each condition have been analysed using the TFL-TELO program.

Comet Assay

For each condition, 2000 cells were suspended in 80µL of 0.5% low melting point agarose at 42 °C. The suspension was immediately laid onto a comet slide (Trevigen Inc.). Agarose was allowed to solidify at 4°C for 20min. The comet slides were then immersed in prechilled lysis solution (1.2M NaCl, 100Mm EDTA, 10mM Tris, 1% Triton (pH 10)) at 4°C, for 90min in the dark. After this treatment, comet slides were placed in a horizontal electrophoresis unit and allowed to equilibrate in electrophoresis buffer for 10min at 4°C, in the dark. For assessing both SSBs and DSBs, the migration was performed in 300mM NaOH, 1mM EDTA (pH=12,3). After migration, the slides were neutralized with 0.4M Tris (pH=7.5). To detect DSBs, the

electrophoresis buffer was 89mM Tris, 89mM boric acid, 2mM EDTA (pH 8). The migration was performed at 30V for 20min and 40V for 25min for pH=12.3 and pH=8 respectively. After migration, the slides were stained with SYBR Green (1000X; Molecular Probes) according to manufacturer's recommendations. Tail moments (=tail length X DNA in the tail/total DNA) were analyzed using the Tritek Comet Score freeware.

Measure of ROS concentration

Steady-state ROS concentration was measured using non-fluorescent H_2DCFDA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) (D399, Molecular Probes) which diffuses across membranes and is oxidized to fluorescent DCF. Cells were rinsed in PBS, incubated with H_2DCFDA diluted in PBS at 5µM for 15min at 37°C. After that, fluorescence was measured using a fluorometer (Fluostar Optima from BMG Labtech) with FITC filters.

Reverse-transcription Quantitative Real-time PCR (RT-qPCR)

RNAs were isolated with the Nucleospin® kit (Macherey-Nagel). Reverse transcription was carried out for 1hr at 55°C with 1µg total RNA, oligodT primers, dNTPs and Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen; 200 units). Primers for PCR were designed with the qPrimerDepot software (http://primerdepot.nci.nih.gov/). Primer sequences were:

parp1 forward GCCCTAAAGGCTCAGAACGA and reverse CAGAAGGCACTTGCTGCTTG; *twist* forward GGCTCAGCTACGCCTTCTC and reverse TCCATTTTCTCCTTCTCTGGAA, *slug* forward TCGGACCCACACATTACCTT and reverse TGACCTGTCTGCAAATGCTC, *EAR*

forward GAGGCTGAGGCAGGAGAATCG and reverse GTCGCCCAGGCTGGAGTG.

The PCR protocol was as recommended for the Mx3005P Real-time PCR System® (Stratagene). Accumulation of PCR products was measured by SYBR green® fluorescence (SYBR Green® master mix; Applied Biosystems). Raw data analysis was performed with the MxPro® software (Agilent). All target gene transcripts were normalized to the *EAR* transcripts. All experiments were conducted a minimum of three times with independent RNA isolations to ensure reproducibility.

Statistical analyses

Statistical analyses were done using student t-test. Significant differences are indicated with * when $p<0.5$ and with ** when $p < 0.01$. When $p>0.5$, difference are considered as non-significant and are indicated as NS.

Acknowledgements

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Lille 1, the Ligue contre le Cancer (CA's team : Comité du Pas-de-Calais and Comité de la Somme; EG's team is équipe labellisée), the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Institut Pasteur de Lille, the SIRIC OncoLille, Grant INCa-DGOS-Inserm 6041, and the European integrated project RISC-RAD (FI6R-CT2003-508842). J.N. has a fellowship from the Université Lille 2 and from the Association pour la Recherche sur le Cancer. S.M. had a fellowship from the Ministry of Research and from the Fondation pour la Recherche Médicale. E.D. had a fellowship from the Institut Pasteur de Lille and the Région Nord-Pas-de-Calais. N.M. had fellowships from the Centre National de la Recherche Scientifique and the Région Nord/Pas-de-Calais, from the Ligue contre le Cancer, and from the Université Lille 1. O.P. has a Chaire d'Excellence from the Université Lille 2 and the Centre National de la Recherche Scientifique. We thank the Bioimaging Center Lille-Nord de France (Campus Calmette), especially Antonino Bongiovanni and Hélène Bauderlique for imaging and cytometry facilities. We thank Tahsin Khundkar for participating in this work. We thank Géraldine Pottier for excellent technical help. The authors have no conflicting financial interests.

References

1. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **37,** 614–636 (1965).
2. Dimri, G. P. *et al.* 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 (1995).
3. Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D. & Sedivy, J. M. Cellular senescence in aging primates. *Science* **311,** 1257 (2006).
4. Wang, C. *et al.* DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. *Aging Cell* **8,** 311–323 (2009).
5. Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y. & Erusalimsky, J. D. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* **113 (Pt 20),** 3613–3622 (2000).
6. Narita, M., Young, A. R. J. & Narita, M. Autophagy facilitates oncogene-induced senescence. *Autophagy* **5,** 1046–1047 (2009).
7. Gosselin, K. *et al.* Senescent keratinocytes die by autophagic programmed cell death. *Am. J. Pathol.* **174,** 423–435 (2009).
8. Narita, M. *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113,** 703–716 (2003).
9. Campisi, J. & d' Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8,** 729–740 (2007).
10. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. & Peeper, D. S. The essence of senescence. *Genes Dev.* **24,** 2463–2479 (2010).
11. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **153,** 1194–1217 (2013).
12. Rodier, F. & Campisi, J. Four faces of cellular senescence. *J. Cell Biol.* **192,** 547–556 (2011).
13. D' Adda di Fagagna, F. *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426,** 194–198 (2003).
14. Rodier, F. *et al.* Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol.* **11,** 973–979 (2009).
15. Mallette, F. A., Gaumont-Leclerc, M.-F. & Ferbeyre, G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev.* **21,** 43–48 (2007).
16. Toussaint, O., Medrano, E. E. & von Zglinicki, T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp. Gerontol.* **35,** 927–945 (2000).
17. Braig, M. *et al.* Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436,** 660–665 (2005).
18. Chen, Z. *et al.* Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436,** 725–730 (2005).
19. Collado, M. *et al.* Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* **436,** 642 (2005).
20. Michaloglou, C. *et al.* BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **436,** 720–724 (2005).
21. Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P. Y. & Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 12072–12077 (2001).
22. Romanov, S. R. *et al.* Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature* **409,** 633–637 (2001).
23. Yaswen, P. & Stampfer, M. R. Molecular changes accompanying senescence and

immortalization of cultured human mammary epithelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34,** 1382–1394 (2002).
24. Gosselin, K. *et al.* Senescence-associated oxidative DNA damage promotes the generation of neoplastic cells. *Cancer Res.* **69,** 7917–7925 (2009).
25. Bernard, D. *et al.* Involvement of Rel/nuclear factor-kappaB transcription factors in keratinocyte senescence. *Cancer Res.* **64,** 472–481 (2004).
26. Deruy, E. *et al.* MnSOD upregulation induces autophagic programmed cell death in senescent keratinocytes. *PloS One* **5,** e12712 (2010).
27. Caldecott, K. W. Single-strand break repair and genetic disease. *Nat. Rev. Genet.* **9,** 619–631 (2008).
28. Dianov, G. L. & Parsons, J. L. Co-ordination of DNA single strand break repair. *DNA Repair* **6,** 454–460 (2007).
29. Berquist, B. R. & Wilson, D. M., 3rd. Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. *Cancer Lett.* **327,** 61–72 (2012).
30. Deruy, E. *et al.* Level of macroautophagy drives senescent keratinocytes into cell death or neoplastic evasion. *Cell Death Dis.* **5,** e1577 (2014).
31. Martin, N. *et al.* Identification of a gene signature of a pre-transformation process by senescence evasion in normal human epidermal keratinocytes. *Mol. Cancer* **13,** 151 (2014).
32. Zheng, H. & Kang, Y. Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene* **33,** 1755–1763 (2014).
33. Boire, A. *et al.* PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* **120,** 303–313 (2005).
34. Crawford, H. C., Dempsey, P. J., Brown, G., Adam, L. & Moss, M. L. ADAM10 as a therapeutic target for cancer and inflammation. *Curr. Pharm. Des.* **15,** 2288–2299 (2009).
35. Malaquin, N. *et al.* Senescent Fibroblasts Enhance Early Skin Carcinogenic Events via a Paracrine MMP-PAR-1 Axis. *PLoS ONE* **8,** e63607 (2013).
36. Nakamura, A. J. *et al.* Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. *Epigenetics Chromatin* **1,** 6 (2008).
37. Brem, R. & Hall, J. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Res.* **33,** 2512–2520 (2005).
38. El-Khamisy, S. F., Masutani, M., Suzuki, H. & Caldecott, K. W. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **31,** 5526–5533 (2003).
39. Hill, J. W., Hazra, T. K., Izumi, T. & Mitra, S. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Res.* **29,** 430–438 (2001).
40. Vidal, A. E., Hickson, I. D., Boiteux, S. & Radicella, J. P. Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step. *Nucleic Acids Res.* **29,** 1285–1292 (2001).
41. Caldecott, K. W. Protein ADP-ribosylation and the cellular response to DNA strand breaks. *DNA Repair* (2014). doi:10.1016/j.dnarep.2014.03.021
42. Okano, S., Lan, L., Caldecott, K. W., Mori, T. & Yasui, A. Spatial and Temporal Cellular Responses to Single-Strand Breaks in Human Cells. *Mol. Cell. Biol.* **23,** 3974–3981 (2003).
43. Le Chalony, C. *et al.* Partial complementation of a DNA ligase I deficiency by DNA ligase III and its impact on cell survival and telomere stability in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* **69,** 2933–2949 (2012).
44. Abdou, I., Poirier, G. G., Hendzel, M. J. & Weinfeld, M. DNA ligase III acts as a DNA strand break sensor in the cellular orchestration of DNA strand break repair. *Nucleic Acids Res.* **43,** 875–892 (2015).

45. Lan, L. *et al.* In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101,** 13738–13743 (2004).
46. Caldecott, K. W. DNA single-strand break repair. *Exp. Cell Res.* **329,** 2–8 (2014).
47. Zdanov, S., Debacq-Chainiaux, F., Remacle, J. & Toussaint, O. Identification of p38MAPK-dependent genes with changed transcript abundance in H2O2-induced premature senescence of IMR-90 hTERT human fibroblasts. *FEBS Lett.* **580,** 6455–6463 (2006).
48. Naka, K., Tachibana, A., Ikeda, K. & Motoyama, N. Stress-induced premature senescence in hTERT-expressing ataxia telangiectasia fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **279,** 2030–2037 (2004).
49. Wang, W. *et al.* Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol. Cell. Biol.* **22,** 3389–3403 (2002).
50. Iwasa, H., Han, J. & Ishikawa, F. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells* **8,** 131–144 (2003).
51. Torres, M. & Forman, H. J. Redox signaling and the MAP kinase pathways. *BioFactors* **17,** 287–296 (2003).
52. Brenner, A. J., Stampfer, M. R. & Aldaz, C. M. Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene* **17,** 199–205 (1998).
53. Kiyono, T. *et al.* Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* **396,** 84–88 (1998).
54. Dickson, M. A. *et al.* Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics. *Mol. Cell. Biol.* **20,** 1436–1447 (2000).
55. Muller, M. Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. *Antioxid. Redox Signal.* **11,** 59–98 (2009).
56. Ben-Porath, I. & Weinberg, R. A. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **37,** 961–976 (2005).
57. Azad, A. *et al.* Co-targeting Deoxyribonucleic Acid–Dependent Protein Kinase and Poly(Adenosine Diphosphate-Ribose) Polymerase-1 Promotes Accelerated Senescence of Irradiated Cancer Cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **88,** 385–394 (2014).
58. Barreto-Andrade, J. C. *et al.* Response of human prostate cancer cells and tumors to combining PARP inhibition with ionizing radiation. *Mol. Cancer Ther.* **10,** 1185–1193 (2011).
59. Efimova, E. V. *et al.* Poly(ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor Induces Accelerated Senescence in Irradiated Breast Cancer Cells and Tumors. *Cancer Res.* **70,** 6277–6282 (2010).
60. Meng, Y. *et al.* Radiation-inducible Immunotherapy for Cancer: Senescent Tumor Cells as a Cancer Vaccine. *Mol. Ther.* **20,** 1046–1055 (2012).
61. Shibata, A. *et al.* Parp-1 deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements in vivo after treatment with an alkylating agent. *Oncogene* **24,** 1328–1337 (2004).
62. Wang, Z. Q. *et al.* Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev.* **9,** 509–520 (1995).
63. Tsutsumi, M. *et al.* Increased susceptibility of poly(ADP-ribose) polymerase-1 knockout mice to nitrosamine carcinogenicity. *Carcinogenesis* **22,** 1–3 (2001).
64. Piskunova, T. S. *et al.* Deficiency in Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Accelerates Aging and Spontaneous Carcinogenesis in Mice. *Curr. Gerontol. Geriatr. Res.* 754190 (2008). doi:10.1155/2008/754190
65. Nozaki, T. *et al.* Parp-1 deficiency implicated in colon and liver tumorigenesis

induced by azoxymethane. *Cancer Sci.* **94,** 497–500 (2003).
66. Boyce, S. T. & Ham, R. G. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* **81,** 33s–40s (1983).
67. Guerardel, C. *et al.* Identification in the Human Candidate Tumor Suppressor GeneHIC-1 of a New Major Alternative TATA-less Promoter Positively Regulated by p53. *J. Biol. Chem.* **276,** 3078–3089 (2001).

Figure legends

Figure 1: Growth curve and characteristics of in vitro cultured NHEKs and NHDFs.

(A) Growth curve of NHEKs (left panel) and NHDFs (right panel) (donor 1MC) with representative micrographs of each growth phase; Scale bar=50µm. (B) Cell cycle distribution of exponentially growing and senescent NHEKs and NHDFs. Percentage of cells in G0/G1, S, and G2/M phases is quantified. The bar chart represents the means ± SD of the means of three experiments performed with three different NHEKs-NHDFs couples: K1MC (ExpG: 11 PDs – Sen: 58 PDs), F1MC (ExpG: 3 PDs – Sen: 12.4 PDs), K1320 (ExpG: 3.5 PDs – Sen: 10 PDs), F1320 (ExpG: 11 PDs – Sen: 39 PDs), K67FA1 (ExpG: 2 PDs – Sen: 13 PDs), F67FA1 (ExpG: 10.5 PDs – Sen: 42PDs). (C) Western blot analysis of p53, p21, p16, Rb phosphorylated on serine 807 and 811 (p-Rb (S807-811)), Rb and GAPDH (loading control) levels in total cell extracts of exponentially growing and senescent NHEKs and NHDFs (donor 1MC). (D) RT-qPCR analysis of *slug* and *twist* transcripts in exponentially growing and PSNE NHEKs (donor K67FA1). Results are means ± SD of triplicates. Similar results were obtained with donor K1MC. (E) Western blot analysis of F2R, MET, E-Cadherin, ADAM10 (pro-ADAM10 and mature-ADAM10) and GAPDH (loading control) levels in total NHEKs extracts (donor K1MC). (F) *hprt* assays performed in NHEKs (donor K1MC). The quantification of the results is given in sup Fig.11.

ExpG=exponentially growing cells; Sen=cells at the senescence plateau. The exact PD at which cells were taken is indicated.

Figure 2: Senescent NHEKs do not experience massive telomere shortening nor activate the DDR pathway

(A) Telo-FISH on metaphase chromosome spreads of NHEKs and NHDFs (donor 2F19). Upper panel: representative Telo-FISH images. Lower panel: quantification of telomeres loss. The given results are the mean of counts performed on 45 to 58 metaphases for each case. (B) Telo-FISH on interphasic cells. Upper panel: representative confocal microscopy images for the 1MC donor. Scale bar=20µm. Lower panel: Quantification of the fluorescence intensity obtained with three different NHEKs-NHDFs couples (1MC, 1320 and 67FA1). Scatter dot plots indicate the means ± SD of the means of the three experiments. (C) Analysis of the activation of the DDR pathway in NHEKs and NHDFs (donor 1MC). Left: Representative ApoTome microscopy images of DDR foci. Scale bar= 20µm. Right: Quantification of the number of cells displaying at least 3 foci of γH2AX, p-ATM, p-Chk2, or 53BP1, or at least one foci of p-ATR or p-Chk1. DDR foci-positive cells were automatically counted with ImageJ in 10 independent microscopic fields for a total of at least 200 cells for each case. The bar chart represents the mean ± SD of each 10 counts. The results are representative of 3 independent experiments. (D) Western blot analysis of the activation of the DDR pathway in total cell extracts of NHEKs and NHDFs (donor 1MC). PCNA was used as proliferative index and GAPDH as loading control. (E) p53 and p-p53 (Ser15) immunofluorescences performed on NHEKs and NHDFs (donor 1MC). Upper panel: Representative ApoTome microscopy images. Scale bar=20µm. Lower panel: Quantification of cells displaying p53 and p-p53 (Ser15) nuclear staining. Cells were counted in 5 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells for each case. The bar chart represents the mean ± SD of each 10 counts. The results are representative of 2 independent experiments.

ExpG=exponentially growing cells; Sen=cells at the senescence plateau. The exact PD at which cells were taken is indicated.

Figure 3: Senescent NHEKs display a decrease in PARP1 expression and activity, and accumulate unrepaired SSBs

(A) Neutral (pH8) (left) and alkaline (pH12.3) (right) comet assays performed in tandem on exponentially growing and senescent NHEKs and NHDFs (donor 1MC). The microphotographs of the comets are shown in sup Fig.6A. Tail moments of 30 to 50 comet-positive cells were quantified. Scatter dot plots represent the mean ± SD. The results are representative of 5 independent experiments. (B) XRCC1 immunofluorescence performed on exponentially growing and senescent NHEKs and NHDFs (donor 1MC) using three different antibodies raised against different XRCC1 immunogens. The specificity of the antibodies is analyzed in sup Fig.6B and C. Left: Representative ApoTome microscopy images. Scale bar=10µm. XRCC1 foci-positive cells were automatically counted with ImageJ in 5 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells for each case. The mean ± SD of the 5 counts is indicated as insets. Right: Bar chart representing the means ± SD of the means obtained with the 3 antibodies. (C) RT-qPCR analysis of PARP1 transcripts (donor 1MC). Results are means ± SD of triplicates. Similar results were obtained with the 67FA1 donor. (D) Western-blot analysis of PARP1, PAR, PCNA (proliferative index) and GAPDH (loading control) levels in total cell extracts of exponentially growing and senescent NHEKs and NHDFs (donor 1MC) treated or not with 100µM H_2O_2 at 4°C for 10min and then placed at 37°C for 5min. The specificity of PARP1 and PAR antibodies is analyzed in sup Fig.7B. (E) Double immunofluorescence detection of XRCC1 and BrdU, ligase1, ligase3 and PCNA. Upper panel: Representative ApoTome microscopy images of results obtained with the 1MC donor. Scale bar=10µm. Similar results were obtained with the 1320 and 67FA1 donors. Lower panel: Cells displaying double-positive foci were automatically counted with ImageJ in 10 fields for a total of

more than 100 nuclei and the means were calculated. Scatter dot plots represents the means ± SD of the means of the three experiments performed with the three different donors.

ExpG=exponentially growing cells; Sen=cells at the senescence plateau. The exact PD at which cells were taken is indicated.

Figure 4: Restoring PARP1 expression enables SSB repair, shuts off the p16/Rb pathway and delays the occurrence of senescence

Exponentially growing NHEKs (donor 1MC; 8.5 PDs) were infected with AdPARP1-V5 or AdGFP or kept non infected (NI). (A) Growth curve. (B) Western-blot analysis of the efficacy of infection. PARP1, V5, GFP, PCNA (proliferative index) and GAPDH (loading control) levels were analyzed in total cell extracts. (C) Representative images of cell morphologies at days 7 and 16 post-infection. Scale bar=50µm. (D) Percentage of SA-β-gal positive cells at days 3, 7 and 16 post-infection. Positive cells were counted in 5 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells for each case. The bar chart represents the means ± SD of each 5 counts. (E) Immunofluorescence detection of XRCC1 and 53BP1 foci positive cells. Upper panel: Representative ApoTome microscopy images, Scale bar=10µm. Lower panel: Positive cells were automatically counted with ImageJ in 10 independent microscopic fields for a total of at least 200 cells. The bar chart represents the mean ± SD of each 10 counts. The results are representative of 2 independent experiments. (F) Senescent NHEKs (donor 1MC; 12 PDs) were infected as in A-D. Western-blot analysis of PARP1, V5, p16, p-Rb, p21 and GAPDH (loading control) levels in total cell extracts.

ExpG=exponentially growing cells; Sen=cells at the senescence plateau.

Figure 5: A default in PARP1 expression and activity at senescence alters the dynamics of XRCC1 foci

(A) Confocal microscopy analysis of PAR and XRCC1 foci in exponentially growing (2.5 PDs) and senescent (11.5 PDs) NHEKs (donor 1MC) treated by 100µM H_2O_2 at 4°C for 10min and then placed at 37°C for 5 to 120min. Left panels: Representative photomicrographs at 5min. Middle panels: Measure of the fluorescence intensity performed along the dotted white lines. Right panel: Follow-up of the formation and disappearance of XRCC1 foci. The numbers of XRCC1 foci per cell were counted in more than 50 cells. Each point represents the mean +/- SD of all cells. (B) Senescent NHEKs (donor 1MC; 11.8 PDs) were infected by AdPARP1 as in Fig.5 and treated or not by the PARP inhibitors 3AB (1mM) and ABT-888 (1µM). Double immunofluorescence detection of XRCC1 and PARP1 performed 24hrs post-infection. Left: Representative ApoTome microscopy images. Scale bar=10µm. Right: XRCC1 foci-positive cells were automatically counted with ImageJ in 5 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells. The bar chart represents the mean ± SD of each 5 counts. The results are representative of two independent experiments.

ExpG=exponentially growing cells; Sen=cells at the senescence plateau.

Figure 6: XRCC1 foci activate the p16/Rb pathway through p38MAPK

(A) Presenescent NHEKs (donor 1MC; 10 PDs) were transfected with a pool of control or anti-XRCC1 siRNAs. Western-blot analysis of XRCC1, p16, Rb, p-Rb, p53 and GAPDH (loading control) levels in total cell extracts on days 2, 4, 6 and 8 post-transfection. (B) Western-blot analysis of phosphorylated p38MAPK (p-p38),

p38MAPK (p38), p16 and GAPDH (loading control) in exponentially growing and senescent NHEKs (donor 1MC) at the indicated PDs. (C) Senescent NHEKs (1MC; 10PDs) were transfected with a pool of control or anti-XRCC1 siRNAs and analyzed by western-blot for XRCC1, phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2), ERK1/2, phosphorylated p38MAPK (p-p38), p38MAPK (p38), p16 and GAPH (loading control). ExpG=exponentially growing cells; Sen=cells at the senescence plateau.

Figure 7: Accumulation of unrepaired SSBs is sufficient to cause PSNE

Exponentially growing NHEKs (donor 1MC; 8PDs) were transfected with 3 different siRNAs directed against PARP1 or a pool of four control siRNAs. The efficiency of the siRNAs is given in sup Fig.8A. (A) Growth curve. (B) XRCC1 and 53BP1 immunofluorescences performed at day 6 post-transfection. Positive cells were automatically counted with ImageJ in 5 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells for each case. The bar chart represents the means ± SD of each 5 counts. (C) Neutral (pH8) and alkaline (pH12.3) comet assays performed in tandem at day 6 post-transfection. Tail moments of 50 comet-positive cells were quantified. Scatter dot plots represent the mean ± SD of all measures. (D) Upper panel: measure of PSNE frequency performed as described in Materials and Methods at the indicated time. The given results are the mean +/- SD of counts of PSNE clones performed in 5 independent culture dishes. Lower panels: Representative photomicrographs of PSNE clones stained with Crystal violet. Scale bar=50µm. (E) Upper panel: siCTR- and siPARP1-transfected NHEKs were analyzed by FACS according to their size and granularity. About thirty% of the most large and granular cells were sorted, plated at low density, stained with the filiation tracer CFDA SE, and monitored for emergence which occurred about one week later. Lower panel:

Representative images of PSNE clones which have inherited the fluorescent tracer from their senescent mother cell. Scale bar=50µm. (F) Western-blot analysis of F2R, MET and GAPDH (loading control) levels in total cell extracts at the given time post-transfection. (G) *hprt* assays performed at the given time post-transfection. The quantification of the results is given in sup Fig.11.

Figure 8: Oxidative stress resumes SSB accumulation, senescence and PSNE in NHEKs

Exponentially growing NHEKs (donor 1MC; 6.5PDs) were treated daily or not either with 1,000U/mL of catalase, 1,000U/mL of catalase-PEG, 2mM of N-acetylcysteine (NAC) or 20µM H_2O_2. The efficacy of the antioxidants is given in sup Fig.10B. (A) Growth curve. (B) Representative images of cell morphologies on days 3, 9 and 18 of the treatment. Scale bar=50 µm. (C and E) Analysis of XRCC1 and 53BP1 foci-positive cells performed on H_2O_2-treated and antioxidant-treated cells at respectively day 3 and 9 after the beginning of the treatment. Positive cells were automatically counted with ImageJ in 10 independent microscopic fields for a total of at least 200 cells. The bar chart represents the means ± SD of each 10 counts. The results are representative of 2 independent experiments. (D and F) Neutral (pH8) and alkaline (pH12.3) comet assays performed in tandem on H_2O_2-treated and antioxidant-treated cells at respectively day 3 and 9 after the beginning of the treatment. Scatter dot plots represent the mean ± SD of 50 measures. (G) Measure of PSNE frequency in control and H_2O_2-treated NHEKs as described in Materials and Methods. Lefts: Bar chart represents the mean +/- SD of counts performed in 5 independent culture dishes. Left: Representative photomicrographs of PSNE clones stained with Crystal violet. Scale bar=50µm. (H) Western-blot analysis of F2R, MET and GAPDH (loading

control) levels in total cell extracts of control and H_2O_2-treated NHEKs at the given time post-transfection. (I) *hprt* assays performed in H_2O_2-treated NHEKs at the given PDs. The quantification of the results is given in sup Fig.11.

Figure 9: Detection of PARP1, SSBR and DDR foci in skin samples from donors at different ages

PARP1, XRCC1/Vimentin, 53BP1/Vimentin and MnSOD immunohistofluorescences performed in sections of skin samples from healthy human young (n=3) and old donors (n=4) (see sup table 2). Representative ApoTome microscopy images for epidermis and dermis of a young (nu 32645/09, 34 y.o.) and an aged donor (nu 9238/09, 75 y.o.). Scale bar = 50µm. The square delimits the below image at higher magnification. Scatter dot plots indicate the percentage of positive epidermal and dermal cells in young and aged skin. Positive cells were counted in 10 independent microscopic fields for a total of at least 150 cells. The given results are the mean ± SD of the means in the 3-4 donors.

Figure 10: Senescence and post-senescence emergence of HMECs are associated with decrease in PARP1 expression and activity and accumulation of SSBs

(A) Growth curve of HMECs. (B) Western blot analysis of p16, phosphorylated Rb (p-Rb (S807-811)), p53, PCNA (proliferative index) and GAPDH (loading control) levels in total cell extracts. (C) Upper panel: Morphology of HMECs observed by phase-contrast microscopy. Lower panels: images of SA-β-Gal-stained cells. Scale bar=50µm. (D) Western blot analysis of F2R, MET, E-Cadherin, vimentin and GAPDH (loading control) levels in total cell extracts. (E) *hprt* assays. The

quantification of the results is given in sup Fig.11. (F) Western-blot analysis of PARP1, PAR, PCNA (proliferative index) and GAPDH (loading control) levels in total extracts of exponentially growing and senescent HMECs treated or not with 100µM H_2O_2 at 4°C for 10min and then placed at 37°C for 5min. (G) Quantification of SA-β-Gal, XRCC1 and 53BP1 foci positive cells accumulation along the growth curve of HMECs. SA-β-Gal positive cells were counted in 5 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells. XRCC1 or 53BP1 foci-positive cells were automatically counted with ImageJ in 5 to 10 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells at each point. Each point represents the mean +/- SD of all counts. Representative images of XRCC1 and 53BP1 staining are given. Scale bar=10µm. ExpG=exponentially growing cells; Sen=cells at the senescence plateau. The exact PD at which cells were taken is indicated.

Supplemental figure legends

Supplemental Figure 1: Characteristics of senescent NHEKs and NHDFs (complements to Figure 1).

(A) Upper panels: images of SA-β-Gal-stained NHEKs and NHDFs (donor 1MC). SA-β-Gal-positive cells were counted in 5 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells for each case. The means ± SD of the 5 counts are indicated as insets. Scale bar=50µm. Lower panels: BrdU incorporation assays with quantification of BrdU-positive cells. Scale bar=10µm. Positive cells were counted in 5 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells for each case. The given results are the mean +/- SD of all counts. The statistical analyses are given in the table below. (B) Dot plots of cell cycle distribution of exponentially growing and senescent NHEKs and NHDFs (donor 1MC) analyzed by flow cytometry. Percentages of cells in G0/G1, S, and G2/M phases are indicated in insert. The experiment was performed with 3 couples of NHDFs-NHEKs from 3 different donors. The statistical analysis of the 3 experiments is given in Fig.1B.

ExpG=exponentially growing cells; Sen=cells at the senescence plateau. The exact PD at which cells were taken is indicated.

Supplemental Figure 2: NHEKs but not NHDFs upregulated p16 at senescence (complements to Figure 1).

(A) Immunofluorescence detection of p16 in exponentially growing and senescent NHEKs and NHDFs (donor 1MC). Upper panels: Representative ApoTome microscopy images. Scale bar=10µm. Lower panel: Quantification of p16-positive cells. Positive cells were automatically counted with ImageJ in 5 independent microscopic fields for a total of at least 50 cells. The bar chart represents the mean ±

SD of each 10 counts. (B) Checking of the specificity of the p16 immunostaining. Senescent NHEKs (donor 1MC) at 12 PDs were transfected by a pool of control or p16 siRNAs and processed for immunofluorescence with the anti-p16INK4a antibody (550834, BD Pharmingen). Representative ApoTome microscopy images, scale bar=20µm.

ExpG=exponentially growing cells; Sen=cells at the senescence plateau. The exact PD at which cells were taken is indicated.

Supplemental Figure 3: PSNE cells are generated from fully senescent cells (complements to Figure 1).

(A) Senescent NHEKs (donor 1MC) at 12 PDs were analyzed by flow cytometry according to their size (FSC-A) and granularity (SSC-A). Thirty-two % of the largest and most granular cells were sorted, plated at low density and monitored for PSNE which occurred 5 days later. (B) Representative images by phase contrast microscopy of PSNE clones clearly showing the remaining links between PSNE cells and their senescent mother cell. Scale bar= 50µm.

Supplemental Figure 4: Growth curves of the three NHDFs-NHEKs couples used in this study

See supplemental table 1 for the characteristics of each donor.

Supplemental Figure 5: DDR foci in senescent NHDFs are both telomeric and non telomeric (complements to Figure 2).

Upper panels: Representative confocal microscopy images for 53BP1 (green) and TRF2 (red) double immunofluorescence performed on exponentially growing and

senescent NHEKs and NHDFs (donor 1MC). Lower panel: Foci double positive for 53BP1 and TRF2 (TIF) and foci positive only for 53BP1 (non-telomeric foci) were counted amongst at least 150 cells. The given results are the mean +/- SD of all counts.

ExpG=exponentially growing cells; Sen=cells at the senescence plateau. The exact PD at which cells were taken is indicated.

Supplemental Figure 6: complements to Figure 3.

(A) Representative ApoTome microscopy images of comet assays stained with SYBR ® Green whose quantitative analysis is given in Fig.3A. (B) Checking of the specificity of the XRCC1 immunostaining. Three antibodies raised against three different immunogens were used: an antibody from Santa Cruz raised against the N-terminal 1-300 amino-acids, an antibody from Abcam raised against full length XRCC1, and an antibody from Cell Signaling raised against a peptide made of amino-acids around Arg300. Senescent NHEKs (donor 1MC) at 12.5 PDs transfected by a pool of control or anti-XRCC1 siRNAs were processed for immunofluorescence with the 3 antibodies. Left panel: Representative ApoTome microscopy images. Scale bar=10µm. Right panel: The numbers of XRCC1 foci per cell were counted in more than 40 cells. The bar chart represents the mean +/- SD of all counts (C) Analysis of the same cells as in B by western-blotting with the same 3 antibodies.

ExpG=exponentially growing cells; Sen=cells at the senescence plateau. The exact PD at which cells were taken is indicated.

Supplemental Figure 7: complements to Figure 3

(A) XRCC1/hOGG1 double immunofluorescences performed on senescent NHEKS and NHDFs (donor 1MC). Left panel: Representative ApoTome microscopy images. Scale bar=10µm. Right panel: Positive cells were automatically quantified with ImageJ in 5 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells for each case. The bar chart represents the means +/- SD of each 5 counts. (B) Checking of the specificity of anti-PARP1 and anti-PAR antibodies. Left panels: western-blot analysis of PARP1, PAR and GAPDH (loading control) levels in total extracts of exponentially growing NHEKs (donor 1MC) treated with 3-AB or ABT888 during 24hrs, then with 100µM H_2O_2 at 4°C for 10min and then placed at 37°C for 5min. Right panel: western-blot analysis of PARP1, PAR and GAPDH (loading control) levels in exponentially growing NHEKs (donor 1MC) transfected with a pool of control or PARP1 siRNA. Four days after transfection, cells were treated by H_2O_2 as above. (C) PARP1 and PAR immunofluorescences performed on exponentially growing and senescent NHEKs and NHDFs (donor 1MC) treated as in Fig.3D. Left panel: Representative ApoTome microscopy images. Scale bar=10µm. Right panel: PARP1 and PAR positive cells were counted in 10 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells for each case. The bar chart represents the means ± SD of each ten counts. The results are representative of 2 independent experiments.

ExpG=exponentially growing cells; Sen=cells at the senescence plateau. The exact PD at which cells were taken is indicated.

Supplemental Figure 8: complements to Figure 7.

(A) Western-blot analysis of PARP1, PCNA (proliferative index) and GAPDH (loading control) levels in total extracts of siCTR- and siPARP1-transfected NHEKs at the indicated time post-transfection. (B) Representative images of cell morphologies at

days 6 and 15 post-transfection. Scale bar=50µm. (C) Percentage of SA-β-Gal-positive cells counted in 4 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells at days 3, 6, 9 and 15 post-transfection. The bar chart represents the means ± SD of each 4 counts. Significant. (D) Quantification of changes in cell morphology. siCTR- and siPARP1-transfected NHEKs were analyzed for size (FSC-A) and granularity (SSC-A) distribution by flow cytometry at day 6 post-transfection. (E) Western-blot analysis of PARP1, phosphorylated Rb (S807-811), Rb, p16, p53, p21, PCNA (proliferative index) and GAPDH (loading control) levels in total cell extracts. (F) Analysis by flow cytometry of the distribution of cells in G0/G1, S, and G2/M phases.

Supplemental Figure 9: Inhibiting PARP activity using 3AB induces premature senescence followed by PSNE

(A) Growth curve of NHEKs treated or not with 1 or 5mM 3AB every day. (B) Representative images of cell morphology and SA-β-Gal staining at the indicated time after the beginning of the treatment. SA-β-Gal positive cells were counted in 6 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells. The results given as insets are the means +/- SD pf the counts. (C) Western-blot analysis of p16, phosphorylated Rb, p53, PCNA (proliferation index) and GAPDH (loading control) 15 days after the beginning of the treatment. (D) Immunodetection of XRCC1 and 53BP1 foci 15 days after the beginning of the treatment. Positive cells were counted in 5 independent microscopic fields for a total of at least 50 cells for each case. The bar chart represents the means ± SD of each ten counts. (E) Alkaline (pH12.3) and neutral (pH8) comet assays performed in tandem 15 days after the beginning of the treatment. Tail moments of 30 to 50 comet-positive cells were quantified. Scatter dot

plots represent the mean ± SD. (F) Measure of PSNE frequency of NHEKs as described in Materials and Methods. Counts of PSNE clones performed in 4 independent culture dishes. The given results are the mean +/- SD of all counts. (G) Western-blot analysis of the transformation markers F2R and MET and GAPDH as loading control in cells at the indicated time after the beginning of the treatment.

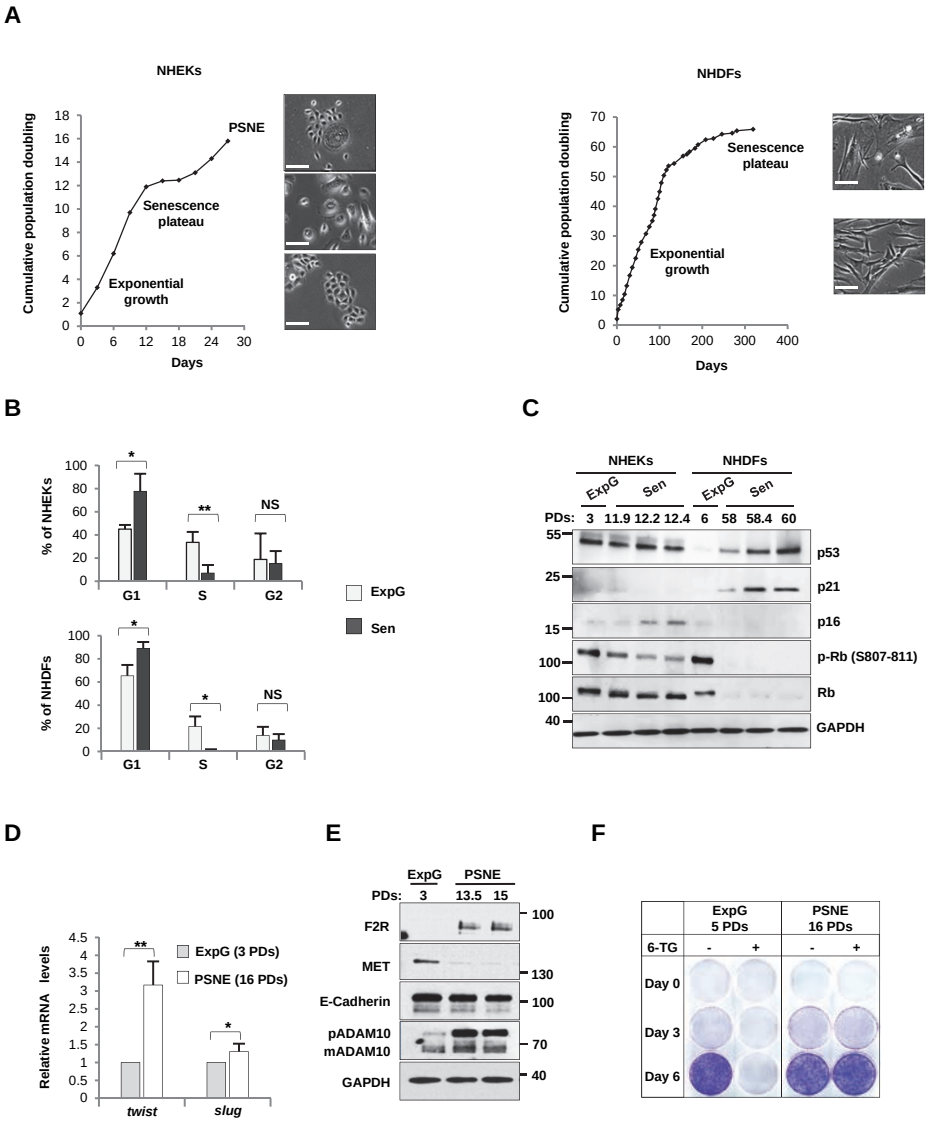
Supplemental Figure 10: Complements to Figure 8

(A) Immunofluorescence detection of 53BP1 and XRCC1 foci in NHEKs (donor 1MC) all along their cultivation, and, in parallel, measure of ROS concentration using H_2DCFDA as described in Materials and Methods. Positive cells were counted in 5 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells for each case. Each point is the mean +/-SD of all counts (B) Verification of the efficacy of the anti-oxidant treatment performed in Fig.9. ROS concentration was measured 24hrs after the beginning of the treatment. The given results are means of triplicates ± SD. (C) Percentage of SA-β-Gal-positive cells counted in 5 independent microscopic fields for a total of at least 100 cells at days 0, 3, 6, 9, 12 and 18 of the experiment. The bar chart represents the means ± SD of the 5 counts. (D) Western-blot analysis of p16, phosphorylated Rb, p53, PCNA (proliferative index) and GAPDH (loading control) levels in total cell extracts of treated and non-treated NHEKs at the indicated time of the experiment.

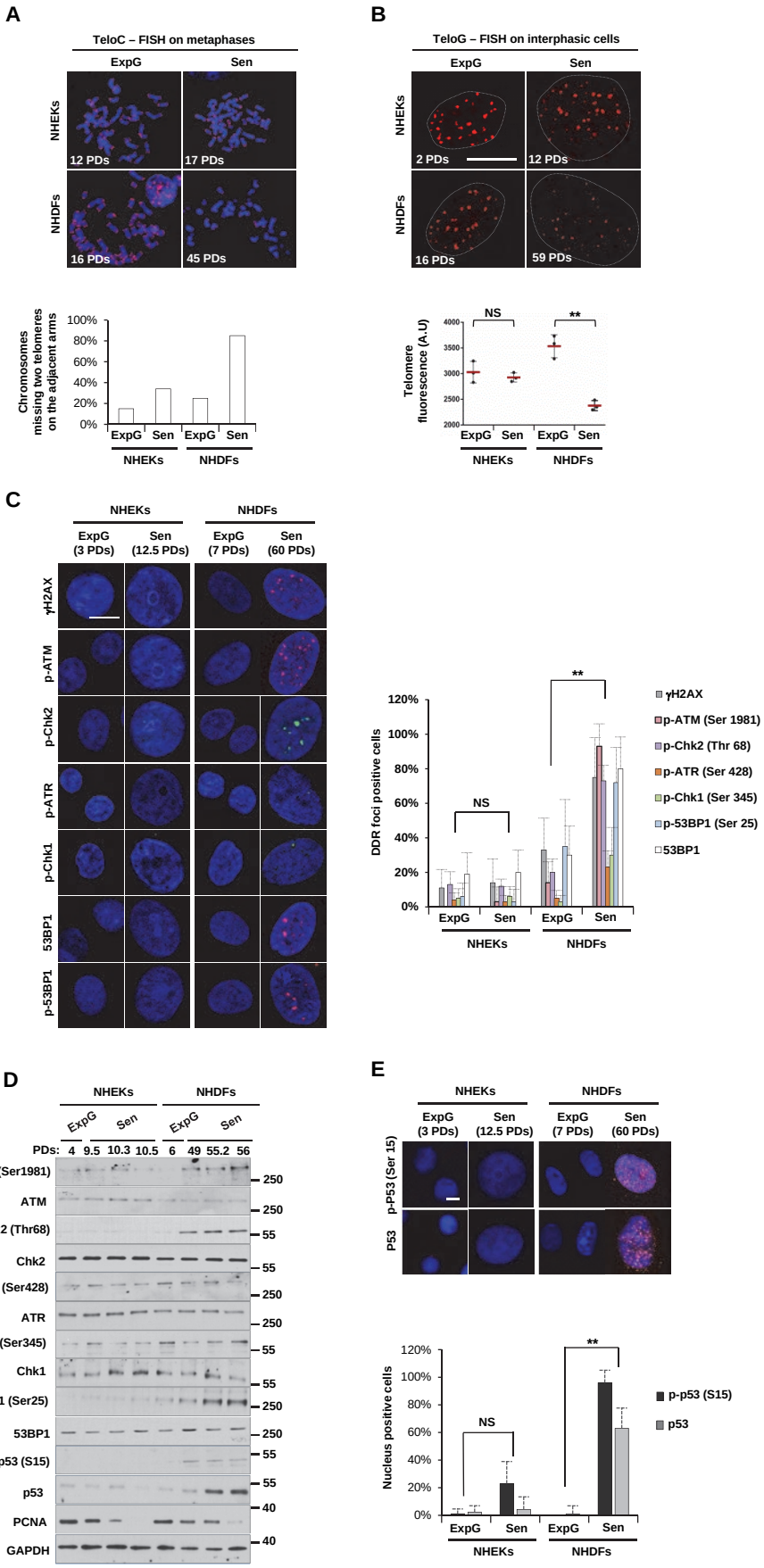
Supplemental Figure 11: Quantification of the *hprt* assays

The optic density of each crystal violet solution was measured three times. The bar charts represent the mean +/- SD of the three counts.

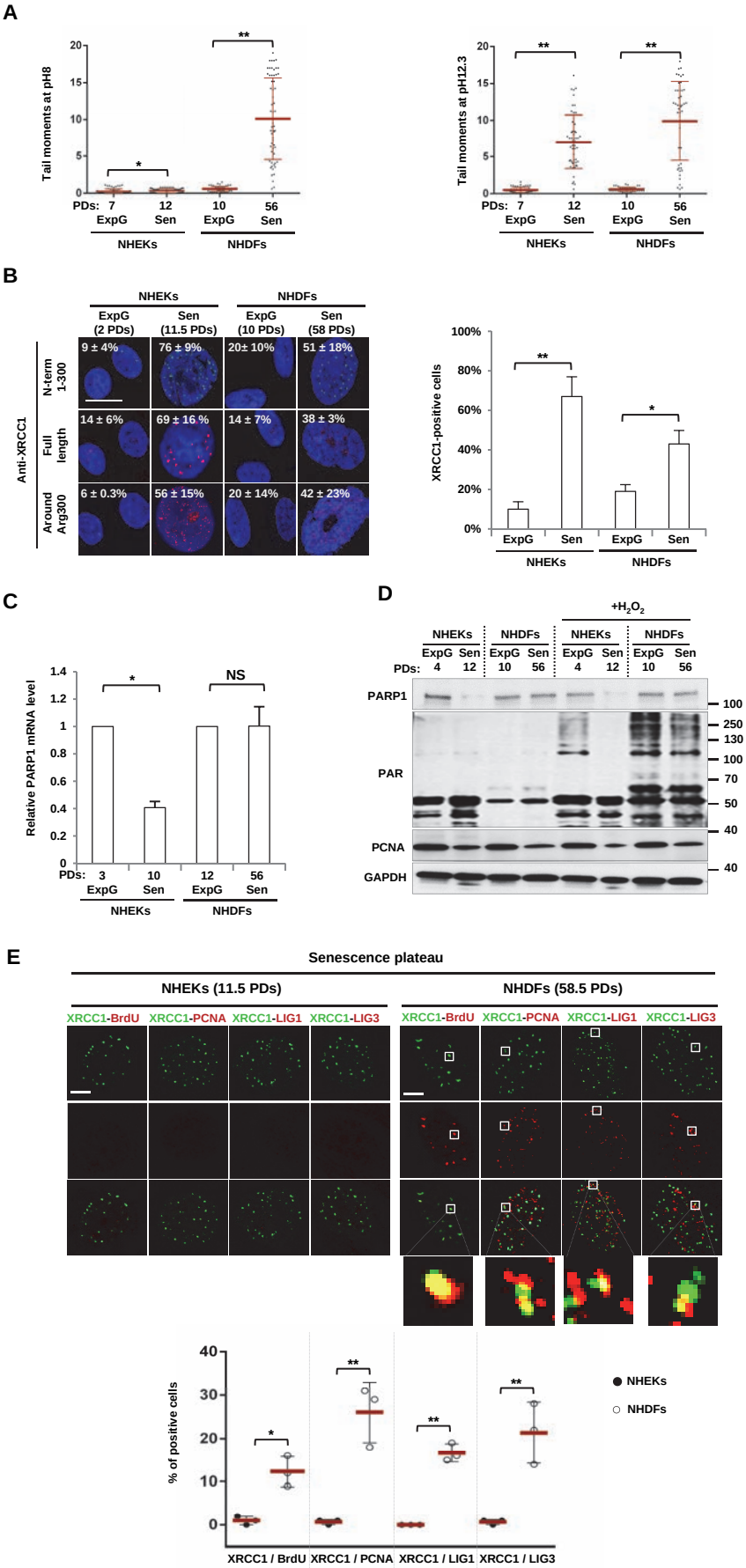
Nassour_Fig1



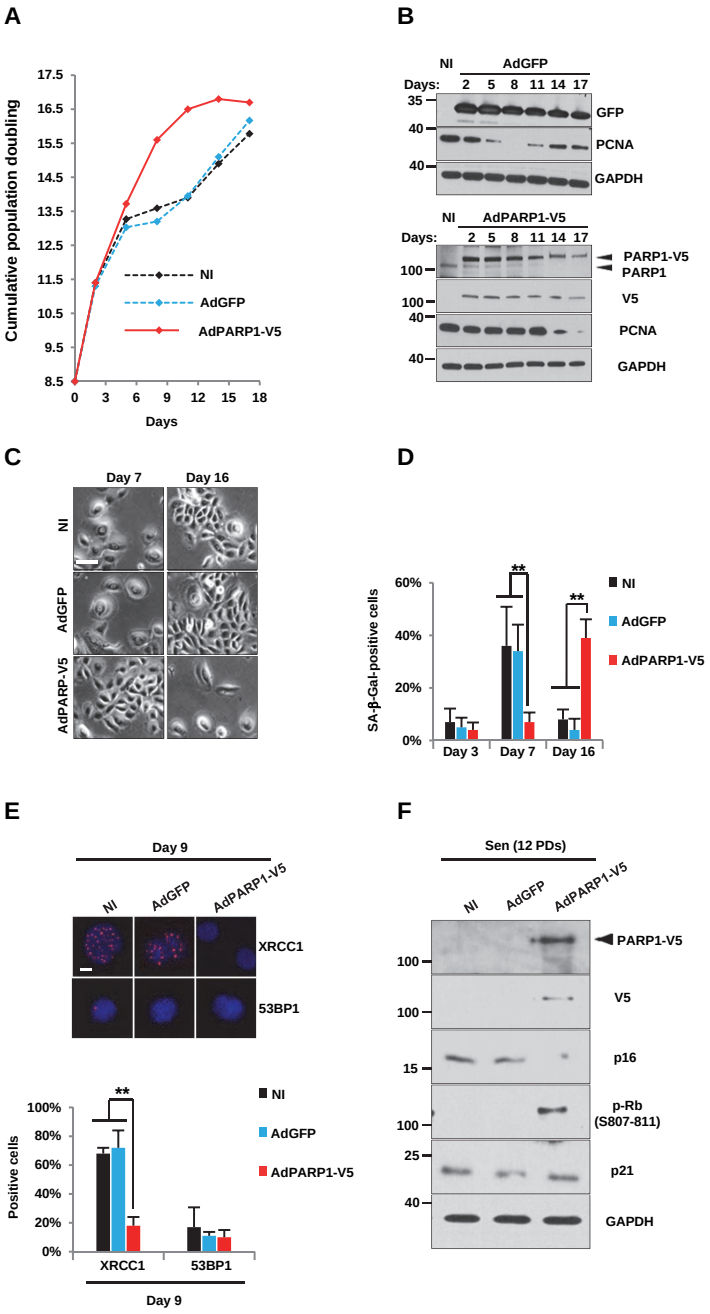
Nassour_Fig2



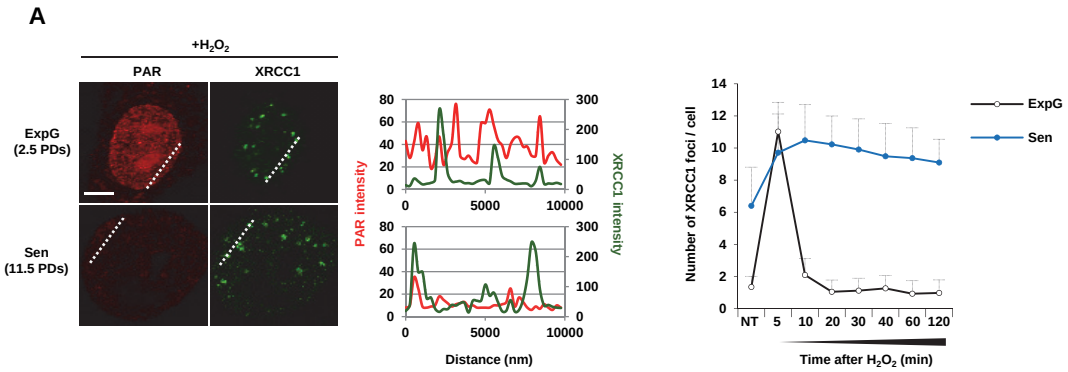
Nassour_Fig3

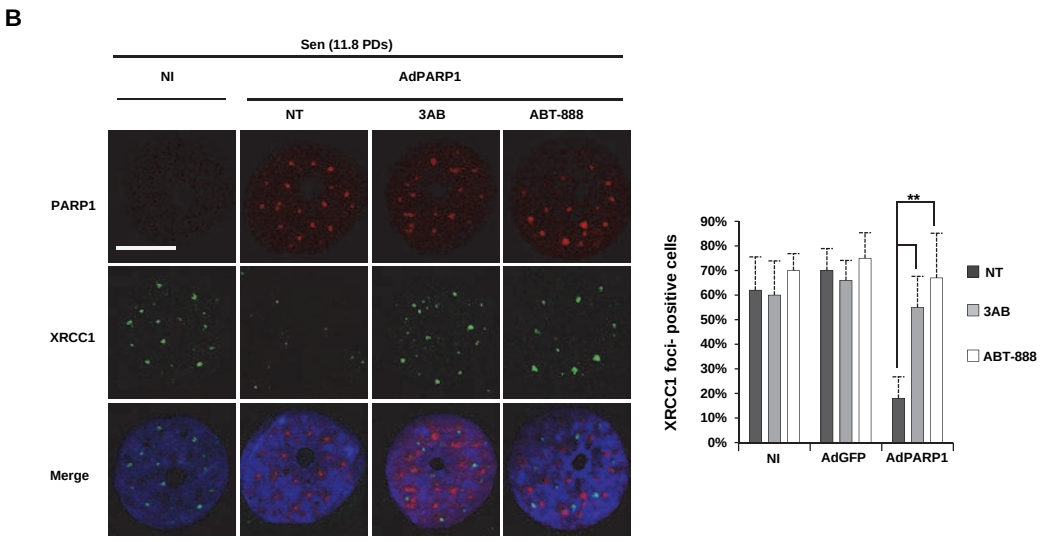


Nassour_Fig4

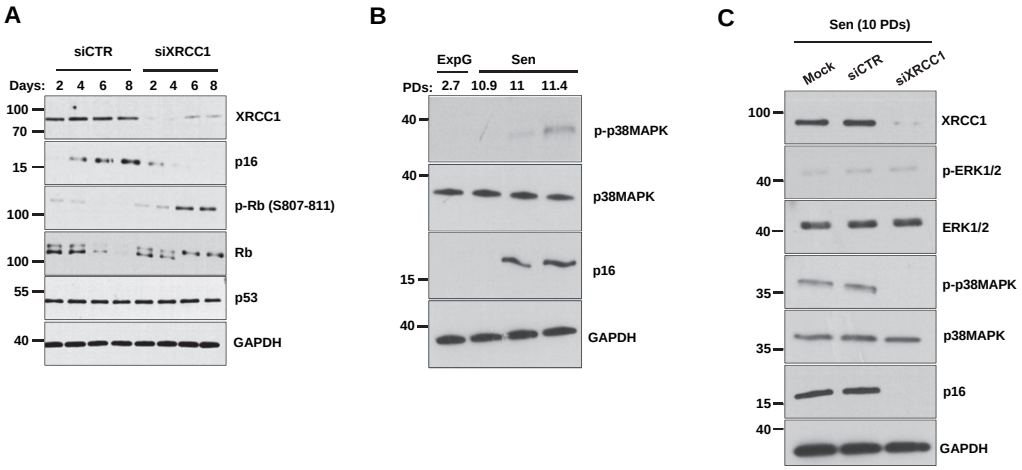


Nassour_Fig5

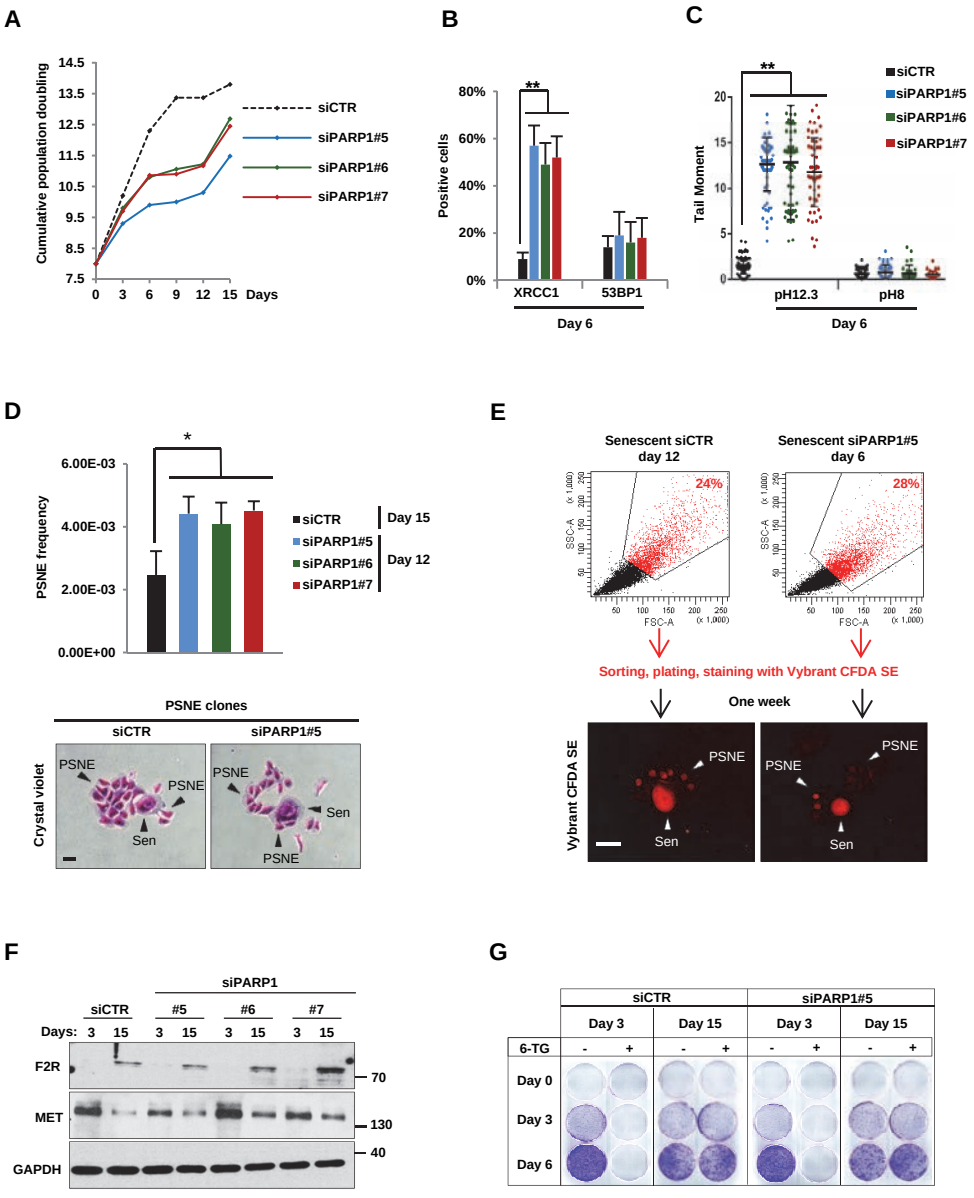




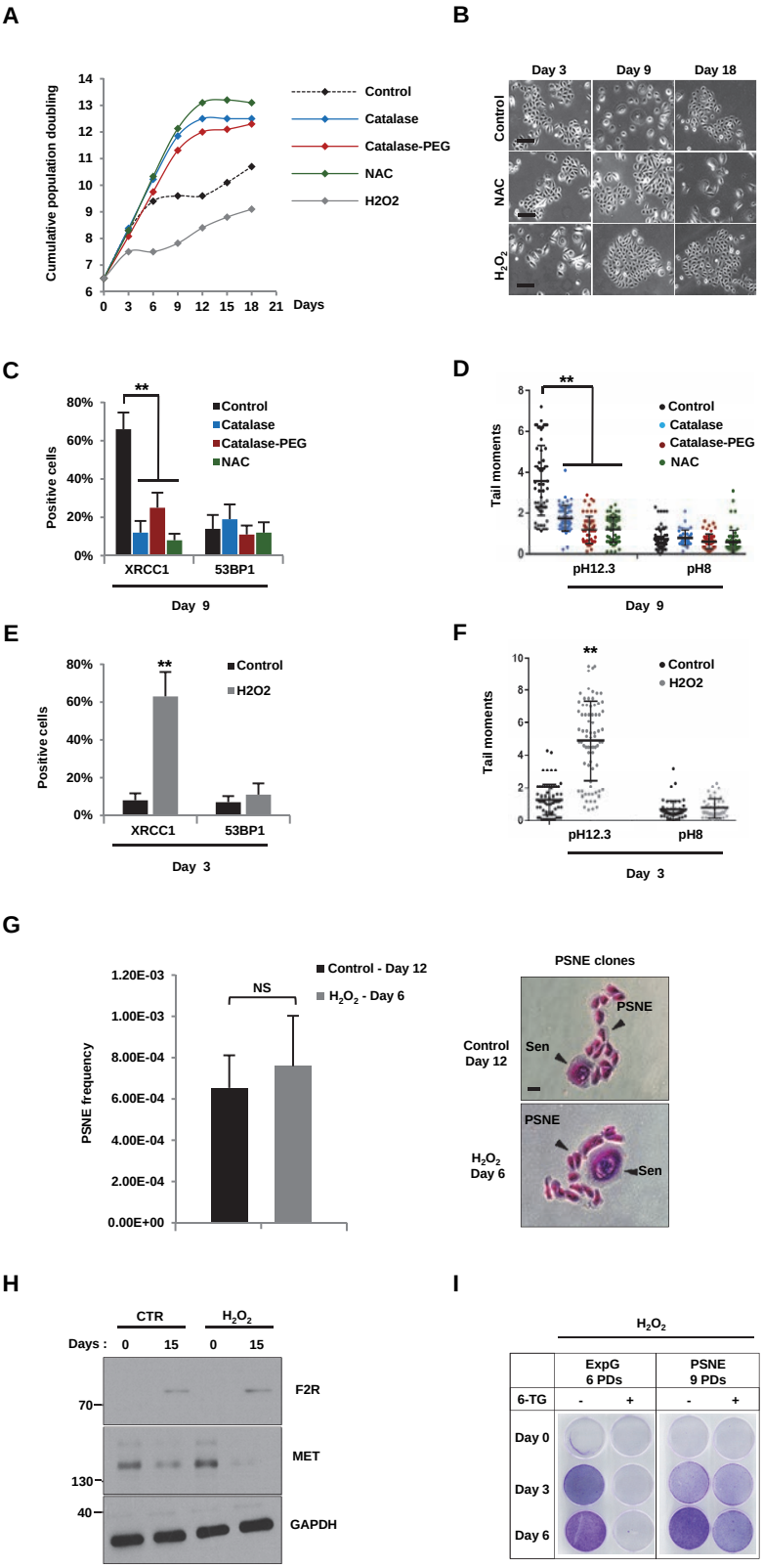
Nassour_Fig6



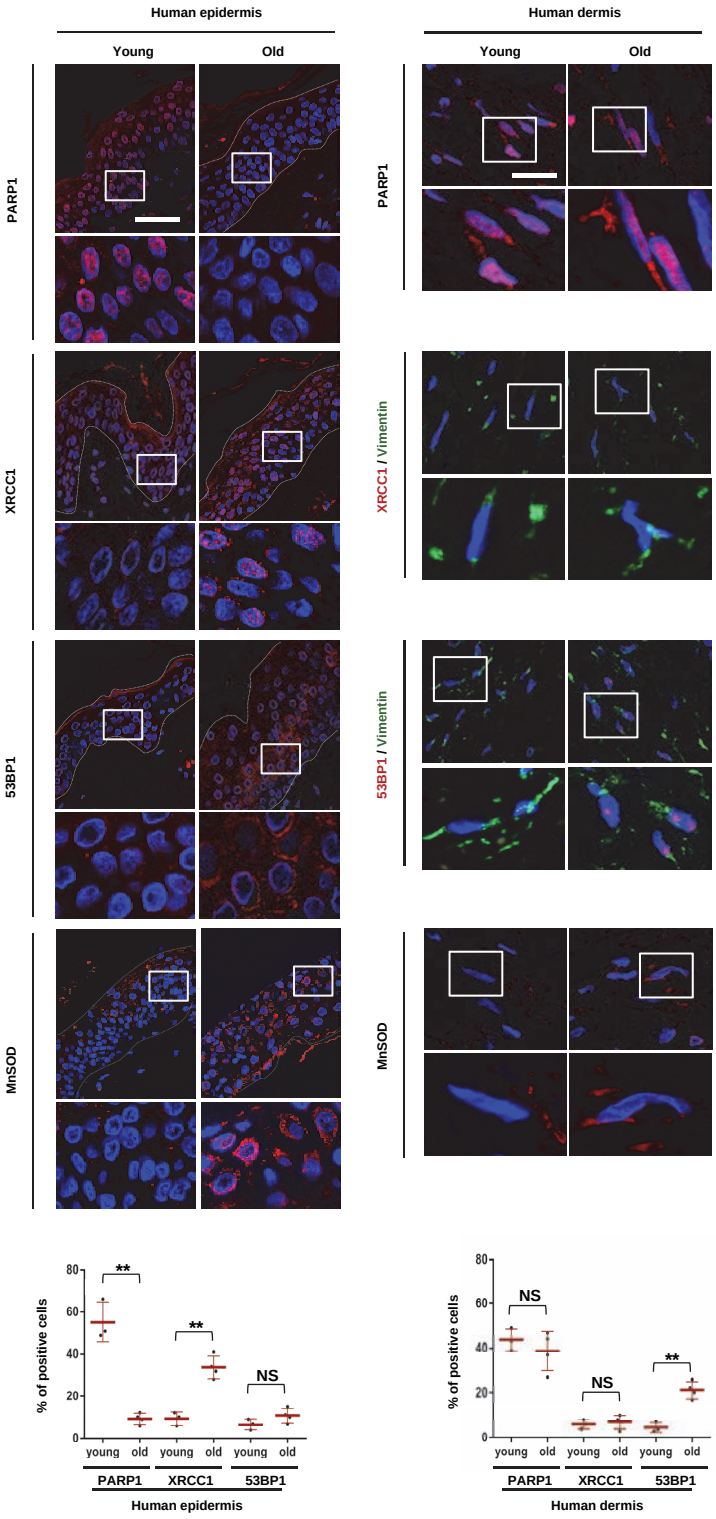
Nassour_Fig7



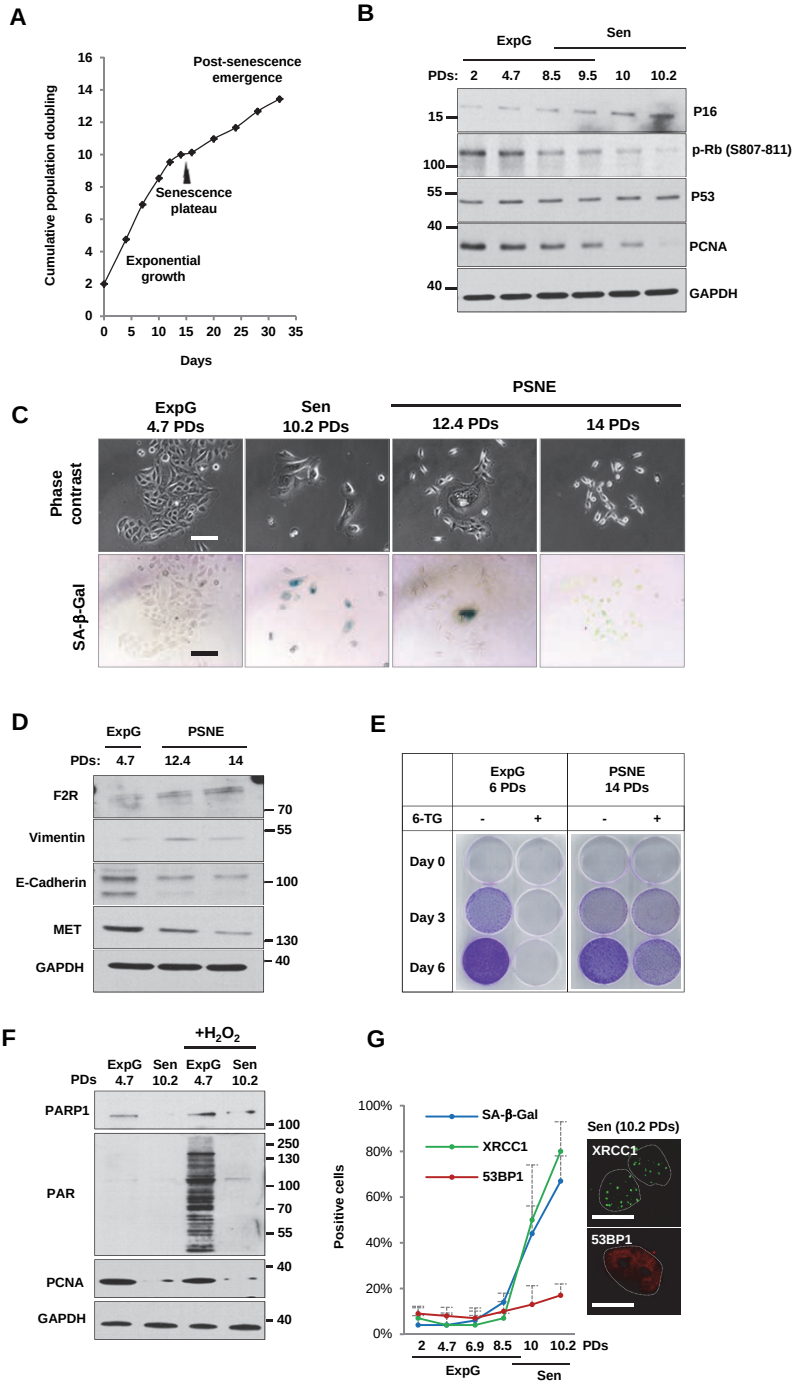
Nassour_Fig8



Nassour_Fig9



Nassour_Fig10



Partie 2: Rôle des SSBs et des fourches de réplication bloquées dans les phases initiales de carcinogenèse par échappement de la sénescence

Les travaux de la partie précédente pointent un rôle causal de l'accumulation des SSBs d'origine oxydante dans la survenue du plateau de sénescence des NHEKs ainsi que, paradoxalement, dans la PSNE. L'implication des SSBs dans la sénescence repose principalement sur la mise en place d'une voie initiée par les foyers XRCC1 et menant à l'activation de p38MAPK $\rightarrow$ $p16^{INK4a}$ $\rightarrow$ Rb, et subséquemment à l'arrêt dans le cycle cellulaire en G1. Toutefois, nous n'avons pas mis en évidence dans ces travaux précédents le mécanisme rattachant les SSBs au processus de PSNE.

Des travaux antérieurs non publiés de l'équipe ont porté sur la caractérisation des modifications génétiques potentiellement impliquées dans l'émergence néoplasique par des approches de *CGH array* (*Comparative Genomic Hybridization*). Il a été ainsi mis en évidence de nombreuses délétions de petite taille réparties aléatoirement dans le génome des cellules émergentes. L'authenticité des résultats de *CGH array* a été vérifiée par des q-PCR sur quelques gènes les plus pertinents (Deruy, Piechaud *et al*, non publié). J'ai moi-même réalisé des essais *HPRT (Hypoxanthine Phospho-Rybosyl Transferase)*. Il s'agit d'un test de mutation génique qui est couramment employé dans le domaine de la toxicologie génétique pour mettre en évidence des substances potentiellement mutagènes. L'ensemble de ces résultats révèlent que le génome des cellules PSNE est parsemé de mutations.

Au vu de ces données et des résultats de l'article N°1, l'hypothèse retenue a été que les SSBs seraient à l'origine des mutations et des délétions préalablement identifiées chez les cellules PSNE. Nous nous sommes ainsi demandé s'il était connu que des SSBs généraient des délétions. Mes recherches bibliographiques m'ont amené à m'intéresser aux fourches de réplication bloquées. En effet, il a été montré que la progression des fourches de réplication est susceptible d'être altérée par la présence de divers types de dommages, notamment des SSBs, induisant une situation qualifiée de stress réplicatif.

Le stress réplicatif est un phénomène complexe qui affecte sérieusement la stabilité du génome. Il s'accompagne le plus souvent d'une génération de fragments ssDNA et d'une activation des voies de signalisation animées principalement par la kinase ATR et dans une moindre mesure par la kinase DNA-PK. Le rôle exact qu'exerce la kinase ATR

est en cours d'exploitation. Des données suggèrent qu'elle puisse intervenir dans l'inhibition de la progression du cycle cellulaire et la suppression des origines de réplication. Ces évènements confèrent aux cellules un temps supplémentaire pour la résolution du stress (Zeman and Cimprich, 2014).

Jusqu'à présent, il n'existe pas de bilan clair des marqueurs caractérisant l'état de stress réplicatif. Toutefois, quelques marqueurs se retrouvent usuellement utilisés dans la littérature pour mettre ceci en évidence. Il s'agit de la forme phosphorylée de RPA32 sur la sérine 33 et de Chk1 sur la sérine 345 (Maréchal and Zou, 2013; Nam and Cortez, 2011). Mais le seul usage des substrats d'ATR (RPA et Chk1) comme marqueurs n'est pas toujours approprié. En effet, des cellules peuvent subir du stress réplicatif sans pour autant activer la voie ATR (Bianco et al., 2012; Koundrioukoff et al., 2013; Lambert and Carr, 2013). Le stress réplicatif s'accompagne systématiquement d'une activation de la voie DDR. De ce fait, les deux protéines γH2AX et 53BP1 sont également utilisées comme des marqueurs. La protéine p53, quant à elle, s'accumule sous forme de foyers nucléaires en réponse à un stress réplicatif. Des données expérimentales révèlent une colocalisation de p53 avec la protéine de recombinaison homologue RAD51. Il en a été déduit que p53 intervient dans la régulation de la fréquence de recombinaison homologue indépendamment de son activité en tant que facteur de transcription (Sengupta et al., 2003).

Le stress réplicatif résulte principalement d'un large éventail d'obstacles à l'avancement de l'ADN polymérase, notamment des SSBs. Ceci aboutit systématiquement à la formation de DSBs atypiques appelées « *one-ended DSBs* » et l'activation de la voie DDR. Ces structures aberrantes sont réparables par recombinaison homologue, un mécanisme qui met en jeu une invasion du fragment simple-brin dans la molécule d'ADN homologue et une synthèse d'ADN capable de progresser jusqu'à une centaine de kilo-bases (Arnaudeau et al., 2001; Lundin et al., 2002). Bien que ce mécanisme soit considéré comme fidèle car il implique une recombinaison d'allèle identique, il est susceptible de mettre en péril l'intégrité du génome puisqu'il induit des échanges entre des séquences homologues dans tout le génome. Dans certains cas, il implique des séquences non-alléliques issues de duplications générant des pseudogènes ou des fragments de gènes. Quand le gène et sa copie non-allélique sont situés sur le même chromosome et dans la même orientation, la NAHR (*Non-Allelic Homologous Recombination*) peut générer des délétions (Iraqui et al., 2012; Liu et al., 2012) .

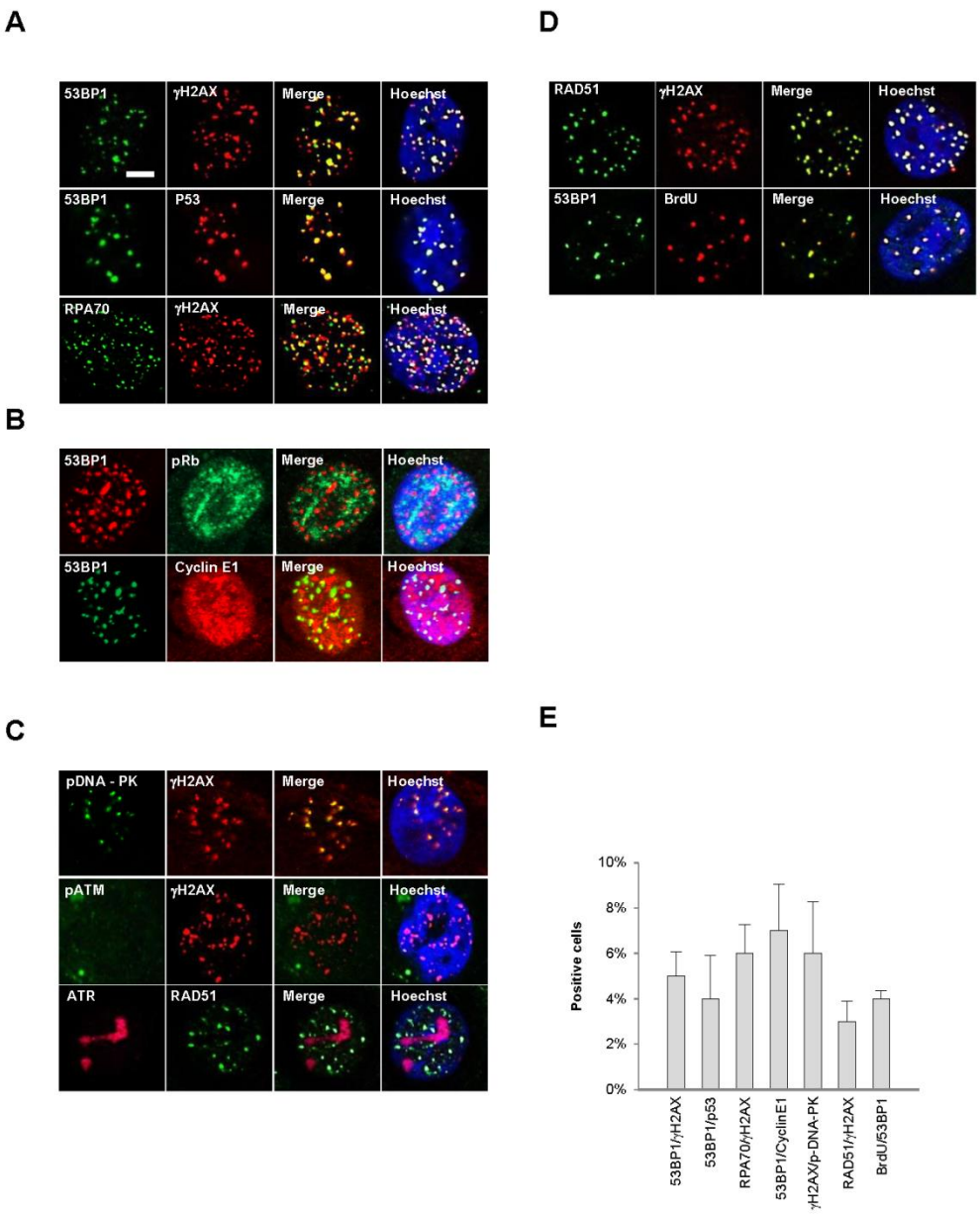


Figure 22 : Trois à 5% de NHEKs sénescents sont en phase S et présentent des marqueurs de fourches de réplication bloquées

(A) Coimmunodétection du marquage 53BP1/γH2AX, 53BP1/p53 et RPA70/γH2AX réalisées sur des NHEKs au plateau de sénescence. La barre d'échelle représente 20 µm.
(B) Coimmunodétection du marquage 53BP1/p-Rb et 53BP1/Cycline E1 réalisées sur des NHEKs au plateau de sénescence
(C) Coimmunodétection du marquage pDNA-PK/γH2AX, pATM/γH2AX et ATR/RAD51 réalisées sur des NHEKs au plateau de sénescence.
(D) Coimmunodétection du marquage RAD51/γH2AX et 53BP1/BrdU réalisées sur des NHEKs au plateau de sénescence.
(E) Les cellules double-positives pour chaque co-marquage ont été comptées directement au microscope dans 3 à 9 champs pris au hasard pour un total d'environ 200 cellules par condition. Les barres de l'histogramme représentent la moyenne sur les différents champs et l'écart type.

Recherche des marqueurs de fourches de réplication bloquées chez les NHEKs sénescents

Ma première démarche a été de déterminer si les NHEKs sénescents présentaient des marqueurs de fourches de réplication bloquées. Pour répondre à cet objectif, j'ai tout d'abord réalisé des expériences d'immunofluorescence dirigée contre des protéines DDR : γH2AX et 53BP1. J'ai ainsi pu remarquer que 4 à 5% de cellules présentent de nombreux petits foyers nucléaires γH2AX/53BP1, alors que les autres ne présentent que 0 ou 1 gros foyer (Figure 22A et E). J'ai ensuite effectué des co-marquages de 53BP1 et γH2AX avec les protéines p53 et RPA70, révélatrices de fourches bloquées. D'une manière très intéressante, ces foyers DDR colocalisent parfaitement (Figure 22A et E), suggérant que 4 à 5% des NHEKs sénescents présentent des fourches de réplication bloquées.

Afin de valider les résultats précédents, il était nécessaire de montrer que les cellules possédant beaucoup de foyers DDR sont présentes en phase S du cycle cellulaire. Pour cela, j'ai réalisé à nouveau des immunofluorescences anti-53BP1 et analysé ensuite les résultats par *Image Stream*. Il s'agit d'un cytomètre en flux équipé d'une caméra permettant l'acquisition de photos de cellules individuelles. L'utilisation de cette technologie nous a permis de repérer les cellules avec des marqueurs de fourches bloquées et de déterminer en parallèle leur phase du cycle cellulaire grâce à l'intensité du marquage Hoechst. D'une manière surprenante, les cellules avec de nombreux foyers 53BP1 apparaissent en phase G1. Nous avons ensuite pensé que ces cellules seraient probablement arrêtées en tout début de la phase S, ce qui rend quasiment impossible leur distinction des cellules en phase G1 avec cette technique.

J'ai poursuivi mon étude en faisant des analyses plus fines. Je me suis focalisé dans un premier temps sur l'étude du niveau de la forme phosphorylée de Rb. Contrairement à la majorité des NHEKs qui perdent la forme phosphorylée de Rb à la sénescence, ceux avec des marqueurs de fourches bloquées maintiennent un marquage nucléaire puissant (Figure 22B). Je me suis intéressé ensuite à étudier l'expression de la cycline E. En effet, la cycline E intervient, en s'associant avec la kinase Cdk2, dans la régulation de l'entrée en phase S et la progression de la réplication. Des données de la littérature ont mis évidence une augmentation de l'activité de la Cdk2 et une induction d'un stress réplicatif en réponse à une surexpression de la cycline E (Ekholm-Reed et al., 2004; Resnitzky et al., 1994; Jones et al., 2013).

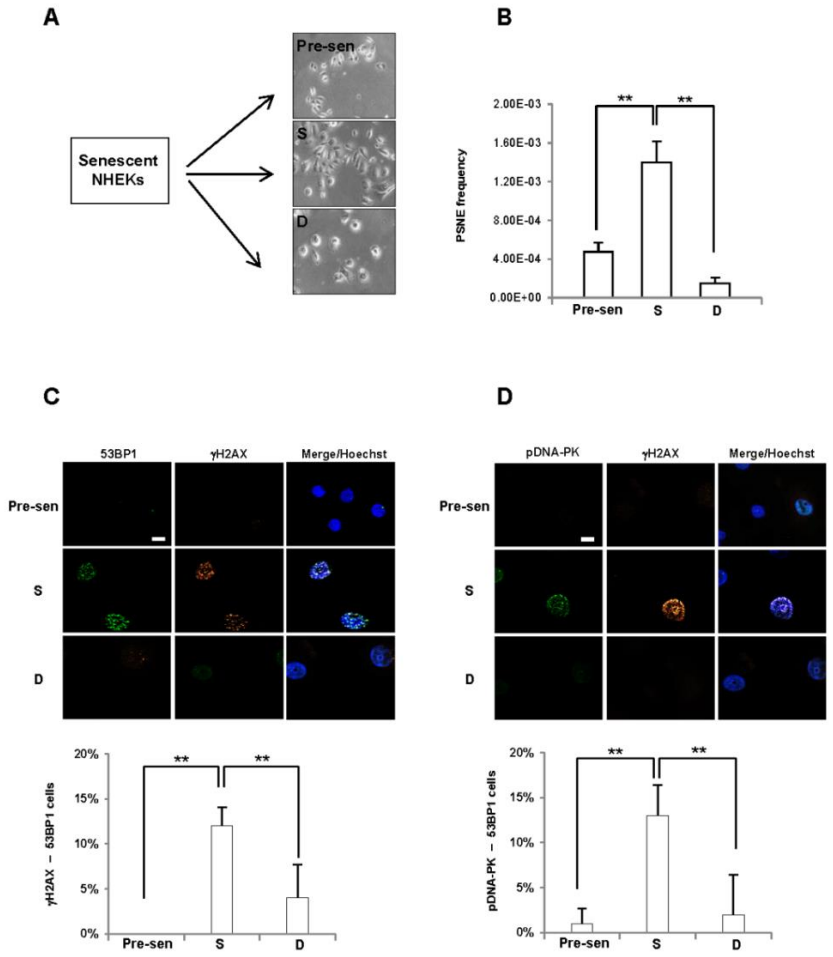


Figure 23 : Les NHEKs sénescents prédisposés à développer des clones PSNE présentent des marqueurs de fourches de réplication bloquées

(A) Des NHEKs sénescents (11 PDs) ont été triés par cytométrie en flux en fonction de leur taille. Pre-sen, S et D correspondent aux trois sous-populations triées. D représente les 30% de NHEKs avec la taille la plus importante - S représente les 30% de NHEKs avec une taille juste en dessous de celles de la sous-population D - Pre-sen englobe les cellules avec la taille la plus faible. Les NHEKs triés ont été ensemencés à faible densité (10 000 cellules / boite de 60mm) et examinés pour leur potentiel à générer des cellules PSNE. Le nombre total de clones par boite a été compté au microscope à contraste de phase. Les barres de l'histogramme représentent la moyenne sur les différentes boites et l'écart type.

(B) Des coimmunodétections des foyers 53BP1/γH2AX ont été réalisées sur les trois sous-populations Pre-sen, S et D de NHEKs. La barre d'échelle représente 20 µm. Les cellules positives ont été comptées directement au microscope dans 10 champs pris au hasard pour un total d'environ 150 cellules par condition. Les barres de l'histogramme représentent la moyenne sur les différents champs et l'écart type.

(C) Des coimmunodétections des foyers pDNA-PK/γH2AX ont été réalisées sur les trois sous-populations Pre-sen, S et D de NHEKs. La barre d'échelle représente 20 µm. Les cellules positives ont été comptées directement au microscope dans 10 champs pris au hasard pour un total d'environ 150 cellules par condition. Les barres de l'histogramme représentent la moyenne sur les différents champs et l'écart type.

Mes expériences d'immunofluorescence indiquent que seules les cellules avec des fourches bloquées possèdent un marquage nucléaire et intense de cycline E (Figure 22B et E).

J'ai cherché ensuite à identifier la kinase impliquée dans la signalisation des fourches bloquées. J'ai donc réalisé des immunofluorescences dirigées contre ATR, ATM et DNA-PK. Les résultats révèlent une activation nette de DNA-PK. Au contraire, nous n'observons pas de foyers ATR ni ATM (Figure 22C et E).

J'ai ensuite cherché à savoir si les fourches de réplication bloquées sont susceptibles d'être réparées par recombinaison homologue. J'ai réalisé des co-marquages des foyers DNA-PK avec RAD51 (protéine impliquée dans la réparation par HR) et BrdU. J'ai ainsi pu constater que les fourches bloquées sont RAD51 et BrdU positives, donc en cours de réparation (Figure 22D et E). L'ensemble de ces résultats nous a permis de conclure que ces nombreux foyers DDR correspondent à une signalisation de fourches de réplication bloquées en phase S du cycle cellulaire.

Vue la particularité de ce type de dommage, nous avons supposé que ces 3 à 5% de NHEKs sénescents pourraient correspondre à ceux qui sont susceptibles de générer les cellules PSNE.

Mise en évidence d'une corrélation positive associant les fourches de réplication bloquées et l'émergence néoplasique des NHEKs

Dans le but de déterminer si les NHEKs sénescents présentant des fourches bloquées étaient ceux prédisposés à échapper à l'arrêt dans le cycle et à développer des clones PSNE, j'ai tout d'abord trié des NHEKs par FACS en fonction de leur taille. Trois sous-populations ont été ainsi récupérées et baptisées : Pre-sen (cellules en pré-sénescence), S (cellules sénescentes) et D (cellules mourantes) avec un paramètre de taille croissant (Figure 23A). Les propriétés des sous-populations S et D sont caractérisées dans l'article N°2 (Figure 1). L'émergence néoplasique de chacune des trois sous-populations a été ensuite monitorée par microscopie et analysée en termes de fréquence (nombre de clones générés par cellules sénescentes platées). Comme attendu et montré dans l'article N°2, les NHEKs de la sous-population D émergent peu et ceux de la sous-population S développent des clones de cellules PSNE avec une fréquence significativement plus élevée (Figure

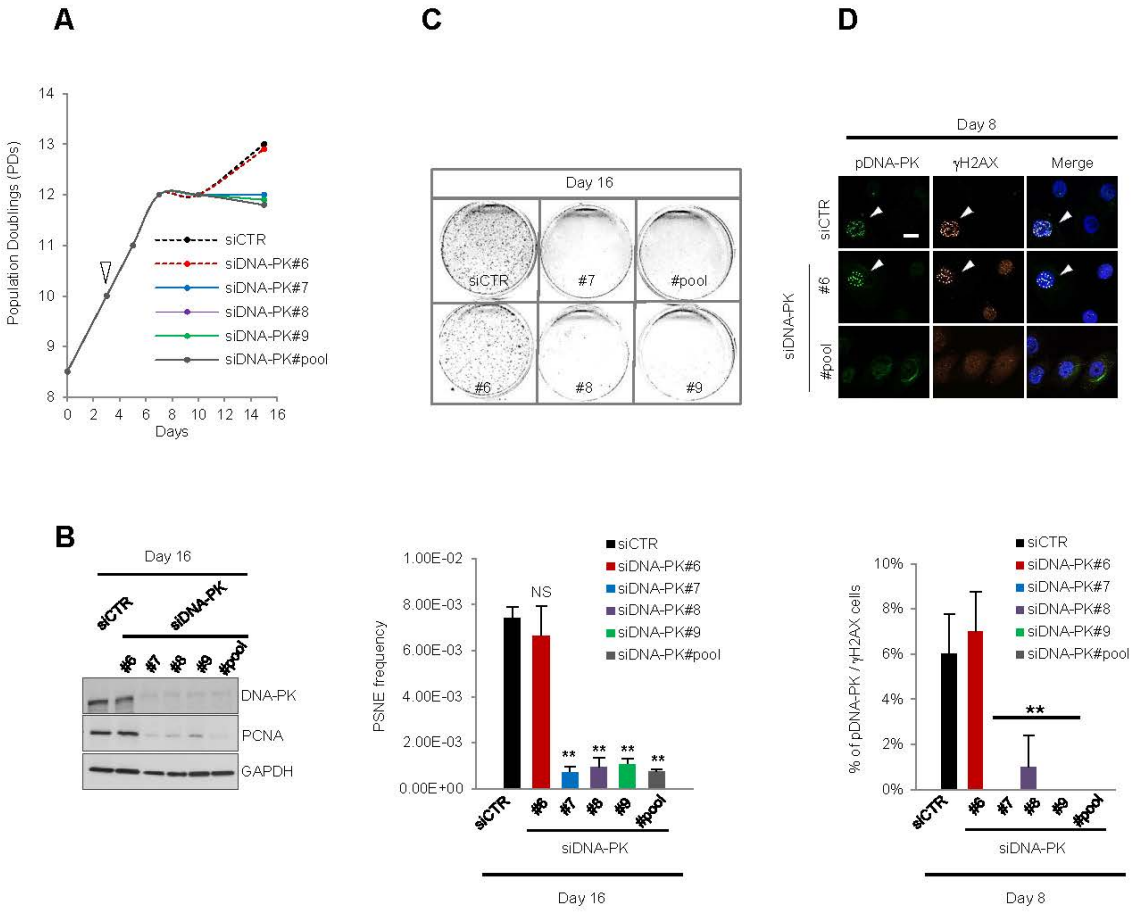


Figure 24 : La réparation des fourches de réplication bloquées est une étape préalable à l'émergence néoplasique

Des NHEKs en phase de croissance exponentielle ont été transfectés par des siRNA contrôle (siCTR), 4 siRNA DNA-PK différents (siDNA-PK N° 6, 7, 8 et 9) et par un pool de 4 siDNA-PK.

(A) Analyse de la courbe de croissance des NHEKs siCTR et siDNA-PK. La flèche représente le jour de la transfection.

(B) L'efficacité de la transfection a été vérifiée par Western Blot au jour 16 de l'expérience. Le siDNA-PK numéro 6 est inefficace.

(C) Des NHEKs sénescents siCTR et siDNA-PK ont été ensemencés à faible densité (10 000 cellules / boite de 60 mm) et examinés pour leur potentiel à générer des cellules PSNE.
-Les cellules ont été fixées et colorées au crystal violet au jour 16 de l'expérience.
-Le nombre total de clones par boite a été compté au microscope à contraste de phase. Les barres de l'histogramme représentent la moyenne sur les différentes boites et l'écart type.

(D) Des coimmunodétections des foyers pDNA-PK/γH2AX ont été réalisées sur des NHEKs siCTR et siDNA-PK au jour 8 de l'expérience. La barre d'échelle représente 20 µm. Les cellules positives ont été comptées directement au microscope dans 10 champs pris au hasard pour un total d'environ 150 cellules par condition. Les barres de l'histogramme représentent la moyenne sur les différents champs et l'écart type.

23B). Les cellules les plus petites et les moins granulaires (sous-population Pre-sen) présentent une fréquence de PSNE intermédiaire à celles des deux autres (Figure 23B). J'ai ensuite évalué le pourcentage de cellules présentant des marqueurs de fourches bloquées. D'une manière très intéressante, les expériences d'immunofluorescence montrent que la sous-population S qui génère le plus de cellules PSNE est enrichie en cellules présentant des marqueurs de fourches bloquées, notamment des foyers de la forme phosphorylée de DNA-PK, 53BP1 et de γH2AX (Figures 23C et D). Ces résultats suggèrent donc que les cellules sénescentes progénitrices de cellules émergentes passent par une étape de transition G1-S qui transforme leurs SSBs non réparées en fourches de réplication bloquées.

Mise en évidence du rôle clé de la réparation des fourches de réplication bloquées dans l'émergence néoplasique des NHEKs

Dans le but de déterminer si la réparation des fourches bloquées était critique pour la continuation du cycle cellulaire et la génération de cellules PSNE, j'ai inhibé l'expression de la kinase DNA-PK impliquée dans leur signalisation et évalué ensuite le potentiel des cellules à développer des clones PSNE. Des NHEKs en phase de croissance exponentielle ont été transfectés par quatre siDNA-PK différents. La vérification de l'efficacité des siRNA, effectuée en Western blot, indique que le siDNA-PK numéro 6 est non fonctionnel (Figure 24B).

L'étude de la cinétique de croissance révèle des effets majeurs sur l'émergence néoplasique. Les cellules contrôle et les cellules invalidées pour DNA-PK sont entrées en sénescence simultanément, mais, contrairement aux cellules contrôle, le plateau de sénescence des cellules invalidées pour DNA-PK est resté stable et n'a pas conduit à une reprise de prolifération (Figure 24A). Ceci est conforté par les analyses de fréquence d'émergence qui révèlent une diminution significative du nombre de clones PSNE chez les NHEKs si-DNA-PK (Figure 24C). Les expériences d'immunofluorescence indiquent une réduction nette du nombre de cellules ayant des marqueurs de fourches de réplication bloquées (Figure 24D). Nous arrivons donc à un modèle selon lequel des SSBs d'origine oxydante accumulées à la sénescence des NHEKs contribueraient à la génération de mutations et de délétions via un blocage transitoire des fourches de réplication et une réparation mutagène par recombinaison homologue. Il faudrait néanmoins valider ces conclusions en inhibant le mécanisme de recombinaison homologue par des siRAD51.

Partie 3: Rôle du stress oxydant sur l'activité autophagique des NHEKs sénescents et sur leur émergence neoplasique.

Le devenir principal des NHEKs sénescents est la mort cellulaire qui affecte la quasi-totalité des cellules. Cette mort n'est pas apoptotique mais procède d'une sur-activation du processus autophagique. Celle-ci est la conséquence d'une activation de la voie pro-oxydante NFκB $\rightarrow$ MnSOD $\rightarrow$ H_2O_2 et d'une accumulation de dommages oxydants, notamment des 8-oxo-guanines et des pontages 1-amino-3-iminopropène ou AIP (Bernard et al, 2004; Deruy et al, 2010; Gosselin et al, 2009b).

Afin de déchiffrer les mécanismes à la base de la PSNE, il était incontournable de déterminer si la mort par macroautophagie des NHEKs sénescents était une barrière efficace à l'émergence néoplasique. Autrement dit, si les progéniteurs de cellules PSNE devaient acquérir une résistance à la mort les rendant capables de reprendre la division mitotique. Nous avons donc investigué le rôle que l'autophagie joue dans la balance émergence néoplasique/mort des NHEKs sénescents.

Nous avons tout d'abord montré que les progéniteurs des cellules PSNE possédaient une activité autophagique modérée, plus importante que ceux en phase de croissance exponentielle (environ x20) mais plus faible (environ x10) que ceux qui subissent la mort (Figures 8 et 9 de l'article N° 2). Nous avons ensuite constaté que l'inhibition efficace de l'autophagie par siRNA ou inhibiteur pharmacologique contribue à une réduction de leur mort, à une très forte accumulation de composés altérés dans les cellules (8-oxoG et aggrésome) et à une réduction de leur potentiel à développer des cellules néoplasiques. En revanche, une inhibition légère contribue aussi à une réduction de la mort des cellules sénescentes, mais n'altère pas l'homéostasie cellulaire et favorise l'émergence néoplasique (Figure 3, Figure 4, Figure 5, Figure 6 et Figure 7 de l'article N°2). De plus, j'ai montré que les niveaux d'activité autophagique à la sénescence chez les NHEKs sont étroitement corrélés avec l'activation de la voie NFκB $\rightarrow$ MnSOD et à l'accumulation de H_2O_2. Les progéniteurs de cellules PSNE activent ainsi plus faiblement NF-κB, induisent plus faiblement l'expression de la MnSOD et produisent ainsi moins de H_2O_2 que les autres cellules sénescentes (Figure 10 de l'article N°2).

L'ensemble de ces résultats nous a amené à conclure que pour générer des cellules PSNE, les NHEKs sénescents doivent échapper à la mort par macroautophagie tout en gardant un niveau d'activité macroautophagique de base suffisant pour l'élimination des composés altérés par le stress oxydant et ainsi maintenir l'homéostasie cellulaire nécessaire à leur ré-entrée en mitose.

L'ensemble de ces résultats fait l'objet d'un article N°2 intitulé «*Level of macroautophagy drives senescent keratinocytes into cell death or neoplastic evasion* » paru dans Cell Death and Disease.

Article N°2: *Level of macroautophagy drives senescent keratinocytes into cell death or neoplastic evasion*

(Cell Death Dis. 2014 Dec 18;5:e1577. doi: 10.1038/cddis.2014.533)

Discussion générale

Chez les cellules épithéliales, du moins les kératinocytes normaux de peau et les cellules épithéliales mammaires, la sénescence est transitoire et débouche sur une émergence néoplasique post-sénescence. Les cellules émergentes présentent des caractères de transformation et ont accumulé des mutations. Cet échappement néoplasique de la sénescence n'est jamais observé chez les fibroblastes normaux de peau qui, au contraire, une fois en sénescence sont arrêtés irréversiblement dans le cycle cellulaire. Mon projet de thèse visait à déchiffrer les évènements moléculaires dépendant du stress oxydant et impliqués dans l'échappement de la sénescence. A cet effet, j'ai réalisé des études comparatives entre les kératinocytes et les fibroblastes. A travers cette étude, j'ai mis en évidence un mécanisme inédit impliqué à la fois dans la survenue du plateau de sénescence et l'échappement tumoral chez les cellules épithéliales. Ce mécanisme met en jeu une forte accumulation de SSBs qui résulte de l'augmentation du niveau de stress oxydant à la sénescence mais également d'une diminution de l'efficacité des mécanismes de réparation. Le stress oxydant et les SSBs qu'il génère ont donc un effet dual qui résulte d'une part de leurs capacités à perturber la progression du cycle cellulaire, expliquant l'effet inducteur de la sénescence, et d'autre part de leurs propriétés mutagènes expliquant leur contribution à la PSNE.

La sénescence s'établit en conséquence de l'accumulation de cassures de l'ADN non réparées dont la nature diffère d'un type cellulaire à l'autre

Les études sur les mécanismes moléculaires de sénescence ont révélé que les dommages à l'ADN et leurs voies de signalisation sont des dénominateurs communs à l'instauration du phénotype sénescent qu'ils soient induits suite au dysfonctionnement télomèrique, à une augmentation du stress oxydant ou à une activation oncogénique inadéquate. D'une part, les télomères raccourcis et le stress réplicatif engendrent une activation DDR (d'Adda di Fagagna et al, 2003; Di Micco et al., 2006), et d'autre part, le stress oxydant entraine une accumulation massive de SSBs et une activation SSBR (Article N°1).

Mais la seule présence du dommage au niveau de la molécule d'ADN ne suffit pas pour induire la sénescence. Le dommage doit demeurer non réparé et induire de façon

persistante une voie de signalisation menant à l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire. Ce modèle est bien établit pour les DSBs associées à la sénescence. L'origine de ces DSBs est sujette à controverse. Bien qu'il y ait des foyers DDR correspondant à des télomères raccourcis et dysfonctionnels (Adda di Fagagna et al., 2003), une fraction non négligeable est extra-télomérique (Wang et al., 2009). De façon surprenante, il n'existe à ce jour que peu de données expliquant la genèse de telles cassures à la sénescence. On suspecte, d'une manière générale, que le stress oxydant en serait l'inducteur. Or, la plupart des expériences réalisées à ce propos utilisent des concentrations non physiologiques de H_2O_2 de l'ordre de 100 voire 200 µM (Chen et al., 2004 , 2005). Or, comme nous l'avons montré dans ce travail, le niveau de stress oxydant associé à la sénescence est équivalent à des concentrations en H_2O_2 comprises entre 7 et 10 µM, inductrices uniquement de SSBs et pas de DSBs.

Il est intéressant de distinguer deux sous-catégories de DSBs. Celles réparables, qui provoquent un ralentissement transitoire de la progression du cycle cellulaire et celles persistantes qui engagent un arrêt stable du cycle cellulaire et le programme de sénescence. Des travaux visant à expliquer la persistance des DSBs à la sénescence ont mis en évidence un déclin de l'efficacité des mécanismes de réparation. Par exemple, la réparation par NHEJ devient moins efficace et plus mutagène à la sénescence (Seluanov et al., 2004). La portée de ces conclusions est modérée puisque les cellules sénescentes semblent être capables de réparer des DSBs néo-induites au même titre que les cellules en phase de croissance exponentielle (Sedelnikova et al., 2004). Il semblerait donc que la survenue de la sénescence s'accompagne d'une accumulation de DSBs de nature atypique les rendant non-réparables et persistantes. Les foyers ainsi générés ont été appelés DNA-SCARS (*DNA Segments with Chromatin Alterations Reinforcing Senescence*) et se distinguent des foyers DDR transitoires par l'absence des protéines RAD51 et RPA et la défaillance d'une activité de néo-synthèse d'ADN (Rodier et al., 2011).

Les foyers DDR sont considérés comme un marqueur robuste du phénotype sénescent utilisable *in vitro* comme *in vivo*. Ainsi, une accumulation de foyers γH2AX a été observée dans les tissus de différents types de cellules somatiques et germinales de souris (Sedelnikova et al., 2004). De plus, des cellules positives aux foyers 53BP1 augmentent avec le vieillissement dans les fibroblastes de derme de peau de singes Babouins (Jeyapalan et al., 2007a).

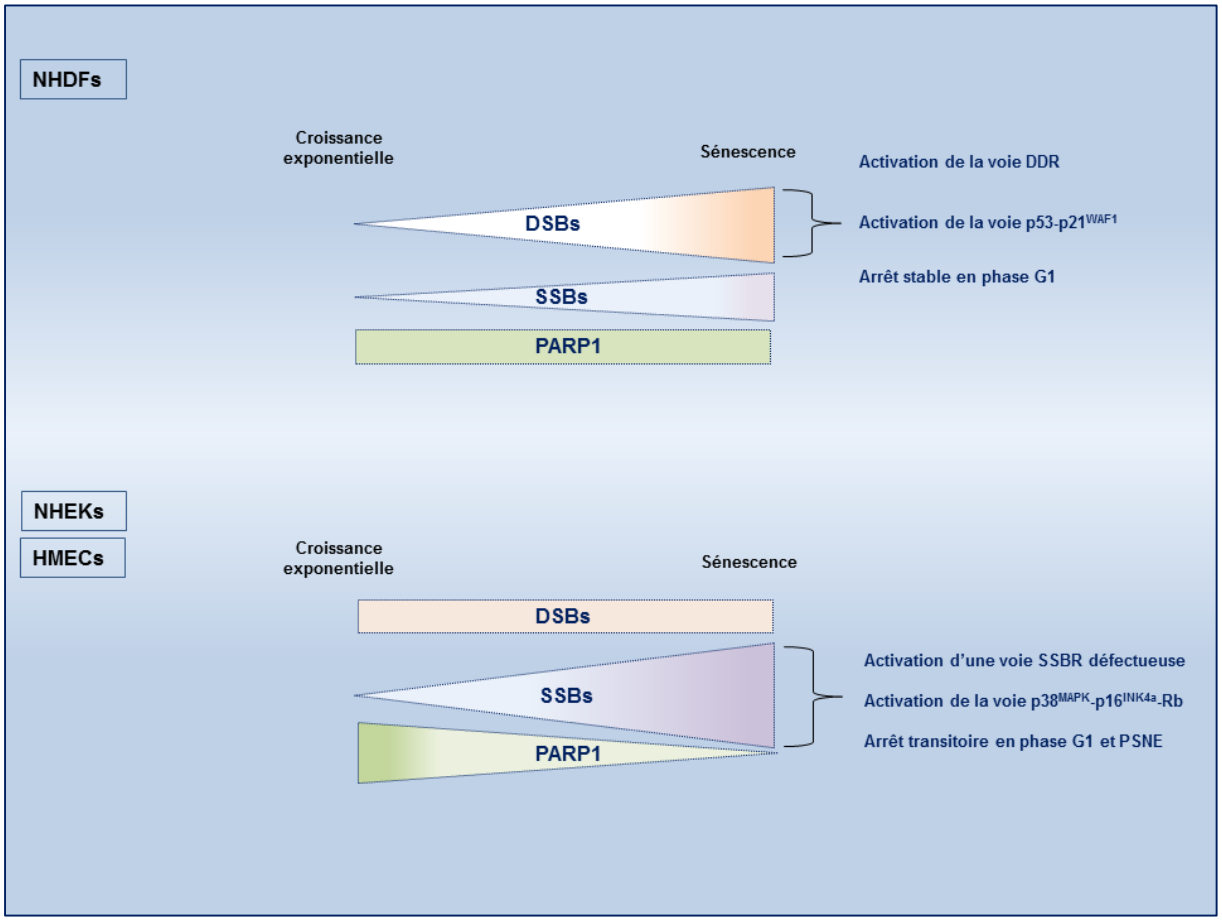


Figure 25 : Schéma récapitulatif des différences entre la sénescence des fibroblastes et celle des cellules épithéliales

Nos résultats révèlent également une augmentation nette du pourcentage de cellules positives aux foyers 53BP1 dans les fibroblastes de derme de peau âgée (Article N°1).

Les SSBs, quant à elles, sont souvent sous-estimées par la communauté scientifique. En effet, le terme DDR est couramment employé pour désigner à la fois les voies de signalisation des SSBs et DSBs. Or, les SSBs engagent des voies de signalisation (SSBR) très différentes de celles des DSBs (DDR) ne conduisant pas aux mêmes conséquences. Une étude très récente a mis en évidence le potentiel des SSBs à induire un arrêt dans le cycle cellulaire en phase G1 via une activation critique de la kinase ATM (Khoronenkova and Dianov, 2015). Pareillement, nos travaux révèlent que les SSBs persistantes sont capables de provoquer un arrêt dans le cycle couplé à la mise en place du programme de sénescence. Ceci met en jeu une activation de la voie $p16^{INK4a}$-Rb et un arrêt en phase G1 (Article N°1).

Le potentiel des cellules sénescentes à échapper à l'arrêt du cycle cellulaire et à procréer à nouveau des cellules proliférantes pourrait dépendre de la nature et de la persistance de ces dommages et en conséquence de la pérennité des voies de signalisation activées. Or, les cassures et les voies de signalisation en aval semblent varier selon les types cellulaires (Figure 25). La survenue de plateau de sénescence des fibroblastes s'accompagne d'une activation robuste et chronique de la voie DDR et de la voie p53-$p21^{WAF1}$. En effet, la quasi-totalité des fibroblastes sénescents possèdent 3 à 5 foyers DDR dans leurs noyaux, notamment des foyers ATM, γH2AX et 53BP1. Une inhibition de la signalisation DDR chez les cellules sénescentes promeut leur réentrée en phase S (Adda di Fagagna et al., 2003). En revanche, la survenue du plateau de sénescence chez les cellules épithéliales (kératinocytes et cellules épithéliales mammaires) s'accompagne d'une très forte accumulation de SSBs et non de DSBs. Contrairement aux DSBs, l'origine oxydante des SSBs a été formellement documentée dans ce travail. L'arrêt dans le cycle associé à la sénescence des cellules épithéliales est transitoire et aboutit systématiquement à la génération de nouvelles cellules proliférantes. Il apparait donc que l'arrêt dans le cycle cellulaire gouverné par les SSBs et la voie $p16^{INK4a}$-Rb soit moins robuste que celui associé à des DSBs et à la voie p53-$p21^{WAF1}$ (Figure 25).

Ainsi, le ratio SSBs/DSBs présent au plateau de sénescence pourrait moduler le devenir des cellules sénescentes. Des cellules possédant une signature DSBs subiront un

arrêt dans le cycle cellulaire stable tandis que celles avec une signature SSBs s'orienteront vers un arrêt transitoire conduisant à une émergence néoplasique.

Pourquoi l'expression de la PARP1 diminue-t-elle à la sénescence chez les cellules épithéliales ?

Malgré la diversité des études réalisées sur les fonctions biologiques de PARP1, il existe très peu de données concernant les mécanismes impliqués dans la régulation de son expression. Les études du promoteur du gène *PARP1* ont révélé que celui-ci ne possède pas de boites TATA. Il est riche en ilots CG et comprend des séquences consensus pour plusieurs facteurs de transcription, notamment SP1(Zaniolo et al., 2005), AP-2 (Yokoyama et al., 1990), YY1 (Oei et al., 1997) et ETS (Soldatenkov et al., 1999). Les régulations de l'expression de PARP1 semblent se limiter à l'échelle transcriptionelle. Dans ce cadre, des changements des niveaux de l'ARN messager de PARP1 ont été observés durant la différentiation cellulaire et la progression du cycle cellulaire (Bhatia et al., 1995; Thibodeau et al., 1989).

La survenue du plateau de sénescence des cellules épithéliales s'accompagne d'une diminution de l'expression de PARP1. Nous avons des résultats préliminaires montrant que cette diminution est assurée principalement par le stress oxydant. En effet, un traitement H_2O_2 de NHEKs en phase de croissance exponentielle provoque une chute drastique et rapide de l'ARNm de PARP1. En revanche, un traitement antioxydant de NHEKs sénescents aboutit à une restauration des niveaux de PARP1 (donnée non publiée). La portée de ce résultat est toutefois surprenante. Il est difficile de comprendre pourquoi l'expression de PARP1 diminue uniquement à la sénescence des cellules épithéliales et pas à celle des fibroblastes, les deux types cellulaires étant soumis à des niveaux équivalents de stress oxydant. De plus, un paradoxe tient au fait que les cellules sénescentes s'adapteraient à une situation de stress oxydant en réduisant les niveaux d'une protéine clé de la réparation des dommages oxydants. En plus de son rôle dans la signalisation des cassures simple-brin, PARP1 joue un rôle dans la mort cellulaire. Une sur-activation de PARP1 induit la mort cellulaire par nécroptose ou parthanatos. Deux mécanismes principaux sont décrits. L'un implique une déplétion du contenu cytosolique en NAD^+ et un défaut de production d'ATP. Un deuxième repose sur le relargage des facteurs inducteurs d'apoptose (*AIF* - *Apoptosis-*

Inducing Factor) des mitochondries vers le noyau par l'intermédiaire des PAR (Delavallée et al., 2011; Ha and Snyder, 1999; Bouchard et al., 2003). Nous pouvons ainsi supposer que la down-régulation de PARP1 à la sénescence en réponse au stress oxydant permettrait de limiter la production de PAR et de maintenir la production d'ATP afin d'échapper à la mort cellulaire malgré le grand nombre de dommages oxydants.

Mise en évidence d'une nouvelle voie de signalisation XRCC1 → p38-MAPK → $p16^{INK4a}$

La survenue du plateau de sénescence chez les cellules épithéliales s'accompagne d'une augmentation considérable du taux de SSBs et d'une apparition massive de gros foyers nucléaires XRCC1. Ceci résulte principalement d'un déclin de l'activité de la PARP1 à la sénescence. Etonament, nous montrons que la régression de l'activité de PARP1 à la sénescence n'affecte pas le recrutement de XRCC1 aux sites SSBs. Elle influe cependant sur la dynamique de leur disparition. Il semble qu'elle s'agrège sur les SSBs pour former de gros foyers. Ce modèle de réponse SSBR ne s'accorde pas vraiment avec ce qui a été décrit dans la littérature jusqu'à récemment. En condition normale, le recrutement et le relargage de XRCC1 se suivent brièvement en quelques minutes et dépendent de l'activité PARP (El-Khamisy et al., 2003b). Cependant, il a été montré récemment que de très petits polymères d'ADP-ribose (7 unités) sont suffisants pour recruter XRCC1(Kim et al., 2014). L'activité résiduelle de PARP1 à la sénescence serait donc suffisante pour recruter XRCC1, mais insuffisante pour le bon déroulement des événements suivants, ce qui aboutit à une accumulation anormale des protéines XRCC1 sur les SSBs. Ceci entraine la mise en route d'une voie de signalisation mettant en jeu la kinase p38-MAPK (Article N°1).

p38 est un groupe de kinases qui appartient, avec les deux groupes JNK et ERK, à la famille des MAPK (Raman et al., 2007). Elle s'active en réponse à de nombreux types de stress, notamment les rayonnements ultraviolets, les radiations ionisantes et le stress oxydant. En fonction de la nature du stress, l'induction de p38-MAPK affecte un large spectre de substrats incluant des facteurs de transcription (ATF2, MEF2), des protéines kinases (MnK, MAPKAPK2), des acteurs de l'apoptose (Bcl-2, caspases) et des régulateurs du cycle cellulaire (cycline D1, $p16^{INK4a}$ et p53) (Raman et al., 2007).

Il existe des données dans la littérature quant à l'activation de p38-MAPK en présence de dommages à l'ADN. En effet, l'induction de DSBs par les rayonnements ionisants γ ou par un traitement étoposide engendre une activation de la p38-MAPK et un arrêt dans le cycle cellulaire en phase G2 (Bulavin et al., 2002; Mikhailov et al., 2004). Ceci repose principalement sur l'activation et la stabilisation de p53 et l'induction de l'expression de ses gènes cibles $p21^{WAF1}$ et Gadd45α (Bulavin et al., 1999; She et al., 2000; Jin et al., 2003). Nos données dévoilent un mécanisme inédit associant les SSBs à l'activation de la voie p38-MAPK→$p16^{INK4a}$→Rb. Ceci met en jeu une voie de signalisation initiée par les foyers XRCC1 anormalement persistants. A l'appui de cette idée, l'inhibition de l'expression et donc de la signalisation XRCC1 chez les NHEKs sénescents atténue l'activation de la voie p38-MAPK (Article N°1).

Pourquoi et comment les cellules sénescentes ré-entrent dans le cycle ?

Les kératinocytes sénescents sont susceptibles de perdre spontanément une des propriétés critiques de la sénescence concernant l'irréversibilité de l'arrêt dans le cycle. Des cellules ayant un phénotype de sénescence se retrouvent ainsi capables de produire un nombre variable de petites cellules filles avec des caractéristiques de cellules transformées. Les observations par vidéomicroscopie ont permis de décrypter les événements associés à la division des kératinocytes sénescents. Ceux-ci sont différents de la division mitotique selon laquelle une cellule mère génère deux cellules filles de tailles équivalentes. En effet, les cellules sénescentes mères procèdent en libérant des cellules filles par un mécanisme de cytokinèse asymétrique. Les cellules produites sont de petite taille, mononuclées et actives sur le plan mitotique (Gosselin et al., 2009b). Ce mode de division, appelé néose, a été associé à l'échappement de la sénescence chez quelques types de cellules primaires, notamment les cellules épithéliales mammaire et les amniocytes (Romanov et al., 2001; Zitcer and Dunnebacke, 1957). Les voies moléculaires à la base de la néose restent à explorer (Rajaraman et al., 2005; Sundaram et al., 2004).

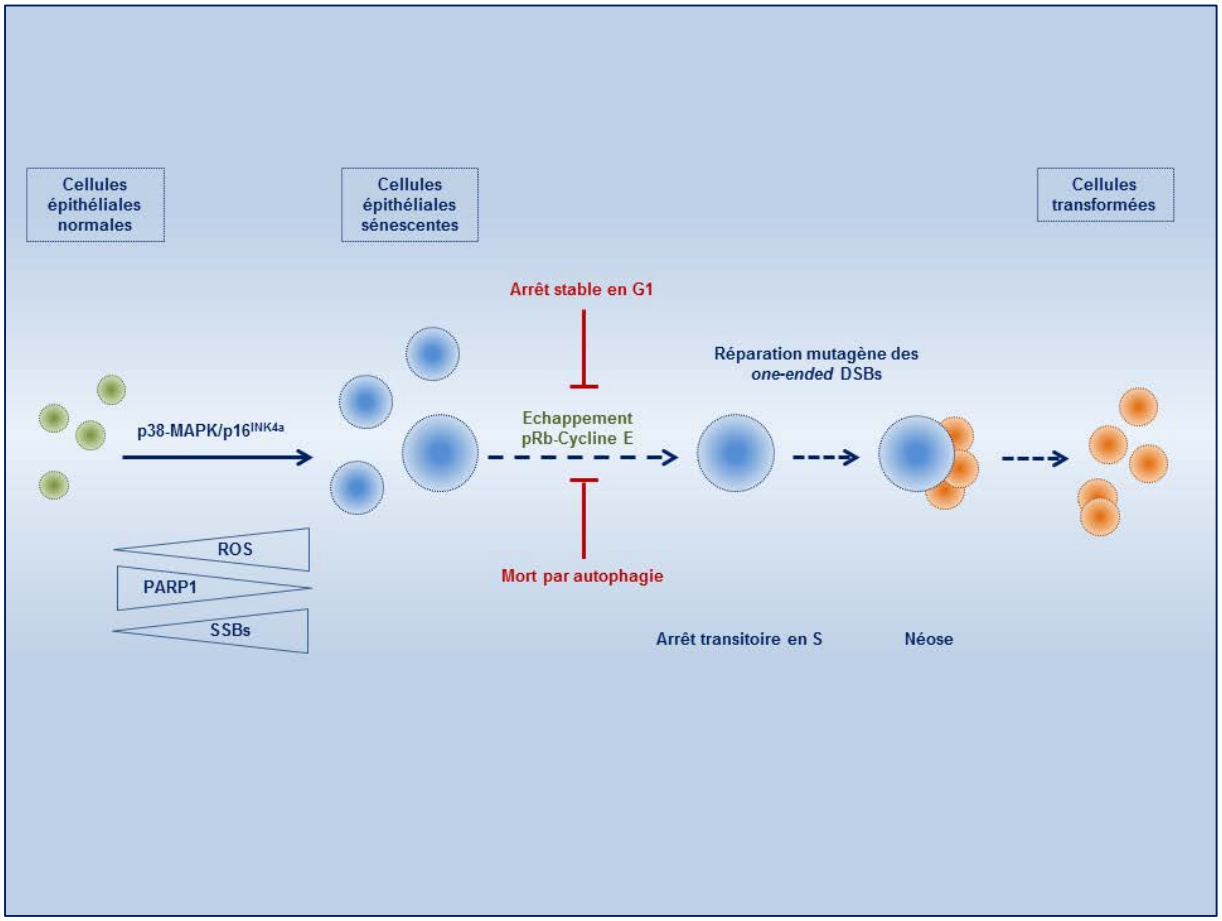


Figure 26 : Modèle plausible à l'origine de l'échappement néoplasique post-sénescence des cellules épithéliales.

L'échappement néoplasique post-sénescence chez les kératinocytes est un processus complexe qui consiste en une succession d'évènements. Un modèle plausible repose sur une évasion critique à deux barrières : la mort par autophagie et l'arrêt dans le cycle en G1. Concernant la première barrière, nous savons aujourd'hui que les progéniteurs de cellules émergentes possèdent un niveau de ROS et une activité autophagique modérés leur permettant d'échapper à la mort. Toutefois, ces cellules maintiennent une activité autophagique de ménage critique pour l'élimination des composés altérés, le maintien de l'homéostasie cellulaire et la reprise du cycle cellulaire (Article N°2).

De plus, comme nous l'avons vu précédemment, la majorité des kératinocytes sénescents activent la voie $p16^{INK4a}$-Rb et s'arrêtent principalement en G1. Toutefois, une minorité de cellules (3 à 5%) se retrouvent en phase S avec des marqueurs de fourches de réplication bloquées. De manière intéressante, ces cellules sont probablement les progéniteurs des cellules émergentes (Figure 26). Il semblerait ainsi que les progéniteurs des cellules émergentes soient capables d'échapper, d'une manière ou d'une autre, à l'arrêt en G1. A l'heure actuelle, nous n'avons pas suffisamment de données expérimentales expliquant le défaut d'arrêt en G1. Nous nous demandons si une altération ou une activation plus faible de $p16^{INK4a}$ pourrait en être la cause. A l'appui de cette idée, les progéniteurs de cellules PSNE possèdent un marquage nucléaire intense de la forme phosphorylée de Rb et de la cycline E (Figure 22B et 26).

Il serait donc intéressant d'évaluer l'expression de $p16^{INK4a}$ dans ces progéniteurs puis de déterminer si une inhibition graduée de $p16^{INK4a}$ à l'aide de siRNA d'efficacité variée pourrait promouvoir de façon dose-dépendante la transition G1-S et en conséquence l'émergence néoplasique.

Comment les cellules PSNE acquièrent-elles des caractères de transformation ?

L'évasion à ces deux barrières ne suffit pas pour produire des cellules transformées. Ceci nécessite des évènements inducteurs de mutations. Dans ce cadre, nous supposons que les progéniteurs de cellules PSNE échappent à la mort par autophagie, échappent à l'arrêt

en G1, progressent en phase S et subissent une phase transitoire de blocage des fourches de réplication suivie d'une réparation mutagène par recombinaison homologue (Figure 26).

Actuellement, l'implication potentielle des cassures simple-brin de l'ADN en tumorigenèse est peu prise en considération car il est admis que ces cassures sont réparées très rapidement, et donc ne s'accumulent pas et ne contribuent que peu à la génération de fourches bloquées. Il existe cependant quelques données dans la littérature quant à l'implication de la PARP1 dans le maintien de la stabilité du génome. En effet, des fibroblastes embryonnaires de souris invalidées pour la PARP1 présentent des défauts de réparation de cassures de l'ADN, des augmentations de la fréquence de recombinaison homologue et d'échanges de chromatides-sœurs (Bürkle, 2001; Murcia et al., 1997, 2003; Wang et al., 1995). Les effets s'accentuent suite à des traitements par des agents alkylants ou suite à une exposition à des radiations ionisantes (Shibata et al., 2004). Des expériences menées dans des modèles de souris PARP1-/- ont mis en exergue des liens directs avec la carcinogenèse. En effet, les souris invalidées pour la PARP1 développent spontanément des hyperplasies de peau (Wang et al., 1995). Les conséquences s'aggravent suite à une invalidation simultanée de p53. Les souris double knock-out présentent une augmentation de l'incidence des carcinomes de glandes mammaires, des carcinomes de peau, des carcinomes de prostate et des tumeurs du cerveau (Tong et al., 2001).

Existe-t-il des liens entre SSBs et autophagie ?

Bien que l'établissement du phénotype sénescent soit accompagné d'une augmentation de l'activité autophagique, les liens fonctionnels associant ces deux processus restent controversés. Il a été proposé que l'autophagie soit un mécanisme effecteur facilitant l'amorçage du phénotype sénescent. Dans le cas des kératinocytes sénescents, l'autophagie conduit à une mort massive affectant la majorité des cellules. Elle renforce ainsi l'effet suppresseur de tumeur de la sénescence en concourant à l'élimination des cellules endommagées. En revanche, les fibroblastes sénescents résistent à la mort et restent viables tout au long du plateau. Nous n'avons pour l'instant abordé aucun des mécanismes expliquant un tel différentiel. Nous nous demandons actuellement si les SSBs persistantes accumulées à la sénescence chez les kératinocytes et non chez les fibroblastes seraient à l'origine de leur mort par autophagie.

Des recherches bibliographiques permettent de dégager des concordances juxtaposant les dommages à l'ADN et l'autophagie : une induction de dommages à l'ADN par des traitements avec de l'étoposide (inductrice de DSBs) ou la campthothécine (inductrice de SSBs) provoque un arrêt dans le cycle et stimule l'autophagie (Abedin et al., 2007; Katayama et al., 2006; Rieber and Rieber, 2008). De plus, les facteurs de transcription FOXO3 s'activent en présence de dommages à l'ADN et induisent la transcription des gènes d'autophagie, notamment LC3 (Chiacchiera and Simone, 2010; Mammucari et al., 2007; Tsai et al., 2008). Il apparait donc que les dommages à l'ADN, l'autophagie et la sénescence soient interconnectés. Nos résultats préliminaires mettent en évidence une corrélation positive entre le niveau d'activité autophagique chez les NHEKs sénescent d'une part et le taux de SSBs d'autre part. En effet, les NHEKs mourants de la sous-population D présentent une quantité de SSBs plus importante que ceux de la sous-population S prédisposés à développer de clones PSNE (données non publiées).

La double face de la sénescence : intrinsèquement suppresseur ou promoteur de tumeur selon la nature des dommages à l'ADN accumulés

Les travaux cherchant à comprendre les processus moléculaires de la sénescence ont été principalement effectués sur des fibroblastes. Ils ont mis en évidence le rôle prépondérant du raccourcissement télomérique et des voies DDR induites en conséquence dans l'état d'arrêt irréversible dans le cycle cellulaire, caractéristique de la sénescence. Ces résultats majeurs dans le domaine de la sénescence ont conduit à l'idée que la sénescence serait strictement un phénomène suppresseur de tumeur. Au regard de ces résultats, il devient difficile de comprendre l'augmentation de la survenue des cancers avec le vieillissement. Les études réalisées sur d'autres types de cellules primaires, les cellules épithéliales en particulier, ont permis de nuancer cette vision et de montrer que l'état de sénescence pourrait correspondre à une phase préparatoire à la tumorigenèse.

Ce comportement opposé vis-à-vis de la sénescence est à mettre en rapport avec les types de cancers associés au vieillissement. En effet, chez l'homme, les cancers d'origine fibroblastique sont très rares et leur incidence n'est pas liée à l'âge. Les cancers les plus fréquents sont de loin ceux d'origine épithéliale, et leur incidence est strictement et

fortement influencée par l'âge (Statistiques du NCI-*National Cancer Institute*). Nous ne pouvons donc pas attribuer à la sénescence toutes les caractéristiques issues des études réalisées sur un modèle précis. Celles-ci peuvent fluctuer selon les types cellulaires.

Bien que les fibroblastes et les cellules épithéliales sénescents partagent abondamment de points communs (changements morphologiques, augmentation de l'activité *SA-β-Gal*, …), les inducteurs et les voies moléculaires engageant l'arrêt de la progression du cycle cellulaire ne sont pas identiques. De plus, la stabilité relative de l'arrêt dans le cycle dans les deux types cellulaires est différente. En effet, le plateau de sénescence chez les fibroblastes est qualifié d'irréversible et dépend singulièrement du raccourcissement des télomères et de l'activation de la voie p53-$p21^{WAF1}$. Il serait donc en effet intrinsèquement suppresseur de tumeur. En revanche, chez les kératinocytes, la survenue du plateau de sénescence découle de l'accroissement du niveau de stress oxydant, de l'accumulation de SSBs et de l'activation de la voie p38-MAPK→$p16^{INK4a}$-Rb. Remarquablement, l'arrêt dans le cycle est transitoire et réversible, au moins dans un petit nombre de cellules, et favorise la mise en place de lésions *one-ended* DSBs dont la réparation est mutagène. La sénescence dans ce cas prépare à l'acquisition de mutations et peut donc être considérée comme intrinsèquement promoteur de tumeur.

Quelle serait alors la pertinence physiologique de ces 'deux types' de sénescence ? Quelques études réalisées sur des populations humaines ont pointé une corrélation négative entre la longueur des télomères et le vieillissement (Aikata et al., 2000; Guan et al., 2007; Kang et al., 2002; Kveiborg et al., 1999; Lindsey et al., 1991). En effet, les télomères semblent diminuer de 24,8 à 27,7 paires de bases chaque année (Brouilette et al., 2003; Valdes et al., 2005). Ceci est affecté par un ensemble de facteurs comprenant le donneur et l'environnement. En outre, les patients atteints de syndrome de vieillissement prématuré (syndrome de Werner et syndrome de Hutchinson-Gilford) présentent un raccourcissement télomérique drastique et une espérance de vie réduite (Callén and Surrallés, 2004). Le nombre de télomères dysfonctionnels dans les tissus augmente avec le vieillissement. Ceci a été mis en exergue chez les fibroblastes de derme de singes babouin âgés (Jeyapalan et al., 2007b). Nos expériences réalisées sur les coupes de peau humaine révèlent une accumulation nette de foyers DDR dans les fibroblastes de derme chez les individus âgés. Celles-ci correspondraient en partie à des télomères dysfonctionnels.

Plusieurs études ont également mis en évidence une amplification du niveau de stress oxydant tissulaire avec le vieillissement. Ceci se manifeste principalement par la diminution du ratio GSH/GSSG et l'accumulation de dommages aux macromolécules dans les tissus (Kregel and Zhang, 2007; Romano et al., 2010). Dans ce cadre, nos résultats soulignent une accentuation des niveaux de la MnSOD et des SSBs dans les cellules du compartiment épidermique avec le vieillissement. Il serait maintenant intéressant que nous recherchions la présence de cellules présentant des foyers DNA-PK dans les coupes de peau de donneurs âgés. Le lien causal potentiel associant le stress oxydant et le vieillissement est conforté par des expérimentations *in vivo*. En effet, la réduction du niveau de stress (traitements antioxydants) diminue les signes de vieillissement et augmente l'espérance de vie des animaux. En revanche, une induction du stress oxydant (*via* la génération de mutations au niveau de la chaîne respiratoire) accélère la survenue de ce processus (Bodnar et al., 1998; Ishii et al., 1998; Schriner et al., 2005; Sun and Tower, 1999). Au vu de ces éléments, les deux types de sénescence semble coexister dans l'organisme et moduler le processus du vieillissement. Il reste à déterminer si, *in vivo*, la sénescence associée aux cassures simple-brin ou à des fourches de réplication bloquées favorise la carcinogenèse.

Références bibliographiques

Abdallah, P., Luciano, P., Runge, K.W., Lisby, M., Géli, V., Gilson, E., and Teixeira, M.T. (2009). A two step model for senescence triggered by a single critically short telomere. Nat. Cell Biol. *11*, 988–993.

Abdou, I., Poirier, G.G., Hendzel, M.J., and Weinfeld, M. (2015). DNA ligase III acts as a DNA strand break sensor in the cellular orchestration of DNA strand break repair. Nucleic Acids Res. *43*, 875–892.

Abedin, M.J., Wang, D., McDonnell, M.A., Lehmann, U., and Kelekar, A. (2007). Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. Cell Death Differ. *14*, 500–510.

Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. Genes Dev. *15*, 2177–2196.

Acosta, J.C., O'Loghlen, A., Banito, A., Guijarro, M.V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., et al. (2008). Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence. Cell *133*, 1006–1018.

Acosta, J.C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J.P., Athineos, D., Kang, T.-W., Lasitschka, F., Andrulis, M., et al. (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. Nat. Cell Biol. *15*, 978–990.

Adda di Fagagna, F. d', Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Zglinicki, T. Von, Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. Nature *426*, 194–198.

Aguilera, A., and Gómez-González, B. (2008). Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. Nat. Rev. Genet. *9*, 204–217.

Aikata, H., Takaishi, H., Kawakami, Y., Takahashi, S., Kitamoto, M., Nakanishi, T., Nakamura, Y., Shimamoto, F., Kajiyama, G., and Ide, T. (2000). Telomere reduction in human liver tissues with age and chronic inflammation. Exp. Cell Res. *256*, 578–582.

Alani, R.M., Hasskarl, J., Grace, M., Hernandez, M.-C., Israel, M.A., and Münger, K. (1999). Immortalization of primary human keratinocytes by the helix–loop–helix protein, Id-1. Proc. Natl. Acad. Sci. *96*, 9637–9641.

Alani, R.M., Young, A.Z., and Shifflett, C.B. (2001). Id1 regulation of cellular senescence through transcriptional repression of p16/Ink4a. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 7812–7816.

Alcorta, D.A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., and Barrett, J.C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. *93*, 13742–13747.

Alexander, K., and Hinds, P.W. (2001). Requirement for p27(KIP1) in retinoblastoma protein-mediated senescence. Mol. Cell. Biol. *21*, 3616–3631.

Altieri, F., Grillo, C., Maceroni, M., and Chichiarelli, S. (2008). DNA damage and repair: from molecular mechanisms to health implications. Antioxid. Redox Signal. *10*, 891–937.

Amé, J.-C., Spenlehauer, C., and de Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol. *26*, 882–893.

Arnaudeau, C., Lundin, C., and Helleday, T. (2001). DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. J. Mol. Biol. *307*, 1235–1245.

Arthur, J.R. (2000). The glutathione peroxidases. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *57*, 1825–1835.

Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. Cell *120*, 483–495.

Barascu, A., Le Chalony, C., Pennarun, G., Genet, D., Imam, N., Lopez, B., and Bertrand, P. (2012). Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. EMBO J. *31*, 1080–1094.

Bartek, J., and Lukas, J. (2001). Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. FEBS Lett. *490*, 117–122.

Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. Cancer Cell *3*, 421–429.

Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.-V.F., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. Nature *444*, 633–637.

Beauséjour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. EMBO J. *22*, 4212–4222.

Beckerman, R., and Prives, C. (2010). Transcriptional regulation by p53. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *2*, a000935.

Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. Physiol. Rev. *78*, 547–581.

Bennett, P.V., Cintron, N.S., Gros, L., Laval, J., and Sutherland, B.M. (2004). Are endogenous clustered DNA damages induced in human cells? Free Radic. Biol. Med. *37*, 488–499.

Ben-Porath, I., and Weinberg, R.A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. Int. J. Biochem. Cell Biol. *37*, 961–976.

Bernstein, E., and Hake, S.B. (2006). The nucleosome: a little variation goes a long way. Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell. *84*, 505–517.

Bhatia, M., Kirkland, J.B., and Meckling-Gill, K.A. (1995). Modulation of poly(ADP-ribose) polymerase during neutrophilic and monocytic differentiation of promyelocytic (NB4) and myelocytic (HL-60) leukaemia cells. Biochem. J. *308 (Pt 1)*, 131–137.

Bianco, J.N., Poli, J., Saksouk, J., Bacal, J., Silva, M.J., Yoshida, K., Lin, Y.-L., Tourrière, H., Lengronne, A., and Pasero, P. (2012). Analysis of DNA replication profiles in budding yeast and mammalian cells using DNA combing. Methods San Diego Calif *57*, 149–157.

Bienert, G.P., Schjoerring, J.K., and Jahn, T.P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. Biochim. Biophys. Acta *1758*, 994–1003.

Bizard, A.H., and Hickson, I.D. (2014). The Dissolution of Double Holliday Junctions. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *6*, a016477.

Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science *279*, 349–352.

Bonilla, C.Y., Melo, J.A., and Toczyski, D.P. (2008). Colocalization of Sensors Is Sufficient to Activate the DNA Damage Checkpoint in the Absence of Damage. Mol. Cell *30*, 267–276.

De Bont, R., and van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. Mutagenesis *19*, 169–185.

Boulé, J.-B., Vega, L.R., and Zakian, V.A. (2005). The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. Nature *438*, 57–61.

Boutros, R., Lobjois, V., and Ducommun, B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? Nat. Rev. Cancer *7*, 495–507.

Bouwman, P., Aly, A., Escandell, J.M., Pieterse, M., Bartkova, J., van der Gulden, H., Hiddingh, S., Thanasoula, M., Kulkarni, A., Yang, Q., et al. (2010). 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. Nat. Struct. Mol. Biol. *17*, 688–695.

Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H.F.M., Schlegelberger, B., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. Nature *436*, 660–665.

Brem, R., and Hall, J. (2005). XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. Nucleic Acids Res. *33*, 2512–2520.

Brouilette, S., Singh, R.K., Thompson, J.R., Goodall, A.H., and Samani, N.J. (2003). White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *23*, 842–846.

Bulavin, D.V., Saito, S., Hollander, M.C., Sakaguchi, K., Anderson, C.W., Appella, E., and Fornace, A.J. (1999). Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-

terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. EMBO J. *18*, 6845–6854.

Bulavin, D.V., Amundson, S.A., and Fornace, A.J. (2002). p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony. Curr. Opin. Genet. Dev. *12*, 92–97.

Bunting, S.F., Callén, E., Wong, N., Chen, H.-T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., et al. (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. Cell *141*, 243–254.

Bürkle, A. (2001). Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation *. BioEssays *23*, 795–806.

Busuttil, R.A., Rubio, M., Dollé, M.E.T., Campisi, J., and Vijg, J. (2003). Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. Aging Cell *2*, 287–294.

Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M., Walter, J.C., and Cimprich, K.A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. Genes Dev. *19*, 1040–1052.

Caldecott, K.W. (2007). Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin. DNA Repair *6*, 443–453.

Caldecott, K.W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. Nat. Rev. Genet. *9*, 619–631.

Caldecott, K.W. (2014a). DNA single-strand break repair. Exp. Cell Res. *329*, 2–8.

Caldecott, K.W. (2014b). Protein ADP-ribosylation and the cellular response to DNA strand breaks. DNA Repair.

Caldecott, K.W., Tucker, J.D., Stanker, L.H., and Thompson, L.H. (1995). Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells. Nucleic Acids Res. *23*, 4836–4843.

Caldecott, K.W., Aoufouchi, S., Johnson, P., and Shall, S. (1996). XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular “nick-sensor” in vitro. Nucleic Acids Res. *24*, 4387–4394.

Callén, E., and Surrallés, J. (2004). Telomere dysfunction in genome instability syndromes. Mutat. Res. *567*, 85–104.

Campaner, S., Doni, M., Hydbring, P., Verrecchia, A., Bianchi, L., Sardella, D., Schleker, T., Perna, D., Tronnersjö, S., Murga, M., et al. (2010). Cdk2 suppresses cellular senescence induced by the c-myc oncogene. Nat. Cell Biol. *12*, 54–59; sup pp 1–14.

Cánepa, E.T., Scassa, M.E., Ceruti, J.M., Marazita, M.C., Carcagno, A.L., Sirkin, P.F., and Ogara, M.F. (2007). INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. IUBMB Life *59*, 419–426.

Chandler, H., and Peters, G. (2013). Stressing the cell cycle in senescence and aging. Curr. Opin. Cell Biol.

Chandra, T., Kirschner, K., Thuret, J.-Y., Pope, B.D., Ryba, T., Newman, S., Ahmed, K., Samarajiwa, S.A., Salama, R., Carroll, T., et al. (2012). Independence of Repressive Histone Marks and Chromatin Compaction during Senescent Heterochromatic Layer Formation. Mol. Cell *47*, 203–214.

Chen, Q., and Ames, B.N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 4130–4134.

Chen, D.S., Herman, T., and Demple, B. (1991). Two distinct human DNA diesterases that hydrolyze 3'-blocking deoxyribose fragments from oxidized DNA. Nucleic Acids Res. *19*, 5907–5914.

Chen, J.-H., Stoeber, K., Kingsbury, S., Ozanne, S.E., Williams, G.H., and Hales, C.N. (2004). Loss of proliferative capacity and induction of senescence in oxidatively stressed human fibroblasts. J. Biol. Chem. *279*, 49439–49446.

Chen, J.-H., Ozanne, S.E., and Hales, C.N. (2005a). Heterogeneity in premature senescence by oxidative stress correlates with differential DNA damage during the cell cycle. DNA Repair *4*, 1140–1148.

Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J.D., Yan, L.J., and Ames, B.N. (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 4337–4341.

Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., and Lesnefsky, E.J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. J. Biol. Chem. *278*, 36027–36031.

Chen, Q.M., Tu, V.C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O., and Dilley, T. (2000). Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide. J. Cell Sci. *113*, 4087–4097.

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., et al. (2005b). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. Nature *436*, 725–730.

Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S., and Loeb, L.A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. J. Biol. Chem. *267*, 166–172.

Cheng, T.-J., Rey, P.G., Poon, T., and Kan, C.-C. (2002). Kinetic studies of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase, an enzyme in the topoisomerase I DNA repair pathway. Eur. J. Biochem. FEBS *269*, 3697–3704.

Chiacchiera, F., and Simone, C. (2010). The AMPK-FoxO3A axis as a target for cancer treatment. Cell Cycle Georget. Tex *9*, 1091–1096.

Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. Mol. Cell *40*, 179–204.

Clapier, C.R., and Cairns, B.R. (2009). The biology of chromatin remodeling complexes. Annu. Rev. Biochem. *78*, 273–304.

Cohen, S.B., Graham, M.E., Lovrecz, G.O., Bache, N., Robinson, P.J., and Reddel, R.R. (2007). Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. Science *315*, 1850–1853.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., et al. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. Nature *436*, 642.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *17*, 1195–1214.

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. *6*.

Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. Annu. Rev. Pathol. *5*, 99–118.

Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. Science *294*, 1713–1716.

Costantino, L., Sotiriou, S.K., Rantala, J.K., Magin, S., Mladenov, E., Helleday, T., Haber, J.E., Iliakis, G., Kallioniemi, O.P., and Halazonetis, T.D. (2014). Break-Induced Replication Repair of Damaged Forks Induces Genomic Duplications in Human Cells. Science *343*, 88–91.

Courtois-Cox, S., Genther Williams, S.M., Reczek, E.E., Johnson, B.W., McGillicuddy, L.T., Johannessen, C.M., Hollstein, P.E., MacCollin, M., and Cichowski, K. (2006). A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. Cancer Cell *10*, 459–472.

Cruickshanks, H.A., McBryan, T., Nelson, D.M., VanderKraats, N.D., Shah, P.P., van Tuyn, J., Singh Rai, T., Brock, C., Donahue, G., Dunican, D.S., et al. (2013). Senescent cells harbour features of the cancer epigenome. Nat. Cell Biol. *15*, 1495–1506.

Dankort, D., Filenova, E., Collado, M., Serrano, M., Jones, K., and McMahon, M. (2007). A new mouse model to explore the initiation, progression, and therapy of BRAFV600E-induced lung tumors. Genes Dev. *21*, 379–384.

Davidovic, L., Vodenicharov, M., Affar, E.B., and Poirier, G.G. (2001). Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. Exp. Cell Res. *268*, 7–13.

Dedon, P.C. (2008). The chemical toxicology of 2-deoxyribose oxidation in DNA. Chem. Res. Toxicol. *21*, 206–219.

Delavallée, L., Cabon, L., Galán-Malo, P., Lorenzo, H.K., and Susin, S.A. (2011). AIF-mediated caspase-independent necroptosis: A new chance for targeted therapeutics. IUBMB Life *63*, 221–232.

Denchi, E.L., Attwooll, C., Pasini, D., and Helin, K. (2005). Deregulated E2F Activity Induces Hyperplasia and Senescence-Like Features in the Mouse Pituitary Gland. Mol. Cell. Biol. *25*, 2660–2672.

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., et al. (2006). Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. Nat. Cell Biol. *8*, 1053–1063.

Deriano, L., and Roth, D.B. (2013). Modernizing the Nonhomologous End-Joining Repertoire: Alternative and Classical NHEJ Share the Stage. Annu. Rev. Genet. *47*, 433–455.

Deruy, E., Nassour, J., Martin, N., Vercamer, C., Malaquin, N., Bertout, J., Chelli, F., Pourtier, A., Pluquet, O., and Abbadie, C. (2014). Level of macroautophagy drives senescent keratinocytes into cell death or neoplastic evasion. Cell Death Dis. *5*, e1577.

Dhomen, N., Reis-Filho, J.S., da Rocha Dias, S., Hayward, R., Savage, K., Delmas, V., Larue, L., Pritchard, C., and Marais, R. (2009). Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice. Cancer Cell *15*, 294–303.

Dianov, G.L., and Parsons, J.L. (2007). Co-ordination of DNA single strand break repair. DNA Repair *6*, 454–460.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (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.

Ding, R., Pommier, Y., Kang, V.H., and Smulson, M. (1992). Depletion of poly(ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression results in a delay in DNA strand break rejoining. J. Biol. Chem. *267*, 12804–12812.

Dirac, A.M.G., and Bernards, R. (2003). Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53. J. Biol. Chem. *278*, 11731–11734.

Djordjević, V.B. (2004). Free radicals in cell biology. Int. Rev. Cytol. *237*, 57–89.

Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D.H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., et al. (2009). RNF168 binds and amplifies

ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. Cell *136*, 435–446.

Donehower, L.A. (2009). Using mice to examine p53 functions in cancer, aging, and longevity. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *1*, a001081.

Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. Nature *356*, 215–221.

Dörr, J.R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Däbritz, J.H.M., Lisec, J., Lenze, D., Gerhardt, A., Schleicher, K., et al. (2013). Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. Nature *501*, 421–425.

Downs, J.A., Allard, S., Jobin-Robitaille, O., Javaheri, A., Auger, A., Bouchard, N., Kron, S.J., Jackson, S.P., and Côté, J. (2004). Binding of chromatin-modifying activities to phosphorylated histone H2A at DNA damage sites. Mol. Cell *16*, 979–990.

Drayton, S., Rowe, J., Jones, R., Vatcheva, R., Cuthbert-Heavens, D., Marshall, J., Fried, M., and Peters, G. (2003). Tumor suppressor p16INK4a determines sensitivity of human cells to transformation by cooperating cellular oncogenes. Cancer Cell *4*, 301–310.

Dulić, V., Drullinger, L.F., Lees, E., Reed, S.I., and Stein, G.H. (1993). Altered regulation of G1 cyclins in senescent human diploid fibroblasts: accumulation of inactive cyclin E-Cdk2 and cyclin D1-Cdk2 complexes. Proc. Natl. Acad. Sci. *90*, 11034–11038.

Eccles, L.J., O'Neill, P., and Lomax, M.E. (2011). Delayed repair of radiation induced clustered DNA damage: Friend or foe? Mutat. Res. *711*, 134–141.

Ekholm-Reed, S., Méndez, J., Tedesco, D., Zetterberg, A., Stillman, B., and Reed, S.I. (2004). Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. J. Cell Biol. *165*, 789–800.

El-Khamisy, S.F., Masutani, M., Suzuki, H., and Caldecott, K.W. (2003a). A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. Nucleic Acids Res. *31*, 5526–5533.

El-Khamisy, S.F., Masutani, M., Suzuki, H., and Caldecott, K.W. (2003b). A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. Nucleic Acids Res. *31*, 5526–5533.

Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud, M., and Harrison, S.C. (1994). Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. Genes Dev. *8*, 970–980.

Eoff, R.L., Choi, J.-Y., and Guengerich, F.P. (2010). Mechanistic Studies with DNA Polymerases Reveal Complex Outcomes following Bypass of DNA Damage. J. Nucleic Acids *2010*.

Espinoza, S.E., Guo, H., Fedarko, N., DeZern, A., Fried, L.P., Xue, Q.-L., Leng, S., Beamer, B., and Walston, J.D. (2008). Glutathione Peroxidase Enzyme Activity in Aging. J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci. *63*, 505–509.

Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R.G., Bartek, J., and Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. Nature *410*, 842–847.

Fanning, E., Klimovich, V., and Nager, A.R. (2006). A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways. Nucleic Acids Res. *34*, 4126–4137.

Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., and Yu, J. (1995). The RNA component of human telomerase. Science *269*, 1236–1241.

Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C., and Lowe, S.W. (2000). PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. Genes Dev. *14*, 2015–2027.

Fingar, D.C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., and Blenis, J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. Genes Dev. *16*, 1472–1487.

Fisher, A.E.O., Hochegger, H., Takeda, S., and Caldecott, K.W. (2007). Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Accelerates Single-Strand Break Repair in Concert with Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase. Mol. Cell. Biol. *27*, 5597–5605.

Flynn, R.L., and Zou, L. (2011). ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. Trends Biochem. Sci. *36*, 133–140.

Forsyth, N.R., Evans, A.P., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2003). Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase. Aging Cell *2*, 235–243.

Foster, S.A., Wong, D.J., Barrett, M.T., and Galloway, D.A. (1998). Inactivation of p16 in Human Mammary Epithelial Cells by CpG Island Methylation. Mol. Cell. Biol. *18*, 1793–1801.

Freund, A., Patil, C.K., and Campisi, J. (2011). p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. EMBO J. *30*, 1536–1548.

Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. J. Exp. Biol. *201*, 1203–1209.

Frippiat, C., Dewelle, J., Remacle, J., and Toussaint, O. (2002). Signal transduction in H2O2-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. Free Radic. Biol. Med. *33*, 1334–1346.

Fuchs, M., Gerber, J., Drapkin, R., Sif, S., Ikura, T., Ogryzko, V., Lane, W.S., Nakatani, Y., and Livingston, D.M. (2001). The p400 complex is an essential E1A transformation target. Cell *106*, 297–307.

Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B., and Kroemer, G. (2014). Metabolic control of autophagy. Cell *159*, 1263–1276.

van Gent, D.C., and van der Burg, M. (2007). Non-homologous end-joining, a sticky affair. Oncogene *26*, 7731–7740.

Gévry, N., Chan, H.M., Laflamme, L., Livingston, D.M., and Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. Genes Dev. *21*, 1869–1881.

Gibson, B.A., and Kraus, W.L. (2012). New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 411–424.

Goehe, R.W., Di, X., Sharma, K., Bristol, M.L., Henderson, S.C., Valerie, K., Rodier, F., Davalos, A.R., and Gewirtz, D.A. (2012). The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? J. Pharmacol. Exp. Ther. *343*, 763–778.

Goel, V.K., Ibrahim, N., Jiang, G., Singhal, M., Fee, S., Flotte, T., Westmoreland, S., Haluska, F.S., Hinds, P.W., and Haluska, F.G. (2009). Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. Oncogene *28*, 2289–2298.

Gosselin, K., Deruy, E., Martien, S., Vercamer, C., Bouali, F., Dujardin, T., Slomianny, C., Houel-Renault, L., Chelli, F., De Launoit, Y., et al. (2009a). Senescent keratinocytes die by autophagic programmed cell death. Am. J. Pathol. *174*, 423–435.

Gosselin, K., Martien, S., Pourtier, A., Vercamer, C., Ostoich, P., Morat, L., Sabatier, L., Duprez, L., T'kint de Roodenbeke, C., Gilson, E., et al. (2009b). Senescence-associated oxidative DNA damage promotes the generation of neoplastic cells. Cancer Res. *69*, 7917–7925.

Grabarz, A., Barascu, A., Guirouilh-Barbat, J., and Lopez, B.S. (2012). Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. Am. J. Cancer Res. *2*, 249–268.

Grallert, B., and Boye, E. (2008). The multiple facets of the intra-S checkpoint. Cell Cycle Georget. Tex *7*, 2315–2320.

Gravel, S., Chapman, J.R., Magill, C., and Jackson, S.P. (2008). DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. Genes Dev. *22*, 2767–2772.

Green, D.R., and Levine, B. (2014). To Be or Not to Be? How Selective Autophagy and Cell Death Govern Cell Fate. Cell *157*, 65–75.

Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. Cell *43*, 405–413.

Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. Cell *97*, 503–514.

Gruber, R., Zhou, Z., Sukchev, M., Joerss, T., Frappart, P.-O., and Wang, Z.-Q. (2011). MCPH1 regulates the neuroprogenitor division mode by coupling the centrosomal cycle with mitotic entry through the Chk1-Cdc25 pathway. Nat. Cell Biol. *13*, 1325–1334.

Guan, J.Z., Maeda, T., Sugano, M., Oyama, J.-I., Higuchi, Y., and Makino, N. (2007). Change in the telomere length distribution with age in the Japanese population. Mol. Cell. Biochem. *304*, 353–360.

Ha, H.C., and Snyder, S.H. (1999). Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 13978–13982.

Haber, J.E. (1999). DNA recombination: the replication connection. Trends Biochem. Sci. *24*, 271–275.

Hada, M., and Georgakilas, A.G. (2008). Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review. J. Radiat. Res. (Tokyo) *49*, 203–210.

Hai, T., Wolfgang, C.D., Marsee, D.K., Allen, A.E., and Sivaprasad, U. (1999). ATF3 and stress responses. Gene Expr. *7*, 321–335.

Haince, J.-F., McDonald, D., Rodrigue, A., Déry, U., Masson, J.-Y., Hendzel, M.J., and Poirier, G.G. (2008). PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. J. Biol. Chem. *283*, 1197–1208.

Hakmé, A., Wong, H.-K., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2008). The expanding field of poly(ADP-ribosyl)ation reactions. "Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects" Review Series. EMBO Rep. *9*, 1094–1100.

Hanssen-Bauer, A., Solvang-Garten, K., Sundheim, O., Peña-Diaz, J., Andersen, S., Slupphaug, G., Krokan, H.E., Wilson, D.M., Akbari, M., and Otterlei, M. (2011). XRCC1 coordinates disparate responses and multiprotein repair complexes depending on the nature and context of the DNA damage. Environ. Mol. Mutagen. *52*, 623–635.

Hara, E., Yamaguchi, T., Nojima, H., Ide, T., Campisi, J., Okayama, H., and Oda, K. (1994). Id-related genes encoding helix-loop-helix proteins are required for G1 progression and are repressed in senescent human fibroblasts. J. Biol. Chem. *269*, 2139–2145.

Hara, E., Smith, R., Parry, D., Tahara, H., Stone, S., and Peters, G. (1996). Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. Mol. Cell. Biol. *16*, 859–867.

Hassa, P.O., and Hottiger, M.O. (2008). The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *13*, 3046–3082.

Hastings, P.J., Ira, G., and Lupski, J.R. (2009). A Microhomology-Mediated Break-Induced Replication Model for the Origin of Human Copy Number Variation. PLoS Genet *5*, e1000327.

Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. *37*, 614–636.

Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. *25*, 585–621.

He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu. Rev. Genet. *43*, 67–93.

Helleday, T., Lo, J., van Gent, D.C., and Engelward, B.P. (2007). DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. DNA Repair *6*, 923–935.

Henderson, E.R., and Blackburn, E.H. (1989). An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. Mol. Cell. Biol. *9*, 345–348.

Herbig, U., Wei, W., Dutriaux, A., Jobling, W.A., and Sedivy, J.M. (2003). Real-time imaging of transcriptional activation in live cells reveals rapid up-regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene CDKN1A in replicative cellular senescence. Aging Cell *2*, 295–304.

Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). Mol. Cell *14*, 501–513.

Hottiger, M.O., Hassa, P.O., Lüscher, B., Schüler, H., and Koch-Nolte, F. (2010). Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. Trends Biochem. Sci. *35*, 208–219.

Houtgraaf, J.H., Versmissen, J., and van der Giessen, W.J. (2006). A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. Cardiovasc. Revasc. Med. *7*, 165–172.

Huertas, P. (2010). DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break. Nat. Struct. Mol. Biol. *17*, 11–16.

Ikura, T., Ogryzko, V.V., Grigoriev, M., Groisman, R., Wang, J., Horikoshi, M., Scully, R., Qin, J., and Nakatani, Y. (2000). Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis. Cell *102*, 463–473.

Iraqui, I., Chekkal, Y., Jmari, N., Pietrobon, V., Fréon, K., Costes, A., and Lambert, S.A.E. (2012). Recovery of arrested replication forks by homologous recombination is error-prone. PLoS Genet. *8*, e1002976.

Ishii, N., Fujii, M., Hartman, P.S., Tsuda, M., Yasuda, K., Senoo-Matsuda, N., Yanase, S., Ayusawa, D., and Suzuki, K. (1998). A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. Nature *394*, 694–697.

Itahana, K., Zou, Y., Itahana, Y., Martinez, J.-L., Beausejour, C., Jacobs, J.J.L., Van Lohuizen, M., Band, V., Campisi, J., and Dimri, G.P. (2003). Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. Mol. Cell. Biol. *23*, 389–401.

Izumi, T., Hazra, T.K., Boldogh, I., Tomkinson, A.E., Park, M.S., Ikeda, S., and Mitra, S. (2000). Requirement for human AP endonuclease 1 for repair of 3'-blocking damage at DNA single-strand breaks induced by reactive oxygen species. Carcinogenesis *21*, 1329–1334.

Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. Nature *461*, 1071–1078.

Jacobs, J.J.L., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A., and van Lohuizen, M. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. Nature *397*, 164–168.

Jarrard, D.F., Sarkar, S., Shi, Y., Yeager, T.R., Magrane, G., Kinoshita, H., Nassif, N., Meisner, L., Newton, M.A., Waldman, F.M., et al. (1999). p16/pRb Pathway Alterations Are Required for Bypassing Senescence in Human Prostate Epithelial Cells. Cancer Res. *59*, 2957–2964.

Jeyapalan, J.C., Ferreira, M., Sedivy, J.M., and Herbig, U. (2007a). Accumulation of Senescent Cells in Mitotic Tissue of Aging Primates. Mech. Ageing Dev. *128*, 36–44.

Jeyapalan, J.C., Ferreira, M., Sedivy, J.M., and Herbig, U. (2007b). Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. Mech. Ageing Dev. *128*, 36–44.

Jha, S., Shibata, E., and Dutta, A. (2008). Human Rvb1/Tip49 Is Required for the Histone Acetyltransferase Activity of Tip60/NuA4 and for the Downregulation of Phosphorylation on H2AX after DNA Damage. Mol. Cell. Biol. *28*, 2690–2700.

Jilani, A., Ramotar, D., Slack, C., Ong, C., Yang, X.M., Scherer, S.W., and Lasko, D.D. (1999). Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. J. Biol. Chem. *274*, 24176–24186.

Jin, S., Mazzacurati, L., Zhu, X., Tong, T., Song, Y., Shujuan, S., Petrik, K.L., Rajasekaran, B., Wu, M., and Zhan, Q. (2003). Gadd45a contributes to p53 stabilization in response to DNA damage. Oncogene *22*, 8536–8540.

Jiranusornkul, S., and Laughton, C.A. (2008). Destabilization of DNA duplexes by oxidative damage at guanine: implications for lesion recognition and repair. J. R. Soc. Interface *5*, S191–S198.

Kang, M.K., Swee, J., Kim, R.H., Baluda, M.A., and Park, N.-H. (2002). The telomeric length and heterogeneity decrease with age in normal human oral keratinocytes. Mech. Ageing Dev. *123*, 585–592.

Kang, M.K., Kim, R.H., Shin, K.-H., Zhong, W., Faull, K.F., and Park, N.-H. (2005). Senescence-associated decline in the intranuclear accumulation of hOGG1-alpha and impaired 8-oxo-dG repair activity in senescing normal human oral keratinocytes in vivo. Exp. Cell Res. *310*, 186–195.

Kang, T.-W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., et al. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. Nature *479*, 547–551.

Karimi-Busheri, F., Daly, G., Robins, P., Canas, B., Pappin, D.J., Sgouros, J., Miller, G.G., Fakhrai, H., Davis, E.M., Le Beau, M.M., et al. (1999). Molecular characterization of a human DNA kinase. J. Biol. Chem. *274*, 24187–24194.

Karlseder, J., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. Science *295*, 2446–2449.

Katayama, M., Kawaguchi, T., Berger, M.S., and Pieper, R.O. (2006). DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. Cell Death Differ. *14*, 548–558.

Khoronenkova, S.V., and Dianov, G.L. (2015). ATM prevents DSB formation by coordinating SSB repair and cell cycle progression. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, 3997–4002.

Kim, I.-K., Stegeman, R.A., Brosey, C.A., and Ellenberger, T. (2014). A Quantitative Assay Reveals Ligand Specificity of the DNA scaffold repair protein XRCC1 and Efficient Disassembly of Complexes of XRCC1 and the Poly (ADP-ribose) polymerase 1 by PAR glycohydrolase. J. Biol. Chem. jbc.M114.624718.

Kim, M.Y., Zhang, T., and Kraus, W.L. (2005). Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: `PAR-laying' NAD+ into a nuclear signal. Genes Dev. *19*, 1951–1967.

Kiyono, T., Foster, S.A., Koop, J.I., McDougall, J.K., Galloway, D.A., and Klingelhutz, A.J. (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. Nature *396*, 84–88.

Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M., and Hocevar, B.A. (2010). Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. Toxicol. Pathol. *38*, 96–109.

Kodama, R., Kato, M., Furuta, S., Ueno, S., Zhang, Y., Matsuno, K., Yabe-Nishimura, C., Tanaka, E., and Kamata, T. (2013). ROS-generating oxidases Nox1 and Nox4 contribute to oncogenic Ras-induced premature senescence. Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech. *18*, 32–41.

Kosar, M., Bartkova, J., Hubackova, S., Hodny, Z., Lukas, J., and Bartek, J. (2011). Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16(ink4a). Cell Cycle Georget. Tex *10*, 457–468.

Koundrioukoff, S., Carignon, S., Técher, H., Letessier, A., Brison, O., and Debatisse, M. (2013). Stepwise activation of the ATR signaling pathway upon increasing replication stress impacts fragile site integrity. PLoS Genet. *9*, e1003643.

Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R.J., Kominami, E., and Momoi, T. (2007). ER stress (PERK/eIF2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. Cell Death Differ. *14*, 230–239.

Kregel, K.C., and Zhang, H.J. (2007). An integrated view of oxidative stress in aging: basic mechanisms, functional effects, and pathological considerations. Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol. *292*, R18–R36.

Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., and Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. Nucleic Acids Res. gks270.

Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 12072–12077.

Kubbutat, M.H., Jones, S.N., and Vousden, K.H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. Nature *387*, 299–303.

Kubota, Y., Nash, R.A., Klungland, A., Schär, P., Barnes, D.E., and Lindahl, T. (1996). Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. EMBO J. *15*, 6662–6670.

Kuilman, T., and Peeper, D.S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. Nat. Rev. Cancer *9*, 81–94.

Kulis, M., and Esteller, M. (2010). DNA methylation and cancer. Adv. Genet. *70*, 27–56.

Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W.H., Swanson, S.K., Glaser, R.L., Yates, J.R., Abmayr, S.M., Washburn, M.P., and Workman, J.L. (2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. Science *306*, 2084–2087.

Kushnareva, Y., Murphy, A.N., and Andreyev, A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)+ oxidation-reduction state. Biochem. J. *368*, 545–553.

Kveiborg, M., Kassem, M., Langdahl, B., Eriksen, E.F., Clark, B.F., and Rattan, S.I. (1999). Telomere shortening during aging of human osteoblasts in vitro and leukocytes in vivo: lack of excessive telomere loss in osteoporotic patients. Mech. Ageing Dev. *106*, 261–271.

Lambert, S., and Carr, A.M. (2013). Impediments to replication fork movement: stabilisation, reactivation and genome instability. Chromosoma *122*, 33–45.

Lan, L., Nakajima, S., Oohata, Y., Takao, M., Okano, S., Masutani, M., Wilson, S.H., and Yasui, A. (2004). In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 13738–13743.

Lavin, M.F. (2008). Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *9*, 759–769.

Lavin, M.F., and Kozlov, S. (2007). ATM activation and DNA damage response. Cell Cycle Georget. Tex *6*, 931–942.

Lee, J.-H., and Paull, T.T. (2007). Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. Oncogene *26*, 7741–7748.

Lee, A.C., Fenster, B.E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N.S., Hirai, T., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Howard, B.H., and Finkel, T. (1999). Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. J. Biol. Chem. *274*, 7936–7940.

Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. Aging Cell *5*, 187–195.

Lenaz, G., and Genova, M.L. (2010). Structure and organization of mitochondrial respiratory complexes: a new understanding of an old subject. Antioxid. Redox Signal. *12*, 961–1008.

Leung, A.K.L. (2014). Poly(ADP-ribose): An organizer of cellular architecture. J. Cell Biol. *205*, 613–619.

Levy, M.Z., Allsopp, R.C., Futcher, A.B., Greider, C.W., and Harley, C.B. (1992). Telomere end-replication problem and cell aging. J. Mol. Biol. *225*, 951–960.

Li, X., and Heyer, W.-D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. Cell Res. *18*, 99–113.

Li, L., Zhu, Y.-Q., Jiang, L., and Peng, W. (2012). Increased autophagic activity in senescent human dental pulp cells. Int. Endod. J. *45*, 1074–1079.

Li, M., Lu, L.-Y., Yang, C.-Y., Wang, S., and Yu, X. (2013). The FHA and BRCT domains recognize ADP-ribosylation during DNA damage response. Genes Dev. *27*, 1752–1768.

Li, Y., Nichols, M.A., Shay, J.W., and Xiong, Y. (1994). Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. Cancer Res. *54*, 6078–6082.

Lim, P., Wuenschell, G.E., Holland, V., Lee, D.-H., Pfeifer, G.P., Rodriguez, H., and Termini, J. (2004). Peroxyl radical mediated oxidative DNA base damage: implications for lipid peroxidation induced mutagenesis. Biochemistry (Mosc.) *43*, 15339–15348.

Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C., van Aelst, L., Serrano, M., and Lowe, S.W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. Genes Dev. *12*, 3008–3019.

Lindsey, J., McGill, N.I., Lindsey, L.A., Green, D.K., and Cooke, H.J. (1991). In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. Mutat. Res. *256*, 45–48.

Liu, D., O'Connor, M.S., Qin, J., and Songyang, Z. (2004). Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. J. Biol. Chem. *279*, 51338–51342.

Liu, J., Huang, K., Cai, G.-Y., Chen, X.-M., Yang, J.-R., Lin, L.-R., Yang, J., Huo, B.-G., Zhan, J., and He, Y.-N. (2014). Receptor for advanced glycation end-products promotes premature senescence of proximal tubular epithelial cells via activation of endoplasmic reticulum stress-dependent p21 signaling. Cell. Signal. *26*, 110–121.

Liu, P., Carvalho, C.M.B., Hastings, P.J., and Lupski, J.R. (2012). Mechanisms for recurrent and complex human genomic rearrangements. Curr. Opin. Genet. Dev. *22*, 211–220.

Liu, S., Shiotani, B., Lahiri, M., Maréchal, A., Tse, A., Leung, C.C.Y., Mark Glover, J.N., Yang, X.H., and Zou, L. (2011). ATR Autophosphorylation as a Molecular Switch for Checkpoint Activation. Mol. Cell *43*, 192–202.

Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M.A., Celeste, A., Manis, J.P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T.T., et al. (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. Mol. Cell *21*, 187–200.

Lu, T., and Finkel, T. (2008). Free radicals and senescence. Exp. Cell Res. *314*, 1918–1922.

Luger, K., Dechassa, M.L., and Tremethick, D.J. (2012). New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 436–447.

Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. Nat. Cell Biol. *13*, 1161–1169.

Lundin, C., Erixon, K., Arnaudeau, C., Schultz, N., Jenssen, D., Meuth, M., and Helleday, T. (2002). Different roles for nonhomologous end joining and homologous recombination following replication arrest in mammalian cells. Mol. Cell. Biol. *22*, 5869–5878.

Ma, P.C., Rould, M.A., Weintraub, H., and Pabo, C.O. (1994). Crystal structure of MyoD bHLH domain-DNA complex: perspectives on DNA recognition and implications for transcriptional activation. Cell *77*, 451–459.

Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuâsen, R.G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. Science *288*, 1425–1429.

Mailloux, R.J., McBride, S.L., and Harper, M.-E. (2013). Unearthing the secrets of mitochondrial ROS and glutathione in bioenergetics. Trends Biochem. Sci. *38*, 592–602.

Majumder, P.K., Grisanzio, C., O'Connell, F., Barry, M., Brito, J.M., Xu, Q., Guney, I., Berger, R., Herman, P., Bikoff, R., et al. (2008). A Prostatic Intraepithelial Neoplasia-Dependent p27Kip1 Checkpoint Induces Senescence and Inhibits Cell Proliferation and Cancer Progression. Cancer Cell *14*, 146–155.

Malaquin, N., Vercamer, C., Bouali, F., Martien, S., Deruy, E., Wernert, N., Chwastyniak, M., Pinet, F., Abbadie, C., and Pourtier, A. (2013). Senescent Fibroblasts Enhance Early Skin Carcinogenic Events via a Paracrine MMP-PAR-1 Axis. PLoS ONE *8*, e63607.

Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., and Tainsky, M.A. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science *250*, 1233–1238.

Mamane, Y., Petroulakis, E., LeBacquer, O., and Sonenberg, N. (2006). mTOR, translation initiation and cancer. Oncogene *25*, 6416–6422.

Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., et al. (2007). FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. Cell Metab. *6*, 458–471.

Marcotte, R., Lacelle, C., and Wang, E. (2004). Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3. Mech. Ageing Dev. *125*, 777–783.

Maréchal, A., and Zou, L. (2013). DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *5*.

Maréchal, A., and Zou, L. (2015). RPA-coated single-stranded DNA as a platform for post-translational modifications in the DNA damage response. Cell Res. *25*, 9–23.

Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., and Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *15*, 81–94.

Martin, N., Salazar-Cardozo, C., Vercamer, C., Ott, L., Marot, G., Slijepcevic, P., Abbadie, C., and Pluquet, O. (2014). Identification of a gene signature of a pre-transformation process by senescence evasion in normal human epidermal keratinocytes. Mol. Cancer *13*, 151.

Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1998). XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. Mol. Cell. Biol. *18*, 3563–3571.

Merlo, A., Herman, J.G., Mao, L., Lee, D.J., Gabrielson, E., Burger, P.C., Baylin, S.B., and Sidransky, D. (1995). 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. Nat. Med. *1*, 686–692.

Meyer-Ficca, M.L., Meyer, R.G., Coyle, D.L., Jacobson, E.L., and Jacobson, M.K. (2004). Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. Exp. Cell Res. *297*, 521–532.

Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. Nature *444*, 638–642.

Di Micco, R., Sulli, G., Dobreva, M., Liontos, M., Botrugno, O.A., Gargiulo, G., dal Zuffo, R., Matti, V., Ario, G. d', Montani, E., et al. (2011). Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. Nat. Cell Biol. *13*, 292–302.

Michaloglou, C., Vredeveld, 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., and Peeper, D.S. (2005).

BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. Nature *436*, 720–724.

Michel, B. (2000). Replication fork arrest and DNA recombination. Trends Biochem. Sci. *25*, 173–178.

Mikhailov, A., Shinohara, M., and Rieder, C.L. (2004). Topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors delay the G2/M transition by triggering the p38 MAPK checkpoint pathway. J. Cell Biol. *166*, 517–526.

Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2009). DNA end resection: many nucleases make light work. DNA Repair *8*, 983–995.

Misteli, T., and Soutoglou, E. (2009). The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 243–254.

Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschênes-Simard, X., and Ferbeyre, G. (2009). Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. Mol. Cell. Biol. *29*, 4495–4507.

Morales, C.P., Holt, S.E., Ouellette, M., Kaur, K.J., Yan, Y., Wilson, K.S., White, M.A., Wright, W.E., and Shay, J.W. (1999). Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. Nat. Genet. *21*, 115–118.

Morin, G.B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. Cell *59*, 521–529.

Morton, J.P., Timpson, P., Karim, S.A., Ridgway, R.A., Athineos, D., Doyle, B., Jamieson, N.B., Oien, K.A., Lowy, A.M., Brunton, V.G., et al. (2010). Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 246–251.

Mortusewicz, O., Rothbauer, U., Cardoso, M.C., and Leonhardt, H. (2006). Differential recruitment of DNA Ligase I and III to DNA repair sites. Nucleic Acids Res. *34*, 3523–3532.

Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., and Wu, J.R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)n, present at the telomeres of human chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *85*, 6622–6626.

Murcia, J.M. de, Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M., et al. (1997). Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. Proc. Natl. Acad. Sci. *94*, 7303–7307.

Murcia, J.M. de, Ricoul, M., Tartier, L., Niedergang, C., Huber, A., Dantzer, F., Schreiber, V., Amé, J.-C., Dierich, A., LeMeur, M., et al. (2003). Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. EMBO J. *22*, 2255–2263.

Murr, R., Vaissière, T., Sawan, C., Shukla, V., and Herceg, Z. (2007). Orchestration of chromatin-based processes: mind the TRRAP. Oncogene *26*, 5358–5372.

Naka, K., Tachibana, A., Ikeda, K., and Motoyama, N. (2004). Stress-induced premature senescence in hTERT-expressing ataxia telangiectasia fibroblasts. J. Biol. Chem. *279*, 2030–2037.

Nakamura, J., and Swenberg, J.A. (1999). Endogenous Apurinic/Apyrimidinic Sites in Genomic DNA of Mammalian Tissues. Cancer Res. *59*, 2522–2526.

Nakamura, T.M., and Cech, T.R. (1998). Reversing time: origin of telomerase. Cell *92*, 587–590.

Nam, E.A., and Cortez, D. (2011). ATR signalling: more than meeting at the fork. Biochem. J. *436*, 527–536.

Narita, M., Nũnez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. Cell *113*, 703–716.

Narita, M., Narita, M., Krizhanovsky, V., Nuñez, S., Chicas, A., Hearn, S.A., Myers, M.P., and Lowe, S.W. (2006). A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. Cell *126*, 503–514.

Nimonkar, A.V., Ozsoy, A.Z., Genschel, J., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2008). Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *105*, 16906–16911.

Nishio, K., and Inoue, A. (2005). Senescence-associated alterations of cytoskeleton: extraordinary production of vimentin that anchors cytoplasmic p53 in senescent human fibroblasts. Histochem. Cell Biol. *123*, 263–273.

Nordberg, J., and Arnér, E.S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic. Biol. Med. *31*, 1287–1312.

Nowsheen, S., Wukovich, R.L., Aziz, K., Kalogerinis, P.T., Richardson, C.C., Panayiotidis, M.I., Bonner, W.M., Sedelnikova, O.A., and Georgakilas, A.G. (2009). Accumulation of oxidatively induced clustered DNA lesions in human tumor tissues. Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen. *674*, 131–136.

Obeid, S., Blatter, N., Kranaster, R., Schnur, A., Diederichs, K., Welte, W., and Marx, A. (2010). Replication through an abasic DNA lesion: structural basis for adenine selectivity. EMBO J. *29*, 1738–1747.

O'Connell, M.J., Walworth, N.C., and Carr, A.M. (2000). The G2-phase DNA-damage checkpoint. Trends Cell Biol. *10*, 296–303.

Oei, S.L., Griesenbeck, J., Schweiger, M., Babich, V., Kropotov, A., and Tomilin, N. (1997). Interaction of the transcription factor YY1 with human poly(ADP-ribosyl) transferase. Biochem. Biophys. Res. Commun. *240*, 108–111.

Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., et al. (2006). Autophagy Is Activated for Cell Survival after Endoplasmic Reticulum Stress. Mol. Cell. Biol. *26*, 9220–9231.

Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T.J., Stinson, J.A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A.D., Peters, G., and Hara, E. (2001). Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. Nature *409*, 1067–1070.

Oka, S., Kato, J., and Moss, J. (2006). Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase. J. Biol. Chem. *281*, 705–713.

Okano, S., Lan, L., Caldecott, K.W., Mori, T., and Yasui, A. (2003). Spatial and Temporal Cellular Responses to Single-Strand Breaks in Human Cells. Mol. Cell. Biol. *23*, 3974–3981.

Olovnikov, A.M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. J. Theor. Biol. *41*, 181–190.

Op het Veld, C.W., Jansen, J., Zdzienicka, M.Z., Vrieling, H., and van Zeeland, A.A. (1998). Methyl methanesulfonate-induced hprt mutation spectra in the Chinese hamster cell line CHO9 and its xrcc1-deficient derivative EM-C11. Mutat. Res. *398*, 83–92.

Opresko, P.L., Fan, J., Danzy, S., Wilson, D.M., and Bohr, V.A. (2005). Oxidative damage in telomeric DNA disrupts recognition by TRF1 and TRF2. Nucleic Acids Res. *33*, 1230–1239.

Packer, L., and Fuehr, K. (1977). Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. Nature *267*, 423–425.

Le Page, F., Schreiber, V., Dherin, C., De Murcia, G., and Boiteux, S. (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is required in murine cell lines for base excision repair of oxidative DNA damage in the absence of DNA polymerase beta. J. Biol. Chem. *278*, 18471–18477.

Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. Nat. Cell Biol. *5*, 741–747.

Patschan, S., Chen, J., Polotskaia, A., Mendelev, N., Cheng, J., Patschan, D., and Goligorsky, M.S. (2008). Lipid mediators of autophagy in stress-induced premature senescence of endothelial cells. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. *294*, H1119–H1129.

Payen, C., Koszul, R., Dujon, B., and Fischer, G. (2008). Segmental Duplications Arise from Pol32-Dependent Repair of Broken Forks through Two Alternative Replication-Based Mechanisms. PLoS Genet *4*, e1000175.

Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S.V., Hainaut, P., and Olivier, M. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. Hum. Mutat. *28*, 622–629.

Pfeiffer, P., Goedecke, W., and Obe, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. Mutagenesis *15*, 289–302.

Pike, L.R.G., Singleton, D.C., Buffa, F., Abramczyk, O., Phadwal, K., Li, J.-L., Simon, A.K., Murray, J.T., and Harris, A.L. (2013). Transcriptional up-regulation of ULK1 by ATF4 contributes to cancer cell survival. Biochem. J. *449*, 389–400.

Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Strohm, M., and Althaus, F.R. (2000). Poly(ADP-ribose) Binds to Specific Domains in DNA Damage Checkpoint Proteins. J. Biol. Chem. *275*, 40974–40980.

Pogozelski, W.K., and Tullius, T.D. (1998). Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety. Chem. Rev. *98*, 1089–1108.

Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liégeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., et al. (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. Cell *92*, 713–723.

Price, B.D., and Andrea, A.D. D' (2013). Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. Cell *152*, 1344–1354.

Rajaraman, R., Rajaraman, M.M., Rajaraman, S.R., and Guernsey, D.L. (2005). Neosis—a paradigm of self-renewal in cancer. Cell Biol. Int. *29*, 1084–1097.

Raman, M., Chen, W., and Cobb, M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. Oncogene *26*, 3100–3112.

Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H., and Reed, S.I. (1994). Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. Mol. Cell. Biol. *14*, 1669–1679.

Rhind, N., and Russell, P. (2000). Checkpoints: it takes more than time to heal some wounds. Curr. Biol. CB *10*, R908–R911.

Rieber, M., and Rieber, M.S. (2008). Sensitization to radiation-induced DNA damage accelerates loss of bcl-2 and increases apoptosis and autophagy. Cancer Biol. Ther. *7*, 1561–1566.

Robinson, P.J.J., An, W., Routh, A., Martino, F., Chapman, L., Roeder, R.G., and Rhodes, D. (2008). 30 nm chromatin fibre decompaction requires both H4-K16 acetylation and linker histone eviction. J. Mol. Biol. *381*, 816–825.

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., and Campisi, J. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. Nat. Cell Biol. *11*, 973–979.

Rodier, F., Muñoz, D.P., Teachenor, R., Chu, V., Le, O., Bhaumik, D., Coppé, J.-P., Campeau, E., Beauséjour, C.M., Kim, S.-H., et al. (2011). DNA-SCARS: distinct nuclear

structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. J. Cell Sci. *124*, 68–81.

Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J. Biol. Chem. *273*, 5858–5868.

Romano, A.D., Serviddio, G., de Matthaeis, A., Bellanti, F., and Vendemiale, G. (2010). Oxidative stress and aging. J. Nephrol. *23 Suppl 15*, S29–S36.

Romanov, S.R., Kozakiewicz, B.K., Holst, C.R., Stampfer, M.R., Haupt, L.M., and Tlsty, T.D. (2001). Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. Nature *409*, 633–637.

Ryter, S.W., Mizumura, K., and Choi, A.M.K. (2014). The Impact of Autophagy on Cell Death Modalities. Int. J. Cell Biol. *2014*, e502676.

Ryu, S.J., Oh, Y.S., and 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*, 1020–1028.

Sage, J., Miller, A.L., Pérez-Mancera, P.A., Wysocki, J.M., and Jacks, T. (2003). Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. Nature *424*, 223–228.

Sakofsky, C.J., Roberts, S.A., Malc, E., Mieczkowski, P.A., Resnick, M.A., Gordenin, D.A., and Malkova, A. (2014). Break-induced replication is a source of mutation clusters underlying kataegis. Cell Rep. *7*, 1640–1648.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kaçmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annu. Rev. Biochem. *73*, 39–85.

Sarkisian, C.J., Keister, B.A., Stairs, D.B., Boxer, R.B., Moody, S.E., and Chodosh, L.A. (2007). Dose-dependent oncogene-induced senescence in vivo and its evasion during mammary tumorigenesis. Nat. Cell Biol. *9*, 493–505.

Sasaki, M., Miyakoshi, M., Sato, Y., and Nakanuma, Y. (2010). Autophagy mediates the process of cellular senescence characterizing bile duct damages in primary biliary cirrhosis. Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol. *90*, 835–843.

Schreiber, V., Amé, J.-C., Dollé, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Ménissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. J. Biol. Chem. *277*, 23028–23036.

Schriner, S.E., Linford, N.J., Martin, G.M., Treuting, P., Ogburn, C.E., Emond, M., Coskun, P.E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., et al. (2005). Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. Science *308*, 1909–1911.

Sedelnikova, O.A., Horikawa, I., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., Bonner, W.M., and Barrett, J.C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. Nat. Cell Biol. *6*, 168–170.

Seiler, J.A., Conti, C., Syed, A., Aladjem, M.I., and Pommier, Y. (2007). The Intra-S-Phase Checkpoint Affects both DNA Replication Initiation and Elongation: Single-Cell and -DNA Fiber Analyses. Mol. Cell. Biol. *27*, 5806–5818.

Seluanov, A., Gorbunova, V., Falcovitz, A., Sigal, A., Milyavsky, M., Zurer, I., Shohat, G., Goldfinger, N., and 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*, 1552–1564.

Seluanov, A., Mittelman, D., Pereira-Smith, O.M., Wilson, J.H., and Gorbunova, V. (2004). DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 7624–7629.

Sengupta, S., Linke, S.P., Pedeux, R., Yang, Q., Farnsworth, J., Garfield, S.H., Valerie, K., Shay, J.W., Ellis, N.A., Wasylyk, B., et al. (2003). BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination. EMBO J. *22*, 1210–1222.

Serra, V., Zglinicki, T. von, Lorenz, M., and Saretzki, G. (2003). Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. J. Biol. Chem. *278*, 6824–6830.

Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature *366*, 704–707.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. Cell *88*, 593–602.

Sharpless, N.E., and DePinho, R.A. (1999). The INK4A/ARF locus and its two gene products. Curr. Opin. Genet. Dev. *9*, 22–30.

She, Q.B., Chen, N., and Dong, Z. (2000). ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. J. Biol. Chem. *275*, 20444–20449.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev. *13*, 1501–1512.

Shibata, A., Kamada, N., Masumura, K., Nohmi, T., Kobayashi, S., Teraoka, H., Nakagama, H., Sugimura, T., Suzuki, H., and Masutani, M. (2004). Parp-1 deficiency causes an increase of deletion mutations and insertions/rearrangements in vivo after treatment with an alkylating agent. Oncogene *24*, 1328–1337.

Shiloh, Y., and Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *14*, 197–210.

Smerdon, M.J., Tlsty, T.D., and Lieberman, M.W. (1978). Distribution of ultraviolet-induced DNA repair synthesis in nuclease sensitive and resistant regions of human chromatin. Biochemistry (Mosc.) *17*, 2377–2386.

Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. EMBO J. *21*, 4338–4348.

Soldatenkov, V.A., Albor, A., Patel, B.K., Dreszer, R., Dritschilo, A., and Notario, V. (1999). Regulation of the human poly(ADP-ribose) polymerase promoter by the ETS transcription factor. Oncogene *18*, 3954–3962.

Spassky, A., and Angelov, D. (1997). Influence of the local helical conformation on the guanine modifications generated from one-electron DNA oxidation. Biochemistry (Mosc.) *36*, 6571–6576.

Srivastava, S., Zou, Z.Q., Pirollo, K., Blattner, W., and Chang, E.H. (1990). Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. Nature *348*, 747–749.

Stein, G.H., Drullinger, L.F., Soulard, A., and 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*, 2109–2117.

Stolz, A., Ertych, N., and Bastians, H. (2011). Tumor suppressor CHK2: regulator of DNA damage response and mediator of chromosomal stability. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *17*, 401–405.

Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. Cell *123*, 1213–1226.

Sun, J., and Tower, J. (1999). FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult Drosophila melanogaster flies. Mol. Cell. Biol. *19*, 216–228.

Sun, Y., Jiang, X., and Price, B.D. (2010). Tip60: connecting chromatin to DNA damage signaling. Cell Cycle Georget. Tex *9*, 930–936.

Sundaram, M., Guernsey, D.L., Rajaraman, M.M., and Rajaraman, R. (2004). Neosis: a novel type of cell division in cancer. Cancer Biol. Ther. *3*, 207–218.

Sung, P., and Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *7*, 739–750.

Sutherland, B.M., Bennett, P.V., Sidorkina, O., and Laval, J. (2000). Clustered damages and total lesions induced in DNA by ionizing radiation: oxidized bases and strand breaks. Biochemistry (Mosc.) *39*, 8026–8031.

Tang, J., Gordon, G.M., Nickoloff, B.J., and Foreman, K.E. (2002). The Helix–Loop–Helix Protein Id-1 Delays Onset of Replicative Senescence in Human Endothelial Cells. Lab. Invest. *82*, 1073–1079.

Tang, Y., Zhao, W., Chen, Y., Zhao, Y., and Gu, W. (2008). Acetylation is indispensable for p53 activation. Cell *133*, 612–626.

Tao, W., and Levine, A.J. (1999). P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 6937–6941.

Thibodeau, J., Gradwohl, G., Dumas, C., Clairoux-Moreau, S., Brunet, G., Penning, C., Poirier, G.G., and Moreau, P. (1989). Cloning of rodent cDNA coding the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain and analysis of mRNA levels during the cell cycle. Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell. *67*, 653–660.

Thompson, L.H., Brookman, K.W., Dillehay, L.E., Carrano, A.V., Mazrimas, J.A., Mooney, C.L., and Minkler, J.L. (1982). A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange. Mutat. Res. *95*, 427–440.

Tong, W.-M., Hande, M.P., Lansdorp, P.M., and Wang, Z.-Q. (2001). DNA Strand Break-Sensing Molecule Poly(ADP-Ribose) Polymerase Cooperates with p53 in Telomere Function, Chromosome Stability, and Tumor Suppression. Mol. Cell. Biol. *21*, 4046–4054.

Trucco, C., Oliver, F.J., de Murcia, G., and Ménissier-de Murcia, J. (1998). DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. Nucleic Acids Res. *26*, 2644–2649.

Tsai, W.-B., Chung, Y.M., Takahashi, Y., Xu, Z., and Hu, M.C.-T. (2008). Functional interaction between FOXO3a and ATM regulates DNA damage response. Nat. Cell Biol. *10*, 460–467.

Valdes, A.M., Andrew, T., Gardner, J.P., Kimura, M., Oelsner, E., Cherkas, L.F., Aviv, A., and Spector, T.D. (2005). Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. Lancet Lond. Engl. *366*, 662–664.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int. J. Biochem. Cell Biol. *39*, 44–84.

Vallabhaneni, H., O'Callaghan, N., Sidorova, J., and Liu, Y. (2013). Defective repair of oxidative base lesions by the DNA glycosylase Nth1 associates with multiple telomere defects. PLoS Genet. *9*, e1003639.

Vertuani, S., Angusti, A., and Manfredini, S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. Curr. Pharm. Des. *10*, 1677–1694.

Vidal, A., and Koff, A. (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. Gene *247*, 1–15.

Volonté, D., Galbiati, F., Pestell, R.G., and Lisanti, M.P. (2001). Cellular Stress Induces the Tyrosine Phosphorylation of Caveolin-1 (Tyr14) via Activation of p38 Mitogen-activated Protein Kinase and c-Src kinase EVIDENCE FOR CAVEOLAE, THE ACTIN CYTOSKELETON, AND FOCAL ADHESIONS AS MECHANICAL SENSORS OF OSMOTIC STRESS. J. Biol. Chem. *276*, 8094–8103.

Wajapeyee, N., Serra, R.W., Zhu, X., Mahalingam, M., and Green, M.R. (2008). Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. Cell *132*, 363–374.

Wallace, S.S. (2002). Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. Free Radic. Biol. Med. *33*, 1–14.

Wang, E. (1995). Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. Cancer Res. *55*, 2284–2292.

Wang, C., Jurk, D., Maddick, M., Nelson, G., Martin-Ruiz, C., and Zglinicki, T. von (2009). DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. Aging Cell *8*, 311–323.

Wang, W., Chen, J.X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J.J., Huang, S., and Sun, P. (2002). Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. Mol. Cell. Biol. *22*, 3389–3403.

Wang, Z.Q., Auer, B., Stingl, L., Berghammer, H., Haidacher, D., Schweiger, M., and Wagner, E.F. (1995). Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosyl)ation develop normally but are susceptible to skin disease. Genes Dev. *9*, 509–520.

Ward, I.M., Wu, X., and Chen, J. (2001). Threonine 68 of Chk2 Is Phosphorylated at Sites of DNA Strand Breaks. J. Biol. Chem. *276*, 47755–47758.

Wei, S., Wei, S., and Sedivy, J.M. (1999). Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. Cancer Res. *59*, 1539–1543.

Wei, W., Hemmer, R.M., and Sedivy, J.M. (2001). Role of p14ARF in Replicative and Induced Senescence of Human Fibroblasts. Mol. Cell. Biol. *21*, 6748–6757.

Weterings, E., and Chen, D.J. (2008). The endless tale of non-homologous end-joining. Cell Res. *18*, 114–124.

Whitehouse, C.J., Taylor, R.M., Thistlethwaite, A., Zhang, H., Karimi-Busheri, F., Lasko, D.D., Weinfeld, M., and Caldecott, K.W. (2001). XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. Cell *104*, 107–117.

Willis, N., and Rhind, N. (2009). Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. Cell Div. *4*, 13.

Winterbourn, C.C. (1995). Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. Toxicol. Lett. *82-83*, 969–974.

Winters, T.A., Henner, W.D., Russell, P.S., McCullough, A., and Jorgensen, T.J. (1994). Removal of 3'-phosphoglycolate from DNA strand-break damage in an oligonucleotide substrate by recombinant human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1. Nucleic Acids Res. *22*, 1866–1873.

Woodhouse, B.C., and Dianov, G.L. (2008). Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. DNA Repair *7*, 1077–1086.

Xin, H., Liu, D., and Songyang, Z. (2008). The telosome/shelterin complex and its functions. Genome Biol. *9*, 232.

Xu, M., Yu, Q., Subrahmanyam, R., Difilippantonio, M.J., Ried, T., and Sen, J.M. (2008). β-Catenin Expression Results in p53-Independent DNA Damage and Oncogene-Induced Senescence in Prelymphomagenic Thymocytes In Vivo. Mol. Cell. Biol. *28*, 1713–1723.

Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. Nature *445*, 656–660.

Yang, J., Yu, Y., Hamrick, H.E., and Duerksen-Hughes, P.J. (2003). ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. Carcinogenesis *24*, 1571–1580.

Yokoyama, Y., Kawamoto, T., Mitsuuchi, Y., Kurosaki, T., Toda, K., Ushiro, H., Terashima, M., Sumimoto, H., Kuribayashi, I., and Yamamoto, Y. (1990). Human poly(ADP-ribose) polymerase gene. Cloning of the promoter region. Eur. J. Biochem. FEBS *194*, 521–526.

Young, A.R.J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F.J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., et al. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. Genes Dev. *23*, 798–803.

Yu, H. (2007). Chk1: A Double Agent in Cell Cycle Checkpoints. Dev. Cell *12*, 167–168.

Yuan, H., Kaneko, T., and Matsuo, M. (1995). Relevance of oxidative stress to the limited replicative capacity of cultured human diploid cells: the limit of cumulative population doublings increases under low concentrations of oxygen and decreases in response to aminotriazole. Mech. Ageing Dev. *81*, 159–168.

Zaniolo, K., Rufiange, A., Leclerc, S., Desnoyers, S., and Guérin, S.L. (2005). Regulation of the poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene expression by the transcription factors Sp1 and Sp3 is under the influence of cell density in primary cultured cells. Biochem. J. *389*, 423–433.

Zannini, L., Delia, D., and Buscemi, G. (2014). CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. J. Mol. Cell Biol. *6*, 442–457.

Zdzienicka, M.Z., van der Schans, G.P., Natarajan, A.T., Thompson, L.H., Neuteboom, I., and Simons, J.W. (1992). A Chinese hamster ovary cell mutant (EM-C11) with sensitivity to simple alkylating agents and a very high level of sister chromatid exchanges. Mutagenesis *7*, 265–269.

Zeman, M.K., and Cimprich, K.A. (2014). Causes and consequences of replication stress. Nat. Cell Biol. *16*, 2–9.

Zglinicki, T. von, Saretzki, G., Döcke, W., and Lotze, C. (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? Exp. Cell Res. *220*, 186–193.

Zglinicki, T. von, Pilger, R., and Sitte, N. (2000). Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. Free Radic. Biol. Med. *28*, 64–74.

Zhang, R., Chen, W., and Adams, P.D. (2007). Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. Mol. Cell. Biol. *27*, 2343–2358.

Zhao, H., and Piwnica-Worms, H. (2001). ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1. Mol. Cell. Biol. *21*, 4129–4139.

Zheng, W., Wang, H., Xue, L., Zhang, Z., and Tong, T. (2004). Regulation of Cellular Senescence and p16INK4a Expression by Id1 and E47 Proteins in Human Diploid Fibroblast. J. Biol. Chem. *279*, 31524–31532.

Zitcer, E.M., and Dunnebacke, T.H. (1957). Transformation of cells from the normal human amnion into established strains. Cancer Res. *17*, 1047–1053.

Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D.C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., and Shiloh, Y. (2006). Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. Nat. Cell Biol. *8*, 870–876.

Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. Science *300*, 1542–1548.

Annexes

Article N°3: *DNA double-strand breaks lead to activation of hypermethylated in cancer 1 (HIC1) by SUMOylation to regulate DNA repair*

(J Biol Chem. 2013 Apr 12;288(15):10254-64. doi: 10.1074/jbc.M112.421610)