



HAL
open science

Expression et rôles de l'hétérochromatine péricentrique humaine au cours de la réponse cellulaire au stress thermique

Solenne Dufour

► **To cite this version:**

Solenne Dufour. Expression et rôles de l'hétérochromatine péricentrique humaine au cours de la réponse cellulaire au stress thermique. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2022. Français. NNT : 2022GRALV047 . tel-04368494

HAL Id: tel-04368494

<https://theses.hal.science/tel-04368494v1>

Submitted on 1 Jan 2024

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Biologie cellulaire

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Solenne DUFOR

Thèse dirigée par **Claire VOURCH**

préparée au sein du **Laboratoire IAB : Epigenetics, Environment, Cell Plasticity, Cancer (UGA / Inserm U1209 / CNRS UMR 5309)**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

**Expression et rôles de l'hétérochromatine
péricentrique humaine au cours de la réponse
cellulaire au stress thermique**

**Expression and roles of pericentric
heterochromatin in cellular response to heat
stress**

Thèse soutenue publiquement le **7 juillet 2022**,
devant le jury composé de :

Madame Claire VOURCH

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université Grenoble Alpes,
Directrice de thèse

Monsieur Peter MULLIGAN

CHARGE DE RECHERCHE HDR, INSERM délégation Auvergne-Rhône-
Alpes, Rapporteur

Madame Nathalie BEAUJEAN

DIRECTRICE DE RECHERCHE, INSERM délégation Auvergne-Rhône-
Alpes, Rapporteur

Madame Nadia CHERRADI

DIRECTRICE DE RECHERCHE, INSERM délégation Auvergne-Rhône-
Alpes, Examinatrice

Monsieur Rob RUIGROK

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS, Université Grenoble Alpes,
Président

Monsieur Fabien MONGELARD

MAITRE DE CONFERENCES HDR, ENS de Lyon, Examineur



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, madame Nathalie Beaujean, Directrice de Recherche, monsieur Peter Mulligan, Chargé de Recherche, madame Nadia Cherradi, Directrice de Recherche, monsieur Fabien Mongelard Maître de conférences et monsieur Rob Ruigrok, professeur, pour avoir accepté de participer à l'évaluation de mon projet de thèse.

Je remercie tout particulièrement les membres de mon CSI, Saadi Khochbin et Fabien Mongelard, pour leurs conseils scientifiques, leurs encouragements et leur bienveillance à mon égard.

Je remercie également l'école doctorale de chimie et sciences du vivant, ainsi que l'Université Grenoble Alpes pour avoir rendu administrativement possible la réalisation de ce doctorat.

J'ai effectué ce travail sous la direction du Professeur Claire Vourc'h, dans l'équipe ARN, Epigénétique et Stress dirigée par le Directeur de Recherche André Verdel.

Je les remercie tous deux pour m'avoir accordé leur confiance et de m'avoir accompagné tout au long de ces années bien remplies, ainsi que tous les membres de l'équipe (Daphné, Daniel, Leila, Auriane et Viviam) pour le temps et les conseils avisés et précieux qu'ils m'ont apporté ainsi que Claire K. pour son aide dans la logistique du labo.

Je remercie très chaleureusement Kalina et Auriane pour tous les moments drôles et sympas qu'on a passé dans le « bureau des étudiants ». Kalina, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir légué ta cafetière en partant, grâce à toi, j'ai encore une excuse pour passer rigoler avec les étudiants !

Je tiens vraiment à remercier mes petits « soleils » de l'IAB, grâce à qui j'ai pu parcourir mon chemin jusqu'à la ligne d'arrivée sans me perdre. Merci pour votre soutien indéfectible les copines ! Véro, Virginie, Lydia, et Sophie, vous n'imaginez même pas à quel point vous avez été importantes (Je me rends bien compte à quel point vous m'avez aidé tout au long de ce périple...), vivement le prochain « afterwork », il s'y passe toujours des trucs de dingue !!

Comme le dit si bien Christiane lorsqu'elle discute avec un ministre, « l'IAB, c'est comme une famille, on est tous solidaires », et c'est bien vrai ! Alors j'aimerais du fond du cœur remercier toutes les personnes qui au détour d'un couloir ont eu pour moi une petite phrase d'encouragement, un petit mot bienveillant, ou même juste un petit sourire, merci sincèrement à vous tous, vous êtes nombreux et ça fait chaud au cœur ! Une petite pensée également pour le comité biotech auquel je suis si fière d'appartenir.

Un grand merci aussi à celles et ceux que j'ai dû voir quitter l'institut (la facette la plus triste du métier ITA) et qui ont aussi illuminé mon chemin : Sivan et Yohan avec qui on partait en courant à la Bastille, depuis que vous n'êtes plus là j'ai pris 10kg !!

Et mon club préféré : celui des moutons noirs (Adèle, Laure et Céline), avec qui nous faisons parfois « le tour des cavernes à la nuit tombée, en vue nous abreuver » dit Laure. Vous me manquez trop !!

Enfin j'aimerais me tourner vers les « non-IABs », qui eux aussi font partie intégrante de mon parcours « atypique ».

Tout d'abord un grand merci à mes parents pour leur soutien inconditionnel et éternel, et surtout parce qu'ils ont trouvé « super cool d'avoir une fille étudiante à l'université, ça nous rajeunit ! » Puis ma sœur Alex, Thierry et Candice pour tous les bons moments bretons (généralement sous une pluie horizontale, mais au bord de la mer quand même !).

Une pensée pour mes deux grand-mères toujours vaillantes, dont l'une centenaire (Lorette) m'a transmis son mantra : « Ne jamais baisser les bras ! » et l'autre (Mam Coz') son énergie folle et son enthousiasme, ainsi que tous mes oncles, tantes et cousins pour les bonnes rigolades aux repas de famille. Un merci spécial pour ma marraine (Christiane) qui s'est penchée sur mon berceau pour me donner l'envie d'être biologiste.

Enfin un énorme merci à toutes les amitiés sincères que j'ai noué au cours du temps (plus j'avance plus il y en a !) Vous m'apportez tous soutien, réconfort et grosse rigolade quelle que soit la situation dans laquelle je me trouve : et il y 'en a eu des bien délicates ces 25 dernières années !

Les plus « anciennes » amitiés d'abord : Julie-ma-copine-orthophoniste (c'est comme ça que je l'appelle tout le temps) : Cette année on fête nos 30 ans d'amitié...Ai-je besoin d'en rajouter ? 30 ans c'est deux fois la vie d'un ado, et Laure D. « seulement » 28 ans qu'on se marre ensemble !

Ensuite vient le clan des « biologistes », David, Julien et Emilie, Laurent et Marion. Kiki et Julien : quand je pense que 20 ans en arrière, j'assistais à votre soutenance de thèse, au même endroit, dans l'amphithéâtre de l'IAB ! Curiosité de la vie...

Le clan des « niçois » (dont pratiquement aucun n'est originaire de cette ville) Christophe et Fanny, Fred et Steph, Seb et Auré, (c'est dingue, ces prénoms « so 80's » !) Merci de m'offrir toutes ces petites parenthèses enchantées (A base de vin bio et charcuterie locale, je vous ai parlé de mes 10kg ?). Lorsque je viens vous voir, ce n'est que du bonheur (sauf quand je suis obligé de participer à des travaux « d'intérêt général » de type, tamiser du compost (??!!), élaguer des arbres de 4 mètres

de haut pour faire du soleil à la plante de dessous, qui en poussant fera de l'ombre à celle encore en dessous... (WTF ???, je suis de la ville, moi !) bref, merci pour cette initiation à la permaculture !).

Merci à tous les (vrais) ados qui m'entourent, je vous ai tous vu naître (Salomé, Liam, Agathe, Oscar et Eloïse), vous êtes tous tellement différents et parfaits à la fois, restez-vous-mêmes, vous nous donnez espoir en l'avenir !

A Grenoble, merci à Jean-mi, et Tote (mes partenaires de Squash et Marathon mais aussi d'apéro/barbeque !), Laura et « Gilles B. » mes partenaires d'apéro seulement, mais avec eux, c'est déjà beaucoup !

Et enfin l'ultime merci à Benoît, mon compagnon de route, sans qui rien n'aurait été possible... Merci pour toute la patience quotidienne dont tu as fait preuve durant ces années, bientôt c'est promis, on reprend une vie normale... Enfin pas sûre... Qu'est-ce -que je pourrai me mettre maintenant comme challenge ? !

RESUME

La voie de signalisation contrôlée par le facteur de transcription HSF1 (pour Heat Shock Factor1) a été beaucoup étudiée dans la littérature.

Son activation est essentielle à la survie des cellules soumises à un stress. Le facteur HSF1 a été jusqu'à présent particulièrement étudié pour son impact sur la fraction codante du génome mais nous savons aujourd'hui qu'il est également capable d'induire la synthèse d'ARNs non codants, de type satellite III (ARN *SATIII*) chez l'homme. La fonction de ces ARNs, très abondamment transcrits dans les cellules stressées est encore mal connue. Ils sont produits à partir de régions d'hétérochromatine péricentrique de plusieurs mégabases, en principe transcriptionnellement silencieuses dans les cellules non stressées. Mon travail de thèse a porté sur la caractérisation de la structure et de la fonction des ARNs *SATIII* issus de ces régions.

Notre objectif a été dans un premier temps de mieux comprendre la nature de ces transcrits ainsi que les mécanismes moléculaires associés à leur transcription et à leur fonction. En utilisant des approches *in situ* nous avons également cherché à mieux caractériser le statut épigénétique des régions péricentriques au cours de la réponse au stress. Nous avons mis en évidence un profil particulier d'expression en lien avec le statut épigénétique de ces régions au cours de leur activation transitoire, ainsi que l'existence d'une nouvelle cible majeure située sur le chromosome Y. Nos résultats montrent que l'accumulation de ces ARNs est corrélée à la perte transitoire de marques répressives, au blocage de la transition G2/M/G1 dans les cellules stressées, et induisent des défauts mitotiques dans les cellules HeLa stressées. Enfin, l'utilisation de stratégies permettant de diminuer le niveau de ces ARNs met en lumière un rôle nouveau et essentiel de ces ARNs dans les cellules stressées et non stressées.

ABSTRACT

The signaling pathway controlled by the transcription factor HSF1 (Heat Shock Factor1) has been extensively studied in the literature.

Its activation is essential for the survival of cells under stress. The HSF1 factor has so far been particularly studied for its impact on the coding fraction of the genome, but we now know that it is also capable of inducing the synthesis of non-coding RNAs, satellite type III (*SATIII* RNA) in humans. The function of these RNAs, which are very abundantly transcribed in stressed cells, is still poorly understood. They are produced from pericentric heterochromatin regions of several megabases, which are in principle transcriptionally silent in unstressed cells. My PhD dissertation is focused on the characterisation of the structure and function of *SATIII* RNAs derived from these regions.

Our objective was first to better understand the nature of these transcripts as well as the molecular mechanisms associated with their transcription and function. Using *in situ* approaches, we also sought to better characterise the epigenetic status of pericentric regions during the stress response. We have identified a particular expression profile related to the epigenetic status of these regions during their transient activation, as well as the existence of a major new target located on the Y chromosome. Our results show that the accumulation of these RNAs correlates with the transient loss of repressive marks, the arrest of the G2/M/G1 transition in stressed cells, and induce mitotic defects in stressed HeLa cells. Finally, the use of strategies to decrease the level of these RNAs highlights a new and essential role for these RNAs in both stressed and unstressed cells.

ABREVIATIONS

ARN POLII: ARN Polymerase II

BRD: BRomoDomain

CD: ChromoDomain

CIN: Chromosomal Instability

CSD: Chromoshadow Domain

DBD: DNA binding Domain

DNMT: DNA Methyl Transferase

FISH: Fluorescent *In situ* Hybridization

HAT: Histone Acetyl Transferase

HDAC: Histone DeACetylase

HDM: Histone DeMethylase

HMT: Histone Methyl Transferase

HP1: Heterochromatin Protéin 1

HR: Hydrophobic Region

HSE: Heat Shock Element

HSF1: Heat Shock Factor 1

HSP: Heat Shock Protein

HSR: Heat Stress Response

IF: ImmunoFluorescence

lncRNA : Long non coding RNA

M6A : N6-methyladenosine RNA méthylation

MEF: Mouse Embryonic Fibroblasts

ncRNA: non coding RNA

nSBs: nuclear Stress Bodies

PHC : Pericentric HeteroChromatin

PTM : Post Traductionnal Modification

RD: Regulatory Domain

SATIII: Satellite III

SR: Serin Rich

SUV39H: SUppressor of VARiegation effect 3-9

TAD : Trans Activation Domain

Table des matières

CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	9
I-A- Le modèle de la réponse au stress thermique ou Heat Stress Response (HSR).....	9
I-A-1 Caractéristiques générales.....	9
I-A-1-1-La HSR : mécanisme ancestral essentiel à la survie cellulaire.....	9
I-A-1-2-Caractéristiques et régulation d’HSF1, facteur clé de la HSR.....	11
Caractéristiques de la famille des HSFs :	11
Le facteur de transcription HSF1 :.....	13
Domaines fonctionnels d’HSF1.....	13
La régulation de l’activité d’HSF1.....	15
I-A-2- La réponse au stress médiée par HSF1.....	19
I-A-2-1-Introduction générale : HSF1 et la reprogrammation de l’expression génique lors de la HSR.....	19
I-A-2-3-Physiopathologies associées à HSF1.....	22
HSF1, HSPs et Cancer	22
HSF1 et HSPs dans le vieillissement et les maladies neurodégénératives	23
HSF1, HSPs et autres stress.....	24
I-A-3-Mécanismes d’activation transcriptionnelle des cibles d’HSF1 lors de la HSR.....	24
I-A-3-1-Mécanismes d’activation transcriptionnelle.....	24
I-A-3-2-Cibles codantes : les protéines HSPs	26
I-A-3-3 Cibles non-codantes directes d’HSF1.	27
Généralités (Pour Revue Vourc’h et al., 2022)	27
Activation transcriptionnelle des séquences <i>SATIII</i> , formation des nSBs.....	29
I-B- L’Hétérochromatine péricentrique : cible génomique non codante d’HSF1, site de nucléation des nSBs.....	34
I-B-1 Structure chromatinienne ou la relation structure/fonction de la chromatine.....	34
I-B-1-1-Caractéristiques générales.....	34
Le nucléofilament, premier niveau d’organisation de la chromatine	34
La fibre chromatinienne : deuxième niveau d’organisation de la chromatine.....	36
Troisième niveau d’enroulement de la chromatine et ultime compaction.	36
I-B-1-2-Régulation de la chromatine : mécanismes épigénétiques et dynamique de la chromatine	38
Modification chimique de l’ADN : la méthylation.....	38
Modifications post traductionnelles des histones	39
Les complexes de remodelage de la chromatine et les variants d’histones	42
La composante ARN.....	43
I-B-1-3-Organisation tridimensionnelle du noyau ou la relation structure/fonction de la chromatine.....	45
Les territoires chromosomiques et les compartiments chromatiniens	45
Les TADs (Domaines Topologiquement Associées).....	47

Les compartiments nucléaires	47
I-B-2-L'hétérochromatine	49
I-B-2-1-L'hétérochromatine-Caractéristiques générales :	49
Hétérochromatine facultative	49
<i>Le modèle de la différenciation des cellules ES murines</i>	49
L'hétérochromatine constitutive	50
Expression de l'hétérochromatine constitutive	52
Les péricentromères	53
Les centromères :	53
Les télomères	54
I-B-2-2-Maintien et mise en place des régions péricentriques chez les eucaryotes : importance de la composante ARN	55
Rôle du RNAi dans la mise en place et le maintien de l'hétérochromatine centromérique et péricentrique	57
Mise en place de l'hétérochromatine constitutive centromérique et péricentrique	61
Le modèle du développement précoce de Mus Musculus	61
Le modèle expérimental de la réponse au stress thermique (HSR)	61
I-B-3 Les régions péricentriques humaines enrichies en séquences <i>SATIII</i>	63
I-B-3-1-Historique	63
I-B-3-2-SATIII et stress	65
I-B-3-3-SATIII et intégrité du génome	65
Dérépression des régions <i>SATIII</i> et sénescence.	66
Dérépression des régions <i>SATIII</i> et cancer	66
ARNs satellites et cycle cellulaire	68
ARNs satellites et instabilités chromosomiques au cours de la mitose	70
 CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES	74
 Culture Cellulaire	74
Lignées cellulaires, Stress thermique et récupération :	74
Liste des réactifs :	75
 Cytométrie en flux	75
Analyse du cycle cellulaire	76
Blocage des cellules :	76
Knock Down des transcrits SATIII	76
Collecte des cellules :	76
Analyse du taux d'apoptose cellulaire après Stress thermique	77
 Analyses in situ	77
Marquage Immunofluorescent (IF)	77
Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)	78
Préparation des sondes (pour une lamelle)	78
Liste des anticorps	79

Liste des sondes.....	79
FISH ADN (Sonde oligonucléotide)	80
FISH ADN (Sonde double brin)	80
IF suivie d'un FISH ADN	80
FISH ADN préservant les structures tridimensionnelles	81
FISH ARN et FISH ARN suivi d'IF (sonde oligonucléotidique)	81
Observations microscopiques et analyses d'image	81
Cellules fixées	81
Cellules vivantes	82
Analyse par western blot.....	82
Analyse par Northern blot.....	83
CHAPITRE III : RESULTATS	84
RESULTATS	88
III-A- Expression des ARNs <i>Satellite III</i> au cours de la réponse au stress (HSR).	89
III-A-1 Les ARNs <i>SATIII</i> sens et antisens sont transcrits à partir de loci communs.	89
III-A-2 Expression des séquences <i>SATIII</i> : deux types de transcrits, deux cinétiques d'accumulation distinctes dans le noyau des cellules stressées.	91
III-A-3 Devenir des transcrits <i>SATIII</i> sens au cours de la récupération tardive au stress .	93
-Les exosomes :	95
-Les p-bodies :	96
III-A-4 Les ARNs <i>SATIII</i> sens et antisens sont très faiblement exprimés en absence de stress	97
III-A-5 La transcription des ARNs <i>SATIII</i> en orientation sens et antisens, est sous le contrôle de l'ARN polymérase II.	99
 III-B Les profils d'accumulation des ARNs <i>SATIII</i> sens et antisens sont respectivement corrélés à la perte et à la remise en place des marques répressives H3K9me3 et HP1α au locus 9q12.	109
 III-C-Rôle des ARNs <i>SATIII</i> dans la transition G2/M.....	113
III-C-1- Un choc thermique appliqué en G2 provoque l'allongement de la transition G2/M.	115
III-C-2 Impact de l'accumulation des transcrits <i>SATIII</i> induits par le stress sur l'entrée en mitose des cellules synchronisées.	120
III-C-3 Les transcrits <i>SATIII</i> antisens s'accumulent au moment de l'entrée en mitose. .	123
III-C-4 La présence des transcrits <i>SATIII</i> sens est associée des instabilités chromosomiques.	126
III-C-5-Analyse par vidéomicroscopie de l'effet du stress sur des cellules synchronisées.	128

III-D– Identification d’un nouvel acteur (YTHDC1) impliqué dans la reprogrammation de l’expression génique au cours de la HSR.....	131
III-E-Identification d’une nouvelle cible d’HSF1 impliquée dans la réponse au stress. ..	141
CHAPITRE IV : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	143
CHAPITRE V : ANNEXE	148
CHAPITRE VI : BIBLIOGRAPHIE	149

CHAPITRE I : INTRODUCTION

I-A- Le modèle de la réponse au stress thermique ou Heat Stress Response (HSR)

I-A-1 Caractéristiques générales

I-A-1-1-La HSR : mécanisme ancestral essentiel à la survie cellulaire

C'est en 1962 que la réponse cellulaire au stress thermique, la HSR, fut mise en évidence pour la première fois.

L'étude des chromosomes polytènes des glandes salivaires de la drosophile après exposition (accidentelle) à une élévation de température montrait l'apparition de manière transitoire de renflements chromosomiques appelés « puffs » chromosomiques, correspondant à des régions transcriptionnellement actives (Ritossa, 1962). Cette modification de profil de distribution des puffs démontrait la capacité de la cellule à moduler l'activité de ses gènes en réponse aux modifications du milieu extérieur.

Peu de temps après cette observation, la présence de gènes spécifiquement activés lors d'un stress, les gènes de chocs thermiques (*HSPs*) était décrite au niveau de ces régions (Ferruccio Ritossa 1996).

Il apparaît aujourd'hui que cette réponse adaptative environnementale est universelle. En milieu hostile, le maintien de l'homéostasie est essentiel à la survie de tous les organismes vivants. Dès lors, il est indispensable pour la cellule de mettre en place des mécanismes de détection et de réponse lui permettant de s'adapter aux variations des conditions environnementales qui lui seront imposées au cours de sa vie. Chez les eucaryotes, l'exposition à un stress protéotoxique d'origine environnementale (stress thermique ou oxydatif) ou physiopathologique (inflammation, cancer, fièvre) entraîne une profonde modification de l'expression génique, à travers notamment l'activation des gènes de choc thermique codants pour des protéines hautement conservées, les HSPs (Heat Shock Protein) (Trinklein et al. 2004) (Figure 1).

L'élévation de température, ou stress thermique (Heat Stress) fait partie des nombreux agents inducteurs de la réponse au stress. La réponse au stress thermique ou HSR est probablement celle utilisée le plus couramment en raison de sa facilité de mise en œuvre. Une exposition des cellules pendant quelques minutes à une élévation de température de quelques degrés suffit à initier une réponse cellulaire. De plus, s'il s'agit d'une exposition à un stress modéré, la HSR est réversible lorsque les cellules sont de nouveau incubées à leur température d'origine (Jolly et al., 2002). Pour ces raisons, la HSR constitue un modèle puissant pour l'étude des mécanismes et voies de signalisation mis en jeu lors de la régulation de l'expression génique. Le facteur HSF1 (Heat Shock Factor1), qui régule la transcription des protéines HSPs, a été identifié comme un facteur clé de la HSR (Morimoto et al., 1998).

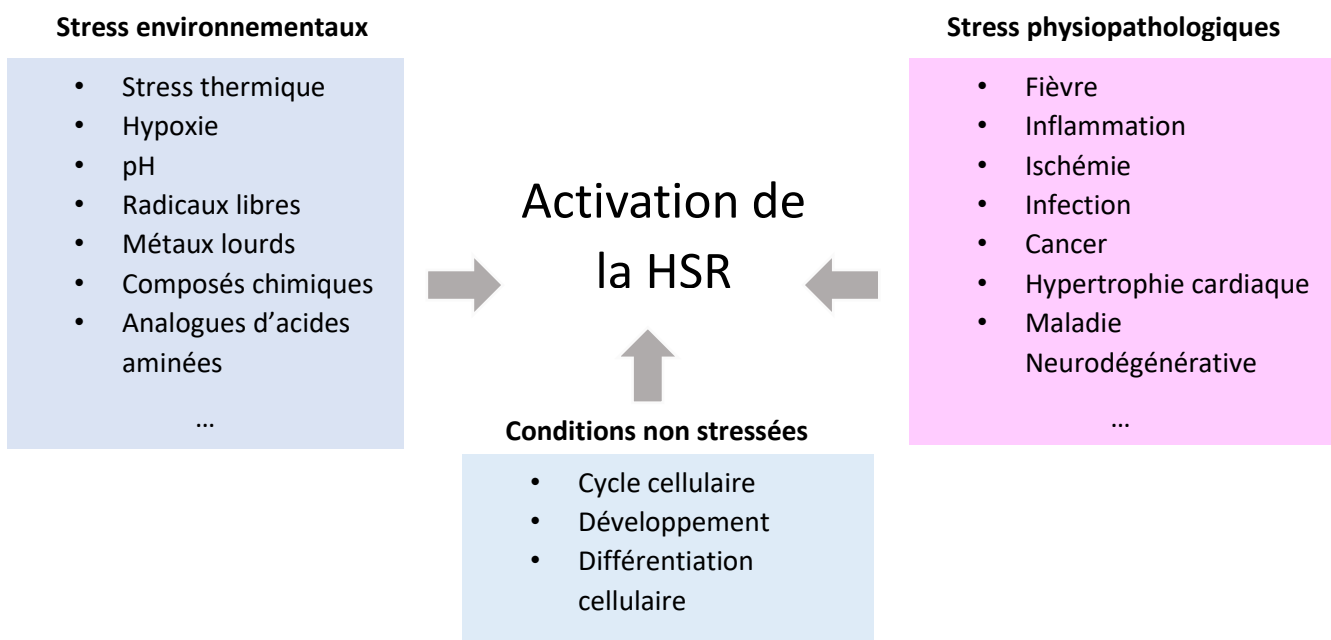


Figure 1 : Les différentes voies d'activation de la réponse au stress cellulaire.

Différents types de stress environnementaux et physiopathologiques, ou certaines conditions physiologiques ont la capacité d'initier la réponse cellulaire au stress. (Adaptée de Morimoto, 1998 et K. Timcheva, PhD 2020).

I-A-1-2-Caractéristiques et régulation d'HSF1, facteur clé de la HSR

Chez les eucaryotes, la HSR met en jeu des mécanismes très conservés au cours de l'évolution. Suite à un stress protéotoxique, la cellule doit faire face à un excès de protéines mal repliées présentant des défauts fonctionnels, et dont l'agrégation en amas insolubles peut rapidement devenir toxique. Pour contrecarrer les effets d'un déséquilibre dans l'homéostasie du protéome, la cellule surexprime des protéines chaperons (HSPs) dont le rôle est de prendre en charge les protéines mal repliées ou agrégées, soit en les repliant de manière correcte soit en les dégradant via la voie du protéasome (Whitesell et Lindquist 2005) ; (Jolly et Morimoto 2000). Le niveau d'expression des protéines HSPs est sous le contrôle d'HSF1, facteur de transcription ubiquitaire lui-même finement régulé, qui orchestre la transduction des signaux de stress en programme de protection cellulaire approprié (Guertin et al., 2010).

Caractéristiques de la famille des HSFs :

Chez les invertébrés (*S. Cerevisiae*, *D. Melanogaster*, ou encore *C. Elegans*), HSF1 est le seul facteur de stress capable de réguler transcriptionnellement les gènes *HSPs* en réponse au stress.

Chez les vertébrés, il existe plusieurs isoformes d'HSF, codées par différents gènes (*HSF1*, *HSF2*, *HSF3* et *HSF4*) (Pour revue Joutsen et Sistonen 2019). Parce qu'ils agissent en réponse à divers stimuli, les HSFs sont aujourd'hui considérés comme des « senseurs environnementaux » impliqués dans une multitude de programmes physiologiques (Pour revue Joutsen et Sistonen 2019). Les différents HSFs partagent des domaines structurels communs et reconnaissent des séquences similaires sur l'ADN. Bien qu'ils soient soumis à des mécanismes de régulation différents ils peuvent tout de même agir de concert pour remplir leurs rôles biologiques en réponse au stress et dans les contextes développementaux ou pathologiques. A ce jour, seul le facteur HSF1 semble être sensible aux stimuli classiques du stress thermique (Pour revue Joutsen et Sistonen 2019).

Les facteurs HSFs sont caractérisés par des domaines conservés (Figure 2) (Åkerfelt, Morimoto, et Sistonen, 2010) :

Un domaine de liaison à l'ADN, DBD (DNA Binding Domain), un domaine d'oligomérisation comprenant les régions hydrophobes (HR) HR-A et HR-B, permettant la trimérisation du facteur, et un domaine HR-C qui maintient le facteur sous sa forme monomérique en s'associant aux domaines HR A/B.

Comme HSF1, le facteur HSF2 participe à la régulation transcriptionnelle en réponse au stress, mais en activant des cibles distinctes. HSF2 présente une expression tissu-spécifique et possède la capacité de s'oligomériser pour former des homotrimères ou des hétérotrimères avec HSF1. En s'associant avec HSF1, HSF2 jouerait le rôle de modérateur de la HSR, en fonction de la durée et de l'intensité du stress (Sandqvist et al. 2009). HSF2 est également impliqué dans des processus physiologiques comme le développement embryonnaire, ou physiopathologiques comme le cancer (Smith et al., 2022) ou le syndrome d'alcoolisation foétale (Jaeger et al. 2016).

De par l'absence de domaine HR-C, HSF4 est constitutivement actif dans la cellule. HSF4 est exprimé sous plusieurs isoformes dont les fonctions sont opposées : certaines activent et d'autres répriment l'activité transcriptionnelle de ses cibles (Syafuruddin et al. 2021).

HSF4 est impliqué dans plusieurs processus physiologiques, incluant la régulation de la différenciation et de la prolifération cellulaire au cours du développement et la réparation des dommages à l'ADN. Des altérations génétiques ou une activité aberrante d'HSF4 ont également été impliquées dans des maladies telles que la cataracte et le cancer (Syafuruddin et al. 2021).

Enfin, HSF3 a été identifié uniquement chez la souris et les oiseaux et joue un rôle redondant à celui d'HSF1 dans l'induction des gènes *hsps* (Fujimoto et al. 2010).

Chez l'homme ont également été identifiés, un gène *HSF5* qui à ce jour, a été détecté uniquement sous forme de transcrits, ainsi que deux gènes *HSFX* et *HSFY* situés respectivement sur les chromosomes X et Y (pour revue Joutsen et Sistonen, 2019). Il y a très peu d'information dans la littérature concernant le rôle de *HSFX*. *HSFY* quant à lui, s'exprime uniquement dans les testicules avec un rôle dans la spermatogénèse (Tessari et al. 2004).

Dans notre étude nous nous focaliserons principalement sur le facteur HSF1 dont les caractéristiques feront l'objet d'une partie plus détaillée.

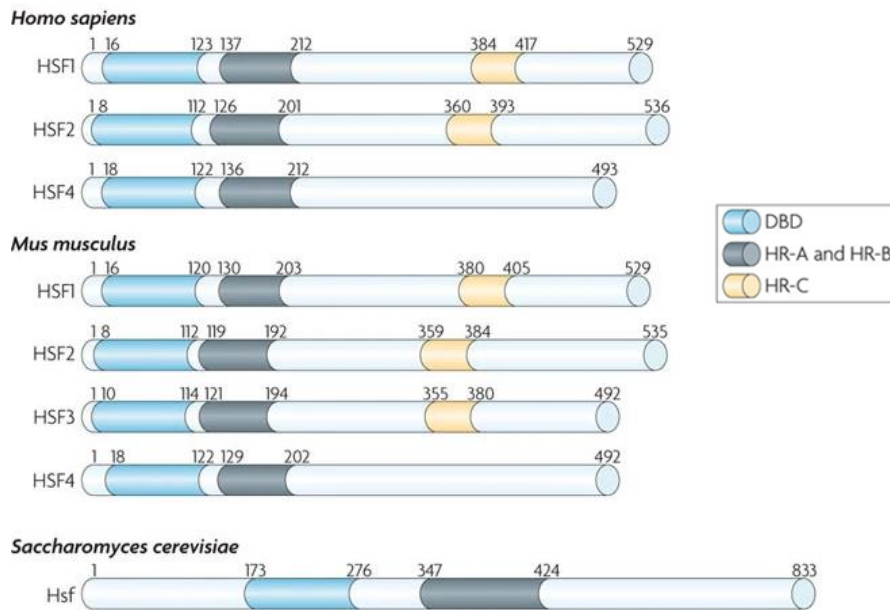


Figure 2 : Domaines fonctionnels conservés des principaux HSF humains, murins et de levure. Sont indiqués le domaine de liaison à l'ADN (DBD), les domaines d'oligomérisation HR-A, HR-B, et d'inactivation HR-C (D'après Åkerfelt, Morimoto, et Sistonen, 2010).

Le facteur de transcription HSF1 :

Domaines fonctionnels d'HSF1

Chez les vertébrés, HSF1 contient plusieurs domaines fonctionnels conservés au cours de l'évolution : Le domaine DBD (DNA binding Domain) situé dans la partie N-terminale de la protéine permet la liaison d'HSF1 à ses cibles génomiques. HSF1 se lie sur des séquences consensus présentes, entre autres, sur les promoteurs des gènes *HSPs* dont il active la transcription (Wu, 1995). Ces séquences, appelées HSEs (Heat Shock Element), sont composées de l'élément nGAAn disposés selon un mode inversé répété (Trinklein et al. 2004a).



Figure 3 : Séquence des éléments HSE, cibles génomique d'HSF1, (d'après Vihervaara et al. 2017).

La résolution de la structure du domaine DBD, montre qu'HSF1 est présent dans les cellules stressées sous forme de trimère, et que chaque DBD reconnaît une séquence nGAAn (Jaeger et al. 2016). *In vitro*, l'affinité d'HSF1 pour les HSEs augmente avec sa trimérisation, et HSF1 se lie préférentiellement sur les HSEs contenant au moins trois unités de répétitions « nGAAn ». De plus, selon des analyses *in silico*, les promoteurs de nombreux gènes cibles de HSF1 contiennent des répétitions nGAAn plus étendues ou plusieurs HSE, ce qui permet la liaison simultanée et coopérative de plusieurs trimères d'HSF1 (Guertin et Lis, 2010).

Le domaine d'oligomérisation est situé à proximité du DBD. Il s'agit d'une répétition de deux motifs de 7 acides aminés formant une structure en hélice de type « Leucine zipper » appelée HR-A/B (Région Hydrophobes). HR-A/B est le domaine permettant la trimérisation d'HSF1. En effet, en réponse à un stress, les domaines HR-A/B s'associent entre eux pour former une molécule trimérique (Rabindran et al. 1993). Il existe une autre structure HR, située à proximité de la partie C-Terminale, le domaine HR-C. En condition normale, HR-A/B et HR-C interagissent pour maintenir HSF1 sous forme de monomérique. Sous l'effet de la chaleur, une dissociation des domaines HR-C et HR-A/B se produit, permettant ainsi la formation de trimères d'HSF1.

Le domaine TAD (Trans Activation Domain) est localisé dans la partie C-terminale de la protéine. Constitué de deux modules d'activation AD1 et AD2 riches en acides aminés hydrophobes, il facilite *in vitro* l'initiation et l'élongation de la transcription des gènes cibles d'HSF1. Les partenaires connus du domaine TAD sont les protéines impliquées dans la transcription : TBP, TFIIB, TFIIA et les TAF, ainsi que la protéine BRG1 membre du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (pour revue, Anckar et Sistonen, 2011).

Le domaine de régulation RD (Regulatory Domain) situé entre les domaines DBD et TAD, exerce, en condition normale, un contrôle négatif sur le domaine TAD. Ce domaine est également soumis à de nombreuses modifications post-traductionnelles permettant de moduler son impact sur le TAD en condition stressée (pour revue, Anckar et Sistonen, 2011).

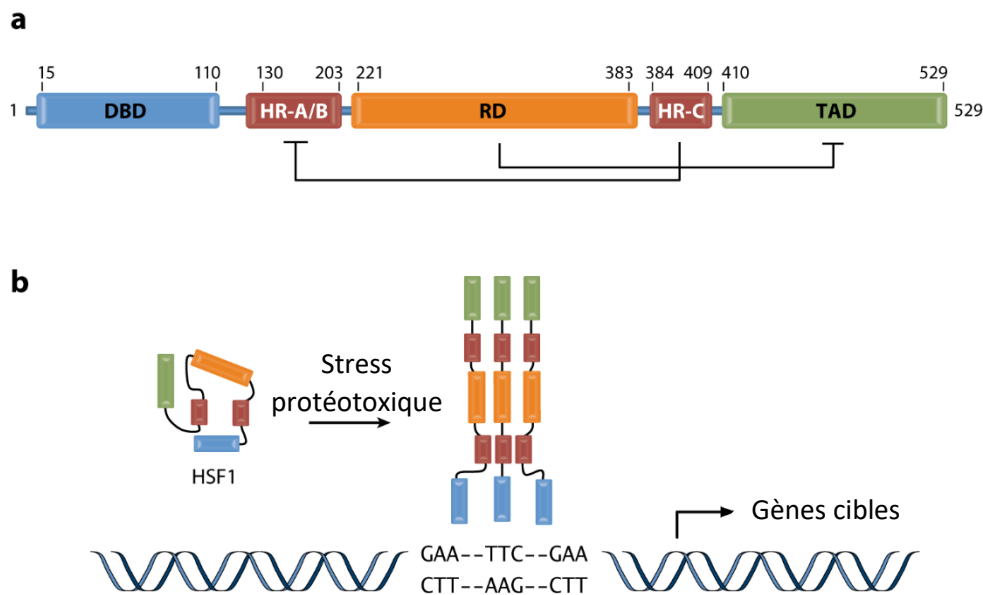


Figure 4 : Structure et domaines fonctionnels d’HSF1 humain (d’après Anckar et Sistonen, 2011).

a- Les différents domaines fonctionnels: le domaine DBD qui assure la liaison entre le trimère d’HSF1 et l’ADN, les domaines d’oligomérisation HR-A/B et le domaine HR-C qui maintient HSF1 sous forme monomérique, le domaine TAD impliqué dans la transcription des gènes cibles et le domaine RD qui régule le domaine TAD.

b- Suite à un stress, HSF1 se trimérise via l’interaction des domaines HR-A/B, se positionne sur ses séquences cibles, les HSEs, et active la transcription de ses gènes cibles.

La régulation de l’activité d’HSF1

HSF1 est exprimé de manière constitutive dans la cellule, sous forme monomérique, et se localise principalement dans le cytoplasme.

Dans les cellules non stressées, HSF1 inactif forme un complexe hétéro-oligomérique impliquant des protéines chaperons et d’autres partenaires. Suite à un stress, HSF1 se dissocie de ses complexes répressifs, subit plusieurs modifications post-traductionnelles (PTMs), se trimérise et acquiert ses capacités de liaison à l’ADN et de transactivation. Lors de la période de récupération au stress, HSF1 retourne progressivement sous sa forme hétéro-oligomérique initiale (pour revue Joutsen et Sistonen, 2019).

La régulation d’HSF1 fait intervenir de nombreuses molécules et voies de signalisation. Le cycle d’activation/atténuation de la HSR fait intervenir de manière complexe interactions

protéiques et modifications post-traductionnelles d'HSF1 (Åkerfelt, Morimoto, et Sistonen 2010) (figures 5 et 6).

-Régulation par les interactions protéine-protéine

Dans les cellules non stressées, HSF1 est présent dans un complexe dormant impliquant la protéine Histone Deacétylase HDAC6, la protéine VCP (Valosin Containing Protein), une AAA-ATPase multitâche et chaperonne (TriC), et les protéines HSP70 et HSP90 (Seigneurin-Berny et al. 2001; Boyault et al. 2007). Lors d'un choc thermique, HDAC6 libère la protéine HSF1 en se liant préférentiellement aux protéines polyubiquitinylées (Poly-Ub). La reformation du complexe hétéro-oligomérique inactif d'HSF1 se produit lorsque les protéines poly-Ub ne sont plus disponibles et nécessite la présence d'un partenaire d'HDAC6, la protéine VCP.

Dans l'équipe, nous avons montré que dans des cellules exprimant une protéine HDAC6 mutée, incapable de lier les protéines ubiquitinylées, une reformation prématurée du complexe HSP90-HDAC6, médiée par la protéine VCP permet la reformation du complexe HSF1 hétéro-oligomérique inactif (Pernet et al., 2014).

Dans le noyau, HSF1 est associé aux protéines chaperons HSP70 et HSP90. En réponse à une élévation de température, le complexe se dissocie. Cette dissociation rapide, dont nous pensons qu'elle mobilise dans un premier temps la fraction nucléaire, est facilitée par les changements structuraux induits par un stress mais également grâce à une mobilisation rapide des chaperons HSP70 et HSP90 vers les protéines mal repliées (Westerheide et Morimoto 2005 ; Voellmy et Boellmann 2007 ; Åkerfelt, Morimoto, et Sistonen 2010).

La liaison d'HSF1 sur ses HSEs n'est pas suffisante pour activer la transcription de ses gènes cibles, la régulation de l'activité d'HSF1 implique également différentes PTMs.

-Régulation par les modifications post-traductionnelles

En fonction de l'origine du stress et de son intensité, tout au long de son cycle activation/atténuation, HSF1 subit de nombreuses PTMs, incluant la phosphorylation, l'acétylation et la sumoylation (Figure 5). Il existe une multitude de résidus susceptibles d'être modifiés post-traductionnellement. Les principales PTMs influençant l'activité d'HSF1 suite au stress thermique se situent dans le domaine de régulation de la protéine (pour revue Vihervaara et Sistonen 2014) : Sous sa forme monomérique HSF1 est constitutivement phosphorylé sur les sérines S121, S303, S307 and S363. En condition stressée, HSF1 est

phosphorylé principalement sur les résidus S230, S320 et S326. Cette hyperphosphorylation est couramment utilisée comme marqueur de l'activation d'HSF1.

Une acétylation se produit au niveau du résidu K80 lors de la phase d'atténuation du cycle d'activation d'HSF1. L'acétylation d'HSF1 est contrôlée par une Acetyl Transférase p300-CBP (CREB-binding protein) et sa déacétylation par une déacétylase, SIRT1 (Westerheide et al. 2009). L'acétylation est associée à une atténuation de la liaison d'HSF1 à l'ADN, au contraire de la déacétylation (Figure 6).

La sumoylation sur le résidu K298, nécessite la phosphorylation du résidu S303 présent au niveau du domaine régulateur. Elle se produit rapidement et transitoirement lors de l'exposition au choc thermique (Hietakangas et al. 2003).

A noter, HSF1 peut aussi être ubiquitinylé pour engendrer sa dégradation par ciblage au protéasome (Figure 5).

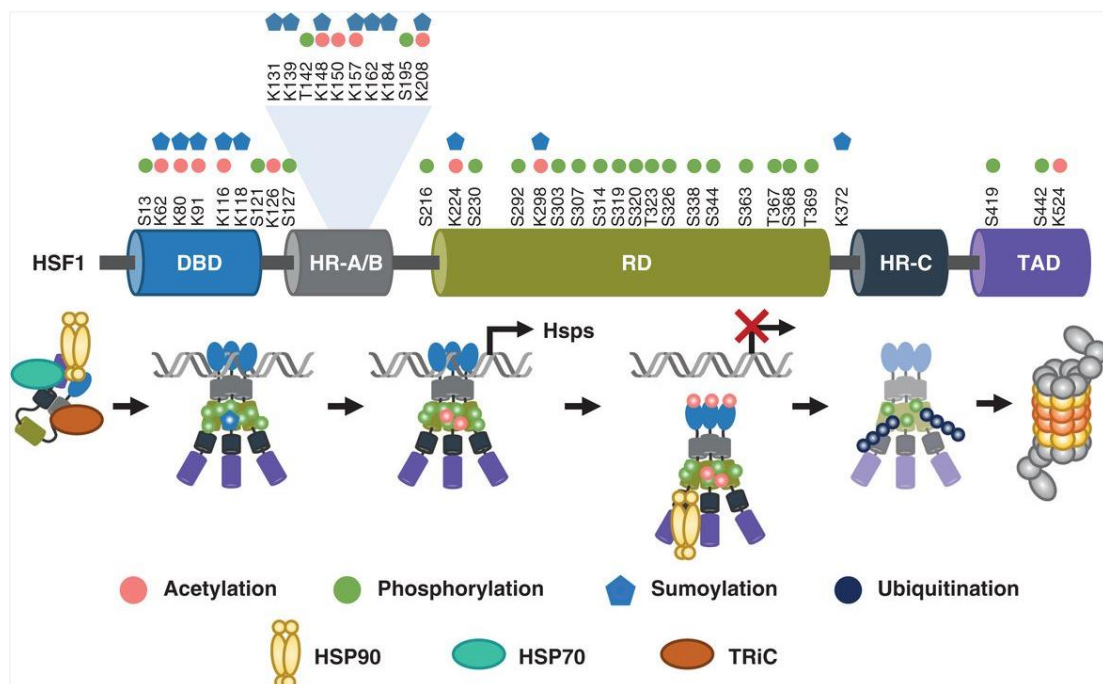


Figure 5 : Ensemble des régulations d'HSF1.

En l'absence de stimulus, HSF1 est présent dans la cellule au sein de complexes qui font intervenir des chaperons (HSP90, HSP70, TRiC), HDAC6 et VCP. Les étapes d'activation et d'atténuation sont accompagnées de modifications post-traductionnelles affectant HSF1. Lors de l'atténuation, HSF1 est dégradé par le système ubiquitine-protéasome (d'après Joutsen et Sistonen 2019).

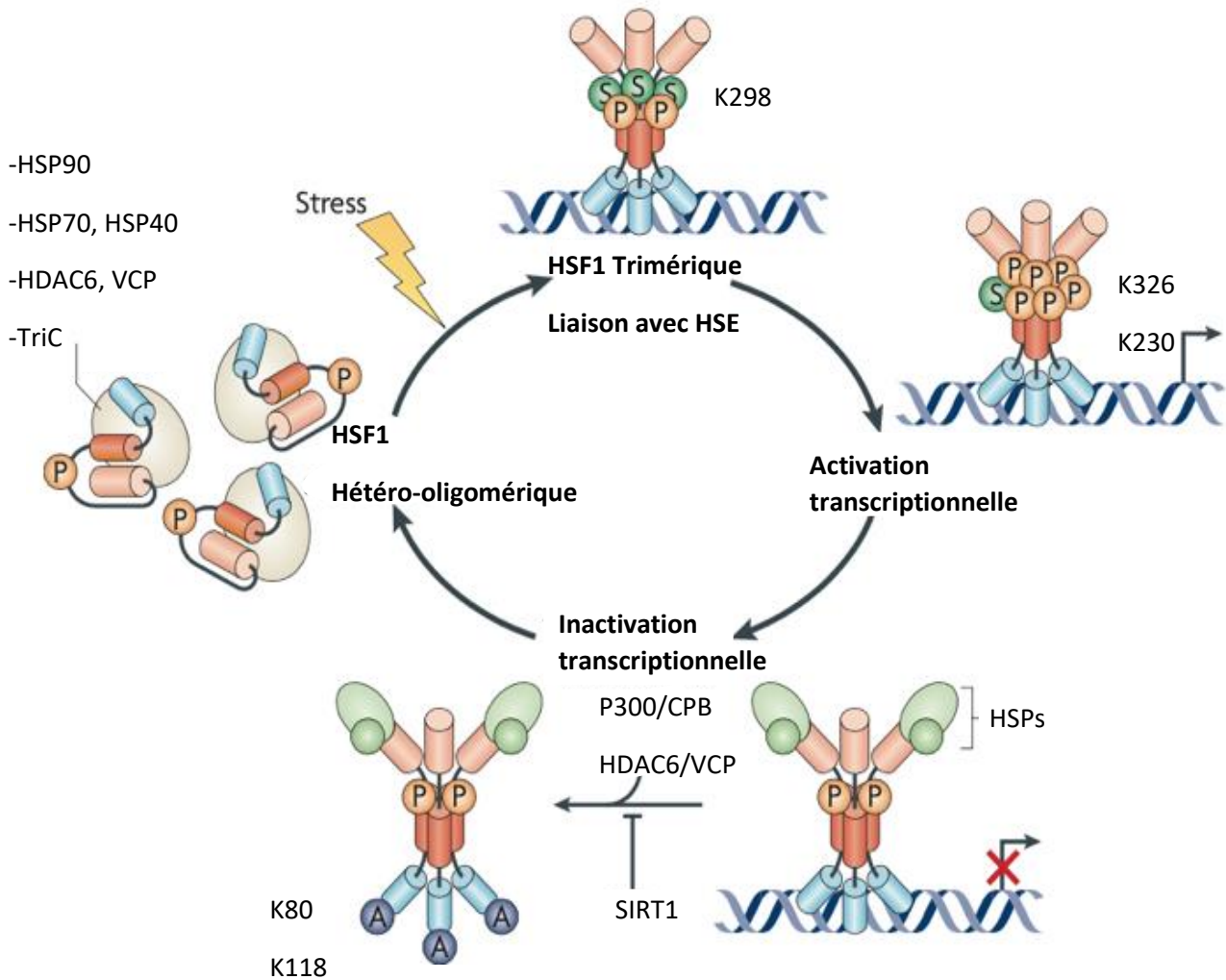


Figure 6 : Cycle d'activation/atténuation d'HSF1 impliquant une trimérisation, de multiples PTMs et une régulation des protéines du complexe hétéro-oligomérique d'HSF1.

En réponse au stress, HSF1 se dissocie du complexe protéique, ce qui permet sa trimérisation et sa liaison aux éléments de choc thermique (HSE). Plusieurs modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation et la sumoylation, sont impliquées dans la régulation de la capacité de transactivation d'HSF1. Pendant la phase d'atténuation, l'association d'HSF1 aux HSPs et à d'autres protéines inhibitrices accompagne le processus d'inactivation d'HSF1. L'acétylation de la lysine 80 d'HSF1 par P300/CBP est également associée à la perte de liaison d'HSF1 à l'ADN. La déacétylase SIRT1 régule la phase d'atténuation de la réponse au choc thermique en empêchant l'acétylation de HSF1. (Adapté de Åkerfelt, Morimoto, et Sistonen 2010).

I-A-2- La réponse au stress médiée par HSF1

I-A-2-1-Introduction générale : HSF1 et la reprogrammation de l'expression génique lors de la HSR

Dès les années 2000, il est apparu que l'activation transcriptionnelle mise en jeu au cours de la HSR impliquait des réseaux et voies de signalisation complexes ne se résumant pas à la simple interaction entre un facteur de transcription et sa cible génomique.

Des approches biomoléculaires de type CHIP et RT qPCR, réalisées avec des puces à ADN dans les cellules humaines stressées, indiquaient qu'une fraction de 5 à 10 % du génome était fortement activée, tandis que plus de la moitié du génome était inactivée (Trinklein et al. 2004a).

Plus récemment, la méthode PRO-seq (Precision Run-On sequencing), qui permet de cartographier la polymérase engagée dans la transcription à la résolution d'un nucléotide, a été appliquée dans un modèle de fibroblastes de souris embryonnaires. Les données obtenues ont confirmé l'activation d'environ 1200 gènes (soit 10% du génome) et l'inactivation d'environ 8000 gènes (soit plus de 50% du génome) dès la première heure du stress thermique (Figure 7) (Mahat et al. 2016b). L'étude comparative de la reprogrammation de l'expression génique déclenchée par la HSR, dans des fibroblastes issus de souris sauvage (MEF WT) et dans des fibroblastes issus de souris *hsf1*^{-/-}, a montré que plus de la moitié des gènes sont activés de manière HSF1-indépendante. Le facteur HSF1 n'est pas non plus principalement associé à la répression globale des gènes suite au stress. Ces informations mettent en évidence l'intervention d'autres acteurs de la HSR, agissant ou non de concert avec HSF1.

La même approche (PRO-seq) a été utilisée dans des cellules humaines érythroïdes K565 soumises ou non à un stress thermique (Vihervaara et al., 2017). Cette étude met en évidence la plasticité spatio-temporelle de la HSR, et identifie 800 gènes activés et 6000 gènes inhibés dans des cellules stressées (Tableau1). Chez l'homme, HSF1 intervient principalement en activant des gènes codants pour des chaperons et co-chaperons et pour des gènes codants pour des protéines impliquées dans la régulation de l'apoptose, dans la réponse aux espèces réactives de l'oxygène (ROS), dans l'organisation membranaire et dans la régulation chromatinienne. Dans les cellules stressées, HSF1 a également pour cible des gènes réprimés codant pour des protéines impliquées dans la répression transcriptionnelle, dans le contrôle

du cycle cellulaire et dans les modifications chromatinienne (Tableau 1) (Vihervaara et al., 2017).

Ainsi, de manière intéressante, en réponse à un stress protéotoxique, HSF1 considéré comme un régulateur clé de la réponse, montre une implication directe limitée.

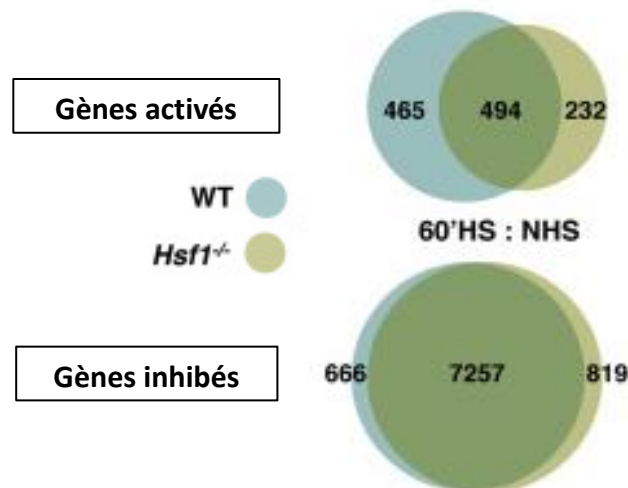


Figure 7 : Lors de la HSR, les modulations d’expression de la plupart des gènes sont, indépendantes d’HSF1.

Diagramme représentant le nombre de gènes régulés positivement ou négativement après 60 min de stress thermique, dans des fibroblastes issus de souris sauvage (wt) ou double mutants pour HSF1 (*hsf1*^{-/-}), (adapté de Mahat et al. 2016).

	Gènes activés	Gènes réprimés
Gènes liés à HSF1	<p>Chaperones and Co-chaperones Regulation of apoptosis Response to ROS Membrane organization Chromatin regulation</p>	<p>Transcriptional repression Chromatin modification Cell cycle</p>
Gènes non liés à HSF1	<p>Hemoglobin chaperone Lipid metabolism Protein catabolic process Negative regulation of apoptosis</p>	<p>Translation Ribosomal protein Mitochondrion Cell cycle Transcriptional elongation Ubl conjugation RNA splicing/spliceosome</p>

Tableau 1 : Caractéristique fonctionnelle des gènes activés et réprimés dans les cellules K565 exprimant HSF1 ou non (d’après Vihervaara et al., 2017).

I-A-2-2-Rôles physiologiques d'HSF1

De manière générale, chez les eucaryotes supérieurs, HSF1, ainsi que les HSPs, ont un impact positif sur la durée de vie en maintenant l'homéostasie du protéome et en assurant la protection de l'organisme.

Chez les invertébrés, HSF1 est impliqué dans une multitude de processus biologiques en absence de stress. Chez la levure, par exemple, le gène *HSF1* est essentiel à la survie même en absence de stress (Sorger et Pelham 1988) (Gallo, Prentice, et Kingston 1993) et régule 3% du génome (Hahn et Thiele 2004). Chez *C. Elegans*, *HSF1* via l'expression des chaperons régule la longévité (Morley et Morimoto 2004). Enfin, chez la drosophile, *HSF1* est essentiel au développement larvaire et à l'ovogénèse (Jedlicka et al., 1997).

Chez les mammifères le gène *HSF1* n'est pas nécessaire à la survie mais contribue au développement (Åkerfelt et al., 2010): Les souris *hsf1*^{-/-} présentent des dérégulations de production de cytokines, un retard de croissance, une léthalité prénatale, une infertilité des femelles, une incapacité à déclencher la HSR (XZ Xiao et al., 1999) et des défauts de spermatogénèse (Salmand et al., 2008).

Un apport d'HSF1 maternel est nécessaire : Les ovocytes de femelles déficientes en HSF1 ne se développent pas au-delà du stade zygotique même fécondés par un mâle sauvage pour le gène *hsf1* (Christians et al., 2000).

Bien qu'ayant un effet global positif sur la survie cellulaire, l'expression d'HSF1 nécessite d'être contrôlée ; un excès d'HSF1 favorise aussi la carcinogénèse (Mendillo et al., 2012).

De même une activation excessive et prolongée d'HSF1 semble également à l'origine de désordres ; en effet, des souris mâles surexprimant une forme active d'HSF1 sont infertiles (Nakai, et al., 2000).

I-A-2-3-Physiopathologies associées à HSF1

HSF1, HSPs et Cancer

Dans un contexte tumoral, pour faire face à une recrudescence de protéines mutées mal repliées et à une augmentation du niveau d'expression de protéines oncogéniques, la cellule active la HSR et l'expression des HSPs (Whitesell et Lindquist 2005). La surexpression des HSPs est associée à l'apoptose, la migration, la prolifération l'angiogenèse et au devenir métastatique des cellules cancéreuses et pose la question du rôle d'HSF1 dans le processus tumoral.

La compréhension de la régulation transcriptionnelle et traductionnelle des gènes *HSPs*, notamment HSP70, est considérée comme un enjeu important dans le développement des drogues anti-cancéreuses (Chatterjee et Burns 2017 ; Mosser et Morimoto 2004).

Des études menées *in vivo* et *in vitro* chez la souris ont démontré une implication directe du facteur HSF1 dans le développement tumoral (Dai et al., 2007; Min et al., 2007). Dans des souris *hsf1*^{-/-}, le développement de tumeurs induites par mutation du suppresseur de tumeur p53, ou chimiquement en altérant la voie oncogénique RAS, est fortement ralenti. De même la croissance et la survie de différentes lignées cancéreuses humaines déplétées en HSF1 sont fortement altérées, en comparaison avec des lignées non cancéreuses (Dai et al., 2007). En plus de son implication dans les voies de signalisations promotrices de cancer RAS/MAPK et cAMP/PKA, HSF1 intervient au niveau de la biogénèse des ribosomes, et dans la régulation métabolique via la glycolyse (Y. H. Zhao et al., 2009).

L'ensemble de ces données suggère fortement l'implication d'HSF1 dans les processus cellulaires d'adaptation aux changements drastiques de l'homéostasie du protéome induits par le stress oncogénique.

Grâce à des approches immunohistochimiques dans des coupes de tumeurs humaines, il a été montré qu'HSF1 est surexprimé et présente une localisation nucléaire dans divers types de cancers (sein, colon, pancréas, prostate, poumon et du col de l'utérus) (Santagata et al., 2011). Au contraire, un faible niveau d'expression d'HSF1 et une localisation cytoplasmique dans les tissus sains correspondants est observée. L'augmentation du niveau d'expression d'HSF1 intervient au cours du processus de transformation des cellules en tumeur maligne. Cette augmentation est indépendante du microenvironnement cellulaire, faisant d'HSF1 un marqueur de malignité tumorale (Santagata et al., 2011).

Des analyses statistiques associent cette surexpression et activation constitutive d'HSF1 dans des tumeurs à un mauvais pronostic vital (Santagata et al., 2011). De ce fait, HSF1 représente donc une cible thérapeutique potentielle. De manière complémentaire, des méthodes génomiques plus spécifiques, de type CHIP-seq et CHIP-qPCR, ont permis de déterminer le rôle crucial d'HSF1 dans la programmation transcriptionnelle dans les cancers du sein, poumon et du colon, mais avant tout distinct de son rôle bien connu dans la HSR (Mendillo et al., 2012). A l'aide d'un modèle constitué de deux lignées cancéreuses humaines de différents niveaux de malignité mais d'origine identique, le groupe de Susan Lindqvist a mis en évidence que 60% des gènes cibles d'HSF1 dans les cellules tumorales malignes, diffèrent des gènes cibles de la HSR dans des cellules normales stressées (Dai et al., 2007). Ces données remettent en cause l'idée selon laquelle les HSPs sont les effecteurs principaux de la tumorigénèse.

HSF1 et HSPs dans le vieillissement et les maladies neurodégénératives

La capacité des cellules à maintenir l'homéostasie en réponse au stress est progressivement compromise dans les cellules vieillissantes.

Chez *C. elegans*, les nématodes exprimant des copies supplémentaires du gène *HSF1* sont résistants à l'hyperthermie et au stress oxydatif, et vivent environ 40 % plus longtemps que leurs homologues de type sauvage (Morley et Morimoto, 2004).

Comme nous l'avons vu, la surexpression d'HSF1 permet à la cellule de se protéger face à un stress, mais favorise le développement tumoral en cas de cancer. Cependant, une trop faible expression d'HSF1 conduit au développement de pathologies induites par une accumulation d'agrégats protéiques.

L'inhibition d'HSF1 par l'utilisation d'ARNi réduit la durée de vie de 30 à 40 % et accélère la formation d'agrégats de protéines associés aux maladies de Huntington et d'Alzheimer (pour revue Gomez-pastor, Burchfiel et Thiele, 2018).

Dans les maladies neurodégénératives de type Parkinson, Alzheimer ou encore la sclérose latérale amyotrophique, une réduction du niveau d'expression et/ou de l'activité de la protéine HSF1 a été rapportée, associée *de facto* à une baisse de l'expression des protéines chaperons. La faible expression des HSPs exacerbe l'agrégation de protéines associées à ces maladies, comme l'amyloïde- β , la protéine Tau phosphorylée (Tau-P), la protéine TAR de liaison à l'ADN 43 (TDP43) (pour revue, Gomez-Pastor, Burchfiel, et Thiele 2018). De plus, deux ubiquitine E3 ligases, NEDD4 et FBXW7, ont été impliquées dans la dégradation d'HSF1 dans

la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington, respectivement (pour revue, Gomez-Pastor, Burchfiel, et Thiele 2018).

HSF1, HSPs et autres stress

Outre le stress thermique, d'autres types de stress peuvent enclencher une réponse cellulaire de type HSR (pour revue Barna, Csermely et Vellai, 2018). C'est le cas du stress oxydatif, provoqué chimiquement en exposant des cellules au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), avec pour conséquences l'induction de transcription des HSPs par HSF1. Deux résidus Cys35 et Cys105, ont été identifiés dans le domaine de liaison à l'ADN de HSF1, comme senseur du statut redox de la cellule, permettant de réguler la trimérisation et relocalisation d'HSF1 sur ses cibles génomiques (pour revue Barna, Csermely, et Vellai, 2018).

L'UPR (Unfold Protein Response), avec la HSR, a pour fonction de réduire l'effet néfaste de la protéotoxicité. L'UPR est un mécanisme extrêmement conservé et prend place dans le réticulum endoplasmique, contrairement à la HSR qui est cytosolique. Une analyse de l'expression du génome a démontré l'implication d'HSF1 à la fois dans la surexpression des chaperons du réticulum endoplasmique et du cytosol, mettant en évidence un cross-talk entre les deux réponses (pour revue Barna, Csermely, et Vellai 2018).

I-A-3-Mécanismes d'activation transcriptionnelle des cibles d'HSF1 lors de la HSR

I-A-3-1-Mécanismes d'activation transcriptionnelle

La régulation transcriptionnelle des gènes *HSPs* au cours de la HSR a été largement étudiée en tant que système modèle d'expression génétique (Guertin et al., 2010 ; Fuda et al., 2009).

L'analyse de l'activation du gène *HSP70* chez la drosophile comme modèle d'étude, a permis de découvrir dans un premier temps que l'ARN POLII était engagée de manière constitutive (soit de manière HSF1 indépendante) (Rougvie et Lis 1988 ; Rasmussen et Lis 1993) sur les promoteurs proximaux du gène. La transcription bien qu'initiée est maintenue en pause par le complexe ARN POLII-NELF (Negative ELongation Factor) (Duarte et al., 2016). C'est grâce à

ce positionnement en « bloc départ » que l'induction de la transcription est très réactive en cas de stress.

La dynamique d'exécution du programme de protection des cellules, ainsi que l'utilisation de nouvelles technologies à l'échelle du génome comme la PRO-seq (permettant de situer au nucléotide près la position de l'ARN POLII), ont permis de décortiquer de manière spatio-temporelle les étapes mécanistiques mises en œuvre lors de la régulation transcriptionnelle dans les cellules humaines (pour revue Vihervaara et al., 2018). Cette régulation comprend plusieurs étapes limitantes, dont l'ouverture de la chromatine, l'assemblage du complexe de pré-initialisation (PIC), l'initiation de la transcription, la levée de pause, l'élongation, la terminaison, et le recyclage de la machinerie transcriptionnelle (Pour revue, Vihervaara et al., 2018).

Lors de la HSR, HSF1 joue un rôle essentiel dans la levée de pause de l'ARN POLII. La liaison d'HSF1 à l'ADN induit le recrutement du complexe p-TEFb (positive-Transcription Elongating Factor b) qui en retour induit la phosphorylation du domaine CTD l'ARN POLII et la dissociation du complexe NELF, permettant ainsi la libération de l'ARN POLII (Guertin et al., 2010).

HSF1 est également associé à des complexes de remodelage de la chromatine qui facilitent la progression de l'ARN POLII. Ainsi BRG1, une sous-unité du complexe de remodelage SWI/SNF, (Sullivan et al. 2001) a été identifié. Tip60 qui neutralise les charges positives des protéines histones grâce à sa capacité d'acétylation des histones (activité HAT) est également impliquée dans l'activation transcriptionnelle des gènes cibles d'HSF1. Les résidus acétylés facilitent le recrutement de protéines à bromodomaine impliquées dans l'activation de la transcription (Miozzo, et al., 2015).

Enfin HSF1 interagit directement avec RPA (Replication Protein A) qui se lie et stabilise l'ADN simple brin. Le complexe RPA/HSF1 recrute la protéine FACT (FACilitates Chromatin Transcription) une histone chaperonne, qui déplace les dimères H2A-H2B pour faciliter l'ouverture de l'ADN (Fujimoto et al., 2012).

I-A3-2-Cibles codantes : les protéines HSPs

Comme nous l'avons vu précédemment, l'expression de nombreux gènes est modulée par HSF1 en réponse à un stress. Parmi eux, les gènes *HSPs* sont considérés comme les principales cibles génomiques codantes du facteurs HSF1 lors de la HSR. Les HSPs sont classées en six grandes familles en fonction de leur poids moléculaire : HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, et les petites protéines de choc thermique sHSPs).

Chaque famille de gènes *HSPs* comprend des membres qui sont exprimés de manière constitutive dans la cellule, régulés par induction et ciblés sur différents compartiments. Les différentes HSPs fonctionnent le plus souvent de manière coopérative dans le but de préserver l'homéostasie du protéome des cellules (pour revue jolly et Morimoto, 2000).

Les protéines chaperons HSP70s et HSP90s sont les plus conservées et les plus étudiées dans le contexte de la HSR, associées à la forme hétéro-oligomérique inactive du facteur HSF1 (pour revue, Jolly et Morimoto, 2000).

Dans des conditions physiologiques, les HSP70s sont impliquées dans le repliement de novo des protéines, et sous stress, elles empêchent l'agrégation des protéines et peuvent même replier les protéines agrégées (pour revue, Richter et al., 2010).

Les HSP90s sont très abondantes dans le cytosol des cellules en conditions physiologiques, et sont fortement surexprimées sous stress. Leur rôle est de veiller au repliement correct des protéines natives. Elles jouent également un rôle dans le contrôle des récepteurs stéroïdiens. Elles sont associées à ces récepteurs dans leur forme inactive (pour revue Prodromou, 2016). Lorsque les mécanismes de repliement sont insuffisants, les protéines endommagées forment des agrégats toxiques pour la cellule. Les HSPs participent alors à leur dégradation en adressant les protéines cibles aux sous-unités protéasomiques. Par exemple, HSP70 et HSP90 coopèrent avec plusieurs ubiquitine ligases E3 afin de marquer les substrats dépliés et/ou agrégés pour la dégradation (Young, Hoogenraad, et Hartl 2003).

I-A-3-3 Cibles non-codantes directes d'HSF1.

Généralités (Pour Revue Vourc'h et al., 2022)

Comme décrit précédemment, la HSR met en jeu une activation de l'expression génique complexe dont HSF1 l'un des acteurs principaux. A l'instar des gènes *HSPs*, dont la transcription est fortement activée directement par HSF1, plusieurs cibles non codantes contenant des HSEs et étant activées par HSF1 ont été identifiées : *SATIII* et *TERRA* sont des lncRNAs (long non coding RNAs) issus de régions répétées d'hétérochromatine péricentrique (Jolly et al., 2004 ; Rizzi et al., 2004) et sub-télomérique respectivement (Koskas et al., 2017 ; Horard et al., 2009), les **SINES** (Short Interspersed Nuclear Elements) dont les transcrits sont issus de séquences répétées et dispersées le long du génome (Deininger, 2011 ; Liu et al. 1995), les **eRNAs** (enhancer RNAs) (Vihervaara et al., 2017), et **NEAT1.1** et **NEAT1.2.**, deux transcrits isoformes issus d'un gène unique non codant (Lellahi et al., 2018).

Les ARNs *TERRA* sont issus des 40% des chromosomes qui contiennent des HSE et des unités de répétition télomériques dans leur domaine subtélomérique (Koskas et al., 2017).

Chez l'homme, les SINES ont été identifiés comme des séquences répétées dispersées de 280 bases nommées Alu. Les séquences Alu sont transcrites par l'ARN Polymérase III et sont distribuées tout le long des chromosomes. Néanmoins certaines localisées au niveau des régions introniques sont transcrites à partir des promoteurs de gènes et de ce fait, transcrites par l'ARN POLII (Pandey et al., 2011). Ces séquences Alu peuvent interagir avec l'ARN POLII et bloquer l'activation de la transcription en *cis* ; la transcription en antisens des séquences Alu situées en aval du promoteur interagirait alors négativement sur la transcription sens (Pandey et al., 2011).

Les eRNAs sont transcrits à partir d'éléments situés à distance des promoteurs des gènes induits par le stress et sont transcrits de manière bi-directionnelle par l'ARN POLII en lncRNA (de 50bp à 2Kb) dans des domaines enrichis en H3K27ac (Creyghton et al., 2010).

NEAT1.1 et *NEAT1.2* sont deux isoformes de 3.7 Kb and 22.3 Kb respectivement, et sont générés à partir d'un même promoteur (Lellahi et al., 2018). *NEAT1.2* est localisé dans des structures nucléoprotéiques dynamiques appelées paraspeckles (Fox et Lamond, 2010).

Bien que leur rôle soit encore mal compris, l'expression des lncRNAs dont la transcription est contrôlée par HSF1 dans le cadre de la HSR apparaît aujourd'hui comme un élément incontournable dans le contrôle de l'expression des gènes. Grâce à leur grande diversité, les

lncRNAs sont impliqués dans la régulation de processus transcriptionnels et post transcriptionnels :

Les transcrits *SATIII* et *NEAT1.2* appartiennent à des structures nucléaires (nSBs et paraspeckles) enrichies en facteurs impliqués dans la transcription et la maturation des ARNs (Biamonti et Caceres 2009 ; Ninomiya et al., 2020).

Les transcrits eRNAs et Alu jouent un rôle dans le contrôle de la machinerie transcriptionnelle. Les ARNs de type eRNAs semblent être impliqués dans l'adressage des facteurs de transcription au promoteur, ou dans le maintien de la chromatine dans une conformation ouverte au niveau des sites de transcription (Tippens, Vihervaara, et Lis, 2018).

Les ARNs issus des séquences SINES sont impliqués dans le recrutement de l'ARN POLII au niveau du complexe de pré-initiation (Allen et al., 2004 ; Espinoza et al., 2004).

Les lncRNAs semblent jouer un rôle dans le recrutement de complexe répressifs. *SATIII* et *TERRA* pourraient servir de plateforme de recrutement dans la mise en place et le maintien de l'hétérochromatine (Arnoult, Van Beneden, et Decottignies 2012 ; Tardat et Déjardin, 2018).

Enfin, les lncRNAs participent au contrôle de l'intégrité du génome. Suite à un stress, l'activation de la transcription des *SATIII* provoque des désordres au niveau des régions centromériques (situés à leur directe proximité), qui altèrent la structure du Kinétochore. Des instabilités chromosomiques ont été mises en évidence dans des cellules mitotiques ayant été préalablement stressées (Giordano et al. 2020).

L'ARN *TERRA* en association avec des protéines joue un rôle de protection des télomères, contre d'éventuelles cassures double brin, en évitant la fusion des télomères entre eux, ou en permettant la compaction des régions télomériques (Koskas et al., 2017).

Les séquences Alu ont une capacité à rétro-transposer, grâce à la transposase apportée par les séquences LINEs (Long Interspersed Nuclear Element). Une rétro-transposition de ces séquences pourrait affecter l'intégrité du génome des cellules stressées (Hagan, Sheffield, et Rudin 2003).

Au cours de notre projet, nous nous sommes plus particulièrement concentrés sur les lncARNs *SATIII* qui feront l'objet d'une description plus détaillée.

Activation transcriptionnelle des séquences SATIII, formation des nSBs

Dans cette partie nous aborderons plus particulièrement les séquences *SATIII* au cours de la HSR. La nature et la structure de ces séquences seront détaillées dans une autre partie.

Chez homme, un des effets les plus spectaculaires de la HSR est la formation de structures nucléaires, appelées nSBs (nuclear Stress Bodies) dans lesquelles HSF1 se relocalise massivement (Vourc'h et Biamonti 2011). Ces foyers de stress, visibles en immunofluorescence, apparaissent dans le noyaux des cellules dès les premières minutes du stress, et disparaissent progressivement de la cellule lorsque les cellules sont replacées dans des conditions physiologiques (Cotto et al., 1997 ; Sarge et al., 1993).

Les nSBs ne sont pas localisés sur les sites de transcription des principaux gènes cibles de la réponse codante d'HSF1, *HSP70* et *HSP90*, et leur nombre est corrélé à la ploïdie des cellules, suggérant l'existence de cibles chromosomiques spécifiques (Jolly et al., 1999). Ces petites structures (de l'ordre du μm) sont également enrichies en protéines liant l'ARN comme les protéines hnRNP (heterogeneous nuclear RiboNuclearProtein) et des protéines SR intervenant dans l'épissage, et dont le recrutement au sein des nSBs est fortement altéré en cas de traitement à la RNase (Metz et al., 2004).

Au début des années 2000, l'ensemble de ces observations laissaient pressentir que les nSBs correspondaient à des sites actifs de transcription (Jolly et al., 2004). L'utilisation de sondes spécifiques et de lignées hybrides Hamster/Humain a permis d'identifier les chromosomes contenant des sites de nucléation des nSBs (Jolly et al., 2002) (Denegri et al. 2002). La région d'hétérochromatine péricentrique 9q12, riche en séquence répétée de type *SATIII*, a été plus précisément identifiée, et l'utilisation de mutant d'HSF1 a confirmé la liaison directe d'HSF1 à cette région d'ADN via son domaine DBD et la nécessité de son domaine de trimérisation dans cette liaison (Jolly et al. 2002).

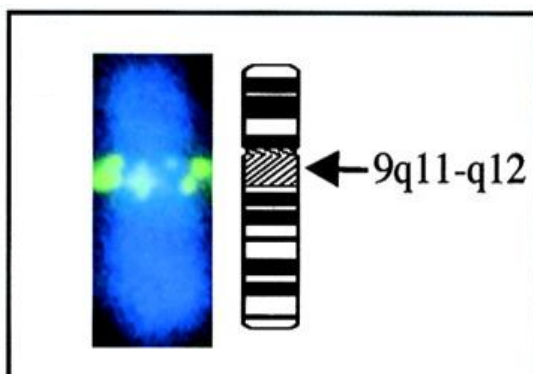


Figure 8 : Idéogramme du chromosome 9 montrant la liaison d'HSF1 à la région 9q12.

Dans des cellules humaines soumises à un stress, HSF1 (signaux verts) se relocalise au niveau de la région q12 du chromosome 9 métaphasique, (Jolly et al. 2002).

Très récemment notre équipe a découvert une nouvelle cible primaire d'HSF1 dans les cellules humaines mâles : la région q12 du chromosome Y (Penin et al., 2021). Cette étude sera résumée dans la partie E des résultats.

Suite à un stress, la relocalisation massive d'HSF1, facteur de transcription, sur ses cibles d'hétérochromatine *SATIII* a pour conséquence l'accumulation de transcrits non codants *SATIII* aux sites de transcription (Jolly, Metz, Govin, Vigneron, Turner, Khochbin, et Vourc'H 2004) (Rizzi et al., 2004) (Figure 9).



Figure 9 : Localisation nucléaires d'HSF1 (vert) et des transcrits *SATIII* (rouge) dans des cellules HeLa stressées (données non publiées).

Nous ne connaissons pas aujourd'hui la nature exacte du motif permettant la liaison du facteur HSF1 aux séquences *SATIII*. Néanmoins les séquences *SATIII* sont composées de répétitions du motif GGAAT commun à la séquence consensus HSE (nGAAn) (Vihervaara et al., 2017). Des approches de gel retard réalisées avec une sonde de 159 bp (Moyzis et al., 1988) contenant un fragment de séquence génomique spécifique de la région 9q12 montrent une interaction directe d'HSF1 avec les *SATIII* (Jolly et al., 2002). De plus, des expériences préliminaires en test luciférase promoteur CMV montrent que certains HSEs identifiés au niveau des séquences *SATIII* sont fonctionnels.

L'activation de la transcription de ces séquences, via le recrutement des acteurs connus de la transcription a été étudié, entre autres, par l'équipe il y quelques années (Jolly et al., 2004) (Col et al., 2017), mettant en évidence des mécanismes différents de ceux décrits pour les gènes activés par la réponse codante.

Comme nous l'avons vu précédemment, lors de la HSR, l'activation transcriptionnelle de la plupart des gènes codants sous le contrôle d'HSF1 réside dans la capacité d'HSF1 à recruter des facteurs permettant la levée de pause de l'ARN POLII qui est déjà engagée. Cette levée de pause met en jeu une augmentation de l'acétylation au niveau des corps des gènes et également au niveau des éléments de régulation de l'activation transcriptionnelle (TRES), incluant la classe produisant les eRNAs (Vihervaara et al., 2017).

L'effet antagoniste d'inhibiteurs tels que la Trichostatine A (TSA), un puissant inhibiteur des HDAC (déacétylases) de mammifères et de JQ1 qui inhibe la liaison des protéines à bromodomaines aux résidus acétylés, met en lumière les différences dans les processus d'activation de la transcription selon la nature de la cible d'HSF1 (*HSPs* ou *SATIII*) (Col et al. 2017).

En effet, alors que la TSA favorise la transcription du gène *HSP70* (Y. M. Zhao et al. 2006), la transcription des ARNs *SATIII* quant à elle est inhibée (Rizzi et al. 2004). De même, l'utilisation de JQ1 empêche la transcription par l'ARN POLII des *SATIII* mais pas celle de *HSP70* (Col et al., 2017).

Les séquences *SATIII* font partie d'une région d'hétérochromatine constitutive, caractérisée par un enrichissement de la marque répressive H3K9me3, et étant faiblement transcrite en absence de stress. De ce fait, la configuration du locus 9q12 en conditions physiologiques est en principe peu accessible à l'ARN POLII. Des approches d'imagerie (FISH et IF) et de biologie moléculaire (ChIP, IP, Northern Blot) nous ont permis de définir un modèle d'activation transcriptionnelle des *SATIII* (Figure 10). Lors de la HSR, après la fixation d'HSF1, des foyers d'histones acétylés apparaissent au locus 9q12, en même temps que la marque répressive H3K9me3 disparaît (Col et al., 2017). L'ARN Polymérase II est ensuite recrutée sur ce même locus (Jolly et al., 2004) dans un processus mettant en jeu HSF1, plusieurs Histones Acétyl Transférases parmi lesquelles les protéines Tip60 et Gcn5 et p300/CBP et les protéines à bromodomaine BET (Bromo and Extracellular Terminal domain). L'interaction du facteur HSF1 avec différentes HATs suggère qu'HSF1 aurait la capacité de les recruter au locus 9q12. L'acétylation du locus servant dans un second temps de plateforme au recrutement des protéines à bromodomaine, et de l'ARN POLII au locus (Col et al., 2017).

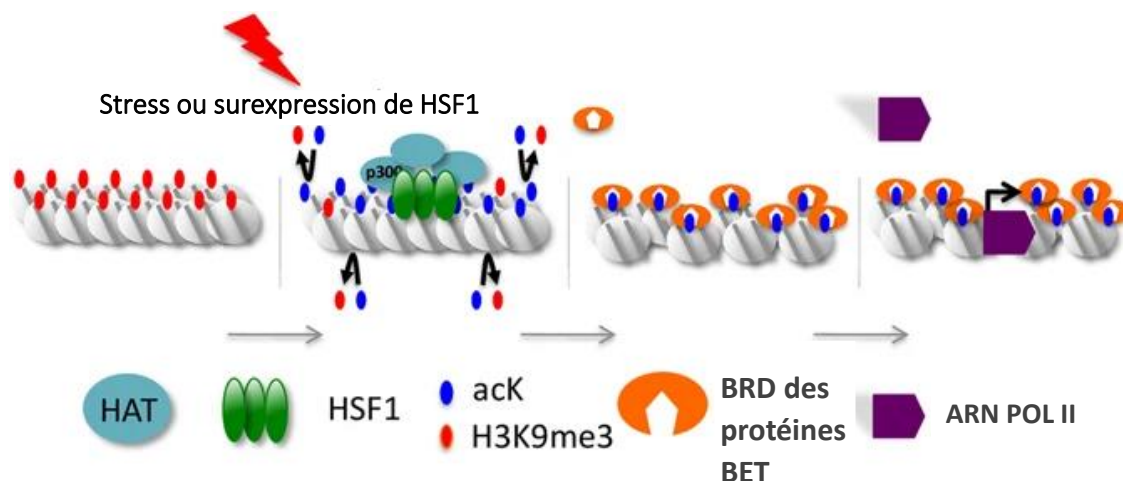


Figure 10 : Modèle de l'activation transcriptionnelle des séquences *SATIII* au nSBs (col et al., 2017). Le choc thermique induit un recrutement massif de plusieurs HATs aux séquences *SATIII* par leur interaction directe ou indirecte avec HSF1. Les résidus lysine acétylés des histones H3 et H4 servent alors de plateforme de recrutement pour les protéines à bromodomaine de la famille BET, ce qui déclenche un remodelage de la chromatine et le recrutement de l'ARN POLII.

Dans le contexte de la HSR, la fonction biologique des lncRNAs *SATIII* n'est pas encore clairement déterminée, mais plusieurs hypothèses ont été proposées.

Les foyers de stress et les ARNs *SATIII* pourraient séquestrer les facteurs de transcription et d'épissage, participant ainsi à l'inhibition globale de la transcription observée au cours de la réponse au stress (Vourc'h et Biamonti 2011).

Récemment, un rôle des *SATIII* dans l'épissage alternatif a été proposé, plus particulièrement dans la rétention d'introns (Hussong et al., 2017 ; Ninomiya et al., 2020). La rétention d'intron observée au cours de la HSR a pour conséquence l'apparition prématurée d'un codon stop entraînant la destruction de l'ARN ou la genèse de protéines tronquées affectées dans leur fonction. Par des approches RNA-seq, un groupe a mis en évidence le rôle de la protéine BRD4, dans le phénomène de rétention d'intron. Dans des cellules stressées n'exprimant pas BRD4, sont observées une augmentation de la rétention d'introns et une baisse du taux d'expression génique de manière concomitante. La relocalisation de BRD4 au nSBs suggère que l'accumulation des transcrits *SATIII* sert de plateforme de recrutement à la machinerie d'épissage dans le but de la garder fonctionnelle aux gènes utiles à la HSR (Hussong et al., 2017).

Plus récemment, une analyse transcriptomique dans des cellules humaines a également révélé l'importance des nSBs, dans la rétention d'introns. La déplétion des cellules en ARNs

SATIII, et de ce fait en nSBs, favorise l'épissage de plus de 500 introns, plus particulièrement pendant la période de récupération au stress (Ninomiya et al., 2020).

Pour investiguer les mécanismes d'actions mis en jeu, Ninomiya et al, ont déterminé l'interactome des ARNs *SATIII* par ChIRP-MS (Chromatin Isolation by RNA Purification, followed by Mass Spectrometry). Cette analyse, effectuée 1 heure après stress, a permis d'identifier un set de 141 partenaires protéiques des lncRNAs *SATIII* dont la plupart sont des facteurs impliqués dans l'épissage des pré-ARNm, la maturation en 3' et l'export des ARNm. Parmi les facteurs les plus enrichis, on trouve des facteurs d'épissage SR/SRSF comme SRF9, dont l'activité est régulée par déphosphorylation lors du stress thermique, et également CLK1 (CDC2-Like Kinase 1) la principale kinase connue pour interagir avec les protéines SR/SRFs.

Lors du stress, les protéines de la machinerie d'épissage SR/SRFs, sont déphosphorylées et recrutées au nSBs via les *SATIII*. Cette relocalisation massive ralentit globalement l'épissage des ARNm dans la cellule. De manière particulière, l'épissage de l'ARNm de CLK1 se trouve modifié par rapport aux conditions physiologiques, générant ainsi une protéine kinase CLK1 active. En récupération post-stress, CLK1 sous sa forme active est à son tour recrutée au nSBs, et participe à la rephosphorylation des protéines SR/SRF dans les nSBs. Cette régulation des protéines SR/SRFs, principalement SRSF9, induit la rétention d'environ 500 introns pendant la période de récupération. D'après ce modèle, les nSBs serviraient donc de plateforme de recrutement de facteurs d'épissage, au cours du stress et aussi en période de récupération, démontrant leur importance dans la vaste reprogrammation de l'expression génique de la HSR.

Un autre rôle envisagé est que les lncARNs *SATIII* pourraient être impliqués dans le maintien de la structure chromatinienne en période de stress (Vourc'h et Biamonti, 2011). Comme pour l'adressage des protéines d'épissage au nSBs, les lncRNAs *SATIII* serviraient de plateforme de recrutement pour des protéines impliquées dans la reformation de l'Hétérochromatine, telles que la protéine HP1 (Vourc'h et Biamonti, 2011).

I-B- L'Hétérochromatine péricentrique : cible génomique non codante d'HSF1, site de nucléation des nSBs.

I-B-1 Structure chromatinienne ou la relation structure/fonction de la chromatine

La double hélice d'ADN, support universel de l'information génétique héréditaire, est constituée d'une succession de quatre nucléotides (ou bases), appariées par paires, dont l'ordre d'enchaînement définit le code génétique unique d'un individu.

Chez l'homme, le génome de $6 \cdot 10^9$ paires de bases, soit un polymère d'ADN d'environ 2 mètres, est compacté, dans chaque cellule, dans un noyau de 10 μm de diamètre (Bloomfield 1996). Cet emballage très structuré possède un certain niveau de plasticité qui permet à certaines parties du génome de rester accessibles à la transcription. La compaction de la molécule d'ADN implique en premier lieu son association à des protéines histones pour former un complexe nucléoprotéique hautement dynamique appelée chromatine (Olins et Olins, 2003).

I-B-1-1-Caractéristiques générales

Le nucléofilament, premier niveau d'organisation de la chromatine

Le nucléofilament est composé d'ADN et de petites protéines basiques (d'environ 10 KDa) très conservées appelées histones. L'unité fondamentale structurale de la chromatine, le nucléosome a été identifié il y a cinquante d'années par microscopie électronique, puis très finement caractérisé par cristallographie et rayon X (Luger 1997; Richmond et Davey 2003). Le nucléosome est une structure nucléoprotéique constituée d'un octamère, soit deux tétramères d'histones (H3, H4, H2A, H2B), ou « core particule » autour duquel viennent s'enrouler 146 paires de bases d'ADN.

Les protéines histones sont constituées d'un domaine globulaire très structuré nommé « histone fold » impliqué dans les liaisons histone-histone et histone-ADN au sein du nucléosome, et d'un domaine N-terminal non structuré « histone tail » s'échappant du nucléosome, offrant ainsi 15 à 38 acides aminés davantage accessibles à des modifications post traductionnelles (Khorasanizadeh, 2004).

La répétition régulière des nucléosomes le long du nucléofilament forme une structure primaire de 11 nm de diamètre de la chromatine aussi appelée « collier de perle ».

Le fragment d'ADN -dit « linker » - reliant deux structures octamériques entre-elles est d'une longueur variable, selon l'espèce ou le type cellulaire, et on y trouve une protéine histone de type H1. Cette histone H1 stabilise la double hélice autour de l'octamère d'histone et permet l'association de deux nucléosomes successifs, formant une structure plus compacte appelée chromatosome.

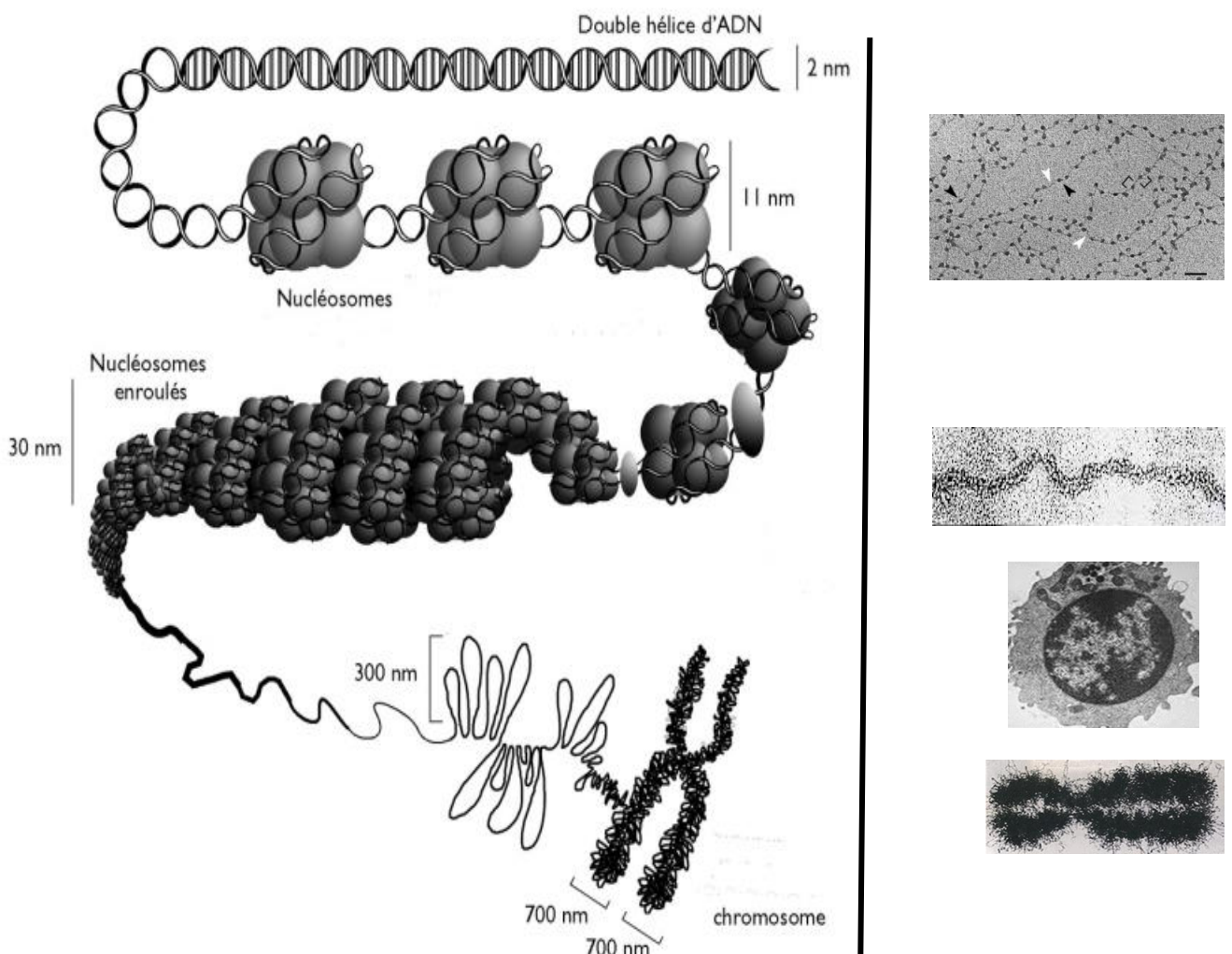


Figure 11 : Représentation des niveaux de compaction de la chromatine de la double hélice d'ADN jusqu'au chromosome.

A droite : visualisation des différents niveaux d'organisation par microscopie électronique.

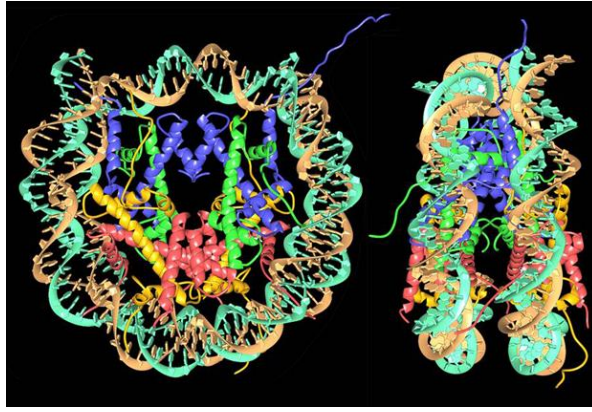


Figure 12 : Représentation cristallographique d'un nucléosome (d'après Luger, 1997).

La fibre chromatinienne : deuxième niveau d'organisation de la chromatine.

La chromatine adopte un niveau de compaction supérieur grâce à l'enroulement du nucléofilament de 11 nm en une structure de 30 nm de diamètre appelée fibre chromatinienne. Il existe plusieurs modèles d'organisation de cette fibre déterminés *in vitro*, dont les deux principaux sont : la structure en solénoïde ou hélice, basée sur l'interaction de deux nucléosomes successifs ou la structure en zig-zag avec deux points de départ, basée sur l'interaction entre deux nucléosomes espacés d'un nucléosome (Figure 13), (Luger, Dechassa, et Tremethick 2012 ; Robinson et Rhodes 2006).

Récemment la structure cristallographique de l'histone H1 complexée à un réseau de 6 nucléosomes a mis en évidence la dynamique d'une structure en échelle avec deux points de départ, sans torsion, qui en fonction des conditions ioniques, évoluerait en une structure torsadée plus compacte de 30nm de diamètre (Figure 13), (Garcia-Saez et al., 2018), Les deux structures pourraient co-exister et correspondre à différents états fonctionnels de la chromatine.

Troisième niveau d'enroulement de la chromatine et ultime compaction.

Après plusieurs repliements successifs, la fibre chromatinienne forme des boucles de 300nm, appelées structures d'ordre supérieur, jusqu'à atteindre son degré de compaction maximal, le chromosome mitotique. Chacune des chromatides sœurs du chromosome forme une fibre estimée à 700 nm. Les mécanismes de compaction de la fibre chromatinienne en chromosome restent à ce jour très mal compris (Belmont, 2002).

Dans le noyau de la cellule interphasique, les formes plus ou moins compactées de la chromatine, sont appelées respectivement hétérochromatine et euchromatine. Ces deux états chromatiniens co-existent dans la cellule (Figure 14), et sont soumis à régulation.

L'hétérochromatine est située préférentiellement à la périphérie du noyau, et est considérée comme répressive à la transcription, alors que l'euchromatine, moins compacte et riche en gènes actifs est accessible la machinerie transcriptionnelle.

Pour que la cellule puisse survivre, s'adapter à son environnement ou répondre à différents stimuli, il est indispensable que certaines régions de l'ADN, sur une échelle de temps bien définie, restent accessibles, ou au contraire inaccessibles aux facteurs de remodelage, de transcription, ou aux ARN polymérase. Grâce à un remodelage spatio-temporel finement adapté, la cellule peut procéder à la mise en place d'évènements tels que la transcription, l'épissage, la recombinaison, la réparation, ou la division. De ce fait, le contrôle de la dynamique de compaction/décompaction de la chromatine est un élément à part entière dans la régulation des fonctions cellulaires.

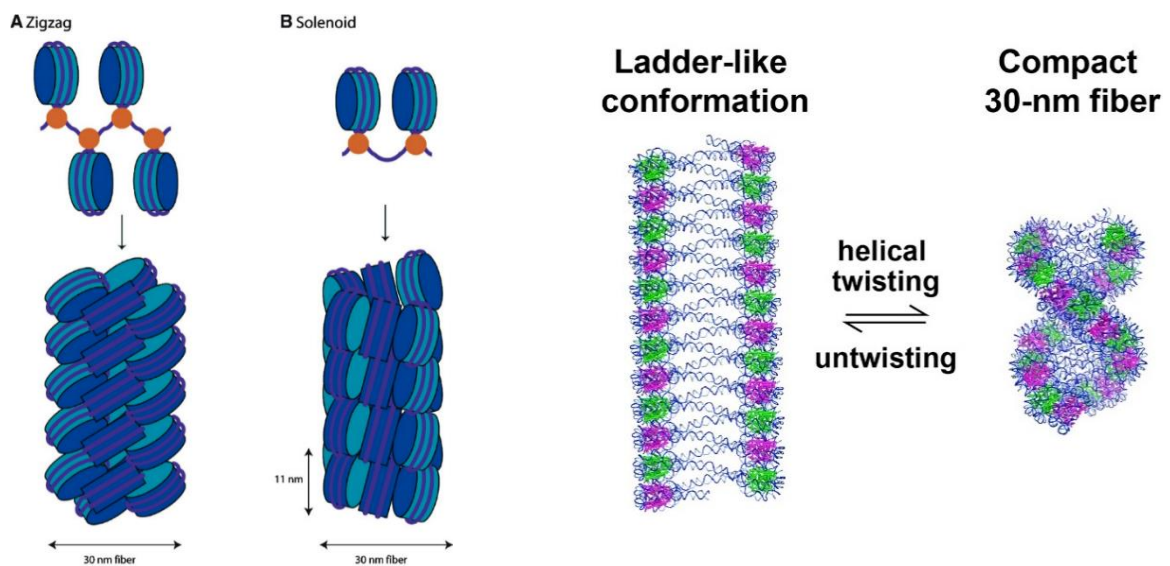


Figure 13 : Représentation de la fibre chromatinienne

A gauche : conformations en zig-zag (A) et solénoïde (B) de la fibre chromatinienne, (d'après Khorasanizadeh, 2004) En bleu les nucléosomes, en violet la double hélice d'ADN et en jaune histone linker H1.

A droite : changement de conformation entre une structure sans torsion et une structure torsadée compacte de 30 nm de diamètre, (d'après Garcia-Saez et al., 2018).

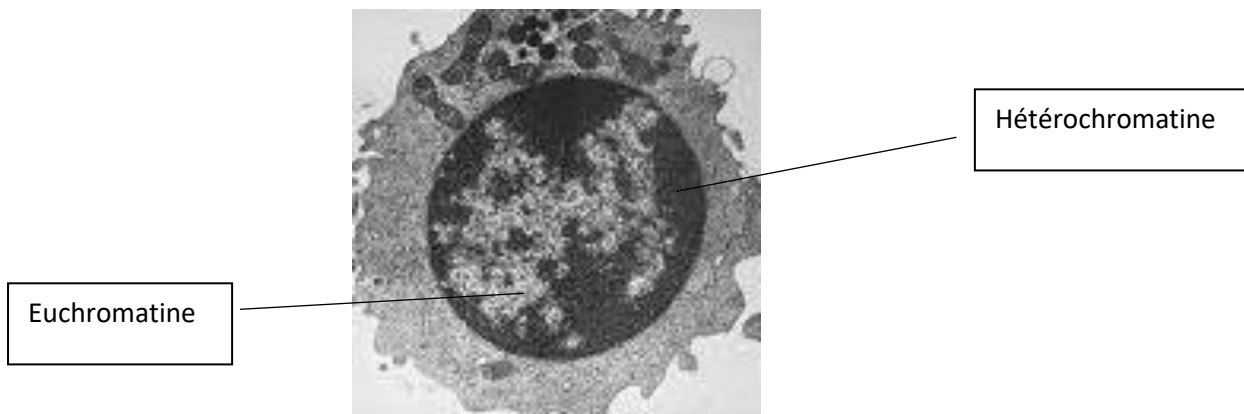


Figure 14 : Visualisation du noyau interphasique par microscopie électronique. Les régions les plus compactes apparaissent en plus foncé.

I-B-1-2-Régulation de la chromatine : mécanismes épigénétiques et dynamique de la chromatine

Il existe de nombreux mécanismes impliqués dans le contrôle de l'état chromatinien. Dans cette partie seront brièvement décrites les principales modifications de l'ADN et des protéines histones menant à la régulation transcriptionnelle.

Modification chimique de l'ADN : la méthylation

La méthylation de l'ADN est généralement associée à la répression de la transcription. Elle agit par encombrement stérique du grand sillon de l'hélice d'ADN et inhibe le recrutement des facteurs de transcription (Watt et Molloy 1988). Les enzymes catalysant cette méthylation sont appelées DNMT (DNA Methyl Transferase), et sont également impliquées dans son maintien. Les protéines TET (Ten-Eleven Transposases) permettent à l'inverse la déméthylation de l'ADN (Williams, Christensen, et Helin 2012).

Chez les vertébrés, la méthylation de l'ADN a lieu principalement sur le carbone 5 des cytosines (C) qui précède une guanine (G) et la cytosine méthylée est désignée par 5-méthylcytosine (5mC). Les îlots CpG ne sont pas distribués aléatoirement le long du génome, mais sont concentrés au niveau des régions promotrices de 60% des gènes humains (Antequera et Bird 1993). On retrouve également de l'ADN méthylé au niveau des séquences répétées du génome qui correspondent à des régions condensées et très peu actives transcriptionnellement.

La méthylation de l'ADN est notamment impliquée dans la régulation de gènes associés à la pluripotence, à la différenciation, et au contrôle de gènes soumis à l'empreinte parentale (Mohn et al., 2008).

Une méthylation anormale de 5-10% de promoteurs normalement non méthylés, a été décrite dans de nombreux cancers, affectant ainsi l'expression des ARNm, mais aussi de nombreux ARNs non codants, et faisant des DNMT une cible thérapeutique. Des inhibiteurs de DNMT (par exemple la 5-azacytidine), sont actuellement utilisés en clinique dans les traitements de certains cancers (Dawson et Kouzarides 2012).

Modifications post traductionnelles des histones

Les protéines histones sont ciblées par de nombreuses et diverses PTMs (Post-Traductionnal Modifications) telles que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination ou la sumoylation, préférentiellement au niveau des résidus de leur partie N-terminale, qui est plus accessible (Figure 15).

D'autres PTMs moins fréquentes ont également été identifiées comme l'ADP-ribosylation, l'isomérisation de la proline, la citrullination, la butyrylation, la propionylation, la glycosylation et la crotonylation (Tan et al., 2011).

Toutes les PTMs sont réversibles. En fonction de la modification, du résidu et de l'isoforme d'histone concerné, les PTMs des histones peuvent soit activer, soit réprimer l'activité des gènes (pour revue Miozzo, Sabéran-Djoneidi, et Mezger 2015).

Les résidus modifiés créent des sites de recrutement pour des domaines protéiques, et certaines modifications entraînent un changement de charge altérant de ce fait la force de l'interaction ADN-Histone (Bannister et Kouzarides 2011).

Les principales modifications d'histones associées à la transcription sont l'acétylation et la méthylation, qui marquent la chromatine transcriptionnellement active et répressive respectivement. En étudiant diverses modifications des histones dans plusieurs tissus, différents états de la chromatine, notamment inactifs, bimodaux et actifs, ont été identifiés. Les états bimodaux, dans lesquels une combinaison de marques actives et répressives est présente dans la chromatine d'une région promotrice d'un gène, facilitent les changements rapides d'expression des gènes. On les trouve au début du développement, lorsque la différenciation et la spécification se produisent (pour revue, Inbar-Feigenberg et al. 2013).

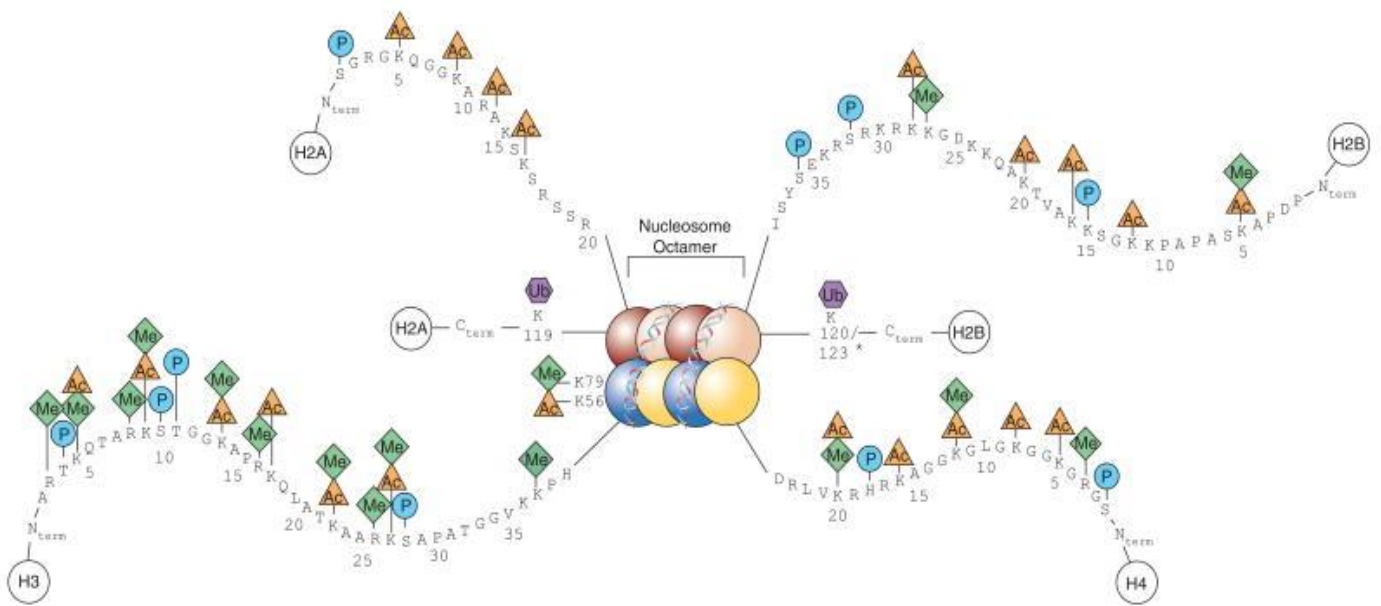


Figure 15 : Cartographie des principales modifications post-traductionnelle des histones de coeur (d'après Keppler et al., 2008 *Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets - Part 1*)
 L'octamère d'histone peut être méthylé (vert), acétylé (orange), phosphorylé (bleu) ou ubiquitylé (vert).

L'acétylation des résidus lysine de l'octamère d'histone, est généralement associée à l'activation de la transcription. Elle est catalysée par les HAT (Histone Acetyl Transferase) et inversement, la désacétylation des protéines histones par les HDACs (Histone DeAcetylase). La lysine est en effet un résidu chargé positivement, et son acétylation neutralise cette charge ce qui affaiblit la liaison entre les histones et les charges négatives des phosphates de l'ADN, et en conséquence décompacte la chromatine.

De plus, la présence de résidus acétylés sur des résidus lysine spécifiques des histones sert au recrutement de protéines à bromodomaine présentes dans les complexes de remodelage de la chromatine, associés à des régulateurs transcriptionnels, ou aux HATs elles-mêmes (par exemple P300 ou Gcn5) (Filippakopoulos, Picaud, Fedorov, et al., 2012). La protéine TAF1 (TBP-associated factor 1), une sous-unité du complexe TFIID, qui intervient dans l'assemblage de la machinerie de transcription de l'ARN POLII, possède également un bromodomaine, permettant d'associer acétylation de la chromatine et initiation de la transcription (Jacobson et al., 2000).

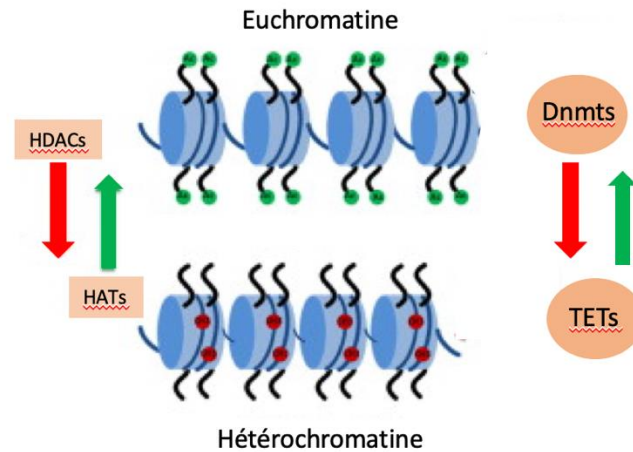


Figure 16 : Méthylation de l'ADN et acétylation des histones sont associées à la capacité transcriptionnelle de la chromatine.

La méthylation de l'ADN est sous le contrôle des DNA méthyl Transférases (Dnmts) et de déméthylases TETs. Le niveau d'acétylation des histones est sous le contrôle d'histones acétyltransférases (HAT) et d'histones désacétylases (HDACs). L'acétylation des protéines d'histone est associée à l'euchromatine (état relaxé de la chromatine) et à une transcription active. A l'inverse, l'hétérochromatine, désacétylée, est enrichie en ADN méthylé (D'après Inbar-Feigenberg et al., 2013).

Alors que l'acétylation des histones est associée à l'activation de la transcription, la méthylation des queues d'histones est plus ambivalente, elle peut favoriser ou réprimer la transcription en fonction du résidu modifié et du nombre de groupes méthyl (pour revue Miozzo, Sabéran-Djoneidi, et Mezger 2015).

Les histones sont méthylées par des méthyltransférases (HMTs) et inversement la déméthylation est catalysée par des histone déméthylases (HDMs). La méthylation des histones ne modifie pas la charge des résidus. Les groupements méthyl servent de plateforme au recrutement de protéines contenant un chromodomaine, et éventuellement empêchent le dépôt d'une autre marque. En général, la méthylation de l'histone H3 au niveau des résidus lysine 9 ou 27 (H3K9 ou H3K27) ou de l'histone H4 au niveau de la lysine 20 (H4K20) est associée à la mise sous silence des gènes. En revanche, les méthylations de H3K4, H3K36 et H3K79 sont généralement corrélées à l'activation des gènes. Cependant, il existe des exceptions pour presque tous ces cas, rendant incertaine la prédiction de l'issue transcriptionnelle à partir d'une seule PTM sans tenir compte de l'ensemble du contexte chromatinien local (pour revue Miozzo et al., 2015).

Des tests de liaison *in vitro* de protéines à bromodomaine, sur des puces de peptides d'histones modifiés par différentes PTMs, ont mis en évidence l'importance des combinaisons

de modifications, plutôt que la reconnaissance d'une seule marque (Filippakopoulos et al., 2012).

Les enzymes qui catalysent la mise en place des PTM histones sont appelées "writers" celles qui les suppriment "erasers", et celles qui les reconnaissent spécifiquement les "readers". De nombreux types de domaines assurent la liaison de ces protéines « reader » aux résidus marqués des histones, notamment les homéodomains végétaux (PHD), le domaine TUDOR, le chromodomaine et le bromodomaine (pour revue, Taverna et al., 2007). Des modifications distinctes des histones peuvent favoriser des interactions synergiques ou antagonistes avec les protéines associées à la chromatine. Cette interdépendance a donné naissance au concept de "code histone", dans lequel les modifications des histones sont interprétées comme un code combinatoire régulant les taux de transcription des gènes à des loci spécifiques du génome (pour revue Jenuwein et Allis 2001).

Les complexes de remodelage de la chromatine et les variants d'histones

Pour accomplir les différents processus cellulaires indispensables, tels que sont la transcription, la réplication ou encore la réparation de l'ADN, il est essentiel que l'accès à la chromatine soit modulé.

Les complexes de remodelage de la chromatine, régulent l'accessibilité de l'ADN en entraînant le désassemblage complet ou partiel des nucléosomes, le réassemblage des nucléosomes ou le déplacement des octamères d'histones le long de l'ADN.

Parmi les complexes multi-protéiques les plus étudiés, le complexe SWI/SNF (SWitch/Sucrose Non-Fermentable), le complexe NURF (NUcléosome Remodelling Factor), et BAF (BRG1 Associated Complexe) utilisent des mécanismes ATP-dépendants pour modifier la structure et la localisation des nucléosomes (pour revue, Allis et Jenuwein 2016). Ces complexes de remodelage peuvent également agir de concert avec certaines protéines, les « histones chaperons », pour procéder à l'échange des histones H2A, H2B, H3 et H4, qui sont les histones dits « canoniques » avec des « variants » de ces histones (Pour revue, Polo et Almouzni 2006). Certains chaperons interagissent spécifiquement avec des couples contenant des variants d'histones. C'est notamment le cas de la chaperon CAF-1 qui interagit avec H3.1 (un variant de H3) au niveau des sites de réplication (pour revue, Polo et Almouzni, 2006).

Un autre exemple est le variant d'histone CenpA qui remplace l'histone H3 au niveau des centromères des chromosomes et joue un rôle essentiel dans l'assemblage du kinétochore au

cours de la mitose. Le variant d'histone H3.3 qui diffère de l'histone canonique H3 seulement par 5 acides aminés, est chaperonné par HIRA, une protéine qui lui est spécifique. HIRA favorise l'incorporation de H3.3 au niveau des régions transcriptionnellement actives (pour revue (Polo et Almouzni, 2006).

L'un des variants d'histones le plus étudié est sans doute H2A.X dont la forme phosphorylée sur la sérine 139 (γ -H2A.X) est trouvée spécifiquement aux sites de cassures double-brin de l'ADN et permet la reconnaissance et la réparation de ces dommages (pour revue : Sarma et Reinberg 2005). H2A.Z quant à lui est un variant enrichi aux sites d'initiation de la transcription déplétés en marques répressives 5mC, il est donc associé à une activation transcriptionnelle. A l'inverse, macroH2A, une isoforme longue de H2A est enrichie sur le chromosome X inactif (Pour revue Allis et Jenuwein 2016).

La composante ARN

Une grande variété d'ARNs non codants a été impliquée dans la régulation de l'organisation de la chromatine et de l'expression des gènes. Il s'agit notamment des miRNAs (microARNs), des piRNAs (ARNs interagissant avec Piwi), des siRNAs (petits ARNs interférents) et des lncRNAs (pour revue Gomes, Nolasco et Soares, 2013).

Les ARNs non codants emploient plusieurs modes d'action pour médier les changements épigénétiques, notamment en recrutant des complexes de remodelage de la chromatine et en fonctionnant comme co-activateurs ou co-répresseurs de la transcription (Pour revue, Gomes, Nolasco, et Soares 2013).

Les petits ARNs simple brin, générés par DICER et les protéines AGO, à partir de la transcription par une ARN polymérase ARN-dépendante (RDRP) servent de guide la mise en place de la TGS (Transcriptional Gene Silencing), en partie en adressant des protéines de complexes répresseurs à l'hétérochromatine (pour revue Verdel 2009) .

Les **miARN** (18-24 nucléotides de longueur) sont générés à partir d'un ARN précurseur clivé par deux enzymes DROSHA et DICER pour produire des miARN matures. Une fois matures les miARN peuvent contrôler l'expression des gènes en ciblant des ARNm spécifiques pour les dégrader et/ou réprimer leur traduction. Ils peuvent également contrôler l'expression des gènes en recrutant des complexes de remodelage de la chromatine à l'ADN, modifiant ainsi la conformation de la chromatine.

Les **piRNAs** (entre 24 et 34 nucléotides), associés aux protéines du complexe PIWI s'appairent sur des ARNs cibles et induisent leur dégradation. Les cibles des piRNA sont principalement des éléments transposables qui sont maintenus dans un état de forte répression (pour revue Gomes, Nolasco, et Soares 2013).

Les petits ARN interférent (**siRNAs**), appartiennent à une classe de molécules d'ARN double brin au départ non codantes, d'une longueur typique de 20-24 (normalement 21) paires. Ces ARNs sont impliqués dans le contrôle post-transcriptionnel de l'expression des gènes par dégradation des ARNs (pour revues Gomes, Nolasco, et Soares 2013 ; Carthew et Sontheimer 2009).

Les Long ARNs noncodants (**LncRNAs**) sont une classe hétérogène de molécules d'ARN qui sont transcrites entre autres, par l'ARN polymérase II (POLII), et qui possèdent une longueur comprise entre 50 bases et 2Kb (pour revue, Rocha et Heard, 2017).

Certains peuvent présenter une expression cellule ou tissu spécifique en conditions physiologiques ou physiopathologiques, et réguler de nombreux processus cellulaires y compris le cycle cellulaire, la prolifération, l'apoptose et la réponse aux dommages de l'ADN (DDR) ; la dérégulation de toutes ces voies est souvent associée au cancer.

Les lncRNAs influencent ces processus cellulaires en intervenant dans la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des gènes, l'organisation de la chromatine, la signalisation cellulaire et la régulation post-traductionnelle de l'activité des protéines (Yao, Wang, et Chen 2019). Par exemple, il a été démontré que certains lncRNAs, comme Xist, guident des complexes de remodelage de la chromatine vers des loci génomiques spécifiques, participant ainsi à l'établissement de statuts épigénétiques cellule-spécifiques au cours de développement (Pour revue de Rocha et Heard 2017).

I-B-1-3-Organisation tridimensionnelle du noyau ou la relation structure/fonction de la chromatine

La structure tridimensionnelle de la chromatine au sein du noyau interphasique a été très étudiée ces dernières années, et les progrès techniques de biologie moléculaire et de microscopie haute résolution ont permis une meilleure définition de l'organisation spatio-temporelle de la chromatine, notamment dans le noyau de cellule unique. Cette organisation très hiérarchisée, est en lien avec la capacité de l'expression génique (Bickmore et van Steensel, 2013 ; Elimelech et Birnbaum, 2020).

Les territoires chromosomiques et les compartiments chromatinien

L'idée d'une distribution non-aléatoire des chromosomes au sein du noyau a émergé dans les années 80, et a été mise en évidence par des approches basées sur les processus cellulaires de réparation de l'ADN. Après avoir été irradiées par un micro-laser, les régions altérées du noyau interphasique ont été visualisées par incorporation de nucléotides radioactifs. La détection du signal radioactif, correspondant aux régions lésées et réparées, dans les chromosomes au stade métaphasique indique que les régions marquées appartiennent seulement à quelques chromosomes, plutôt qu'à un ensemble aléatoire, signifiant qu'en interphase, chacun des chromosomes occupe un espace bien déterminé (Zorn et al., 1979).

Plus tard, des approches basées sur des techniques de FISH en multiplex et super résolution, permettant de visualiser simultanément des chromosomes entiers dans le noyau de cellules humaines en interphase, ont permis de cartographier en trois dimensions l'ensemble des chromosomes (Cremer et Cremer, 2010 ; Bolzer et al., 2005), et ainsi, à affirmer la notion de territoires chromosomiques.

Les frontières entre les différents territoires chromosomiques sont encore mal définies, mais le développement des techniques de type capture de conformation des chromosomes (3C, 4C, 5C et Hi-C) ayant une résolution de plusieurs mégabases, ont démontré l'existence d'associations entre des régions inter ou intra chromosomiques partageant les mêmes caractéristiques transcriptionnelles. Ces techniques basées sur l'identification de régions proches dans l'espace, ont mis en évidence deux compartiments chromatinien distincts, nommés A et B (Lieberman-Aiden et al., 2009).

La chromatine de type A (active), ou encore euchromatine demeure accessible à la transcription, riche en gènes actifs ou capables d'activation, et en marques épigénétiques activatrices. La chromatine B, ou hétérochromatine, moins permissive à la transcription, contient peu de gènes voire des gènes très peu exprimés, et est associée à des marques épigénétiques répressives.

Des approches de DamID (IDentification par ADN adénosine methyltransferase), permettant l'identification des interactions ADN-protéines, ont également mis en évidence l'association de larges régions d'hétérochromatine de 100 kb à 10 Mb à des structures fixes du noyau comme la lamina (Guelen et al., 2008) ou les nucléoles (van Koningsbruggen et al., 2010).

Ces sous domaines de l'hétérochromatine, riches en marque répressive de type H3K9me3, sont appelés LADs (Lamina Associated Domain), ou NADs (Nucleolus Associated Domain) et constituent des zones au sein desquelles l'environnement est répressif pour la transcription.

La lamina est un complexe protéique constitué des protéines lamines de type A/C et B, située en bordure de la membrane nucléaire. La polymérisation des lamines forme des filaments qui ont un rôle de maillage dans la structure du noyau. Par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation, la lamina possède la capacité de se désassembler en début de mitose et de se reformer en fin de mitose (Snider et Omary 2014).

Le nucléole a comme fonction principale la biogénèse des sous-unités ribosomiques, sa composition est moins bien définie et, comme la lamina, sa structure est hautement dynamique au cours du cycle cellulaire (Hernandez-Verdun 2011).

Chez l'homme des séquences d'ADN appartenant à un grand nombre de chromosomes ont été identifiées comme associées au nucléole purifié, c'est le cas par exemple des séquences satellites, (Németh et al., 2010). Grâce à des observations microscopiques, il est apparu que certaines régions d'hétérochromatine initialement associées au nucléole dans une cellule mère étaient redistribuées à la membrane nucléaire dans les cellules filles. Cette réorganisation des régions d'hétérochromatine en LADs et NADs (Thomson et al., 2004 ; van Koningsbruggen et al., 2010), signifie la mise en place de novo de l'Hétérochromatine au sein de ces domaines qui sont considérées comme des plateformes organisatrices du génome.

Les TADs (Domaines Topologiquement Associés)

Grâce à la technique Hi-C, qui permet l'identification à l'échelle du génome des régions en contact physique dans l'espace nucléaire, des domaines capables d'interactions entre eux ont pu être caractérisés (Dixon et al., 2012). Ces domaines sont appelés TAD pour Domaine Topologiquement Associé, et les interactions de l'ADN se font préférentiellement au sein d'un même TADs, plutôt qu'entre deux TADs distincts. La fonction des TADs est de favoriser le rapprochement spatial de deux régions distantes linéairement l'une de l'autre mais appartenant au même TAD, par exemple, elle permet l'interaction entre un promoteur et un enhancer. La formation des TADs a été décrite récemment dans la littérature et met en jeu l'interaction de deux protéines principales, la cohésine et le facteur CTCF (CCCTC Binding Factor) (Dixon et al., 2012), ainsi que des séquences génomiques reconnues par CTCF, nécessaires à la délimitation entre deux TADs adjacents. L'organisation en TADs est conservée chez les mammifères, mais l'organisation de chaque TAD peut être modulée dans le temps, au cours du développement ou du cycle cellulaire par exemple, et peut être différente d'une cellule à l'autre (Krietenstein et al., 2020).

Les compartiments nucléaires

Il existe dans le noyau plusieurs sites d'ancrage des régions génomiques, définis comme des structures sans membrane, permettant la mise en place de microenvironnement favorisant la concentration locale de facteurs ou substrats. Ces compartiments optimisent l'adaptation de la cellule en réponse à un stimuli, et l'absence de membrane facilite le regroupement des facteurs associés à ces compartiments (Spector 2006). Les plus connus sont le nucléole, les corps cajal, les speckles, les paraspeckles et les nSBS.

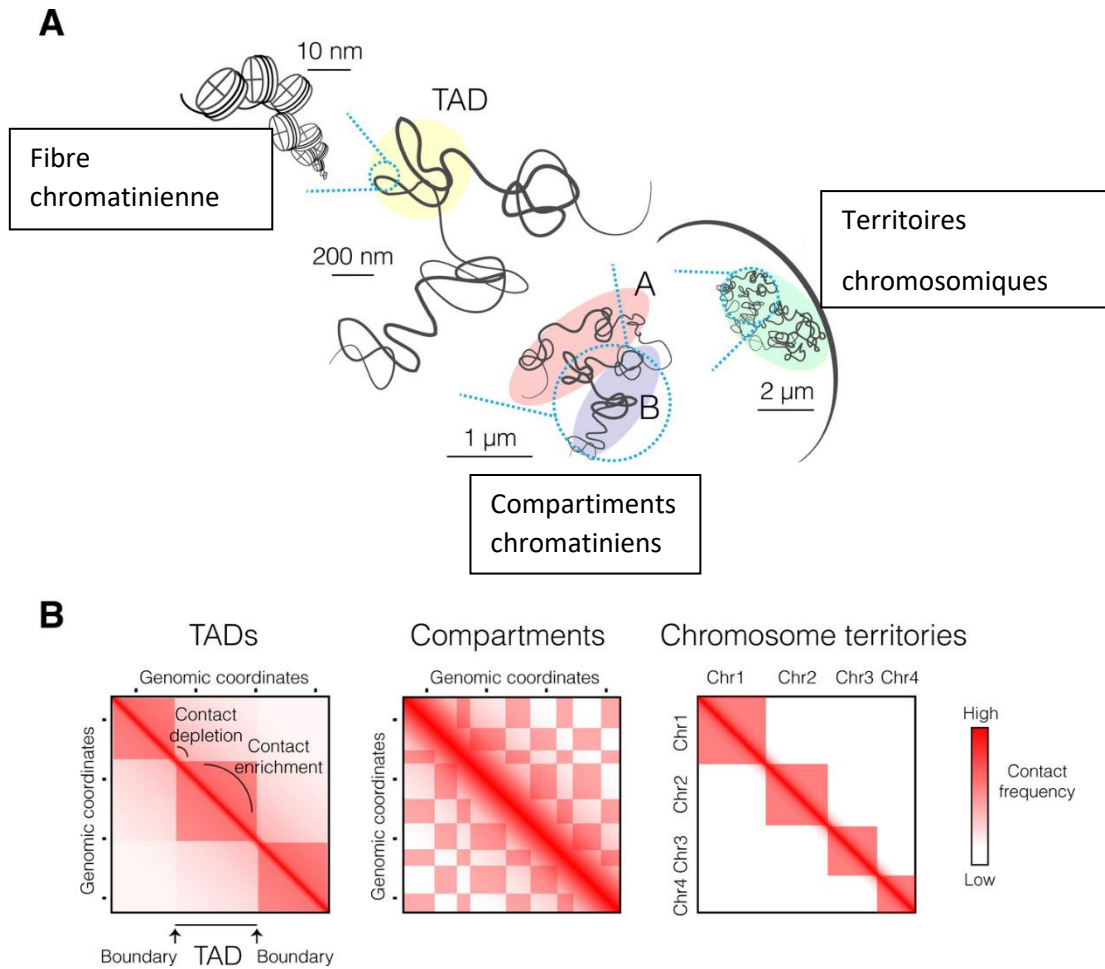


Figure 17 : Organisation spatiale de la chromatine (d'après Szabo, Bantignies, et Cavalli 2019)

A-vision schématique des différents niveaux d'organisation des chromosomes, de la fibre chromatinienne aux territoires chromosomiques.

B- Représentation de la cartographie obtenue par Hi-C à différentes échelles génomiques.

Les coordonnées génomiques sont indiquées sur les deux axes, et la fréquence de contact entre les régions est représentée par un code couleur.

I-B-2-L'hétérochromatine

I-B-2-1-L'hétérochromatine-Caractéristiques générales :

Comme nous l'avons vu, le génome des eucaryotes est organisé en domaines plus ou moins compactés dans le noyau des cellules. Les régions les plus compactées forment l'Hétérochromatine, sont pauvres en gènes et sont généralement peu permissives à la transcription, car moins accessibles aux facteurs et machineries transcriptionnels. L'hétérochromatine est composée de deux grands états chromatinien, l'hétérochromatine facultative et l'hétérochromatine constitutive qui diffèrent par leur signature épigénétique et leurs fonctions, et dont la régulation met en jeu des ncARNs.

Hétérochromatine facultative

L'hétérochromatine facultative est mise en place au cours du développement, et sa fonction principale est la répression génique au cours de la différenciation cellulaire, comme par exemple l'inactivation du X chez les mammifères. Sa marque caractéristique est la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27Me3).

Le modèle de la différenciation des cellules ES murines

Ce modèle met en évidence le rôle des complexes PRC1 et PRC2 (Complexe Répresseur Polycomb) dans la répression de la transcription des gènes de l'hétérochromatine facultative, au cours du développement. Les protéines du complexe répressif Polycomb, initialement découvert chez la drosophile, jouent un rôle dans la régulation des gènes impliqués dans le développement embryonnaire (Orlando 2003).

Les sous-unités du complexe PRC2 sont impliquée dans la triméthylation de l'histone 3 sur sa lysine 27 (H3K27me3) et participent aux mécanismes d'inactivation du X (pour revue Gomes, Nolasco et Soares, 2013). L'inactivation du chromosome X (XCI) est l'exemple classique de régulation impliquant les lncRNAs. Pour compenser l'effet de deux chromosome X présents chez la femelle, un des deux chromosomes doit être inactivé (pour revue Gomes, Nolasco, et Soares 2013). Chez la souris, le processus d'inactivation du X implique deux lncRNAs, dont l'ARN Xist et son répresseur antisens, Tsix. Sur le chromosome X qui reste actif, l'expression de Tsix bloque l'expression de Xist et empêche le recrutement des facteurs de mise sous

silence en *cis*. Sur le chromosome X inactif Tsix est inhibé, permettant la transactivation de Xist et sa propagation le long du chromosome. Le lncRNA "Xist" sert alors de plateforme de recrutement au complexe répressif Polycomb 2 (PRC2), entre autres, et permet son adressage sur le chromosome, ce qui conduit à son inactivation (J. Zhao et al., 2008).

Récemment il a été montré que Xist interagissait directement avec le récepteur de la Lamin B, un composant intégral de la lamina nucléaire. Le recrutement du chromosome X vers ce compartiment facilite la propagation de Xist et des protéines répressives le long du chromosome, à l'origine d'une répression transcriptionnelle globale des gènes portés par ce chromosome (Chen et al., 2016).

L'hétérochromatine constitutive

L'hétérochromatine constitutive joue un rôle dans la cohésion des chromatides sœurs pendant la mitose, le maintien de l'intégrité des télomères ou encore dans la structuration fonctionnelle du noyau. L'hétérochromatine constitutive se caractérise par sa richesse en marques épigénétiques répressives :

L'ADN de ses régions est méthylé, les histones H3 sont triméthylées au niveau de la lysine 9 (H3K9me3), et les histones sont hypoacétylées. La marque H3K9me3 est également associée à la protéine « reader » HP1 α (Heterochromatin Protein 1 α) ainsi qu'aux KMT (Histone Methyl transferase) SUV39H 1 et 2 « writers » de la marque (Becker, Nicetto, et Zaret 2016).

L'analyse génétique, moléculaire et biochimique du PEV (Position Effect of Variegation) chez la drosophile a contribué à de nombreuses découvertes clés concernant la mise en place et le maintien de l'hétérochromatine. Le phénomène de PEV est un processus à travers lequel un gène à l'origine dans une configuration euchromatinienne subit l'influence de régions d'hétérochromatine situées en *cis* ou en *trans* de ce gène. Ce gène évolue progressivement en une structure hétérochromatinienne et se trouve alors anormalement réprimée. Chez la drosophile, des cribles pour les mutations dominantes qui suppriment ou améliorent l'effet PEV ont mis en évidence le rôle de la méthyltransférase SU(VAR)3-9 (SUppressor of VARiegation effect 3-9), de la marque H3K9me3 et de la protéine HP1 dans la mise sous silence génique (Elgin et Reuter 2013).

L'Histone Methyl Transférase SU(VAR)3-9, appartient à la famille de protéines à domaines catalytiques SET, (Rea et al., 2000) est conservée de *S.pombe* à l'homme, (clr4 chez la levure, SUV39H chez la souris et l'homme) et agit spécifiquement sur le résidu H3K9. EHMT1, EHMT2,

PRDM2, G9a et SETDB1, d'autres KMTs ont également une capacité de méthyler la lysine 9 de H3. En revanche, chez la souris, SUV39H1/2 est la KMT « writer » qui méthyle H3K9 spécifiquement aux péricentromères (Peters et al., 2003). Il a également été montré une mono-méthylation d'H3K9 dans le cytoplasme par les méthyltransférases Prdm3 et Prdm16, puis après incorporation à l'hétérochromatine des péricentromères, SUV39H1 catalyse leur tri-méthylation (Pinheiro et al., 2012).

Chez les mammifères, SUV39H1/2 via le dépôt de la marque H3K9me3, crée un site de liaison à haute affinité pour les protéines HP1 (Heterochromatin Protein 1), (Lachner et al., 2001 ; Bannister et al., 2001).

L'hétérochromatine constitutive est enrichie en protéines HP1 α « readers » de la marque H3K9me3.

Chez *S.pombe*, il existe deux protéines HP1: Swi6 et Chp2. Chez les mammifères, HP1 α possède deux paralogues, HP1 β et HP1 γ qui partagent la même structure (Figure18).

Le ChromoDomaine (CD) situé dans la partie N-Terminale, et nécessaire et suffisant à la lecture de la marque H3K9me2/3 (Nielsen et al., 2002) et le ChromoShadow Domain (CSD), situé dans la partie C-Terminal permet la liaison d'HP1 avec d'autres protéines et également son homodimérisation (Lachner et al., 2001 ; Bannister et al., 2001). La liaison de deux protéines HP1 entre elles permettrait le rapprochement de deux nucléosomes adjacents et de ce fait participerait à la compaction de la chromatine. HP1 via son CSD, recrute SUV39H1, et participe à la propagation de l'hétérochromatine.

Les domaines CD et CSD sont très conservés entre HP1 α , HP1 β , et HP1 γ , alors que les fonctions cellulaires de ces isoformes présentent des divergences (Canzio et al., 2014). HP1 α et β se retrouvent majoritairement à l'hétérochromatine, alors que le recrutement d'HP1 γ se fait majoritairement aux régions euchromatiniennes. A noter également qu'HP1 est peu présente au niveau des régions d'hétérochromatine centromériques car l'histone H3 y est remplacée par son variant CENP-A.

Le domaine Hinge (HR) reliant CD et CSD est le moins conservé entre les isoformes, et possède la capacité de s'associer aux acides nucléiques. Il a été proposé que le HR et le CSD contribuent à l'enrichissement d'HP1 α aux régions enrichies en H3K9me3 (Muchardt et al., 2002 ; Mishima et al., 2013).

Le domaine Hinge et la région N-Terminale d'HP1 participent au processus de séparation de phase impliquant des régions hautement désordonnées (Larson et al., 2017 ; Sanulli et al.,

2019). Ces domaines ont été identifiés pour leur rôles dans la formation de l'hétérochromatine.

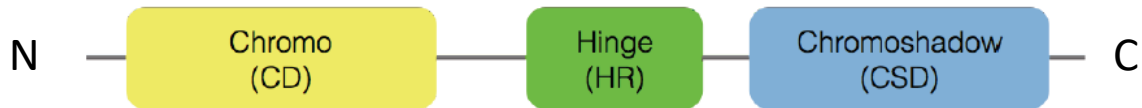


Figure 18 : Représentation de la structure des protéines de la famille HP1.

Toutes les isoformes d'HP1 contiennent les trois domaines suivants : un chromodomaine qui lie H3K9me3 et un chromoshadow domain impliqué dans la dimérisation d'HP1, reliés entre eux par une région Hinge qui lie l'ARN. D'après Eissenberg et al., 2002).

HP1, le « reader » de la marque H3K9me3, peut recruter son propre « writer » SUV39H via son CSD, et HP1 possède également la capacité de se lier à l'ADN méthyl transférase DNMT1. Ainsi, un lien existe entre méthylation H3K9me3 et méthylation de l'ADN, permettant un couplage entre méthylation de l'ADN et méthylation des histones (Pour revue Torres et Fujimori 2015). BRCA1 est impliqué dans l'ubiquitination de l'histone H2A, un processus associé au maintien de l'hétérochromatine péricentrique (Zhu et al., 2011).

La protéine BMI1, aussi connue sous les noms de Polycomb Group RING Finger protein 4 (PCGF4) ou RING finger protein 51 (RNF51)) possède également une redondance fonctionnelle partielle avec BRCA1 pour l'ubiquitinylation de H2A, avec un rôle essentiel dans la formation de l'hétérochromatine constitutive et sa mise sous silence dans les cellules somatiques des mammifères (Abdouh et al., 2016).

Expression de l'hétérochromatine constitutive

Chez les eucaryotes sous certaines conditions physiologiques (développement précoce, différenciation, cycle cellulaire, réponse au stress...), des régions d'hétérochromatine constitutive constituées de séquences répétées en tandem (Tableau 2), sont transcrites et les ARNs issus de ces régions sont impliqués dans les différents processus cellulaires. Ces régions sont principalement non-codantes car elles ne donnent pas d'ARNs messagers, mais génèrent des ARNs non codants qui tendent à rester associés aux régions dont ils sont issus (Figure 19).

Les péricentromères

La présence d'une composante ARN au sein de l'hétérochromatine a été mise en évidence initialement chez la levure (Volpe et al., 2002 ; Bühler et al., 2006) et la souris (Muchardt et al., 2002 ; Maison et al., 2002).

Dans les cellules murines, un traitement des cellules à la RNase entraîne une perte des chromocentres, foyers nucléaires très visibles par coloration des cellules au DAPI, formés par le regroupement de régions d'hétérochromatine péricentrique.

Toujours chez la souris, il a été proposé que les ARNs non codants issus des séquences péricentriques SAT (major SAT) servent de guide à la protéine HP1, permettant son ciblage aux régions d'hétérochromatine (Muchardt et al., 2002 ; Maison et al., 2002 ; Maison et al., 2011) (Almouzni et Probst 2011) La liaison de la protéine HP1 α aux résidus H3K9me3 permettant dans un second temps le recrutement de la protéine SUV39H1, assurant ainsi le maintien de l'hétérochromatine.

Les centromères :

Chez la Drosophile, au cours de la phase M, la présence d'ARNs non codants d'origine centromérique (*SatIII*) (*pour rappel, les ARNs SatIII de Drosophile sont des transcrits d'origine centromérique et non péricentrique*) est nécessaire à l'intégrité des kinétochores (Rošić, Köhler, et Erhardt 2014).

La déplétion de l'ARN *SatIII* centromérique (suite à l'injection de LNA gapmer *SatIII*) provoque de graves défauts de ségrégation chromosomique et une perte partielle des composants du kinétochore impliqués dans la liaison aux microtubules, laissant supposer que les transcrits non codants *SatIII* centromériques jouent un rôle dans le bon déroulement de la mitose.

Dans cette étude, l'ARN *SatIII* centromérique apparaît ainsi comme un acteur important de la fonction des centromères avec un rôle dans la formation du kinétochore permettant une bonne répartition des chromosomes lors de la mitose (Rošić, Köhler, et Erhardt 2014).

L'hétérochromatine péricentrique est nécessaire pour la cohésion des chromatides soeurs et l'orientation bipolaire pendant la mitose (Yamagishi et al., 2008 ; Sakuno et al., 2009).

Toutefois, les marqueurs universels d'hétérochromatine péricentrique HP1 et H3K9me3 ne sont pas affectés dans les cellules déplétées en *SatIII*. Les défauts de ségrégation chromosomique observés après la déplétion de *SatIII* ne sont donc probablement pas causés

par une perte de la cohésion des chromatides sœurs, mais bien par un dysfonctionnement au niveau des régions centromériques.

Les télomères

Les télomères appartiennent à l'hétérochromatine constitutive et jouent un rôle essentiel dans l'intégrité et la stabilité des chromosomes (Azzalin et al., 2007). Ils protègent l'extrémité des chromosomes de la dégradation et des cassures double brin.

Les télomères sont transcrits par l'ARN polymérase II, en un long ARN non codant TERRA (telomeric repeat containing RNA), dont la transcription est initiée dans des régions subtélomériques chromosome-spécifiques.

L'intégrité des télomères et la transcription sont toutes deux affectées par le stress thermique. Chez la levure, une longue exposition à la chaleur raccourcit les télomères après une centaine de générations (Romano et al., 2013). De plus, le stress thermique provoque l'accumulation de TERRA dans les cellules de souris et humaines. Des travaux menés dans l'équipe ont montré l'implication de la HSR via HSF1 sur l'activation transcriptionnelle des séquences télomériques (Koskas et al., 2017).

Dans le cadre de ce projet, nous nous intéresserons plus particulièrement aux régions péricentriques (PHC) humaine.

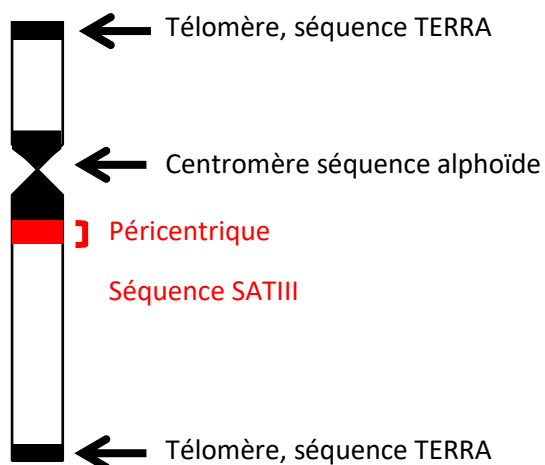


Figure 19 : Représentation sur le chromosome 9 des principales régions d'Hétérochromatine humaines transcrites en ARN non codant.

Les ARNs TERRA issus des séquences télomériques jouent un rôle dans la stabilité et la protection des télomères. Les régions centromériques sont cruciales pour le maintien de l'intégrité des kinétochores. Les régions péricentriques enrichies en *SATIII* sont fortement activées en réponse à un stress thermique.

Souris		
Motif télomérique répété		
TERRA	Tous les chromosomes	(TTAGGG) _n sur 20 à 100 Kb
Motif centromérique répété		
Minor SAT (120 bp)	Tous les chromosomes	GGAAAATGATAAAAACCACACTGTAGAACATATTAGATGAGTGAGTT ACACTGAAAAACACATTCTGTGGAAACGGGA TTTGTAGAACAGTGTATATCAATGAGTTACAA TGAGAAACAT
Motif péricentromérique répété		
Major Sat (234 bp)	Tous les chromosomes	CCTGGAATATGGCGAGAAAACGAAAATCACGAAAATGAGAAATACACACTTTAGGACGTGAAATATGGCGAGGAAAAC TGAAAAAGGTGAAAATTTAGAAATGTCCACTGTAGGACGTGGAATATGGCAAGAAAACGAAAATCATGGAAAAT GAGAAACATCCACTTGACGACTTGAAAATGACGAAATCACTAAAAACGTGAAAATGAGAAATGCACACTGAAGGACCTCG
Humain		
Motif télomérique répété		
TERRA	Tous les chromosomes	(TTAGGG) _n sur 5 à 15 Kb
Motif centromérique répété		
alphoid (171 bp)	Tous les chromosomes	CTTCTGTAGTTTTTATATGAAGATATCCCGTTTCCAACCAAGGCCTCAAAGCGGTCAAATATCCACAAGCTGATTCTACAAAA GAGTGTTCCAAACCTGCTCTATGAAAAGGAAGGTTCAACTCTGTGAGTTGAATGTATACATCACAAAGAGTTTCTGAGAATG
Motif péricentromérique répété		
SAT I	chrs 3, 4, 13, 14, 15, 21, 22	Alternance de fragments A (17 bp) = ACATAAAATATG/CAAAGT et B (25 bp) B1 : ACAT/CCCAAATATAG/TATTA/TTATA/TCTGT and B2 : ACCCAAAGT/GCCATAT/GCATT/CTATACT
SAT II	chrs 1, 2, 7, 10, 15, 16, 17, 22	Répétitions GGAAT dégénérés insérées dans des motifs différents de GGAAT
SAT III	chrs 1, 5, 9, 10, 17, Y, acrocentric	Répétitions du motif GGAAT insérées dans des motifs non GGAAT

Tableau 2 : Les différentes séquences répétées de l'hétérochromatine chez la souris et l'homme.

I-B-2-2-Maintien et mise en place des régions péricentriques chez les eucaryotes : importance de la composante ARN

Chez l'homme, les séquences répétées constituent 55% du génome, et parmi elles, la PHC composée de séquences SAT représente environ 5% de l'ensemble du génome (Figure 20).

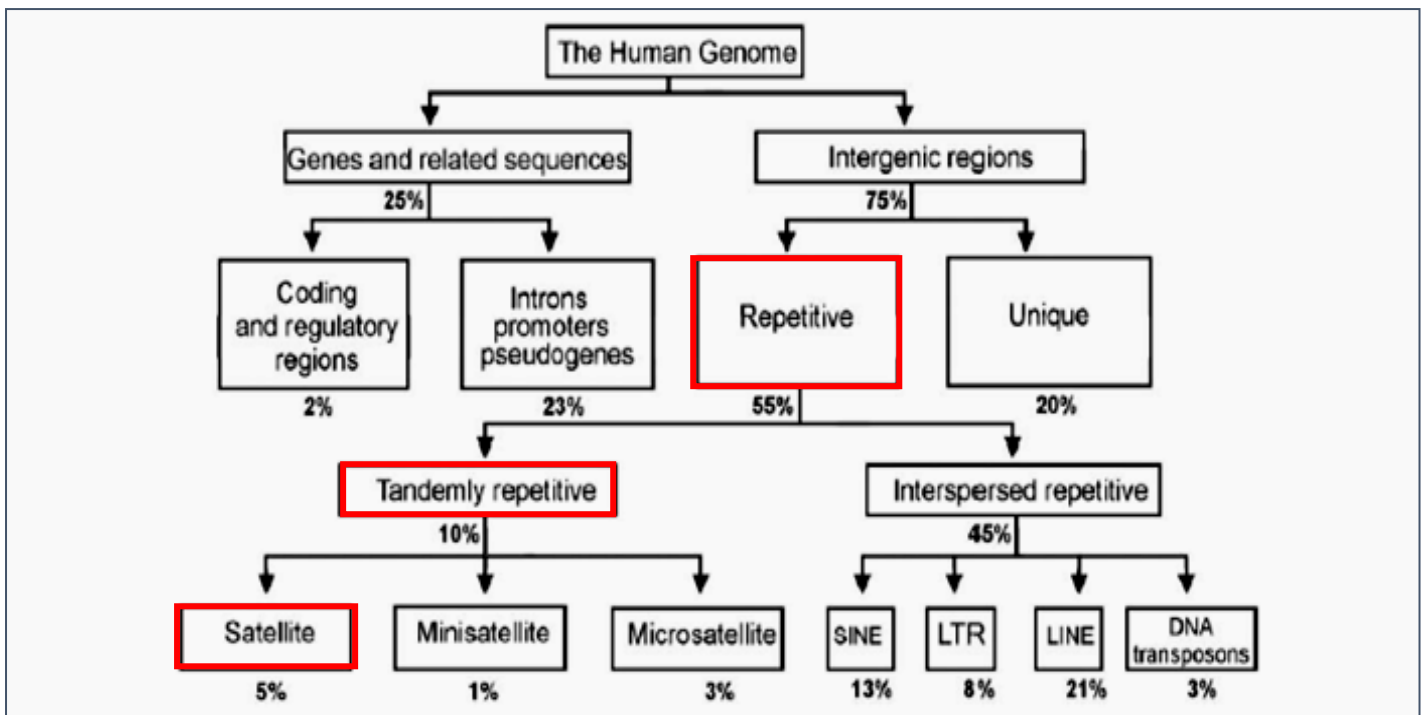


Figure 20 : Composition du génome humain, (d'après Jasinsca et al., 2004).

L'organisation générale de l'hétérochromatine constitutive péricentrique (PHC) est conservée à travers les espèces (Figure 21).

Chez *S.Pombe*, les régions centromériques sont formées d'un domaine central qui contient une séquence unique riche en AT d'environ 4 Kb (noyau central) flanquée de répétitions imparfaites (imr) de 5 à 6 Kb chacune. Les régions péricentriques sont constituées de répétitions externes dh et dg d'environ 5 kb chacune (Wood et al., 2002).

Chez la souris, les régions centromériques et péricentriques n'ont pas encore été entièrement caractérisées. Les régions centromériques d'environ 600 kb sont constituées d'une répétition de motifs satellites mineurs riches en bases AT de 120pb. Les régions péricentriques sont constituées d'une répétition de motifs satellites majeurs également riches en bases AT de 234 pb (Tableau 2).

Chez l'homme, les régions péricentriques peuvent atteindre jusqu'à 27Mb selon le chromosome considéré. La structure des régions péricentriques, qui varie également entre les chromosomes, est constituée de répétitions de satellites de trois types : type I (0,5 % du génome), type II (2 % du génome) et type III (1,5 % du génome) (Prosser et al., 1986) (Tableau 3).

Les mécanismes de mise en place et de maintien de l'hétérochromatine constitutive sont très étudiés à travers l'étude de différentes espèces, car bien que l'on en connaisse les principales fonctions et acteurs, les processus mis en jeu lors de sa formation et/ou maintien dans la cellule restent assez mal connus. Malgré tout, des mécanismes impliquant des ARNs non codants issus de ces régions ont été mis en évidence dans plusieurs organismes.

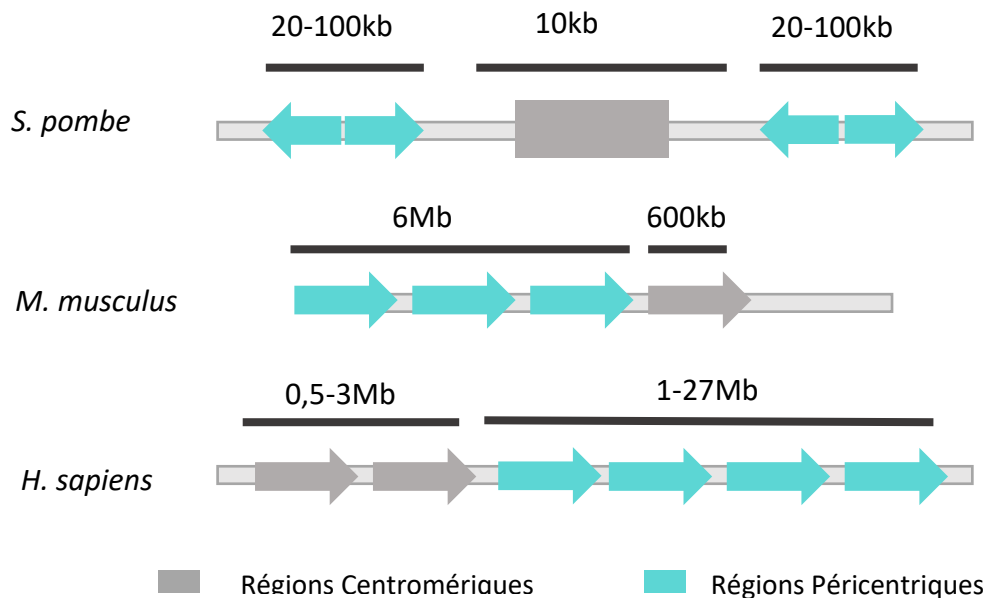


Figure 21 : Représentation de l'organisation des séquences centromériques et péri-centriques chez la levure, la souris et l'homme.

Les centromères des chromosomes sont flanqués de régions d'hétérochromatine constitutives péri-centriques constituées de séquences répétées.

Rôle du RNAi dans la mise en place et le maintien de l'hétérochromatine centromérique et péri-centrique

Chez la levure *S. Pombe* la voie du RNAi a été identifiée (Allshire et Ekwall 2015). Des criblages de mutants dont l'expression de loci d'hétérochromatine péri-centrique est anormal, ont mis en évidence des acteurs de la répression épigénétique, dont Clr4 une KMT –Lysine Méthyl Transférase-(homologue de SUV39H1, responsable de la mise en place de H3K9Me3), Swi6 (homologue de HP1), « reader » de la marque H3K9me3 et responsable de sa propagation) et les protéines du complexe RITS (RNA-Induced Transcriptional Silencing) (Allshire et Ekwall 2015). De ces études se dégagent deux mécanismes de mise en place de l'hétérochromatine, le premier impliquant Swi6 et Clr4, le second impliquant les ARNs issus de ces régions, qui peut être considéré comme une boucle de rétrocontrôle.

En effet, les séquences péri-centriques sont transcrites par l'ARN POLII de manière bidirectionnelle, permettant la formation d'un ARN double brin. Celui-ci est pris en charge par Dicer, et clivé en siRNAs, qui sont ensuite chargés, via une protéine, Ago1 (possédant une capacité de formation d'ARN simple brin à partir d'un ARN double brin) dans le complexe RITS (RNA-Induced Transcriptional post-Silencing). L'ARN ainsi chargé, permet le ciblage de RITS au niveau des péri-centromères, par appariement entre l'ARN simple brin et les ARNs

péricentriques naissants. Or, le complexe RITS contient Clr4, qui catalyse la méthylation de H3K9, et ainsi le recrutement de Swi6, qui en retour recrute entre autres des HDACs qui maintiennent l'hypo-acétylation de la région. Ce sont bien les transcrits issus des régions péricentriques, qui initient la propagation de l'hétérochromatine au niveau de ces mêmes régions (Figure 22).

Chez la souris et chez l'homme, l'implication du RNAi dans le maintien de l'hétérochromatine reste une question ouverte.

Chez la souris, il a été montré que des ARNs sont associés au niveau des chromocentres correspondants aux régions d'hétérochromatine péricentrique (major SAT) et que la présence d'ARN était nécessaire au maintien de la marque H3K9me3 et de la protéine HP1 à ces régions (Muchardt et al., 2002 ; Maison et al., 2002). La présence de longs ARNs non codants issus de ces régions a également été montré nécessaire à la présence aux régions péricentriques de la protéines HP1 sumoylée (Maison et al., 2011). Toujours chez la souris, lors de la réplication de l'ADN, une accumulation d'ARNs d'origine péricentrique est observée en fin de phase G1 (Gilbert et al. 2007 ; Probst et al. 2010).

Le rôle direct du RNAi dans la structure de l'hétérochromatine chez la souris et l'homme n'est toujours pas formellement établi. Dans une étude basée sur l'utilisation d'une lignée cellulaire hybride poulet/humain, contenant un chromosome surnuméraire humain, une déplétion de DICER entraîne une augmentation des transcrits centromériques (α SAT) dans les cellules somatiques, des défaut mitotiques et également une séparation prématurée des chromatides sœurs (Fukagawa et al., 2004).

D'autre part, dans des souris *Dicer* $-/-$, une accumulation de transcrits d'origine péricentrique est observée par rapport aux observations faites dans les souris sauvages. En absence de DICER, une augmentation de la fraction des transcrits de taille supérieure à 200nt est observée au détriment de la fraction de transcrits plus petits en taille (25-30nt) (Kanellopoulou et al., 2005). De même, dans les cellules *Dicer* $-/-$, une diminution d'H3K9me3 et de la méthylation de l'ADN aux régions péricentriques est observée, avec un marquage nucléaire des isoformes HP1 β et γ plus diffus et intense (Kanellopoulou et al., 2005).

D'autres études plus récentes suggèrent l'implication de la machinerie du RNAi, dans le maintien du niveau d'expression et de distribution des ARNs non codants de la cellule. En effet DICER serait important pour dissocier momentanément les ncARNs de la chromatine. Dans les fibroblastes embryonnaires de souris et dans des cellules HeLa, une délétion de DICER ou de

AGO2 (appartenant à la machinerie de RNAi) entraîne une accumulation de transcrits ARNs α SAT aux centromères (Huang et al., 2015) et aux régions péricentriques (M. J. Gutbrod et al., 2022). Cependant, il est à noter qu'à l'inverse, une étude réalisée par notre laboratoire et reposant sur un knock-down de DICER réalisée dans les cellules HeLa n'a pas permis de mettre en évidence de dérégulation des régions centromériques et péricentriques (Eymery et al., 2009).

Ainsi, en conclusion, le rôle de la voie du RNAi dans le maintien et la mise en place de l'hétérochromatine chez les eucaryotes supérieurs est encore loin d'être résolue. L'implication de cette voie pourrait dépendre du type de cellules considérées (embryonnaires, somatiques). De même, à considérer que la voie du RNAi joue un rôle dans ces mécanismes, il n'existe pas de données montrant un rôle direct de cette voie dans le contrôle de l'expression des transcrits centromériques et péricentriques. D'autres mécanismes pourraient être impliqués.

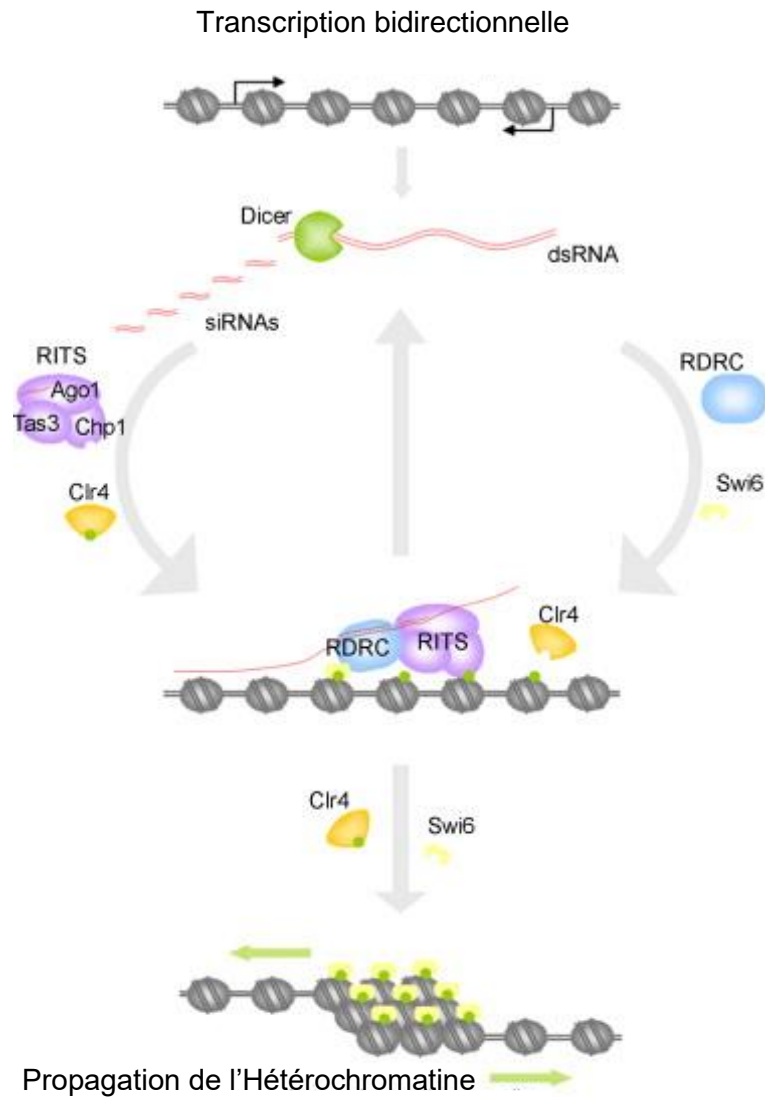


Figure 22 : Assemblage de l'hétérochromatine chez la levure de fission *Schizosaccharomyces pombe* (d'après Pezer et Ugarković 2008).

Une transcription bidirectionnelle de bas niveau à partir des régions centromériques et péricentriques, suivie d'un clivage par Dicer, produit suffisamment de dsRNA pour déclencher la formation de l'hétérochromatine RNAi dépendante. Les siRNA guident les facteurs d'assemblage de l'hétérochromatine sous la forme du complexe RITS vers la séquence d'ARN naissante cible. La mise sous silence est amplifiée par le RDRD (RNA-Directed RNA polymerase Complex) qui produit des dsRNA supplémentaires. La propagation de l'hétérochromatine sur les séquences voisines est induite par la méthylation de H3K9 (points verts) qui résulte de l'activité de l'histone méthyltransférase Clr4, suivie de la liaison de la protéine à chromodomaine Swi6.

Mise en place de l'hétérochromatine constitutive centromérique et péricentrique

L'étude de la mise en place de l'hétérochromatine *de novo* chez les mammifères est délicate car elle nécessite l'utilisation d'un nombre élevé de cellules embryonnaires à un stade précoce du développement. La composante ARN a été identifiée comme faisant partie du processus de différenciation.

Le modèle du développement précoce de Mus Musculus

Chez la souris, une accumulation des transcrits d'origine péricentrique est observé au cours du développement précoce. Le rôle de ces ARNs dans la mise en place des marques répressives associées à l'hétérochromatine péricentrique a été montré par des approches de type LNAGapmer ciblant les ARNs satellites (Probst et al., 2010). Dans ce cas, ce modèle permet l'analyse de la formation *de novo* de l'hétérochromatine constitutive.

Le passage, du stade 2 cellules au stade 4 cellules, requiert la présence d'un variant d'histone, H3.3, et plus précisément de la marque H3.3Me1, la présence d'une protéine de la famille HP1 ainsi que la transcription des régions satellites majeurs (Santenard et al., 2010). Sans cette transcription, le développement embryonnaire s'arrête au stade 4 cellules. Les marques caractéristiques sont ensuite déposées séquentiellement sur la chromatine au cours des stades suivants, afin de réprimer la transcription des satellites majeurs. L'absence de répression transcriptionnelle des régions péricentriques est associée à des échanges de chromatides sœurs et à un grand nombre d'instabilités chromosomiques (Probst et al., 2010).

Le modèle expérimental de la réponse au stress thermique (HSR)

Les mécanismes de mise en place *de novo* de l'hétérochromatine chez l'homme restent aujourd'hui mal connus en raison de la grande difficulté de travailler à partir d'un modèle de cellule souche embryonnaires humaine. Le modèle de la HSR nous donne la possibilité de créer expérimentalement *in vitro* les conditions de perte et de reformation de l'hétérochromatine, incluant une analyse des cinétiques de dissociation et de recrutement des principaux acteurs de la PHC (Figure 23).

La relocalisation massive d'HSF1 à l'hétérochromatine a pour conséquences l'activation transcriptionnelle des régions *SATIII* et la formation de nSBs. Au cours de la HSR, la signature épigénétique du locus 9q12 est caractérisée par la perte des marques répressives (Col et al., 2017), et une hyperacétylation du locus (Jolly et al. 2004; Rizzi et al. 2004).

Le rôle possible des ARNs d'origine péracentrique dans la remise en place des marques répressives fait l'objet de ce travail.

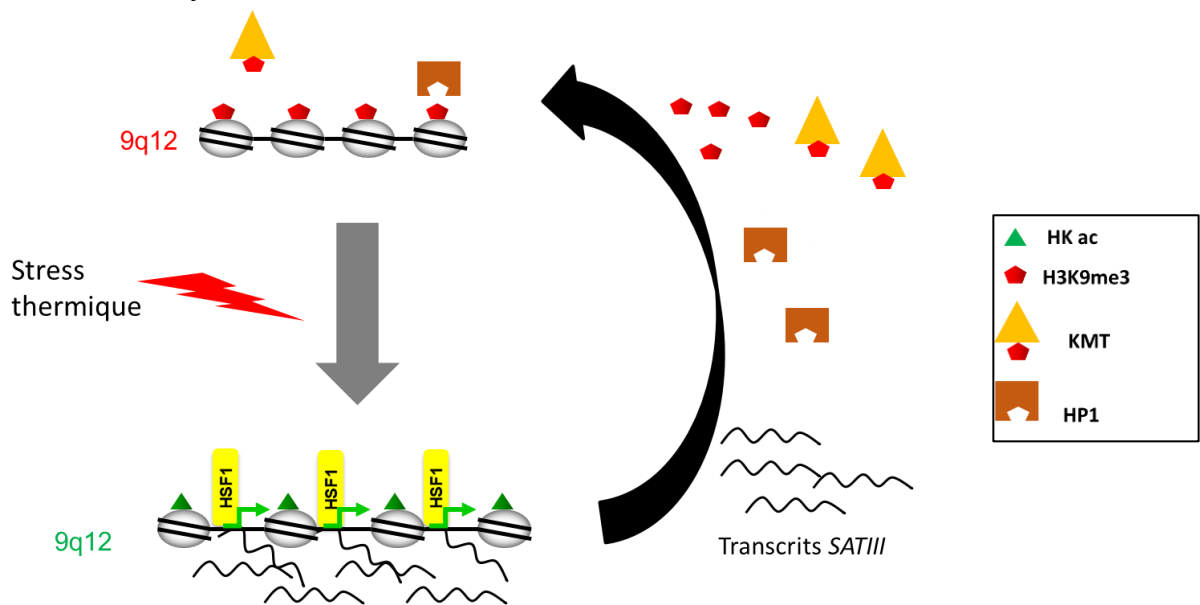


Figure 23 : La HSR médiée par HSF1 au niveau du locus 9q12 est réversible.

Après leur activation transcriptionnelle par un stress thermique, les régions d'hétérochromatine se reforment lors d'une période de récupération. La cinétique de la remise en place de l'hétérochromatine, la nature exacte des mécanismes mis en jeu impliquant des acteurs communs de l'hétérochromatine, (HP1, H3K9me3, l'histone méthyl transférase SUV92H1/2 et les transcrits *SATIII* issus et associées à ces régions) ne sont pas connues.

I-B-3 Les régions péricentriques humaines enrichies en séquences SATIII.

I-B-3-1-Historique

L'ADN satellite a été mis en évidence par centrifugation sur gradient de chlorure de césium (Corneo, Ginelli, et Polli 1967; Corneo, Ginelli, et Polli 1968; Corneo, Ginelli, et Polli 1970). En effet sa composition en base lui confère des propriétés de sédimentation différentes de celles de l'ADN génomique classique.

Une fois centrifugé, l'ADN sédimente sous la forme d'une bande unique accompagnée de bandes mineures, satellites, d'où leur dénomination. Les trois bandes satellites I, II et III correspondent chacune à une famille prédominante appelée satellites 1, 2 et 3 (Prosser et al. 1986) (tableau 3). Les beta satellites ont pu être isolés et caractérisés après digestion de l'ADN génomique avec l'enzyme de restriction Sau3A (Agresti et al. 1987; Waye et Willard 1989) et sont constitués de monomères de 68 bp riches en GC (46%) mais hautement divergents. Ils sont localisés au niveau des régions péricentriques des chromosomes 9, 1 et 3, des bras courts des chromosomes acrocentriques ainsi qu'au niveau du bras long du chromosome Y (Agresti et al., 1989; Cooper, Fisher, et Tyler-Smith 1992 ; Meneveri et al., 1993).

Beta satellites	68 pb	chromosomes 1, 3, 9, 13, 14, 15, 21, 22, Y
Satellites 1	42pb	chromosomes 3, 4, 13, 14, 15, 21, 22
Satellites 2	5pb	chromosomes 1, 2, 7, 10, 15, 16, 17, 22
Satellites 3	5pb	chromosomes 1, 5, 10, 13, 13, 15, 17, 20, 21, 22, Y

Tableau 3: Récapitulatif de la nature et de la distribution chromosomique des séquences péricentriques chez l'homme.

Pendant longtemps les régions péricentriques ont échappé au séquençage du génome humain. Très récemment, le séquençage complet de ces régions a été publié, montrant que la taille de la région 9q12 avait été largement sous-estimée, puisqu'elle est estimée aujourd'hui à 27Mb, contre quelques Mb initialement (Nurk et al., 2021), (<https://sites.google.com/ucsc.edu/t2tworkinggroup/publications?authuser=0>).

Des analyses de bio-informatique réalisées à partir des données de séquençage de ces régions ont été réalisées afin d'identifier la nature des motifs SAT II et III humains les plus couramment rencontrés pour chacun des chromosomes. Ces analyses basées sur une approche dite «Analyse en Composantes Principales » permettent de déterminer, pour une fenêtre de taille déterminée la fréquence d'association de différents motifs. Cette étude indique que l'élément de répétition trouvé est majoritairement de type HSAT3B5 au chromosome 9 et de type, HSAT3A3 au niveau du chromosome Y (Tableau 3) (Altemose et al., 2014). Ces données, bien qu'intéressantes, doivent toutefois être considérées avec précaution. Nous avons de notre côté confirmé par FISH ADN l'abondance du décanucléotide « caaccgagtgca » (contenu dans la séquence HSATB1) au niveau de la région 9q12.

Sous-famille	Taille estimée (Kb)	Localisation chromosomique	Motif 24 mers le plus fréquent
HSat2A1	1,988	1 [†] ,10	TTGATTCCATTAGTTCCATTGGA
HSat2A2	15,366	1 [†]	CATTCGATTCCATTGATGATAAT
HSat2B	16,233	16 [†] ,1,2,7,22	TTCGATTCCATTGATGATTCCAT
HSat3A1	1,299	10,13,21,22	AATTCATTCCATTCCATTCGAGT
HSat3A2	1,951	10,13,14,21,22,Y	TACATTCCATTGACTCCATTCCA
HSat3A3	836	Y [†]	CTTTACACTCCATTCTTTCTATT
HSat3A4	2,518	13,14,15,21,22,Y	AATTCATTCTCCATTCCATT
HSat3A5	4,525	15 [†]	TATTCTATATGATTCCATTCCATT
HSat3A6	12,851	Y [†] ,7	TCGTTTCGATTCTTTCCATTCCA
HSat3B1	539	not determined	TTGCATTCCACTCGGGTTGATTCT
HSat3B2	961	1 [†] ,13,14,21	TTGTTCAATTCCATTCTATTCCA
HSat3B3	6,109	20 [†] ,1,4,5,7,13,14,21,22	TTCTTTCCAGTTGATTCCATTCC
HSat3B4	1,930	13,14,21,22	TTCCATTCCACTCCACCCGGATT
HSat3B5	14,279	9 [†] ,13,14,20,22	CTCCATTACATTCCATTCCATTCCG

Tableau 4 : Caractérisation des sous-types de séquence SAT réalisée par l'approche dite « Analyse en Composantes Principales » à partir des données de séquençage du génome humain (d'après Altemose et al., 2014).

I-B-3-2-SATIII et stress

Comme nous l'avons vu, l'application d'un stress thermique dans des cellules humaines induit l'activation de la transcription des ARNs *SATIII* et la formation de nSBs au niveau du locus 9q12 (Jolly, et al., 2004).

D'autres types de stress peuvent être à l'origine de la transcription des *SATIII* en sens, associées à des cinétiques et niveaux d'expression différents. C'est le cas par exemple de l'hypoxie (Chlorure de Cobalt), du stress oxydatif (H₂O₂), des agents induisant des dommages à l'ADN (UV), du stress osmotique (sorbitol), et de l'exposition aux métaux lourds (cadmium) (Pour revue Valgardsdottir et al., 2008).

Certains de ces traitements, tels que l'exposition au sulfate de Cadmium, aux UV et le stress oxydatif induisent directement la HSR en activant HSF1. Au contraire, le stress osmotique fait intervenir un facteur de transcription différent d'HSF1, TONEBP (Valgardsdottir et al., 2008) qui lui aussi induit la HSR mais à partir de voies de signalisation différentes.

Il existe également un autre type de stress dans lequel un excès de transcrits *SATIII* semble impliqué : les stress répliatifs (Zhu et al., 2018). Lors d'un stress répliatif, la mitose est ralentie ou bloquée au niveau des fourches de réplication. Ce stress peut être causé par une variété d'évènements d'origine endogène ou exogène qui provoque des dommages à l'ADN sur les brins fragilisés par la réplication (Carr et Lambert 2013).

I-B-3-3-SATIII et intégrité du génome

Les processus de différenciation et de dé-différenciation cellulaires sont intimement liés à des mécanismes de remodelage chromatinien impliquant les régions d'hétérochromatine constitutive (Mason et al., 2012; Becker, Nicetto, et Zaret 2016). La relation entre niveau d'expression des transcrits d'origine centromériques et péricentriques et cancer est plus particulièrement étudiée depuis une dizaine d'années. La plupart des cellules tumorales présentent en effet une expression élevée de ces transcrits (Eymery et al., 2009 ; Ting et al., 2011) associée à des instabilités chromosomiques. Par ailleurs, une accumulation de transcrits d'origine péricentrique est également associée à des phénotypes de sénescence, illustrant ainsi la complexité des effets générés, et des mécanismes mis en jeu.

Dérépression des régions SATIII et sénescence.

Chez les mammifères, l'activation transcriptionnelle des régions péri-centriques a été observée dans la sénescence répliquative et le vieillissement. *In vitro*, après un certain nombre de passages, les fibroblastes humains en culture, entrent en sénescence répliquative, en corrélation avec une augmentation de l'expression des transcrits péri-centriques. Dans ces cellules, l'hétérochromatine péri-centrique est décondensée et la méthylation de l'ADN est réduite. Il est difficile de déterminer le rôle de cette dérépression qui pourrait être à l'origine du phénotype de sénescence observé ou plutôt la conséquence d'un état de dérépression de l'hétérochromatine elle-même (Enukashvily et al., 2007).

Une surexpression aberrante de transcrits SATIII issus du locus 9q12 a également été rapportée dans le syndrome Progeria Hutchinson-Gilford (Shumaker et al., 2006). Ce syndrome résulte de mutations dans le gène *LAMIN A*, qui code pour un composant de la lamine nucléaire, révélant le rôle crucial des lamines dans l'organisation de l'hétérochromatine péri-centrique dans les cellules en interphase. Dans ce cas, une altération de la lamine engendre une transcription aberrante associée à une perte de la marque répressive H3K9me3 (Shumaker et al., 2006).

Dérépression des régions SATIII et cancer

Le niveau d'expression des séquences satellites dans différents contextes physiologiques a été étudié par criblage à l'aide d'une puce contenant un set d'oligonucléotides spécifiques de ces régions (Eymery et al., 2009). Dans cette étude l'expression des séquences satellites a été étudiée dans un ensemble de tissus humains. A l'exception du tissu testiculaire dans lequel une expression constitutive de transcrits péri-centriques sous leur forme « C-rich » est détectée, la plupart des tissus n'exprime pas ou peu de transcrits d'origine péri-centriques. En revanche, une surexpression des transcrits SAT est observé dans les tissus tumoraux, en particulier dans des cancers du poumon (Eymery et al., 2009).

D'autres études à plus large échelle ont démontré l'accumulation des ARNs SAT dans les tumeurs de type adénocarcinome du pancréas, du rein, du colon des ovaires et de la prostate (Ting et al., 2011). Dans certaines tumeurs dérivées de modèles murins, la quantité d'ARNs satellite peut représenter jusqu'à 50 % des ARNs de la cellule, contrastant fortement avec les faibles niveaux mesurés de la plupart des lignées tumorales (Ting et al., 2011).

Ainsi, dans un contexte physiopathologique de type cancer, les transcrits *SAT* serviraient de biomarqueurs des tumeurs.

On ne sait pas dans quelle mesure la surexpression de transcrits satellite observée dans certaines tumeurs résulte d'une activation d'HSF1 (Santagata et al., 2011), (voir la partie I). En effet, HSF1 est surexprimé et activé dans certains cancers, et des foyers HSF1 ont été détectés dans certains tissus tumoraux (Gaglia et al., 2020).

L'accumulation des ARNs *SAT* observée dans certaines tumeurs pourraient également impliquer d'autres facteurs de transcription, et reposer sur l'existence d'un état chromatinien globalement moins répressif au niveau des régions centromériques et péricentriques. En effet, dans des cellules HeLa, l'utilisation d'un inhibiteur de la méthylation (5-Aza-Cytidine) entraîne une dérégulation transcriptionnelle des régions péricentriques (Eymery et al., 2009; Ting et al., 2010). Dans le syndrome ICF (immunodeficiency, CEN instability, and Facial anomalies), associé à une mutation du gène DNMT3B, une dérégulation des régions *SATII* et *SATIII* est également observée (Brun et al., 2011).

Un taux élevé de transcrits d'origine centromériques et péricentriques est également observé dans les cellules ES de souris SUV39h KO (Martens et al., 2005) suggérant qu'une perte des marques répressives est associée à la dérégulation transcriptionnelle de ces régions. Par ailleurs, dans des cellules murines Suv39h $\frac{1}{2}$ $-/-$ C caractérisées par un caryotype tétraploïde, une perte de la marque H3K9me3 et une délocalisation de la protéine d'HP1 sont observées, associées à un défaut de compaction de la chromatine et de cohésions des chromatides sœurs aux régions péricentriques (Koch et al., 2008).

De même, un défaut de l'ubiquitinylation de l'histone H2 par la protéine BRCA1 favorise la transcription des régions *SAT* (Zhu et al., 2011).

Ainsi, dans une étude récente, il a été proposé, que la protéine BRCA1 mutée pourrait participer au développement du cancer du sein via une production de transcrits satellites (Zhu et al., 2018). BRCA1 est un suppresseur de tumeur qui maintient l'état répressif de l'hétérochromatine grâce à son activité histone mono-ubiquitinyllase. BRCA1 est capable de prévenir l'effet toxique d'un excès de transcrits sur les fourches de réplication en formant un complexe avec ces transcrits. Dans des cellules tumorales humaines (cellules U2OS ostéosarcome) exprimant une protéine BRCA1 mutée, une surexpression d'ARNs satellite d'origine centromérique et péricentrique est observée. Un excès de transcrits satellite péricentriques dans ces cellules, est à l'origine de la formation d'hybrides ADN-ARN au niveau

des fourches de réplication. Ces hybrides ADN-ARN induisent des cassures doubles brin et des instabilités chromosomiques menant à l'instabilité génomique caractéristique du processus de tumorigénèse (Figure 26).

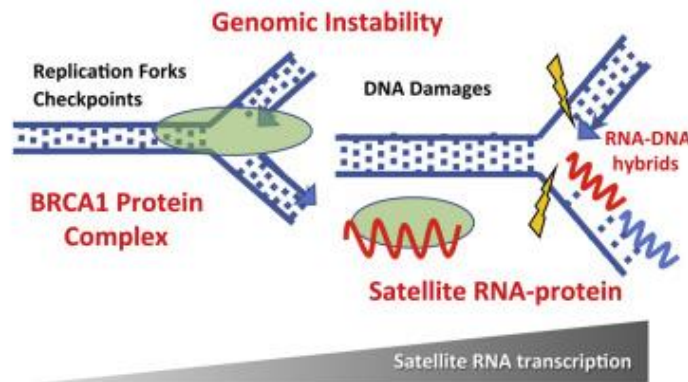


Figure 26 : Modèle d'induction de l'instabilité génomique induite par un excès de transcrits *SATIII*.

Les transcrits satellite péricentriques et centromériques produits en excès s'associent à la protéine BRCA1 et forment des hybrides ARN/ADN au niveau des fourches de réplication, à l'origine d'instabilités chromosomiques (Image tirée de Zhu et al., 2018).

Enfin, une étude récente réalisée dans des cellules humaines a mis en évidence l'implication d'un excès de transcrits *SATIII* dans l'instabilité chromosomique associée à la mitose (Giordano et al., 2020). Une fraction significative des cellules mitotiques soumises à un stress thermique présente des chromosomes retardataires et des ponts chromosomiques associés à des ARNs *SATIII*, et les défauts mitotiques disparaissent après une période de récupération. La disparition des défauts de ségrégation coïncide avec l'apparition de petites molécules d'ARN satellite dont la taille varie entre 25 et 75 nt et donc l'accumulation est indépendante des protéines DICER et AGO (Giordano et al., 2020).

ARNs satellites et cycle cellulaire

Une étude à grande échelle, le projet FANTOM 6, utilisant la technique du RNA-seq sur des cellules cancéreuses humaines synchronisées a identifié plus de 2000 lncRNAs dont l'expression dépend de la phase du cycle cellulaire. En effet, 42 % des gènes dont l'expression augmente dans une phase spécifique du cycle cellulaire sont des ARNs non codants, incluant une majorité de lncRNAs (Hao et al., 2020). La plupart de ces lncRNAs présentent un niveau d'expression plus élevé en phase G1, suggérant que certains de ces lncRNAs pourraient jouer un rôle dans la transition G1/S (pour revue Guiducci et Stojic 2021).

Peu de données concernent l'expression des lncRNAs dans la transition la phase G2/M/G1, ce qui pourrait s'expliquer par une difficulté de quantification des niveaux d'expression des lncRNAs spécifiques à la mitose (en raison de sa durée trop courte 1h) ou d'un moindre rôle de ces ARNs dans les mécanismes contrôlant la transition G2/M (pour revue Guiducci et Stojic 2021).

Dans les fibroblastes primaires embryonnaires de souris, une accumulation de transcrits d'origine centromérique (*MajorSat*) est observée. Le profil d'accumulation de ces transcrits varie en fonction du cycle cellulaire (Lu et Gilbert 2007). Un premier groupe de transcrits longs et hétérogènes de *MajorSat* (de 1 à 8KB) est produit par l'ARN POLII pendant la phase G1 jusqu'à atteindre un pic en phase G1/S, juste avant la phase de réplication.

Un pool de transcrits plus courts (d'environ 200 nt) est produit au début de la mitose, juste après la réplication. La formation de ce pool coïncide avec l'élimination des facteurs de transcription et autres protéines associées à l'hétérochromatine.

Ces pools de transcrits pourraient participer au réassemblage de l'hétérochromatine après les processus de la réplication de l'ADN et de la mitose qui bouleversent profondément la structure chromatinienne (et ne pas être nécessaires dans une cellule quiescente). Au cours de la mitose, la cohésine est éliminée au niveau des régions centromériques et la protéine HP1 également expulsé (Mateescu et al., 2004). Les transcrits issus de l'hétérochromatine pourraient servir à la reformation de l'hétérochromatine en fin de phase M, avec un rôle dans la déposition de la marque H3K9me3.

Il existe peu de données concernant l'expression des transcrits *SATIII* au cours du cycle cellulaire chez l'homme.

Suite à un stress, la formation de nSBs, qui est un marqueur de la transcription de l'ADN *SATIII*, se produit plus rapidement en fin de phase S alors qu'elle est retardée en début de phase G1. Cela suggère que l'accessibilité de ces séquences à la machinerie transcriptionnelle est susceptible de varier au cours du cycle cellulaire (Weighardt et al., 1999). Toutefois, si certaines fractions cellulaires semblent plus réactives au stress, l'ensemble des cellules exprime néanmoins les transcrits *SATIII* lorsqu'un stress est appliqué à des cellules non synchronisées. On ne sait pas aujourd'hui si la variation d'expression des transcrits satellites d'origine péricentrique observée au cours du stress chez la souris (dont nous ne savons pas si elles se produit également dans les cellules humaines) reflète une évolution de la signature épigénétique des régions péricentriques (Vourc'h et Biamonti 2011).

ARNs satellites et instabilités chromosomiques au cours de la mitose

La réplication fidèle de l'ADN et la cohésion des chromatides sœurs assurent une propagation correcte du matériel génétique aux cellules filles pendant la division cellulaire. Un grand nombre de facteurs impliqués dans ces processus ont été identifiés et caractérisés (Masai et al. 2010 ; Peters et Nishiyama 2012). Une altération de l'expression de ces facteurs est associée à une instabilité génétique et éventuellement à la tumorigénèse (Gaillard, García-Muse, et Aguilera 2015; Losada 2014 ; Skibbens 2019).

Au cours du cycle cellulaire, les cellules devront passer une multitude de points de contrôle permettant la vérification de l'intégrité de leur ADN pour se diviser. La mitose est une étape cruciale pendant laquelle peuvent se produire des instabilités chromosomiques.

La mitose peut se décomposer en plusieurs étapes (Figure 24).

En prophase, les chromosomes issus de la réplication (phase S du cycle cellulaire) possèdent deux chromatides identiques qui se condensent. En prométaphase l'enveloppe nucléaire se rompt et en métaphase, les chromosomes s'alignent sur la plaque métaphasique et s'attachent aux microtubules du fuseau mitotique au niveau de leur centromère, par l'intermédiaire de structures protéiques, les kinétochores. C'est lors de l'anaphase qu'a lieu l'étape critique de la ségrégation des chromosomes de part et d'autre de la cellule, grâce à l'action des microtubules. Télaphase et la Cytodiérèse vont achever cette migration et permettre la formation des deux cellules filles, par la reformation de l'enveloppe nucléaire autour des chromosomes issus de la ségrégation.

La ségrégation correcte des chromosomes mitotiques dépend d'un ancrage correct entre les microtubules et le kinétochore, et également de la cohésion entre les chromatides sœurs qui, jusqu'au dernier moment, va permettre d'exercer des forces de résistance aux microtubules, générant une tension qui sert de signal attestant que les chromosomes sont correctement attachés. Cette cohésion est principalement médiée par des complexes protéiques, les cohésines, qui forment des anneaux autour des deux chromatides sœurs issues de la réplication (Figure 25). A la fin de la mitose, des protéines appelées séparases vont provoquer le clivage et le départ des cohésines (Mehta, Rizvi, et Ghosh 2012).

Les régions péricentriques forment un site d'ancrage privilégié pour les cohésines, à cet endroit elles sont protégées des séparases par des protéines de la famille des shugoshins, jusqu'à l'entrée en anaphase (Marston 2015). La localisation des cohésines met en jeu un réseau d'interactions complexes impliquant en particulier HP1 (Yamagishi et al., 2008).

Chez la drosophile, un modèle de chromosome artificiel a permis de montrer que la présence l'hétérochromatine ectopique suffit à elle seule au recrutement de la cohésine permettant de créer de multiples points d'ancrage entre les chromatides sœurs. La correcte structure tridimensionnelle de l'hétérochromatine péricentrique est nécessaire pour la formation du kinétochore (Oliveira et al., 2014).

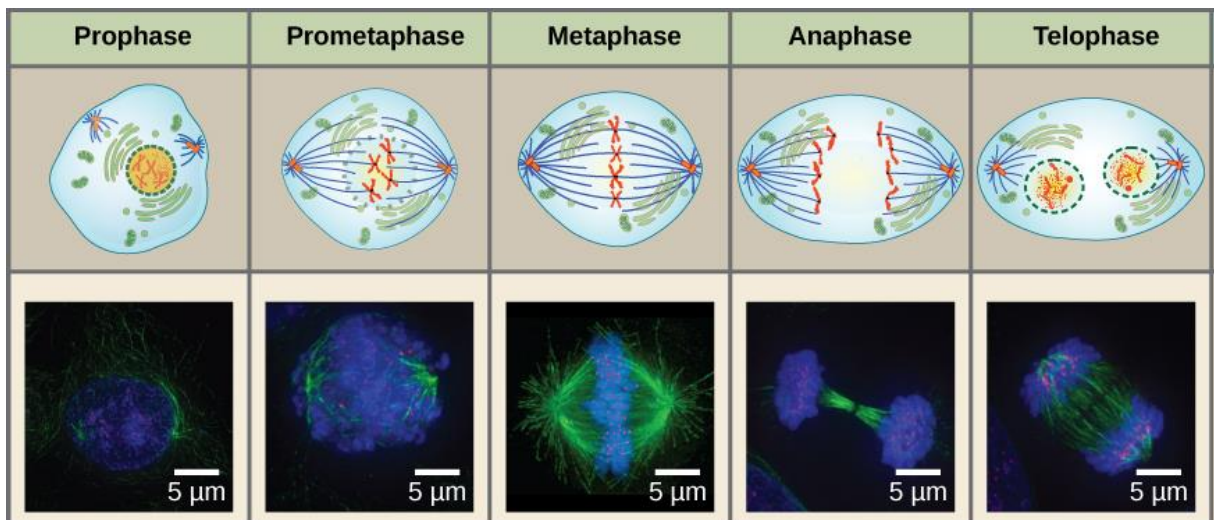


Figure 24 : Les différentes étapes de la mitose visualisées par microscopie de fluorescence.

Une « cellule mère » subit une répartition équitable de son ADN précédemment répliqué pour donner deux « cellules filles » identiques. Le déroulement correct de la mitose assure le maintien de la stabilité génétique de la « cellule mère » aux « cellules filles (D'après une image obtenue du OpenStax College, modifiée par Mariana Ruiz Villareal, Roy van Heesheem, et le Wadsworth Center).

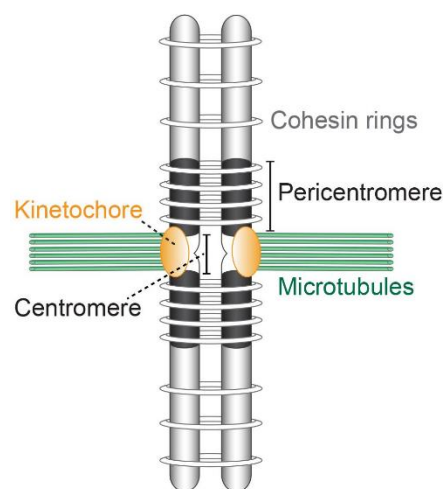


Figure 25 : Représentation d'un chromosome métaphasique d'après (D'après Smurova et De Wulf 2018).

Les chromosomes sont reliés par des anneaux de cohésine et sont liés aux microtubules du fuseau mitotique par les kinétochore du centromère.

Les centromères, qui ont un rôle essentiel dans la formation du kinétochores, ne sont curieusement pas définis par des séquences d'ADN spécifiques, mais plutôt par une signature épigénétique. Le variant d'histone CENP-A (qui remplace H3) est primordial à l'identification des centromères par des composants du kinétochoire (Pour revue, Rošić et Erhardt 2016).

Le statut épigénétique des régions centromériques est finement régulée. Une perte de CENP-A au niveau de ces régions entraîne une mauvaise ségrégation des chromosomes ayant des conséquences drastiques sur les cellules en développement. Au contraire, une surexpression de CENP-A conduit à la formation ectopique de centromères, ainsi la multiplicité des points d'attachement induisent des instabilités chromosomiques (chromosomes retardataires ou cassures ; Heun et al., 2006).

Comme évoqué au chapitre I-B, une composante ARN est également impliquée dans le maintien des structures centromériques. Chez la Drosophile, un Knock-Down des transcrits centromériques de type *SATIII* entraînent une altération de la structure et de la fonction de des régions centromériques (Rošić et Erhardt 2016; Bouzinba-Segard et al., 2006).

Chez l'homme, les ARNs α SAT (Issus des régions centromériques) ont également été détectés au niveau des chromosomes mitotiques. Comme chez la drosophile, la fonction des transcrits centromériques, semble être liée à la stabilisation et à l'assemblage des complexes protéiques nécessaires à la division cellulaire normale. Les ARNs α SAT sont impliqués dans le chargement du variant CENP-A au niveau du centromère, et leur déplétion entraîne des défauts mitotiques (Wong et al., 2007).

Le lien avec l'hétérochromatine péricentrique, située à proximité directe des régions centromériques, est encore mal connu. Il a été proposé que la présence d'hétérochromatine qui entoure les régions centromériques servait de barrière à la propagation de marques activatrices des centromères associée à leur transcription pendant la mitose (Janssen, Colmenares, et Karpen 2018).

Dans des organismes modèles, la perturbation des voies qui maintiennent l'hétérochromatine péricentrique sous une forme répressive, a été associée à l'existence d'une mauvaise ségrégation des chromosomes et au processus tumoral (Slee et al., 2012).

Chez la souris, une accumulation des transcrits centromériques induite par différents types de stress (défaut de nutriments, déméthylation de l'ADN, ou inducteurs de l'apoptose) mais également grâce à une expression ectopique de ces mêmes transcrits, altère l'architecture et la fonction des centromères (Bouzinba-Segard et al., 2006). On observe dans les cellules des

défauts de ségrégation des chromosomes avec perte de cohésion des chromatides sœurs, et une perte de marques répressives H3K9Me3 et HP1 (Bouzinba-Segard et al., 2006). Une autre étude décrit également l'apparition de défauts mitotiques (chromosomes retardataires) dans deux modèles de fibroblastes embryonnaires de souris et de cellules HeLa humaines, Knock-Down pour DICER ou AGO2. Dans ces cellules, les défauts sont associés à une accumulation de transcrits centromériques (alpha-satellite) et à une perte d'intégrité structurale des centromères (Huang et al., 2015). A l'inverse, une étude rapporte que la perte de marques répressives observée dans les cellules de souris *Dicer* *-/-*, également associée à une accumulation de transcrits d'origine centromériques, n'est pas corrélée à une augmentation d'instabilité chromosomique (Kanellopoulou et al., 2005).

Très récemment, une étude réalisée chez la souris, décrit également une instabilité chromosomique associée à une dérégulation de séquences satellite péricentriques spécifiques du chromosome 9 murin dans des cellules ES *dicer* *-/-* (Gutbrod et Martienssen 2022).

Pour finir, une étude récente réalisée dans des cellules humaines a également mis en évidence l'implication d'un excès de transcrits *SATIII* dans l'instabilité chromosomique associée aux chromosomes mitotiques de cellules stressées. Une fraction significative des cellules mitotiques soumises à un stress présente des chromosomes retardataires et des ponts chromosomiques associés à des ARN *SATIII* (Giordano et al., 2020).

CHAPITRE II Matériel et Méthodes

Culture Cellulaire

Lignées cellulaires, Stress thermique et récupération :

Lignée	Description	Provenance	Stress Thermique
HeLa	Cellules humaines cancéreuses de l'utérus	ATCC	30min, 43°C
HeLa KD HSF1	Lignée stable HeLa n'exprimant pas HSF1	Laboratoire L. Sistonen (Turku, Finlande)	30min, 43°C
HeLa GFP-HSF1	Lignée stable HeLa exprimant la protéine de fusion GFP-HSF1	Herbomel et al. (Journal of Microscopy, 2016)	30min, 43°C
HeLa GFP-H2A	Lignée stable HeLa exprimant la protéine de fusion GFP-H2A	Herbomel et al. (Journal of Microscopy, 2016)	30min, 43°C
HeLa Kyoto	Lignée stable HeLa exprimant les protéines de fusion GFP-tubuline et RFP-H2A	ATCC	30min, 43°C
HeLa S3	Cellules humaines cancéreuses de l'utérus, mais non -adhérentes	ATCC	120min, 43°C
HFF2-TERT	Fibroblastes humains normaux et immortalisés par TERT	A. Decottignies (Institut de Duve, Belgique)	45min, 43°C
H460	Cellules humaines du cancer du poumon non à petites cellules	ATCC	30min, 43°C
H538	Cellules humaines du cancer du poumon non à petite cellules	ATCC	30min, 43°C
H1299	Cellules humaines du cancer du poumon non à petite cellules	ATCC	30min, 43°C
HCT116	Carcinome épithélial de colon	Dr Bert Volgenstein (John Hopkins University, USA)	30min, 43°C
HT1080	fibrosarcome humain	ATCC	30min, 43°C
Hybridome chromosome 1,9, ou Y	Lignée de hamster avec un chromosome humain sur numéraire	Mariano Rocchi, Bari, Italy	30min, 43°C

Les cellules ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO₂ dans un incubateur humide, dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, glucose 4.5g/L) (Gibco) complété par 2% glutamate (Gibco) et 10% SVF (Sérum de veau fœtal décomplémenté 30min à 55°C) (Gibco). La lignée HeLa KD HSF1 a été cultivée dans du milieu complet enrichi à 0.4% avec de la généticine (Thermofisher).

-Les cellules ont été soumises à un stress thermique continu de 30, 45 ou 120min à 43°C selon les lignées, afin de garantir les conditions optimales de la réponse au stress.

La récupération au stress s'est faite en condition normale de culture, à 37°C et 5% CO₂ dans un incubateur humide, pendant des temps variant de 1h à 48h.

Liste des réactifs :

Produit	Fournisseur	Reference
2SSC	SIGMA	S6639
Actinomycine D	SIGMA	SBR00013
BRDU	SIGMA	QIA58
BSA	EUROBIO	GAUBSA01
DMEM	Gibco	21969-035
Formamide	EUROMEDEX	R1117
Geneticine	Gibco	20164505
HCl 37%	Carlo Erba	40387
Iodure de propidium	SIGMA	P4864
NP40	SIGMA	8896
Paraformaldehyde	SIGMA	F6775
PBS	Gibco	14190-094
RNase	SIGMA	R5125
Saponine	SIGMA	S7900
SVF	Carlo Erba	10266106
Thymidine	SIGMA	T1896
Triptoloïde	Calbiochem	645900
Triton x-100	SIGMA	T6767
Trizol	Thermofisher	16596018

Cytométrie en flux

Pour chaque type d'analyse, l'intensité de fluorescence des cellules marquées (50000 cellules par conditions) est détectée par un cytomètre en flux BD FACS Accuri C6 et les données obtenues sont ensuite analysées avec le logiciel FCS express7.

Analyse du cycle cellulaire

Blocage des cellules :

Les cellules sont synchronisées en fin de phase G1/début de phase S par double blocage à la thymidine (SIGMA). Après avoir étéensemencées à 20% de confluence (500 000 cellules pour une flasque de type T25), les cellules sont traitées avec 2mM final de thymidine pendant 18h, puis lavées dans du PBS et replacées dans un milieu normal. 9h après la levée du blocage, les cellules sont de nouveau incubées avec de la thymidine 2mM pendant 17h, puis lavées dans du PBS et replacées dans des conditions de culture normales.

Knock Down des transcrits SATIII.

Les cellules HeLa sont transfectées de manière transitoire par des LNA spécifiques des séquence sens ou antisens des transcrits SATIII (LNA 21as et LNA 21s respectivement) ou par un LNA contrôle (LNA-GFP). Les cellules sont transfectées par 0.02µM de LNA avec de la lipofectamine RNAimax (Invitrogen), selon la notice d'utilisation du fournisseur, pendant 5h30, sur des cellules confluentes à 30%. Dans les cellules synchronisées par double blocage à la thymidine, la transfection est effectuée dès le dernier relargage de la thymidine.

Séquence des LNA {LNA}DNA{LNA} :

LNA-sens {ATTCC}ATTCCATTCC{ATTCC}

LNA-antisens {GGAAT}GGAATGGAAT{GGAAT}

LNA-GFP {CCCGC}GCGTCACATT{TAGCG}

Collecte des cellules :

Afin d'analyser leur cycle par cytométrie en flux, après synchronisation, les cellules sont soumises ou non à un stress thermique, puis collectées toutes les heures pendant 24h.

Les cellules (une T25 par condition) sont trypsinées, centrifugées à 1500 rpm, lavées dans 1 mL de PBS et fixées dans 1mL l'éthanol 70 % froid. Après avoir incubées une nuit à 4°C, les cellules sont lavées et le culot repris dans 500µL d'une solution PBS/ 0.05mg/ml Iodure de propidium/0.2mg/mL RNase et incubées à 37°C pendant 30min.

Analyse du taux d'apoptose cellulaire après Stress thermique

Les cellules sont synchronisées, et stressées ou non thermiquement en fin de phase G2. Après 24h de récupération, les cellules sont collectées (trypsinées, centrifugées, lavées au PBS), et doublement marquées à l'iodure de propidium et à l'annexine V FITC, (kit Invitrogen #V13241) selon la notice d'utilisation du fournisseur.

Analyse du devenir des cellules mitotiques par incorporation de BRDU :

Après synchronisation, 200 000 cellules par condition (cultivées dans un puits d'une plaque 6 puits) sont traitées pendant leur phase S à 37°C avec 5µM final de BRDU. Après 20min d'incubation, les cellules sont lavées et remises en conditions normales jusqu'à atteindre la phase G2, puis soumises ou non à un stress thermique. Après 24h de récupération au stress, les cellules sont trypsinées, lavées au PBS/ 0.1% glucose) et fixées à l'Ethanol 70% froid sur la nuit. Une fois culotées (5 min de centrifugation à 2000rpm) les cellules ensuite perméabilisées (2mL pour 100000 cellules d'acide chloridrique 4N, pendant 15min à température ambiante), centrifugées (5min, 2000rpm) et re suspendues dans un volume équivalent de tétraborate de sodium 1M pH, puis lavées 3 fois avec un volume d'une solution de lavage (PBS/glucose 0.1%/BSA) par centrifugation (5min, 2000rpm).

Les cellules sont incubées 45min avec 100µL anticorps anti-BRDU (Life Technologies) dilué au 1/100 dans la solution de lavage, centrifugées (5min, 2500rpm) 3 fois avec 1mL de solution de lavage, et incubées à nouveau 30min avec 100µL d'une solution d'anticorps secondaire (Life Technologies Alexa 647). Après 3 lavages successifs dans de la solution de lavage, le culot est repris dans une solution PBS/iodure de propidium (SIGMA)/RNase (SIGMA) et incubé 30min à 37°C. L'intensité de fluorescence des cellules est déterminée par cytométrie en flux (FACS ARIA Accuri6), les données obtenues sont ensuite analysées avec le logiciel FCS express.

Analyses in situ

Marquage Immunofluorescent (IF)

50 000 cellules sont ensemencées sur des lamelles de verres (18mm de diamètre) préalablement stérilisées à l'éthanol 70%, dans des plaques 24 puits. Après 24h, les cellules sont lavées au PBS, fixées dans une solution PBS/ Paraformaldéhyde 4% pendant 10min sous

agitation, lavées 3 fois 5min dans du PBS et perméabilisées dans une solution PBS/0.5 % saponine/0.5% Triton X-100, pendant 15 min sous agitation.

Après trois lavages successifs dans du PBS, les cellules sont saturées 30min à 37°C dans une chambre humide dans une solution de blocage (PBS/0.3% Triton X-100/10% SVF), puis incubées 1h dans les mêmes conditions avec un anticorps dilué dans une solution de lavage (PBS/ 0.3%Triton X-100/ 2% SVF).

Les cellules sont ensuite lavées 3 fois 5min avec de la solution de lavage à 42°C sous agitation puis incubées avec une dilution d'anticorps secondaire couplé à un fluorophore, dans la solution de lavage, 30min à 37°C dans une chambre humide. Après 3 nouveaux lavages de 5min à 42°C, les lamelles sont montées sur des lames porte-objets avec du milieu de montage DAKO (*Dako*) contenant du DAPI.

Fluorescent *In Situ* Hybridization (FISH)

La synthèse des oligonucléotides fluorescents cy3 a été réalisé à Toulouse (J.-M. Escudier Plateforme de synthèse d'Oligonucléotides modifiés de l'Interface Chimie Biologie de l'ITAV-Toulouse-France)

Préparation des sondes (pour une lamelle)

100ng de sonde et 10µg d'ADN de sperme de saumon (Invitrogen) sont précipités dans 50µL d'acétate de sodium 0.3M pH 5.2, auxquels 2 volumes d'Ethanol absolu (100µL) sont ajoutés. Après 30min d'incubation à -20°C, la sonde est centrifugée 20min à 4°C 12000 rpm, lavée à l'éthanol 70%, centrifugée 10min à 4°C 12000 rpm, puis le culot est séché et repris dans 10µL d'une solution 2SSC/ 50%formamide/ 20% dextran sulfate pour les FISH ADN ou 2SSC/ 20% formamide/ 20% dextran sulfate pour les FISH ARN. Avant l'hybridation, la sonde est dénaturée 5min à 75°C puis plongées 2min dans la glace.

Liste des anticorps

Cible	Espèce	Application	Dilution	Référence
HSF1	Lapin	IF	1/200	Stressgen ADI-SPA-901
HSF1	Lapin	WB	1/1000	Cell signalling 4356
HSF1	Souris	IF	1/100	Santa Cruz sc-17757
HP1 α	Souris	IF-WB	1/250-1/5000	Euromedex 2HP-1H5-AS
H3	Lapin	CHIP-WB	3 μ g/IP-1/2000	Abcam ab1791
H3K9me3	Lapin	IF	1/250	Upstate 07-523
H3K9me3	Lapin	CHIP-WB	5 μ g/IP-1/5000	Abcam ab8898
BRDU souris	Souris	Cytométrie	1/20	Invitrogen B-35141
Tubuline	Souris	WB	1/5000	Sigma T5168
Lapin Dylight 549	Chèvre	IF	1/1000	Vector DL-1549
Lapin Alexa 488	Chèvre	IF	1/500	Invitrogen A-11034
Souris Alexa 647	Chèvre	IF	1/500	Invitrogen A-21236
Souris Alexa 488	Chèvre	IF	1/500	Invitrogen A-11029
Lapin HRP	Chèvre	WB	1/5000	GE Healthcare NA934V
Souris HRP	Mouton	WB	1/5000	GE Healthcare NA931V

Liste des sondes

Nom	Séquence	Cible	Marquage
14as (9q12)	TCCATTGCATTCCATTTCGATTCC ATTCGATTGCACTCGGGTTGATT	<i>SATIII</i> sens chromosome 9	Cyanine3/Alexa 488
21s	GGAATGGAATGGAATGGAAT GGAATGGAATGGAATGGAATGG AAT GGAAT	<i>SATIII</i> antisens(ggaat)n	Cyanine 3
21as	TGATGATTCCATTTCGATTCCGTT CAATGATTATTCCATTTCGAGTCT TCGT	<i>SATIII</i> sens	Cyanine 3
23as (1q12)	TGATGATTCCATTTCGATTCCGTT CAATGATTATTCCATTTCGAGTCT TCGT	<i>SATIII</i> sens chromosome 1	Cyanine3
DYZ1	3564 bp centromère du chromosome Y (Nakahori et al., 1986)	Centromère du Y	Double brin biotinylé

FISH ADN (Sonde oligonucléotide)

Les cellules sont ensemencées sur des lamelles de verre et soumises ou non à un stress thermique suivi ou non d'une période de récupération.

Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées selon le protocole utilisé pour le marquage immunofluorescent. Après le dernier lavage, les cellules sont déshydratées avec des bains successifs de 5min dans de l'éthanol 70, 90 et 100%, puis séchées à l'air ambiant.

Sonde et cible sont ensuite dénaturées entre lames et lamelle 6min à 86°C sur une plaque chauffante, puis incubées sur la nuit à 37°C dans une chambre humide à l'abri de la lumière.

Les cellules sont ensuite lavées 3 fois 5min à 45°C avec une solution 2xSSC/60% formamide, puis 3 fois 5min avec une solution 0.1xSSC (SIGMA) et enfin montées sur lame avec du DAKO/DAPI.

FISH ADN (Sonde double brin)

Avant précipitation, la sonde doit être biotinylée suivant les instructions du fournisseur (Kit Invitrogen- BioPrime DNA labelling system 18094-011).

Après hybridation et lavages (voir FISH ADN), les cellules sont bloquées 30 min à 37°C, en chambre humide dans une solution 4xSSC/3%BSA/0.1%Tween, puis de nouveau 30 min dans la même solution contenant une molécule d'avidine couplée à un fluorophore (Avidine -TRITC ou Avidine-FITC) (SIGMA) diluée au 1/100. Les cellules sont lavées 3 fois 5min à 45°C avec une solution 4xSSC/0.1% tween, puis sur lame avec du DAKO/DAPI.

IF suivie d'un FISH ADN

Les cellules sont fixées dans PBS/Paraformaldéhyde 4% 10min, lavées 3 fois 5min dans du PBS, perméabilisées 5min dans une solution PBS/0.1% Triton X-100, lavées 3 fois 5min dans du PBS. Les cellules sont ensuite saturées 15min dans une solution PBS/1%BSA, incubées 45min en chambre humide avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS/1% BSA, lavées 3 fois 5min dans du PBS, puis incubées 40min en chambre humide avec un anticorps secondaire dilué dans du PBS/1% BSA. Après 3 lavages au PBS, les cellules sont de nouveau fixées 10min au PBS/PFA 4%, lavées 3 fois 5min au PBS puis incubées 2 fois 10min dans une solution 2xSSC. Les cellules sont dénaturées entre lame et lamelle dans une solution 2xSSC/50% formamide, 10min à 80°C, puis lavées 3 fois 5min sur glace avec du 2xSSC froid. Les cellules sont incubées avec une sonde préalablement précipitée et dénaturée, à 37°C en chambre humide sur la nuit, puis

lavées 3 fois 5min à 45°C (2xSSC/50% formamide), et 3 fois 5min à 45°C (2xSSC), et enfin montées sur lame avec du DAKO/DAPI.

FISH ADN préservant les structures tridimensionnelles

Les cellules sont lavées au PBS, fixées dans une solution PBS/ Paraformaldéhyde 4% pendant 10min sous agitation, lavées 3 fois 5min dans du PBS et perméabilisées dans une solution PBS/0.1 % saponine/0.1% Triton X-100, 10 min, puis lavées 5min dans du tris HCl 0.1M pH5.2. Les cellules sont équilibrées dans une solution de PBS/glycérol 20% pendant 20 min et sont soumises à 3 cycles de congélation/ décongélation dans l'azote liquide.

Elles sont immergées dans de l'acide chlorhydrique 0.1M pendant 10min, puis de nouveau perméabilisées dans une solution PBS/0.5 % saponine/0.5% Triton X-100 pendant 10min. Après plusieurs lavages au PBS, l'ADN cible des cellules est dénaturé à 73°C (2min 30 sec à 73°C dans 2xSSC/70% formamide et 10min dans 2xSSC 50% formamide). Les cellules sont incubées avec une sonde préalablement précipitée et dénaturée, à 37°C en chambre humide sur la nuit, puis lavées 3 fois 5min à 45°C (2xSSC/50% formamide), et 3 fois 5min à 45°C (2xSSC), et enfin montées sur lame avec du DAKO/DAPI.

FISH ARN et FISH ARN suivi d'IF (sonde oligonuléotidique)

Les cellules sont fixées et perméabilisées selon le protocole de marquage immunofluorescent, puis déshydratées dans des bains successifs d'éthanol (50%, 90%, 100%), puis séchées à l'air ambiant. Les cellules sont incubées avec une sonde préalablement précipitée et dénaturée, à 37°C en chambre humide sur la nuit, puis lavées 3 fois 5min dans une solution 2xSSC/15% formamide et 3 fois 5min dans une solution 1xSSC. Les cellules sont montées sur lame avec du DAKO/DAPI, ou lavées au PBS et post fixées 10min au PBS/PFA 4% en cas de coupage avec un marquage immunofluorescent.

Observations microscopiques et analyses d'image

Cellules fixées

Les observations se font avec un microscope droit Zeiss AxioImager ZI, pseudo confocal 3D par système d'excitation structurées ApoTome, avec un objectif à immersion 63x/1.4, ou à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser biphotonique Zeiss LSM NLO & SPECTRA PHYSICS,

avec un objectif Plan-Apochromat 63x/1.4 oil. Les analyses d'images sont effectuées à l'aide des logiciels FIJI, ICY, Volocity, LSM510 et AxioVision.

Cellules vivantes

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de pétri P10 (Biotech ou Ibidi), puis soumises ou non à un choc thermique sur plaque chauffante, elles sont ensuite observées sous un microscope inversé, avec une acquisition toutes les 30 ou 15min pendant 24 à 48h.

Les acquisition sont réalisées sur un vidéomicroscope à épifluorescence rapide, statif inversé motorisé Zeiss AxioVert 200M , complémenté d'un insert chauffant et incubateur CO₂ sur-platine, avec un objectif LD Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr, ou sur un vidéomicroscope OBFR (Optogénétique Bi-Focal Rapid) : microscope confocal rapide (Spinning Disk), inversé motorisé iMIC 2.0, stabilisateur de focus FEI, sur-platine chauffante avec mini incubateur CO₂ (Ibidi) insert chauffant pour choc thermique (Biotech), avec un objectif Plan Apochromat 40x/1.4 OIL-DIC M27 WD0.13mm.

Les analyses d'images sont effectuées à l'aide des logiciels FIJI, ICY, MetaMorph, ou ZEN.

Analyse par western blot

Après lavage au PBS les cellules sont collectées, centrifugées (5min 2500 rpm, 4°C) et lysées dans un tampon NP40 (Tris 20mM pH7.5, NaCl 150mM, EDTA 2mM, NP40 1%) 30min dans la glace.

Les cellules sont ensuite soniquées pendant 5min (30 sec in/ 30sec off) puis centrifugées 20min à 4°C, 14000 rpm. Le surnagent contenant les extraits protéiques totaux est dosé selon la méthode spectrophotométrique de Bradford. 10µg d'extrait protéiques sont chargés et séparés par électrophorèse en condition dénaturante (SDS PAGE) sur un gel d'acrylamide 8% (migration 1h30, 150V) dans du tampon TGS (Tris/Glycine/SDS). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (1h, 100 V).La membrane est saturée (PBS /5% lait) 30min puis incubées sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS/Tween 0.1%, après 3 lavages de 10min dans du PBS/Tween 0.1%, la membrane est incubée 30min à température ambiante avec anticorps secondaire couplé à une peroxydase (HRP), dilué dans du PBS-Tween 0.1% , après trois lavages successifs, la membrane est incubée 5min avec de l'ECL (GE Healthcare) et le signal chimioluminescent est détecté par un ChemiDoc MP system (BioRAD). L'intensité du signal est quantifiée avec le logiciel FIJI.

Analyse par Northern blot

Après avoir extrait les ARNs totaux de cellules HeLa (20 millions de cellules par condition), avec du TRIZOL selon les recommandations du fournisseur, 10µg d'ARN dans un tampon Formamide/2x SSC ont été dénaturés à 70°C, chargés sur un gel d'acrylamide 2% et séparés par électrophorèse (5h à 100V). Les ARNs ont ensuite été transférés pendant une nuit par capillarité sur une membrane de transfert en nylon chargée positivement (GE Healthcare), et « cross-linkés » aux UV avec un UV-stratalinker (Stratagene). Les *SATIII* sens et antisens ont été détectés à l'aide d'une sonde oligonucléotidique spécifique (14as ou 21s) marquée au 32P-ATP par la polynucléotide kinase T4 (NEB) et purifiée avec des colonnes illustra microspin G-25 (GE Healthcare). Les hybridations ont été réalisées en utilisant le tampon UltraHyb (Ambion) pendant 16-18h à 45°C ou 50°C. Les membranes ont été lavées dans 2x SSC/0,1% SDS pendant 10min à température ambiante et dans 0,2x SSC/0,1% SDS pendant 20min à 50°C. Les images ont été capturées avec un Phosphorimager (BioRad).

CHAPITRE III : RESULTATS

Introduction au travail de thèse

Depuis la découverte concomitante par notre groupe (Jolly, Metz, Govin, Vigneron, Turner, Khochbin, et Vourc'H 2004) et celui de Giuseppe Biamonti (Rizzi et al., 2004) d'une activation transitoire des séquences satellites d'origine péricentrique au locus 9q12 au cours du stress thermique, les travaux effectués ont été essentiellement centrés sur les mécanismes d'activation de ce locus et plus récemment sur le rôle de ces transcrits au cours de la période d'activation ou de récupération précoce.

Le travail présenté ici concerne principalement le devenir et le rôle de ces transcrits au cours de la période de récupération tardive au stress. Il a été réalisé dans la continuité de travaux non encore publiés, obtenus dans le cadre de la thèse de Jessica Penin (Penin 2016) au laboratoire. Des observations préliminaires réalisées dans le cadre de cette thèse, ont mis en évidence l'existence d'un profil d'expression original des séquences péricentriques caractérisé par une transcription du locus 9q12 dans deux orientations opposées, à des temps différents de la période de récupération. Une accumulation dans un premier temps de transcrits riches en éléments de répétition (GGAAU)_n, transcrits « riches en bases G » qui s'accumulent majoritairement en réponse à un stress thermique, et appelés transcrits en orientation sens. Dans un second temps, une accumulation de transcrits riches en éléments de répétition (AUUCC)_n, transcrits riches en bases C que nous appelons transcrits en orientation antisens (Figure 27). Par ailleurs, ces travaux avaient également permis de mettre en évidence une perte de marques répressives au locus 9q12 activé, (Penin 2016 ; Col et al., 2017).

L'objectif de mon travail a été dans un premier temps d'élargir ces données obtenues dans les cellules HeLa à d'autres lignées cellulaires.

Nous avons également cherché à établir le lien entre l'évolution du statut chromatinien au locus 9q12 au cours de la réponse au stress d'une part et, la cinétique d'accumulation des transcrits *SATIII* sens et antisens d'autre part. Nous nous sommes concentrés en particulier à la cinétique de remise en place des marques répressives au locus 9q12. Ce travail a été dans un premier temps réalisé sur des cellules non synchronisées et a été ensuite complété par une étude sur des cellules synchronisées avec une attention particulière portée à la transition G2/M/G1 du cycle cellulaire.

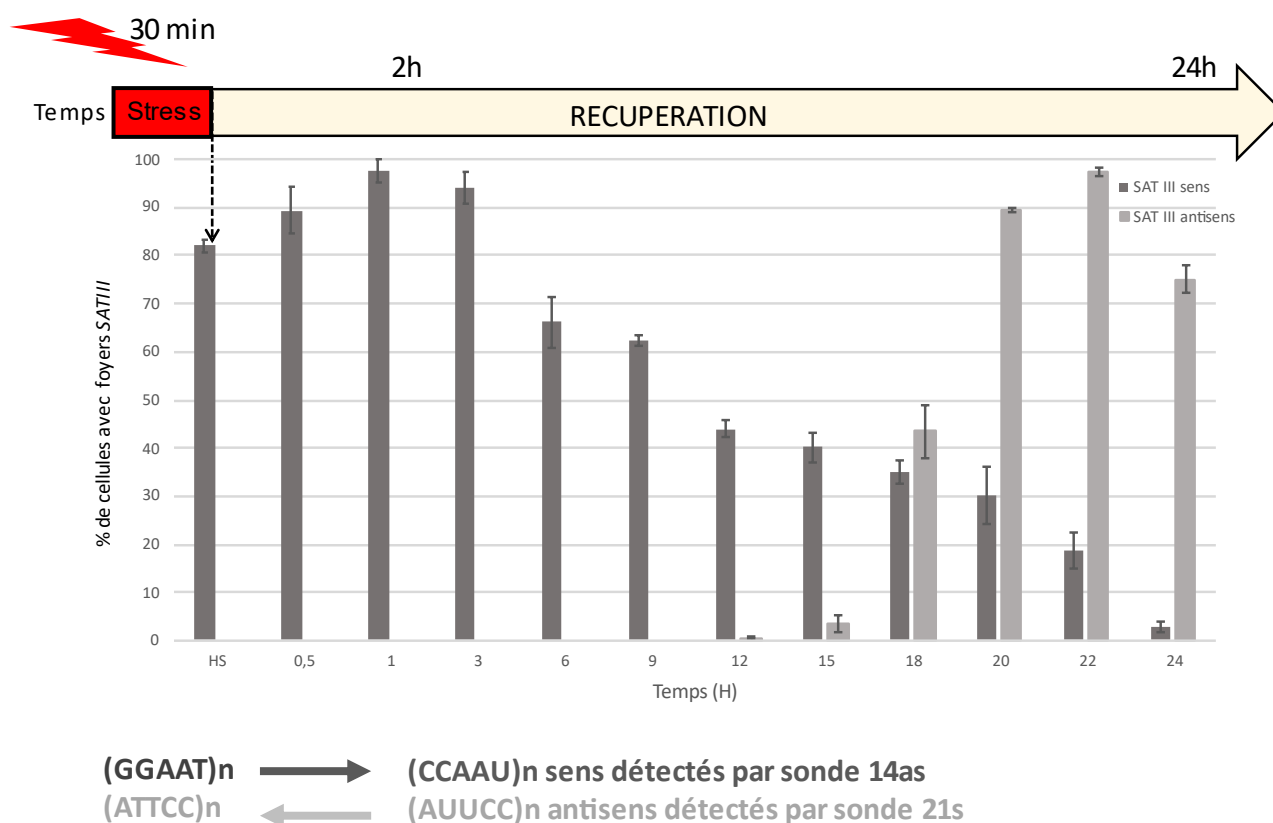


Figure 27 : Cinétique d'accumulation des deux types de transcrits SAT III (sens et antisens) dans le noyau de cellules HeLa stressées et soumises à une période de récupération.

Les transcrits sont détectés par FISH ARN et microscopie à fluorescence avec des sondes oligonucléotidiques marquées. Pour chaque temps de la cinétique analysée, le pourcentage de cellules exprimant les transcrits est déterminé à partir de 100 noyaux, et sur la base de 3 expériences indépendantes (total de 300 noyaux analysés par condition).

Chez la levure *S.Pombe*, des ARNs d'origine centromérique ont en effet été décrits pour leur rôle dans la mise en place et le maintien des marques répressives à la chromatine (pour revue Verdel, 2011). De même, chez la souris, la mise en place de marques répressives au cours des premières étapes du développement embryonnaire met en jeu des ARNs d'origine péricentriques, également exprimés dans les deux orientations sens et antisens (Probst et al. 2010). Les régions péricentriques constituent les derniers points de cohésion entre les chromatides sœurs au cours de la mitose. Nous avons cherché à déterminer l'impact de la perte des marques répressives associées à ces régions au cours de la transition G2/M/G1 et le rôle sur la ségrégation des chromosomes en mitose.

Ce travail repose essentiellement sur des approches *in situ*. Le locus 9q12 a été décrit comme une cible majeure du facteur de transcription HSF1 au cours d'un stress. La taille de cette région (estimée dans les dernières publications de séquençage à plusieurs Mb) permet une analyse *in situ* des événements associés à leur activation (recrutements de facteurs de transcription, de cofacteurs), et une caractérisation *in situ* de la nature des marques épigénétiques présentes lors de la période d'activation de remise sous silence du locus. Les approches *in situ* présentent un avantage dans la détection des séquences répétées pour lesquelles les approches par PCR sont délicates à mettre en œuvre. Elles permettent de rendre compte d'une éventuelle hétérogénéité d'expression au sein d'une population de cellules. Nous avons dans un dernier temps du travail, cherché à évaluer le rôle d'un knock-Down de l'expression des ARNs *SATIII* dans leur orientation sens et antisens par des approches LNA. Parallèlement à ce travail, j'ai contribué à plusieurs travaux de recherche qui sont présentés en annexe de ce travail.

Le premier travail « *Bromodomain factors of BET family are new essential actors of pericentric heterochromatin transcriptional activation in response to heat shock* » publié dans la revue « *Scientific Report* » dans lequel j'apparais en tant que troisième co-auteur concerne la caractérisation du rôle des protéines à bromodomaine dans l'activation des séquences satellite par le facteur HSF1. Dans ce travail, j'ai réalisé la caractérisation *in situ* des transcrits *SATIII* et *HSP70* par FISH dans les cellules traitées ou non par un inhibiteur de protéines à bromodomaine. Ce travail montre un rôle essentiel de ces protéines à bromodomaine dans l'activation des régions péricentriques et dans le recrutement de l'ARN POLII au locus activé, et souligne le rôle facultatif du bromodomaine dans l'activation des gènes *HSPs*, dont la transcription est déjà engagée (Col et al., 2017).

Le second travail dans lequel j'apparais en tant que premier coauteur, publié dans la revue « *Chromosoma* », concerne la caractérisation d'une nouvelle cible du facteur HSF1 au locus Yq12. Mon implication dans ce travail a concerné la caractérisation du facteur HSF1 sur le chromosome Y de cellules tumorales humaines de poumon, les cellules de la lignée H460. Il montre que le ciblage d'HSF1 sur le chromosome Y, qui avait été décrit dans une lignée de cellules humaines de carcinome, la lignée HT1080, n'est pas une caractéristique de ces seules cellules puisque nous observons dans les cellules H460, des foyers HSF1 également au niveau des régions péricentriques du chromosome Y. L'analyse des cellules H460 permet également de confirmer que la nature précise du chromosome ciblé par HSF1 (chromosome 9 ou/et Y)

n'est probablement pas déterminante, au regard de la fonction des nSBs dans les cellules stressées (Penin et al. 2021). En effet, certaines cellules H460 ne présentent des nSBs qu'au niveau du chromosome Y ou du chromosome 9, d'autres présentent des nSBs au niveau des chromosome 9 et Y. Ma contribution à ce travail a permis également de montrer que l'activation des séquences satellites dans ces cellules était associée à un retard dans la transition G2/M, mais n'était pas associée à une instabilité chromosomique.

Enfin, j'ai été impliquée dans un travail consacré à l'analyse du rôle de la protéine YTHDC1, une protéine de liaison aux adénosines méthylées, dans la reprogrammation de l'expression génique au cours de la réponse au stress « Chromatin-associated YTHDC1 m6A reader coordinates heat-induced reprogramming of gene expression ». Mon expertise dans les approches *in situ*, ma connaissance du modèle de stress, et des modèles cellulaires adaptés pour cette étude, m'ont permis de mettre en évidence une relocalisation de cette protéine lors de la période de récupération au stress, et de mettre en évidence le rôle du facteur HSF1 et le rôle des ARNs *SATIII* dans cette relocalisation. Je suis second auteur de ce travail (manuscrit en révision à Molecular Cell).

Une revue intitulée « HSF1-activated non-coding stress response : from Satellite lncRNAs and beyond, an emerging story with a complex scenario » dans laquelle j'apparais comme second auteur, est également associée à ce manuscrit de thèse.

RESULTATS

Le rôle des ARNs non codants dans la mise en place de l'hétérochromatine est une question difficile à aborder expérimentalement chez les eucaryotes supérieurs. En effet ce type d'étude repose sur la possibilité de disposer d'embryons aux premiers stades du développement, et sur la capacité de réaliser des analyses *in situ* sur un matériel biologique difficile à obtenir et contenant un nombre de cellules en quantité très limitée.

Au cours de cette étude nous avons choisi d'appréhender cette question dans le modèle de la réponse cellulaire au stress thermique, qui s'accompagne d'une perte et d'un retour des marques épigénétiques répressives au niveau de l'hétérochromatine péricentrique.

L'objectif de mon travail a été d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires mis en jeu dans les changements de statut épigénétique des régions péricentriques associés à la réponse au stress thermique chez l'humain.

Pour cela, nous avons étudié la remise en place de l'hétérochromatine péricentrique humaine du locus 9q12, sur une période de 24h après le stress thermique, à travers la caractérisation de deux acteurs importants de l'hétérochromatine H3K9me3 et HP1 α , en lien avec le statut des transcrits *SATIII* issus de ce locus.

Le modèle du stress thermique utilisé au laboratoire est celui d'un stress doux et non léthal, consistant à placer les cellules à 43°C pendant 30 ou 45min (en fonction des lignées cellulaires), conditions suffisantes pour obtenir une expression des transcrits *SATIII* dans quasiment 100% des noyaux.

Pour réaliser ce travail, nous nous sommes appuyés sur des données préliminaires du laboratoire, montrant la disparition progressive des nSBs et des transcrits *SATIII* dans une fenêtre de temps de 24h de récupération après 30min de stress à 43°C.

Nous avons analysé de manière spatio-temporelle le statut d'H3K9me3 et d'HP1 α , au locus 9q12, dans des cellules HeLa à différents temps d'une cinétique de récupération au stress.

Notre objectif a été de définir les profils d'expression des d'ARNs *SATIII* en lien avec la cinétique de perte et remise en place d'H3K9me3 et d'HP1 α à ce même locus. Cette relation a été analysée en combinant les approches d'hybridation *in situ* pour la détection d'ARN (RNA FISH) et d'immunofluorescence.

III-A- Expression des ARNs *Satellite III* au cours de la réponse au stress (HSR).

III-A-1 Les ARNs *SATIII* sens et antisens sont transcrits à partir de loci communs.

Dans un premier temps nous avons vérifié, par des approches *in situ*, l'origine des transcrits *SATIII* dans les deux orientations (sens et antisens) lorsqu'ils sont surexprimés en réponse à un stress thermique dans des cellules HeLa.

La technique de FISH ARN (RNA Fluorescent In Situ Hybridization) permet, grâce à l'utilisation de sondes d'oligonucléotides marquées avec un fluorophore, de détecter et de visualiser de manière spécifique les transcrits *SATIII* exprimés dans chaque cellule.

Nous avons déterminé par microscopie de fluorescence le pourcentage de cellules exprimant des transcrits *SATIII* dans les orientations sens (transcrits riches en éléments de répétition GGAAU) et antisens (transcrits riches en éléments de répétition AUUCC).

Le caractère répété des séquences péri-centriques chez l'homme, permet l'utilisation de petites sondes (50 mers) fluorescentes très spécifiques et visibles en microscopie. Au laboratoire, nous disposons de sondes capables de reconnaître des éléments de répétition uniquement présents au niveau des séquences péri-centriques du chromosome 9 (14s ou 14as) et de sondes spécifiques des régions péri-centriques riches en séquences *SATIII* qui reconnaissent des éléments de répétitions communs au chromosome 9 et aux autres chromosomes (voir la note plus bas) (sondes 21s ou 21as).

L'intensité des signaux d'hybridation obtenus est en principe corrélée avec le niveau d'expression des transcrits. La sonde utilisée pour détecter les transcrits *SATIII* antisens (sonde 21s) n'est pas chromosome spécifique. Nous ne connaissons pas en effet à ce jour la séquence exacte des transcrits antisens issus du chromosome 9. L'utilisation d'un oligonucléotide porteur du motif répété GGAAT nous a semblé pour cette raison, préférable pour détecter les transcrits *SATIII* antisens. Ce choix présente en outre l'avantage d'éviter une cross-hybridation des sondes utilisées pour la co-détection des transcrits dans une orientation sens et antisens, susceptible de créer un biais d'interprétation.

Fragment de séquence SATIII spécifique du chromosome 9 humain (en rouge les motifs de répétition communs à tous les chromosomes) :

aatcaaccgagtgcaatcgaatggaatcgaatgaatggaatgcaatggaatggattcacttgaatggaatggaaagaatggaatc
aacacgagtggaatggcatggattggaatggaatggaatggaatcaaccgagtacaggaaatggaatggaa

Sondes utilisées pour la détection des ARNs :

14as : ttccattcattcgattccattcgattgcacacgggttgatt (reconnait les transcrits SAT III sens « G-rich » spécifiques du chromosome 9)

21s : (ggaat)n (reconnait les transcrits SATIII antisens « C-rich »)

21as : (attcc)n (reconnait les transcrits SATIII sens « G-rich »)

L'utilisation simultanée de ces deux sondes (14as et 21s), par FISH ARN permet d'étudier la cinétique d'accumulation des ARNs SATIII sens et antisens en réponse à un stress thermique. La sonde 21as permet une détection des transcrits SATIII sens avec une meilleure sensibilité car les transcrits issus des régions péri-centriques sont très riches en motifs « GGAAT ». En revanche, seule la sonde 14as permet la détection spécifique des transcrits SATIII issus du locus 9q12.

Note au sujet des sondes nucléiques fluorescentes utilisées dans ce travail

Les SATIII sens induits par le stress restent localisés à leur région génomique d'origine, majoritairement au niveau du locus 9q12. La détection simultanée des transcrits SATIII sens et antisens par FISH ARN montre l'existence d'une colocalisation entre certains signaux de fluorescence des transcrits sens avec des transcrits antisens (Figure 28). Il semble donc les régions activées en réponse à un stress thermique soit transcrites dans les deux orientations, sens et antisens

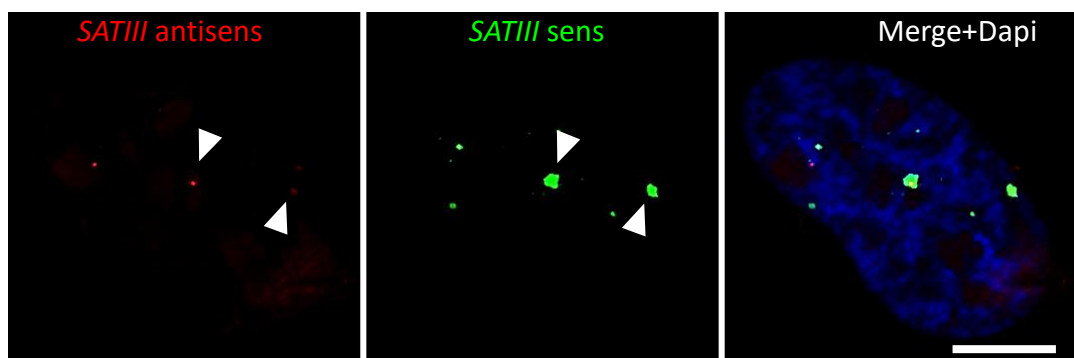


Figure 28 : Les transcrits SATIII sens et antisens sont produits à partir des mêmes régions péri-centriques.

Les transcrits SATIII sens et antisens sont co-détectés par FISH ARN, dans des cellules HeLa soumises à une période de 6h de récupération après 30min de stress à 43°C, à l'aide de sondes oligonucléotidiques fluorescentes brin spécifique. Les signaux d'hybridation sont analysés par microscopie à fluorescence, (barre d'échelle 5µm).

III-A-2 Expression des séquences SATIII : deux types de transcrits, deux cinétiques d'accumulation distinctes dans le noyau des cellules stressées.

En utilisant les approches permettant la co-détection des transcrits *SATIII in situ*, nous avons analysé l'évolution de l'expression de ces transcrits dans leurs deux orientations au cours d'une période de récupération au stress de 24h dans des cellules HeLa (Figures 27 et 29). Nous avons étendu notre investigation à d'autres modèles cellulaires afin de déterminer le caractère général ou non de ces observations.

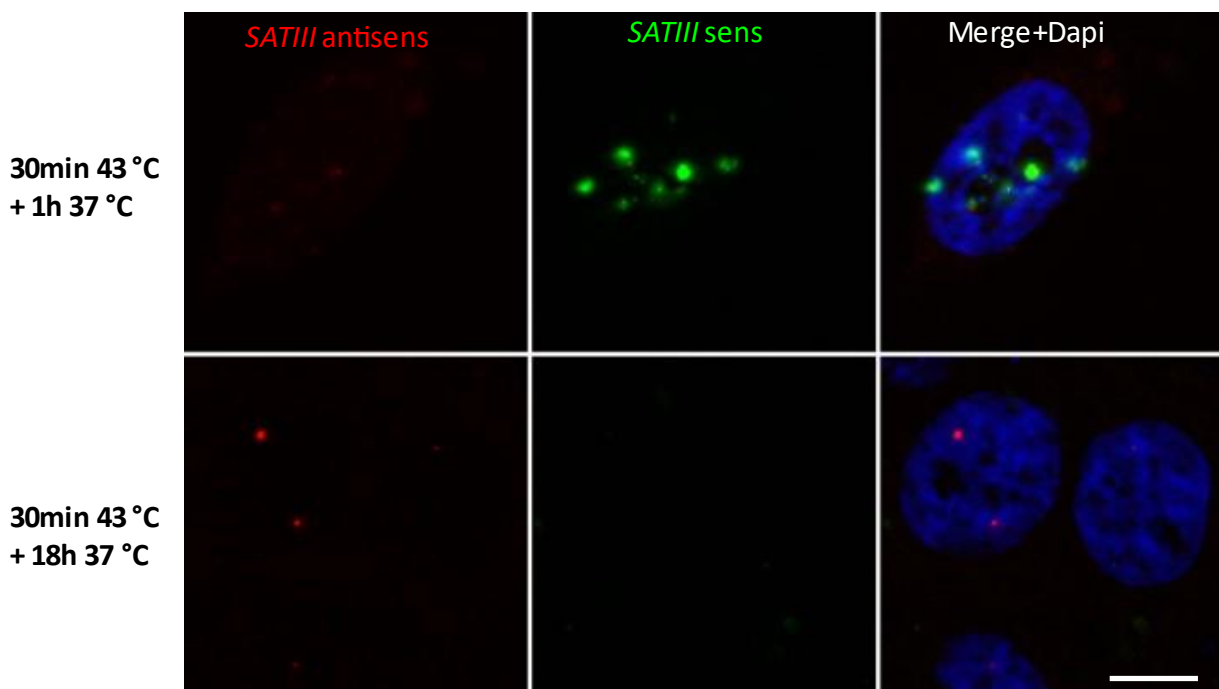


Figure 29 : Détection dans des cellules HeLa des transcrits *SATIII* sens (vert) et antisens (rouge) au cours de la récupération à un stress thermique.

Les transcrits sont détectés par FISH ARN à l'aide de sondes oligo-nucléotidiques fluorescentes dans des cellules HeLa soumises à une période de récupération précoce de 1h (haut) et tardive de 18h (bas) après un stress de 30min à 43°C. Les signaux d'hybridation sont analysés par microscopie à fluorescence (barre d'échelle 10µm).

Dans des cellules soumises à un stress thermique et à une période de récupération précoce (c'est-à-dire au maximum 2h après l'exposition au stress), une forte accumulation nucléaire de transcrits sens (signaux vert), sous forme de 3 à 4 foyers principaux (Figure 29) est observée. Les cellules HeLa sont en effet hypo-tétraploïdes et contiennent ainsi entre 3 et 4 exemplaires du chromosomes 9.

Au cours de la période de récupération comprise entre 2 heures à 24 heures, le pourcentage de cellules contenant des foyers nucléaires de transcrits sens diminue progressivement ainsi que l'intensité de fluorescence des foyers détectés (Figure 29).

Dans les cellules soumises à une période de récupération comprise entre 9 et 24h (récupération tardive), une accumulation nucléaire de la population d'ARN *SATIII* antisens (signaux rouges) est détectée (Figure 29). Le pourcentage de cellules contenant des transcrits antisens augmente avec le temps de récupération (Figure 27-voir plus haut).

Cette même analyse a été complétée sur une lignée de cellules immortalisées, la lignée HFF2, établie à partir de cellules de fibroblastes humains non cancéreux immortalisés par expression de la protéine TERT (Figure 30). Pour obtenir une réponse optimale dans ces cellules (c'est-à-dire un maximum de cellules exprimant des transcrits *SATIII* sens lors des premières heures de la HSR) nous avons allongé le temps d'exposition au stress à 43°C de 30min à 45min.

La cinétique d'apparition des transcrits *SATIII* sens et antisens est dans sa forme générale similaire à celle observée dans les cellules HeLa stressées (30min à 43°C) soumises à récupération : les transcrits sens s'accumulent dans les premières heures de récupération, puis disparaissent progressivement. A l'inverse, les transcrits antisens sont détectés plus tardivement avec une cinétique d'apparition de ces transcrits corrélée à la cinétique de disparition des transcrits sens. La cinétique de disparition des transcrits sens et la cinétique d'apparition des transcrits antisens est néanmoins plus rapide dans les cellules HFF2-TERT que dans les cellules HeLa (après une période de 9h de récupération nous ne détectons qu'un très faible pourcentage de cellules exprimant des transcrits sens dans les cellules HFF2-TERT, contre 60 % dans les cellules HeLa).

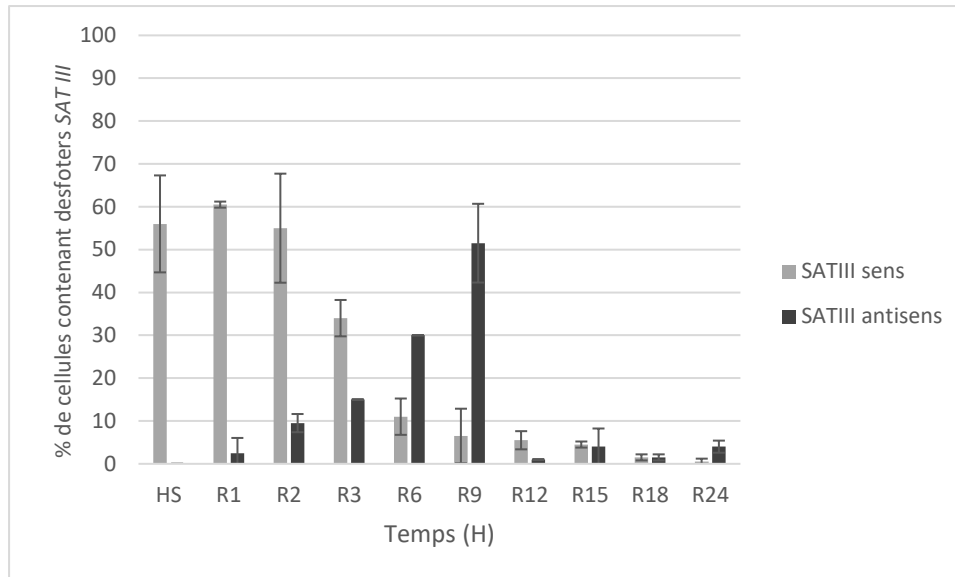


Figure 30 : Cinétique d'accumulation des transcrits SATIII (sens et antisens) dans le noyau de cellules HFF2-TERT stressées (45min, 43°C) et soumises à une période de récupération à 37°C.

Les transcrits sont détectés par FISH ARN, puis visualisés par microscopie à fluorescence. Pour chaque temps de la cinétique analysé, le pourcentage de cellules exprimant les transcrits est déterminé à partir de 100 noyaux, et sur la base de 3 expériences indépendantes (total de 300 noyaux analysés par point de cinétique).

III-A-3 Devenir des transcrits SATIII sens au cours de la récupération tardive au stress

Comme nous l'avons vu précédemment, la production cellulaire massive d'ARNs SATIII sens en réponse à un stress est transitoire. Nous nous sommes donc intéressés aux voies possibles d'élimination de ces transcrits, en adaptant notre protocole de FISH ARN afin de préserver au mieux le noyau et le cytoplasme des cellules. Les résultats obtenus indiquent une localisation cytoplasmique des ARNs SATIII sens qui est observée uniquement en récupération tardive. (Figure 31). A noter que nous avons également mis en évidence des ARNs SATIII sens cytoplasmiques dans les cellules HFF2-TERT.

Des données préliminaires obtenues au laboratoire (J. PENIN) par microscopie de fluorescence, avaient permis d'établir que le pourcentage des cellules HeLa exprimant des ARNs SATIII sens cytoplasmiques augmente avec le temps de récupération au stress (Figure 32).

Nous avons nous-même confirmé la présence de foyers enrichis en transcrits SATIII cytoplasmiques dans une orientation sens dans les cellules HFF2-TERT, suggérant l'existence d'un mécanisme de dégradation de ces ARNs dans le cytoplasme ou l'existence de vésicules assurant la sécrétion de ces transcrits par exocytose. Les images que nous avons réalisées montrent en effet la présence de signaux cytoplasmique en périphérie au niveau des

protrusion cytoplasmiques (Figure 31). Nous nous sommes donc intéressés aux voies possibles d'élimination de ces transcrits, en adaptant notre protocole de FISH ARN afin de préserver au mieux le noyau et le cytoplasme des cellules.

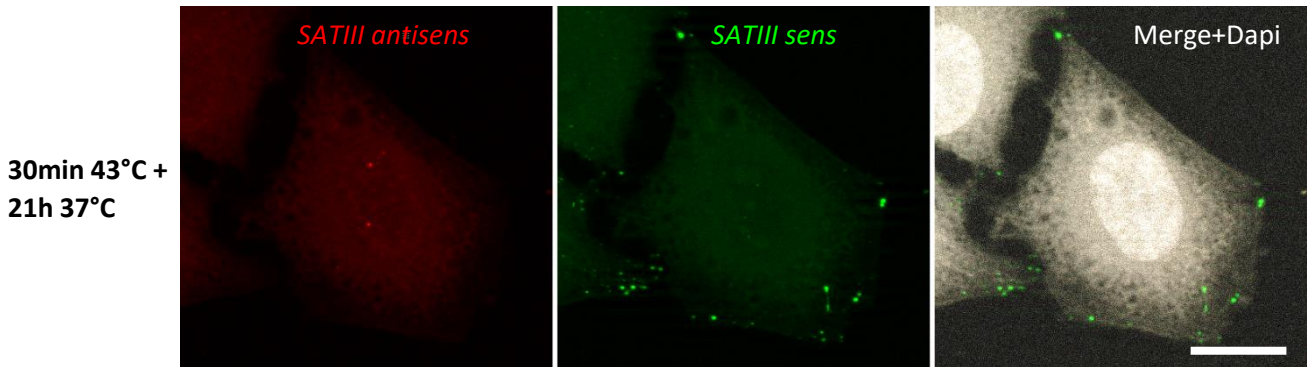


Figure 31 : Localisation cytoplasmique des *SATIII* sense à des temps de récupération tardifs au stress. Co détection des transcrits antisens (rouge) et sens (vert), 21 h après stress dans des cellules HeLa, par RNA FISH, et microscopie à fluorescence (barre d'échelle 10µm).

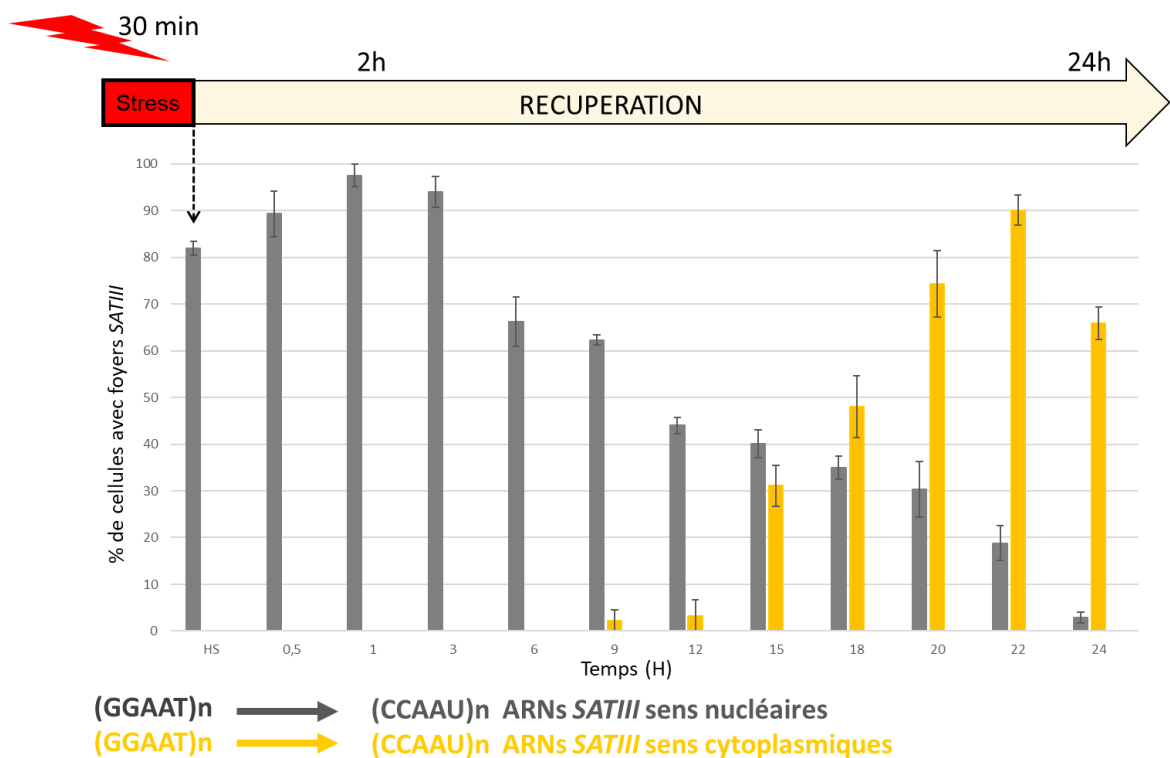


Figure 32 : Cinétique d'accumulation des deux types de transcrits *SATIII* (sens et antisens) dans le noyau de cellules HeLa stressées (45 min, 43°C) et soumises à une période de récupération à 37°C (J.Penin).

Les transcrits sont détectés par FISH ARN puis visualisés par microscopie à fluorescence. Pour chaque temps de la cinétique analysé, le pourcentage de cellules exprimant les transcrits est déterminé à partir de 100 noyaux, et sur la base de 3 expériences indépendantes (total de 300 noyaux analysés par condition).

Sur la base des connaissances actuelles concernant les voies de dégradation des ARNs, nous avons recherché la présence de ces transcrits au sein de deux structures cellulaires connues pour être enrichies en ARNs.

-Les exosomes :

Ces petites vésicules de 30 à 100 nm de diamètre sont composées de protéines, de lipides et d'acides nucléiques, et sont chargées, entre autres, de l'élimination de molécules indésirables de la cellule (Théry, Zitvogel, et Amigorena 2002). Récemment, grâce aux techniques de purification des exosomes et de séquençage nouvelle génération, il a été possible d'identifier différentes populations d'ARNs dans les exosomes, comme des ARNs non codants courts et longs, et plus particulièrement les transcrits *TERRA*, issus de l'hétérochromatine constitutive des régions télomériques (Wang et al. 2015).

La détection de signaux fluorescents aux extrémités des prolongements cytoplasmiques suggère que ces transcrits puissent en effet être sécrétés à travers une production d'exosomes.

Nous avons combiné Immunofluorescence et FISH ARN permettant la détection des marqueurs d'exosome (protéines CD9, CD63 et CD81) avec la détection des transcrits sens en récupération tardive. L'établissement de profils d'intensité de fluorescence des signaux correspondants aux protéines de l'exosome (vert) et aux transcrits *SATIII* sens (rouge) ne nous a pas permis de mettre en évidence l'existence d'une colocalisation des signaux par microscopie confocale (Figure 33).

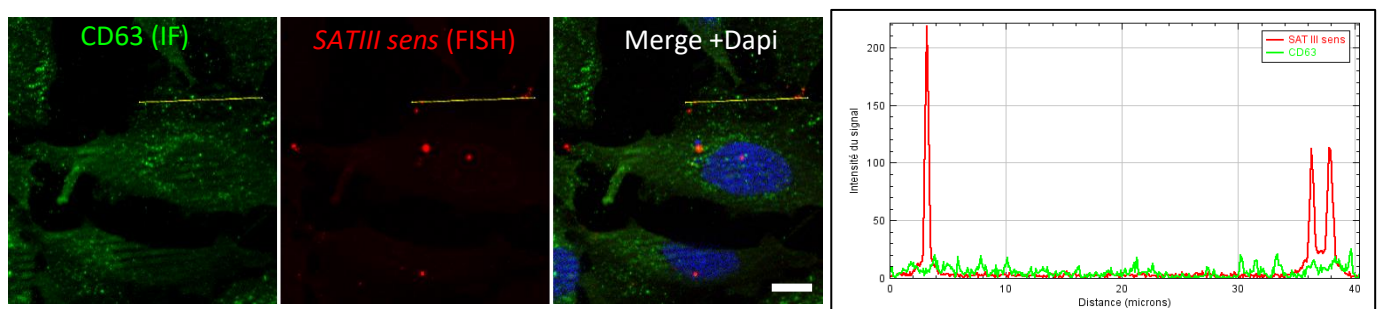


Figure 33 : Co-détection des transcrits *SATIII* cytoplasmiques et de la protéine CD63 dans des cellules HeLa stressées et soumises à une récupération tardive.

La protéine CD63 (marqueur de l'exosome) est détectée par IF. Les transcrits sont détectés par RNA FISH après une période de 21 heures de récupération au stress. L'image est obtenue par microscopie confocale. A droite, profil de l'intensité des signaux (en ordonnée) le long d'un axe traversant la cellule (abscisse) passant par les signaux d'hybridation cytoplasmiques (Barre d'échelle 10 µm).

-Les p-bodies :

Les processing bodies ou p-bodies sont des petites structures nucléoprotéiques très conservées chez les eucaryotes. Les p-bodies sont des structures très dynamiques, localisés dans le cytoplasme des cellules, et dépourvus de membrane ; ils se forment par séparation de phase. L'une de leur principale fonction est le stockage d'ARNm et de mi RNA, afin de les dégrader, ou pour réguler leur traduction en protéines (Kulkarni, Ozgur, et Stoecklin 2010). Nous avons vérifié l'hypothèse d'un adressage des transcrits *SATIII* sens dans ces structures. Nous avons transfecté des cellules Hela avec des protéines spécifiques des p-Bodies fusionnées à la GFP, et étudié la localisation des transcrits *SATIII* sens en récupération tardive (Figure 44) mais nous n'avons pas mis en évidence de co-localisation.

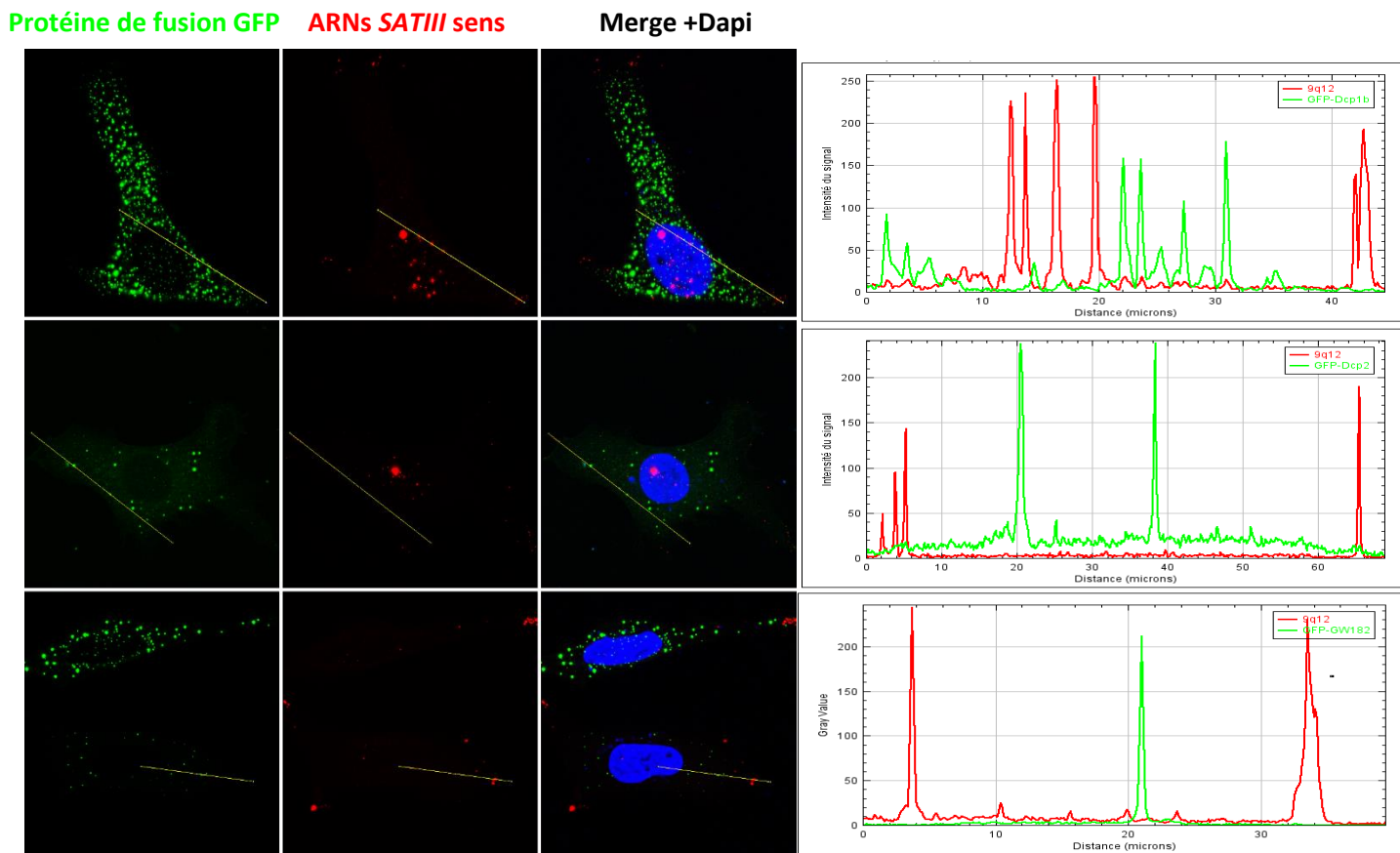


Figure 34 : Co-détection des transcrits *SATIII* sens et de protéines marqueur des p-bodies en récupération tardive post-stress.

Codétection des transcrits par FISH ARN avec différentes protéines des p-bodies (Dcp1b pour Decapping protein 1B, Dcp2 pour Decapping protein 2, et GW182 pour GW-bodies protein182) fusionnées à la GFP, exprimées par transfection transitoire dans des cellules HeLa. Les transcrits sont détectés après 12h de récupération post-stress. L'image est obtenue par microscopie confocale. A droite, intensité des signaux (ordonnée) le long d'un axe traversant la cellule (abscisse) et passant par les signaux d'hybridation cytoplasmiques (Barre d'échelle 5 μ m).

Nos analyses *In Situ* ne nous permettent pas d'exclure formellement une implication de l'exosome ou des p-bodies dans la relocalisation des transcrits *SATIII* sens dans le cytoplasme des cellules en récupération tardive. En effet concernant les exosomes, la technique combinant FISH ARN et Immunofluorescence est délicate à mettre en œuvre. Il est possible que le traitement à base de formamide que nous utilisons pour l'hybridation des sondes puisse masquer certains épitopes des protéines d'intérêt.

Concernant la présence des ARNs *SATIII* dans les p-bodies, nous n'avons pas étendu notre analyse à d'autres points de la cinétique de récupération au stress, nous ne pouvons donc pas exclure que les ARNs *SATIII* puissent transiter dans ces structures à d'autres temps de récupération tardive. Dans les deux cas, exosomes et p-bodies, une purification de ces structures à différents temps de la récupération au stress, suivi d'un séquençage pourrait nous permettre d'obtenir des informations plus précises sur leur éventuelle prise en charge.

III-A-4 Les ARNs *SATIII* sens et antisens sont très faiblement exprimés en absence de stress

Au laboratoire, les expériences de FISH ARN et de RT-qPCR (Valgardsdottir et al., 2005 et nos résultats non publiés) réalisées sur des cellules non stressées suggèrent que les transcrits *SATIII* sens et antisens sont très faiblement exprimés. Dans des cellules non stressées, en effet, les signaux d'hybridation obtenus en utilisant les sondes oligonucléotidiques 21s et 21as (non chromosome spécifique) sont de très petite taille et les transcrits sens apparemment plus abondants car mieux détectés que les transcrits antisens (voir Figure 60).

Nous avons donc cherché à mieux caractériser les transcrits *SATIII* dans les cellules HeLa.

D'après la littérature, les ARNs *SATIII* appartiennent à la famille des lncRNAs (Jolly et al., 2004 ; Rizzi et al., 2004 ; Valgardsdottir et al., 2005).

Sur la base d'analyses préliminaires effectuées au laboratoire (J. Penin) nous avons cherché à préciser la nature de ces transcrits par northern blot, à partir d'extraits de cellules HeLa stressées ou non et soumises à différents temps de récupération à un stress thermique.

En absence de stress, nous ne détectons pas de transcrits *SATIII* sens et antisens, confirmant nos données obtenues par FISH ARN montrant une expression très faible de ces transcrits.

Dans les cellules stressées, nous observons un pic d'accumulation des transcrits *SATIII* sens dans les extraits de cellules soumises à une période de récupération de 3h avec une diminution

progressive de ces transcrits à partir de 3h, confirmant ainsi la cinétique d'accumulation des transcrits *SATIII* sens obtenue par FISH ARN (Figure 35). Contrairement aux transcrits *SATIII* sens et des données de RNA FISH, nous ne détectons pas de pic d'accumulation de transcrits *SATIII* antisens, aux temps de récupération tardifs.

Sur la base des expériences de northern blot et des analyses de FISH ARN, il semble ainsi que le niveau d'expression des ARNs antisens dans les cellules stressées soit beaucoup plus faible que celui des ARNs sens.

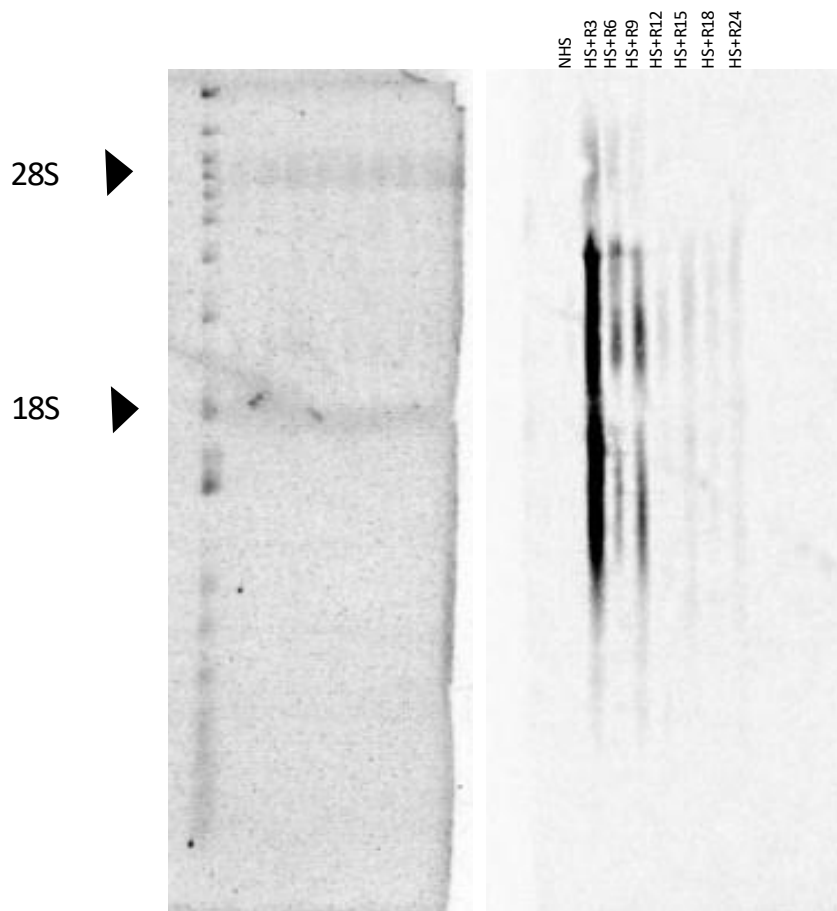


Figure 35 : Analyse par northern blot de l'expression des *SATIII* sens en cinétique de récupération au stress.

A gauche : contrôle de l'intégrité des ARNs sur gel d'agarose, révélé par marquage au GelGreen. A droite : Après migration sur gel d'agarose, les ARNs sont transférés sur une membrane de nitrocellulose et hybridés avec une sonde 14as radioactive, spécifique des transcrits sens. Les signaux sont détectés par phosphor Imageur.

Nos observations sont en accord avec les données obtenues par PCR semi quantitative qui indiquent une expression très faible de ces transcrits (Valgardsdottir et al., 2008).

Le protocole de northern blot que nous avons utilisé ne nous permet pas de détecter des transcrits dont la taille est inférieure à 100 nt. Il reste ainsi possible que les ARNs *SATIII* sens et antisens exprimés constitutivement, et les transcrits *SATIII* antisens détectés en récupération tardive appartiennent à la classe des petits ARNs non codants.

III-A-5 La transcription des ARNs *SATIII* en orientation sens et antisens, est sous le contrôle de l'ARN polymérase II.

Nous avons cherché à déterminer si l'accumulation des ARNs *SATIII* antisens observée au cours de la période de récupération au stress nécessitait une accumulation préalable d'ARNs sens. Il était en effet possible qu'une transcription « sens » puisse, par ouverture chromatinienne, favoriser la mise en place de sites d'initiation de la transcription contrôlant la synthèse d'ARN *SATIII* antisens. L'implication de l'ARN POLII au cours de la HSR, dans la transcription de l'ARN *SATIII* en orientation sens ayant été décrite (Jolly et al., 2004), nous avons cherché dans un premier temps, à identifier l'ARN polymérase impliquée dans la transcription des ARNs *SATIII* antisens.

Dans ce but, nous avons testé l'action de l'Actinomycine D, drogue capable d'inhiber l'élongation des ARN POLI, POLII et POLIII (pour revue, Bensaude 2011) de manière dose - dépendante. L'Actinomycine D, qui agit comme un intercalant de l'ADN, a été ajoutée 5 minutes avant l'exposition des cellules au stress thermique, temps suffisant pour permettre son action inhibitrice, à une concentration susceptible de bloquer à la fois l'action des ARN POL I et II.

Nous avons co-détecté la présence de transcrits sens et antisens par FISH ARN en utilisant les sondes 14as (détection des transcrits *SATIII* sens spécifiques du chromosome 9) et 21s (Détection des transcrits antisens non chromosome spécifiques) (Figure 36).

Comme attendu, en présence de l'inhibiteur, le signal d'hybridation correspondant aux transcrits *SATIII* sens est moins intense dans les cellules contrôles stressées ou soumises à une période de récupération au stress de 3h ou de 18h (Figure 34).

Cependant, de manière surprenante, nous détectons un signal d'hybridation intense correspondant aux ARNs *SATIII* antisens dans 100% des cellules traitées avec la drogue, que ces cellules aient été ou non soumises à un stress. Dans ces cellules traitées, les signaux

correspondants ARNs antisens (rouge) co-localisent avec des signaux de faible intensité correspondant aux transcrits sens issus du chromosome 9 (vert). Ces deux signaux sont détectés également dans des expériences de RNA FISH réalisés avec une seule sonde, capable de reconnaître soit les transcrits sens, soit les transcrits antisens. De même, les signaux détectés disparaissent dans des cellules traitées à la RNase avant hybridation.

La présence de foyers de transcrits antisens dans les cellules soumises à une période de récupération de 18h après stress suggère que la transcription de ces ARNs est initiée indépendamment du traitement à l'Actinomycine D. Il est probable qu'une fois ces ARNs initiés, ils restent dans le noyau aux sites à partir desquels ils sont transcrits.

Ainsi, nos résultats révèlent l'existence d'une transcription constitutive permettant une production de transcrits *SATIII* sens et antisens, et que les transcrits générés sont en revanche dégradés lorsque l'élongation transcriptionnelle n'est pas bloquée par un traitement à l'Actinomycine D.

La présence de foyers de transcrits antisens dans les cellules soumises à une période de récupération de 18h après stress suggère que la transcription de ces ARNs est initiée indépendamment du traitement à l'Actinomycine D. Il est probable qu'une fois ces ARNs initiés, ils restent dans le noyau aux sites à partir desquels ils sont transcrits.

Ainsi, nos résultats révèlent l'existence d'une transcription constitutive permettant une production de transcrits *SATIII* sens et antisens, et que les transcrits générés sont en revanche dégradés lorsque l'élongation transcriptionnelle n'est pas bloquée par un traitement à l'Actinomycine D.

Afin de déterminer la nature de l'ARN polymérase impliquée dans cette activation transcriptionnelle, les cellules ont été traitées au Triptolide, drogue caractérisée pour sa capacité à inhiber l'initiation de la transcription par les ARN POLI et POLII.

Dans les cellules traitées avec la drogue, nous ne détectons pas de transcrits *SATIII* dans leur orientation sens et antisens (Figure 37).

Ainsi, notre étude montre que les signaux observés suite à un traitement par l'Actinomycine D proviennent bien de molécules d'ARNs de petites tailles correspondant à des transcrits dont la synthèse a été préalablement initiée (Figure 37).

Nos résultats suggèrent, que l'élongation de la transcription des ARN *SATIII* sens semble empêcher l'initiation transcriptionnelle à l'origine des transcrits *SATIII* antisens et inversement.

HeLa non traitées

HeLa + Actinomycine D

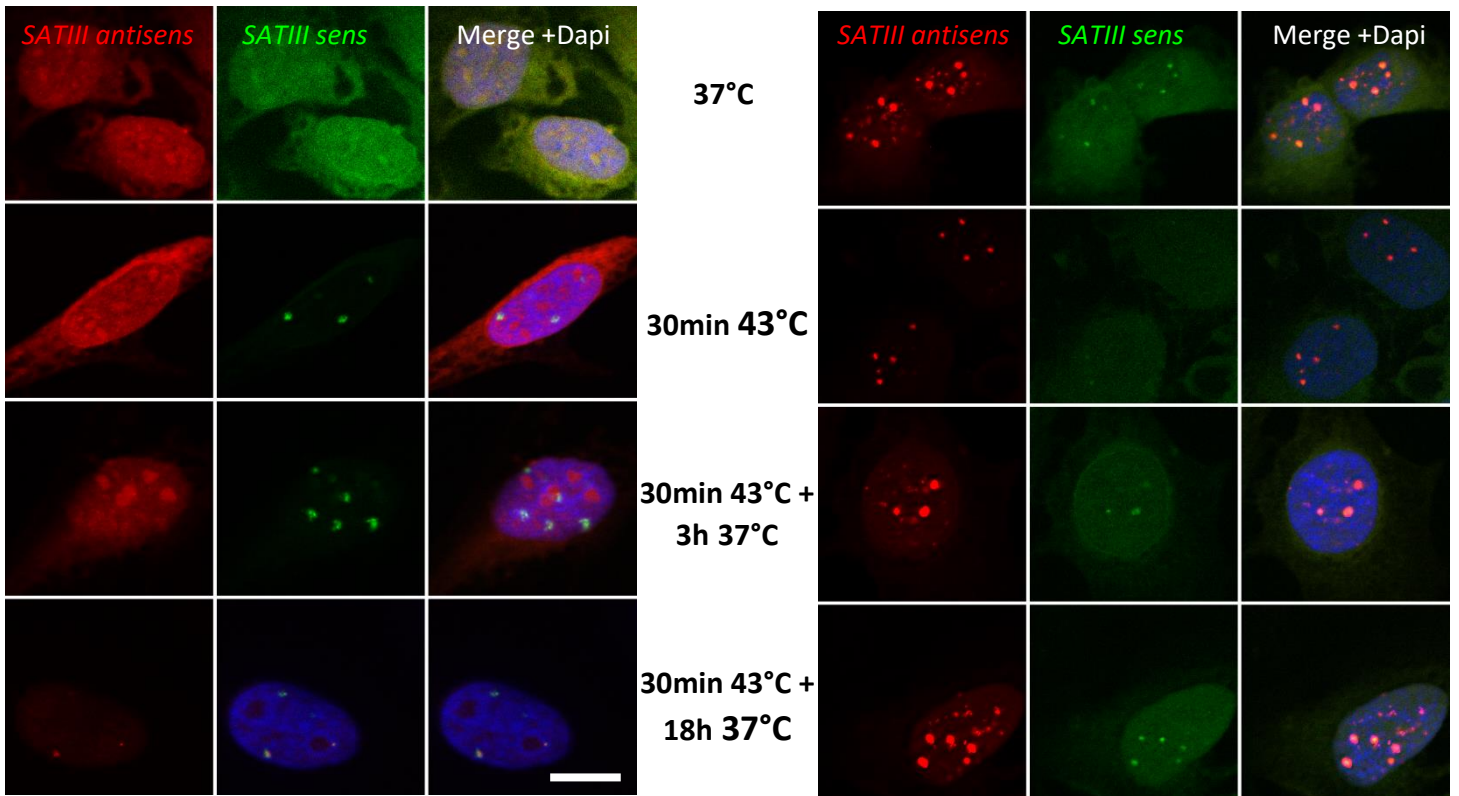


Figure 36 : Impact d'une inhibition de l'élongation de la transcription sur l'accumulation des transcrits *SATIII sens* et *antisens* dans des cellules HeLa non stressées, stressées et soumises ou non à une période de récupération.

Les ARNs *SATIII sens* et *antisens* sont détectés par FISH ARN, dans des cellules HeLa et traitées ou non 5min avant le stress thermique avec 10 μ M d'Actinomycine D. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées après le stress (HS), après 3h (récupération précoce) ou 18h (récupération tardive) de récupération après stress. Les cellules non stressées ont été incubées 3h avec l'Actinomycine D. L'image est obtenue par microscopie à fluorescence (barre d'échelle 10 μ m).

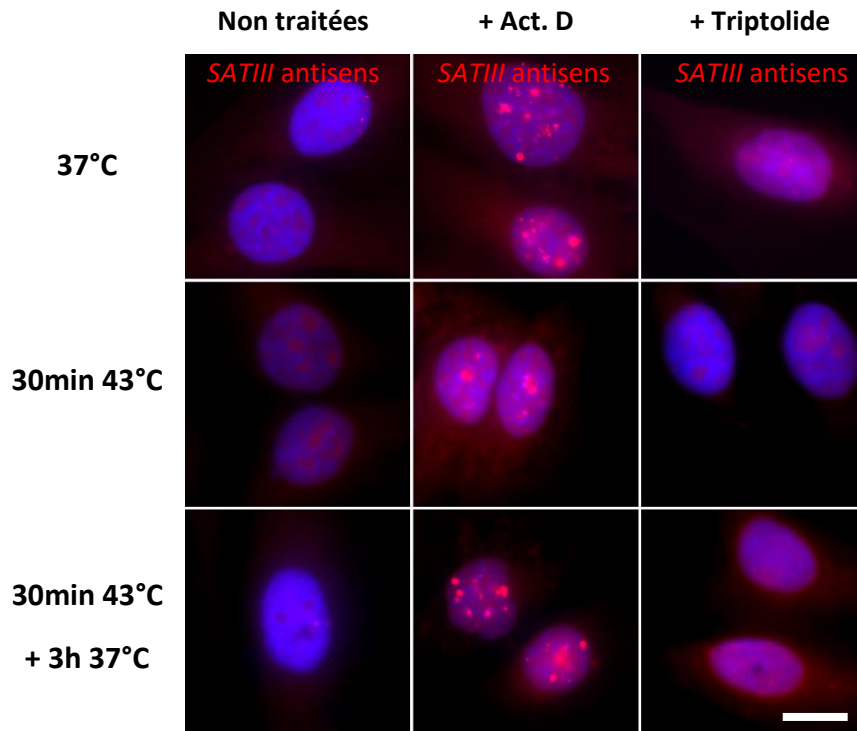


Figure 37 : Impact des inhibiteurs de l'initiation ou de l'élongation transcriptionnelle par l'ARN POLII sur l'accumulation des transcrits *SATIII* antisens dans des cellules stressées.

Les transcrits antisens sont détectés par FISH ARN (sonde 21s), dans des cellules HeLa soumises ou non à une période de récupération de 3h après un stress 30min à 43°C. Les cellules ont été traitées ou non avec un inhibiteur de l'ARN POLII (10µM d'Actinomycine ou 5µM de Triptolide) 5min avant le stress. L'image est obtenue par microscopie à fluorescence et analysée par le logiciel imageJ (barre d'échelle 10µm).

Nous avons ensuite cherché à vérifier l'implication du facteur HSF1 dans l'accumulation des transcrits *SATIII* en orientation antisens au locus 9q12, dans les cellules stressées. Pour cela nous avons utilisé deux approches différentes. L'une repose sur l'utilisation d'un mutant dominant négatif d'HSF1, l'autre sur l'utilisation de cellules HeLa « Knock-Down » pour HSF1. En réponse au stress, HSF1 activé se relocalise sur ses cibles péricentriques et recrute des cofacteurs transcriptionnels, (Col et al., 2017), à l'origine d'une hyperacétylation du locus 9q12, et de la transcription des régions péricentriques en transcrits *SATIII* dans une orientation sens.

Pour tester l'implication possible d'HSF1 dans l'accumulation des ARN *SATIII* antisens, nous avons dans un premier temps exprimé dans des cellules HeLa un mutant dominant négatif d'HSF1 développé au laboratoire, fusionné à la GFP (Jolly et al., 2004 ; Jolly et al., 2002).

La protéine de fusion GFP-HSF1, avec HSF1 sous sa forme sauvage ne bloque pas la transcription des séquences *SATIII* lorsqu'elle est surexprimée dans les cellules HeLa (Figure 38-A).

Au contraire, la forme mutée d'HSF1, est tronquée dans le domaine de transactivation (GFP-DBD-TRIM), et la protéine de fusion GFP-DBD-TRIM surexprimée se lie à la région 9q12 mais empêche la transcription des séquences *SATIII* sens. GFP-DBD-TRIM empêche en effet également la liaison du facteur HSF1 endogène sur ses cibles. La présence du tag GFP permet en outre, de visualiser les loci 9q12 ciblés par la protéine. Afin de valider ces deux modèles d'étude (GFP-DBD-TRIM et HeLa KDHSF1), nous avons analysé par FISH ARN l'expression des transcrits *SATIII* sens dans des cellules stressées ou non.

Comme attendu, contrairement cellules non transfectées, les cellules transfectées avec le mutant HSF1-DBD-TRIM et stressées 30min à 43 °C n'expriment pas de transcrits *SATIII* sens, (Figure 38-B).

Nous avons ensuite cherché à préciser le rôle d'HSF1 dans l'accumulation des transcrits *SATIII* mais en orientation antisens dans des cellules HeLa non stressées ou stressées, en présence ou non d'Actinomycine D.

Dans les cellules traitées avec de l'Actinomycine D, l'expression de GFP-DBD-TRIM n'a pas d'impact sur l'accumulation des transcrits antisens (Figure 39) et une co-localisation est observée entre les signaux GFP et certains signaux correspondants aux transcrits antisens confirmant également la présence d'ARN *SATIII* antisens au locus 9q12.

A noter que dans des cellules non stressées et non traitées à l'Actinomycine D, une accumulation de transcrits *SATIII* antisens (et sens) n'est pas observée, ce qui suggère que la présence GFP-DBD-TRIM au locus n'impacte pas la transcription constitutive bidirectionnelle. Ainsi, l'accumulation des ARNs *SATIII* antisens que nous observons au locus 9q12 dans les cellules n'exprimant pas d'ARNs *SATIII* sens induits par le stress, est indépendante du facteur HSF1.

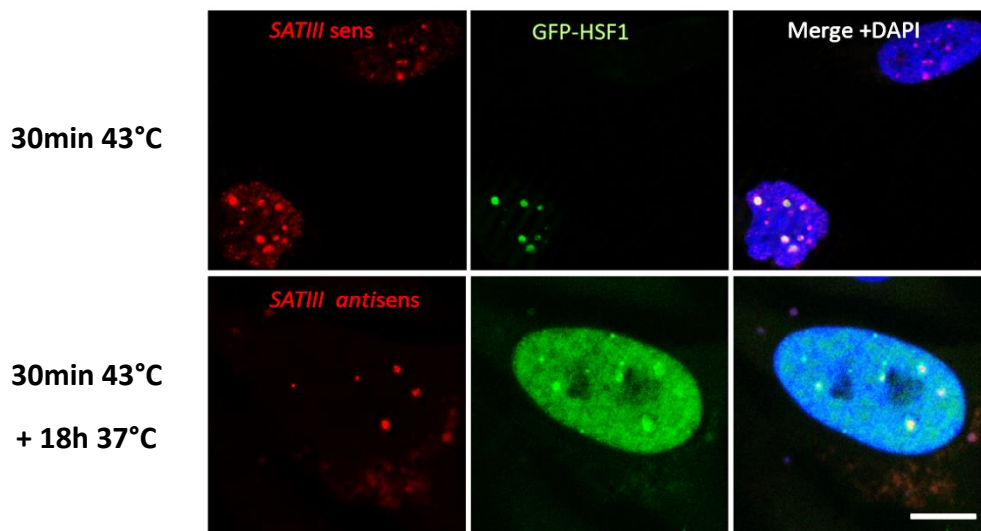


Figure 38-A : Transcription des ARNs *SATIII* sens et antisens dans les cellules transfectées surexprimant la protéine HSF1 fusionné à la GFP.

FISH ARN dans des cellules HeLa stressées 30 min à 43°C, et soumises ou non à une période de récupération de 18 heures. Les transcrits *SATIII* (signaux rouge) sont détectés par FISH ARN en présence de la protéine de fusion GFP-HSF1 (signaux vert). Image obtenue par microscopie confocale (barre d'échelle 5µm)

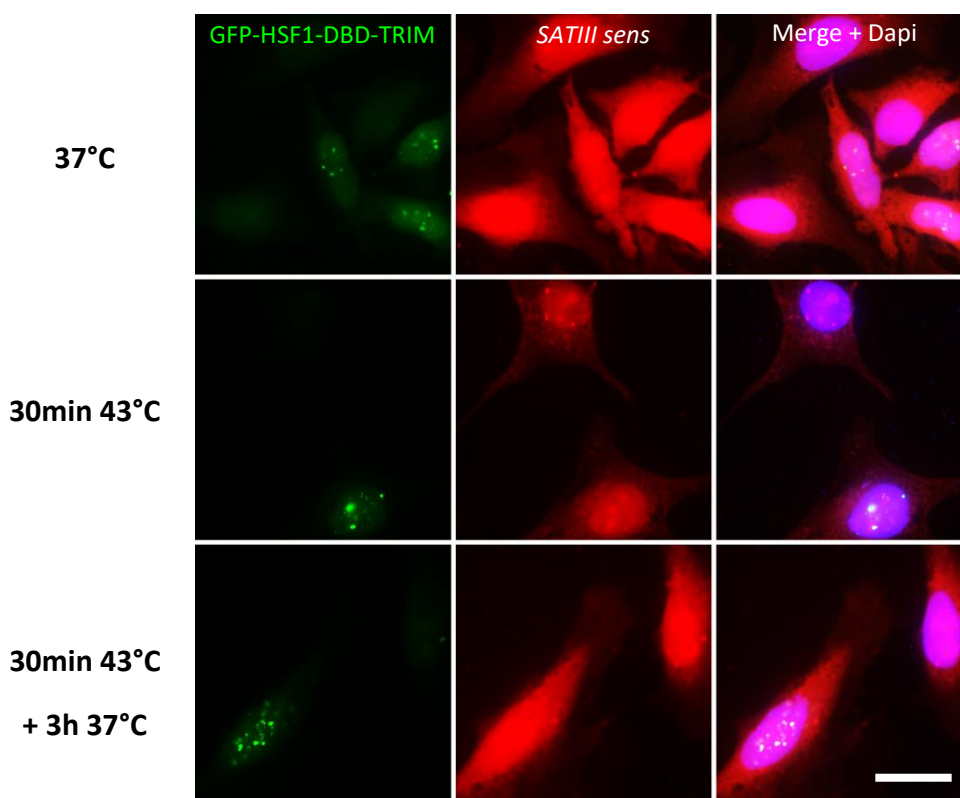


Figure 38-B : Blocage de la transcription des ARNs *SATIII* sens dans les cellules transfectées surexprimant la protéine HSF1 mutée dans son domaine de transactivation.

FISH ARN dans des cellules HeLa non stressées, stressées 30 min à 43°C, et soumises ou non à une période de récupération de 3 heures. Les transcrits sens (signaux rouge) sont détectés par FISH ARN en présence de la protéine de fusion GFP-HSF1-DBD-TRIM (signaux vert). Image obtenue par microscopie confocale (barre d'échelle 10µm)

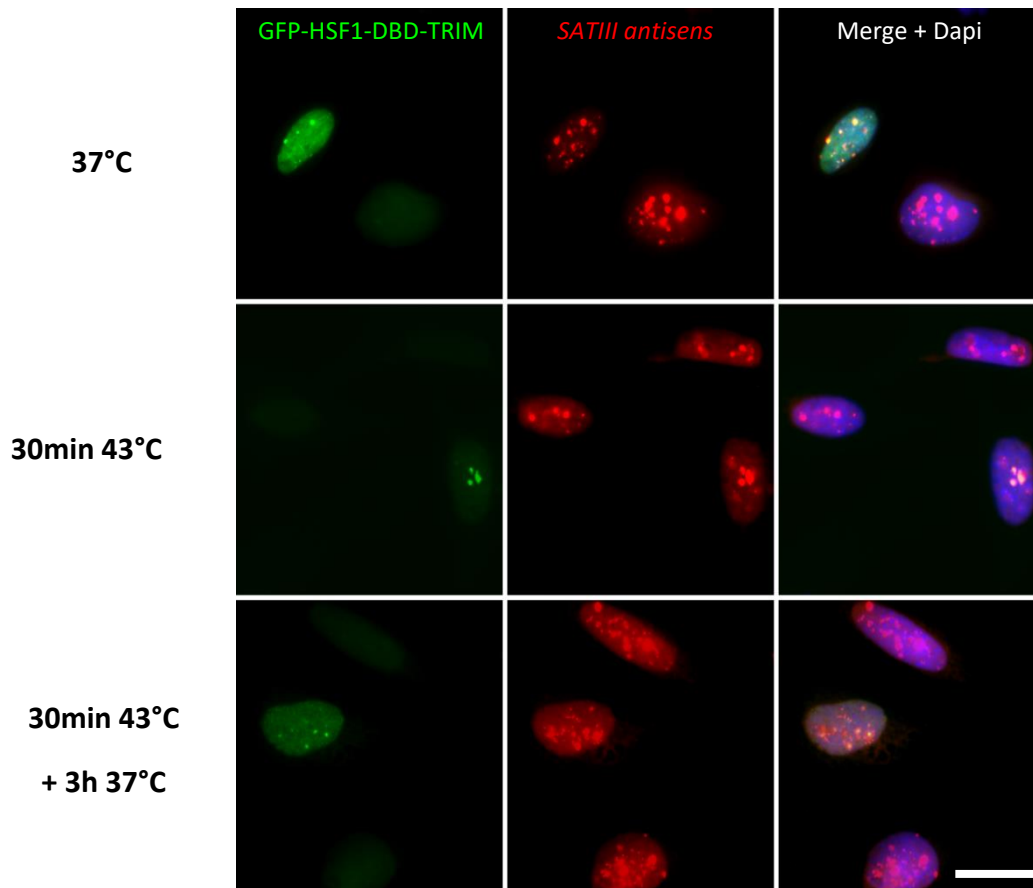


Figure 39 : L'accumulation des transcrits *SATIII* antisens au locus 9q12 dans des cellules traitées à l'Actinomycine D est indépendante de la capacité transactivatrice du facteur HSF1.

Détection simultanée des transcrits antisens (signaux rouges) par FISH ARN et de la protéine de fusion GFP-HSF1-DBD-TRIM (signaux vert) au locus 9q12. Image obtenue par microscopie confocale (barre d'échelle 10µm).

Ces résultats ont été confirmés par RNA FISH dans une lignée stable de cellules HeLa n'exprimant pas HSF1 (HeLa HSF1 KD) (Figure 40-A) stressées ou non et soumises à une période de récupération précoce (3h) ou tardive (18h), (Figure 40-B).

Comme attendu, nous n'observons pas d'accumulation de transcrits *SATIII* sens induits par le stress dans les cellules KD HSF1 (Figure 40). En revanche, nous détectons une accumulation de transcrits *SATIII* antisens, dans les cellules KD HSF1 soumises à une période de récupération de 18h. Ce marquage confirme que l'accumulation de transcrits *SATIII* antisens n'est pas sous le contrôle d'HSF1.

Après traitement à l'Actinomycine, nous observons, dans ces mêmes cellules, des signaux intenses correspondants aux transcrits antisens, qui co-localisent avec des signaux de plus faible intensité correspondant aux transcrits sens (Figure 40). Ces résultats corroborent l'existence d'une transcription bidirectionnelle indépendante du stress et du facteur HSF1 et seulement visible lorsque l'élongation par l'ARN POLII est inhibée.

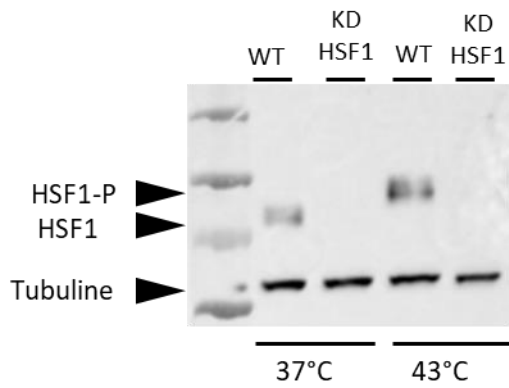


Figure 40-A : Analyse de l'expression d'HSF1 dans des cellules HeLa WT et KD pour HSF1

La forme HSF1-P est détectée après activation et hyperphosphorylation d'HSF1 par le stress thermique.

HeLa KDHSF1 non traitées

HeLa KDHSF1 + Actinomycine

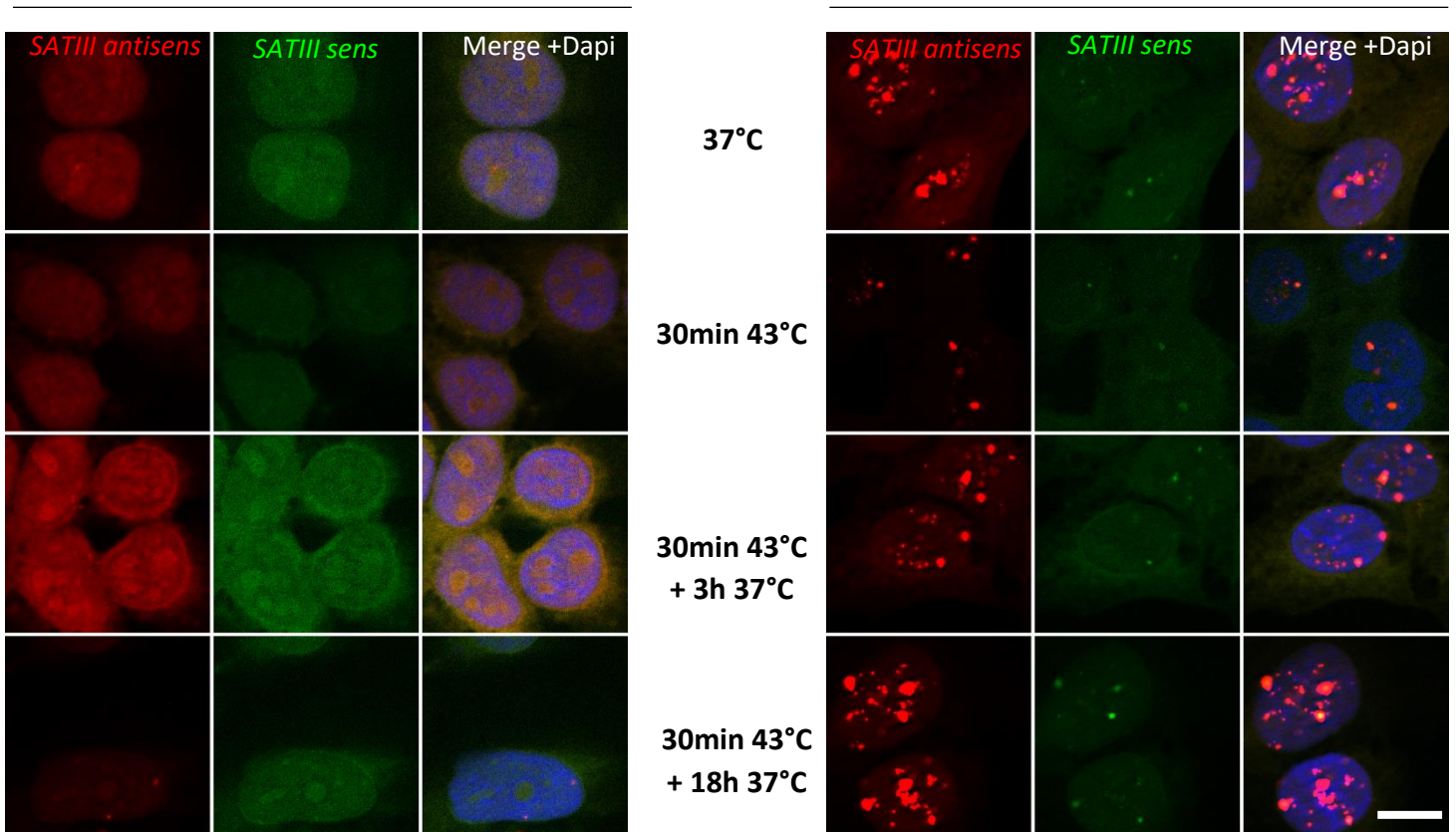


Figure 40-B : Impact d'une inhibition de l'élongation de la transcription sur l'accumulation des transcrits SATIII sens et antisens dans des cellules HeLa KDHSF1 non stressées, stressées et soumises ou non à une période de récupération au stress.

Les ARNs SATIII sens et antisens sont détectés par FISH ARN, dans des cellules HeLa KDHSF1 traitées ou non 5 min avant le stress thermique avec 10µM d'Actinomycine D. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées après le stress (HS), après 3h (récupération précoce) ou 18h (récupération tardive) de récupération après stress. Les cellules non stressées ont été incubées avec l'Actinomycine D (3h). L'image est obtenue par microscopie à fluorescence (barre d'échelle 5µm).

Ainsi nos résultats confirment l'existence de deux populations d'ARNs *SATIII* et révèlent l'existence d'un équilibre entre ces deux populations d'ARNs.

Les ARN *SATIII* sens et antisens sont exprimés de manière constitutive à faible niveau. Dans un premier temps de la réponse au stress une production transitoire des transcrits *SATIII* sens est observée, sous le contrôle de l'ARN POLII et du facteur de transcription HSF1, suivie dans un second temps d'une production de transcrits dans une orientation antisens.

Les données que nous avons obtenues montrent que la production d'ARNs *SATIII* antisens dans les cellules non stressées aussi bien que dans les cellules stressées est sous le contrôle de l'ARN POLII, mais est indépendante du facteur de transcription HSF1.

Lors de la HSR, bien que la production d'ARNs *SATIII* sens induits par le stress ne soit pas indispensable à la production d'ARNs *SATIII* antisens plus tardive, une expression élevée d'ARNs *SATIII* sens, empêche l'accumulation d'ARN *SATIII* antisens que nous observons en période de récupération tardive uniquement, à un moment où le pic d'ARNs *SATIII* sens n'est plus détecté.

Nos observations suggèrent que suite au stress, la production en masse d'ARNs *SATIII* se fait préférentiellement en orientation sens, au détriment de la production d'ARNs *SATIII* antisens. Par ailleurs, les données que nous avons obtenues dans des cellules traitées avec des inhibiteurs de l'ARN polymérase, en particulier avec l'Actinomycine D, renforcent cette idée. Les données que nous avons obtenues nous permettent de proposer un schéma d'expression des transcrits *SATIII* sens et antisens au cours de la réponse au stress, présenté Figure 41.

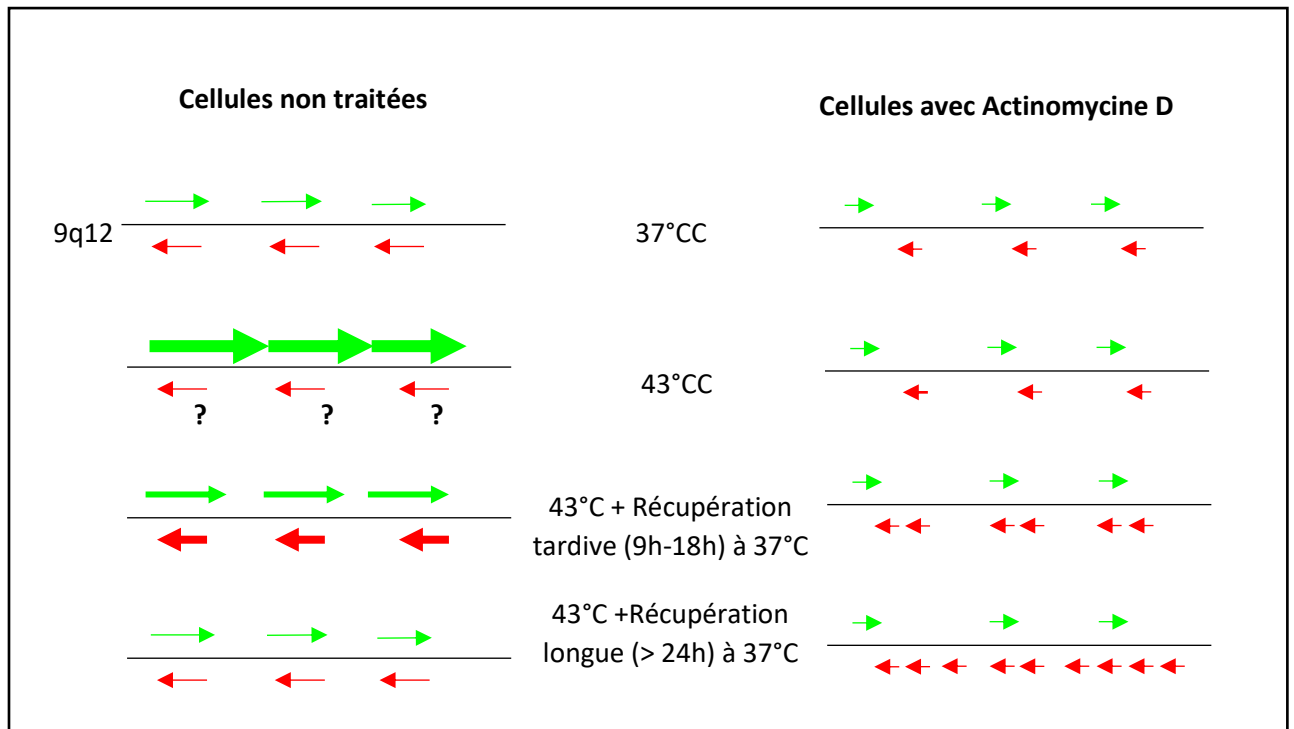


Figure 41 : Modèle d'expression des transcrits SATIII sens et antisens au niveau du locus 9q12, au cours de la HSR.

Les transcrits SATIII sens et antisens sont produits à faible niveau dans les cellules non stressées. Lors d'un stress, la transcription sens est fortement activée de manière transitoire, contrairement à la transcription en antisens. En récupération tardive, les ARNs SATIII sens disparaissent progressivement du locus 9q12, dans le même temps que les transcrits antisens sont produits aux mêmes loci. Après 24 heures de récupération au stress, les transcrits antisens disparaissent à leur tour jusqu'à atteindre leur niveau de production constitutive initiale.

Dans les cellules traitées à l'Actinomycine D, l'élongation par l'ARN POLII est inhibée, et seuls les transcrits initiés s'accumulent aux sites de transcription, indépendamment des conditions de stress. L'absence d'accumulation des transcrits SATIII sens et antisens dans les cellules non stressées repose sur un mécanisme de dégradation associée à une transcription sens/antisens, dont la nature exacte reste à définir.

III-B Les profils d'accumulation des ARNs *SATIII* sens et antisens sont respectivement corrélés à la perte et à la remise en place des marques répressives H3K9me3 et HP1 α au locus 9q12.

Comme présenté dans l'introduction, HP1 α est une protéine conservée, caractéristique de l'hétérochromatine péricentrique, et impliquée dans sa mise en place, son maintien et sa propagation. C'est une protéine « reader » de la marque répressive H3K9me3, et qui peut également interagir avec des ARNs.

Dans le modèle murin, les liens entre la protéine HP1 α , la marque H3K9me3 et les transcrits issus des régions péricentriques dans le contexte de mise en place *de novo* de l'hétérochromatine ou de son maintien, ont fait l'objet de plusieurs études (Muchardt et al. 2002 ; Probst et Almouzni 2008).

Il a été montré qu'un stress thermique entraîne une hyper acétylation transitoire du locus 9q12 (Jolly et al. 2004 ; Rizzi et al. 2004), une transcription en ARN non codant *SATIII*, et également une perte de H3K9me3 (Col et al., 2017) dans des cellules exposées à un stress de 60min à 43 °C.

Afin de mieux comprendre les éléments associés à la remise en place de l'hétérochromatine en lien avec l'expression des ARNs *SATIII*, nous avons étudié l'évolution de la protéine HP1 α et des marques H3K9me2/3 au locus 9q1.2, dans des cellules stressées 30 min 43°C, et soumises à une période de récupération de 1 à 24 heures.

Nous avons ensuite comparé les cinétiques d'accumulation des transcrits sens et antisens obtenus, au même locus, et dans les mêmes conditions de stress (voir chapitre A) avec les cinétiques de perte et de remise en place de la marque H3K9me2 et 3 et de la protéine HP1 α . Ainsi, nous avons combiné les techniques d'immunofluorescence indirecte pour détecter la protéine HP1 α et les marques H3K9me2/3, avec la technique de FISH ADN permettant l'identification du locus 9q12.

L'analyse des profils d'intensité des signaux obtenus par analyse confocale grâce au logiciel FIJI nous a permis d'analyser la cinétique de relocalisation au locus 9 q12 de la protéine HP1 α et de H3K9me2/3 au cours de la récupération au stress (Figures 42 et 43).

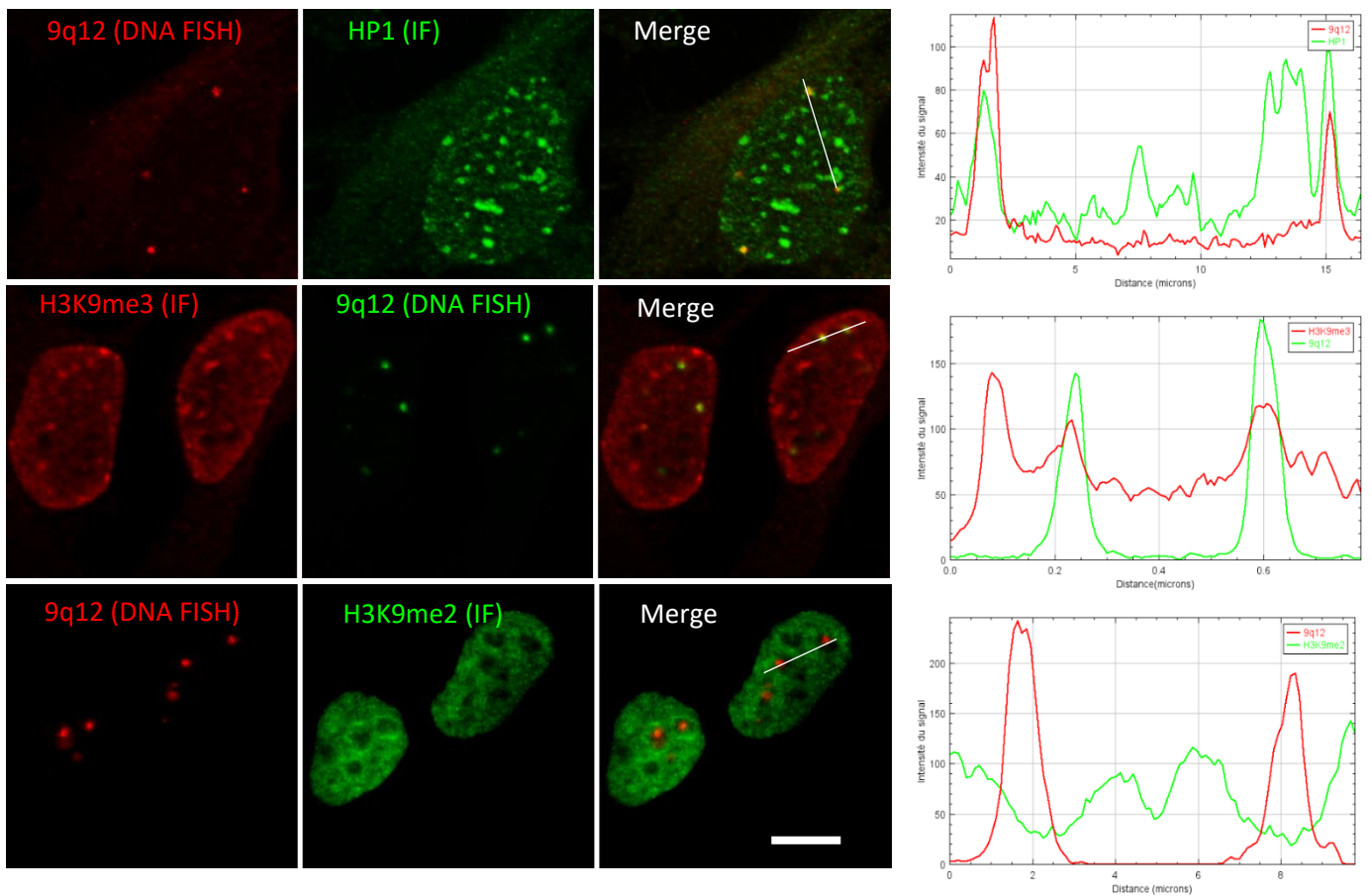


Figure 42 : Evolution des marques de l'hétérochromatine constitutive au niveau du locus 9q12 dans des cellules stressées puis soumises à une période de récupération de 1 à 24h.

La protéine HP1 α les marques H3K9me2 et H3K9me3 sont analysées par immunofluorescence. Le locus 9q12 est détecté par FISH ADN à l'aide d'une sonde spécifique. Les signaux sont visualisés par microscopie confocale dans des cellules non soumises à un stress (barre d'échelle 10 μ m). Pour chaque image obtenue, les profils d'intensité de fluorescence des signaux de fluorescence ont été comparés. Pour chaque temps de récupération, les loci 9q12 de 30 noyaux ont été analysés, à partir de 3 expériences indépendantes.

Les données obtenues montrent l'existence d'une perte progressive et réversible de la protéine HP1 α et de la marque H3K9me3 au cours de la période de récupération au stress. (Figure 43).

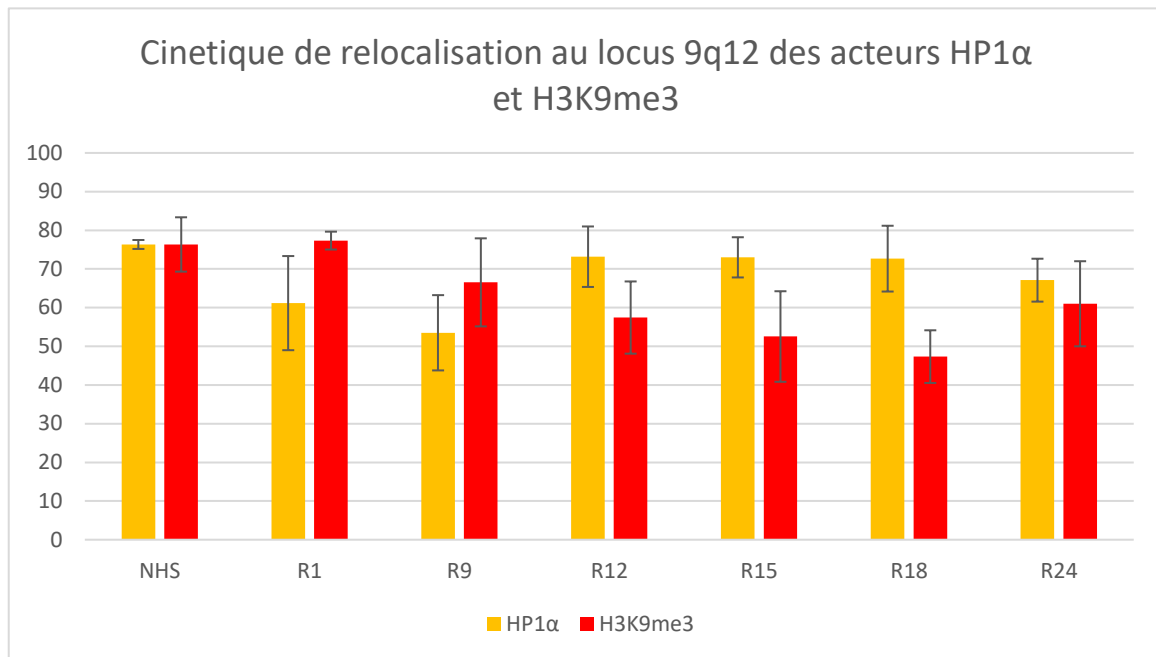


Figure 43 : Evolution de l'enrichissement de la protéine HP1α et de la marque H3K9me3 détectées par immunofluorescence au locus 9q12 (détecté par FISH ADN) dans les cellules HeLa au cours de la récupération.

En ordonnée, le pourcentage de cellules avec HP1α ou H3K9me3 enrichis au locus 9q12. L'enrichissement est analysé sur la base de profils d'intensité réalisés à partir de 30 noyaux par conditions, et sur la base de 3 expériences indépendantes (total de 90 noyaux analysés par condition).

Dans des cellules stressées, une perte progressive d'HP1α est observée jusqu'à 9h de récupération, suivie d'un retour de la protéine au locus 9q12 entre 9 et 12 h de récupération. De même une perte progressive et plus tardive de la marque H3K9me3 est également observée, entre 9 et 15heures de récupération. Une restauration du marquage d'H3K9me3 au locus 9q12 est observée entre 15 et 18h de récupération.

Ainsi le départ et le retour d'HP1α au locus 9q12 précèdent respectivement la perte et le retour de la marque H3K9me3 à ce même locus.

Nous avons également analysé la présence de la marque H3K9me2 qui est identifiée comme une marque de l'hétérochromatine permissive à la transcription, jouant un rôle d'intermédiaire, impliquée dans le remodelage de l'hétérochromatine constitutive, notamment chez la levure. Toutefois nous n'avons pas observé de variation de cette marque au locus 9q12 (Figure 43).

Sur la base de l'évolution des marquages obtenus pour les trois acteurs d'intérêt (HP1α, H3K9me3 et les transcrits *SATIII*) sur une échelle de temps, nous pouvons proposer un schéma

récapitulatif pour l'ensemble des événements associés à l'activation transcriptionnelle de ces régions et à leur remise sous silence (Figure 44).

Suite à la perte d'HP1 α induite par un stress, la marque H3K9me3 disparaît à son tour progressivement du locus. Après 12h de récupération, le retour d'HP1 α précède le retour de d'H3K9me3.

Ces données associées aux données de cinétique d'apparition des transcrits *SATIII* sens et antisens au cours de la période de récupération au stress, nous permettent d'établir un lien entre cinétique d'accumulation des transcrits *SATIII* sens et antisens et cinétique de perte et de retour des marques répressives au locus 9q12. (Figure 44).

Les cinétiques comparées que nous avons réalisées révèlent une perte des marques répressives de l'hétérochromatine péricentrique au locus 9q12 corrélée à une accumulation d'ARN *SATIII* sens, ainsi qu'une remise en place de ces marques, corrélée à une accumulation de transcrits *SATIII* antisens suggérant que les transcrits antisens pourraient jouer un rôle dans la remise en place des marques répressives.

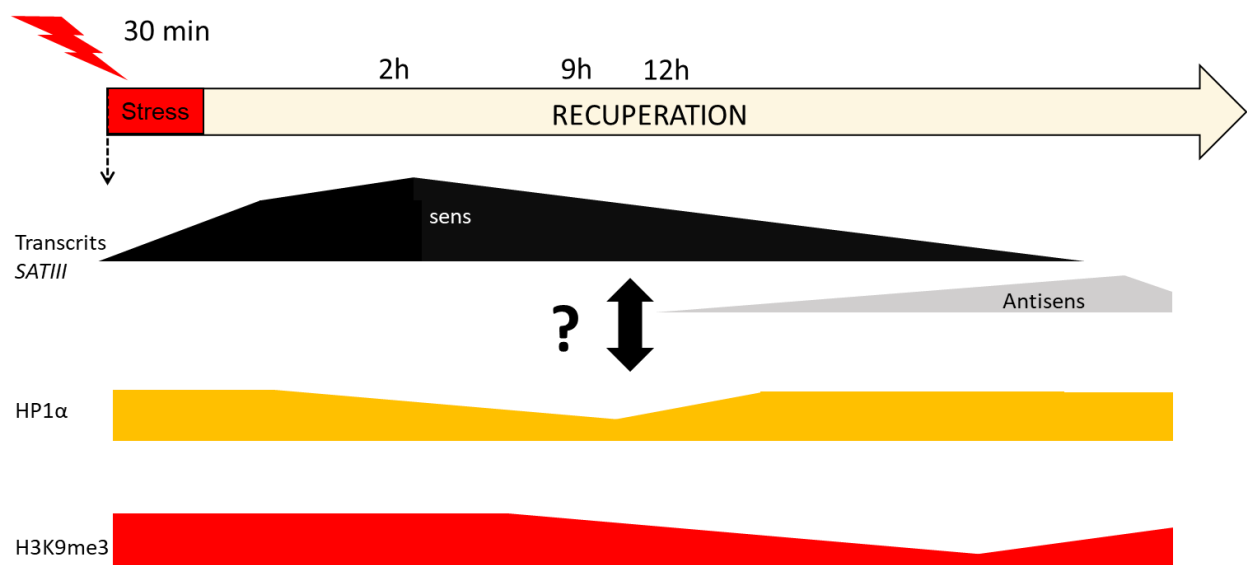


Figure 44 : Evolution du statut des marques répressives de l'hétérochromatine et des transcrits *SATIII* sens et antisens au cours d'une cinétique de 24 h de récupération au stress dans des cellules HeLa.

La période de récupération précoce au stress thermique se caractérise par une accumulation transitoire de transcrits *SATIII* sens au locus 9q12. Une accumulation tardive de transcrits *SATIII* antisens est observée au locus 9q12 au cours de la période de récupération tardive au stress thermique (qui démarre environ 15h après un stress thermique de 30 min à 43°C). L'accumulation des transcrits *SATIII* sens observée dans les cellules stressées est associée à une perte progressive de la protéine HP1 α et de la marque H3K9Me3 au locus 9q12. A l'inverse, l'accumulation des transcrits *SATIII* antisens au locus 9q12 est associée à un retour progressif d'HP1 α et de H3K9me3 au locus 9q12.

III-C-Rôle des ARNs *SATIII* dans la transition G2/M.

L'hétérochromatine péricentrique joue un rôle important dans la cohésion des chromatides sœurs au moment de la mitose. Une perte de marques répressives au niveau de ces régions engendre des défauts de ségrégations mitotiques (Yi et al. 2018).

Suite aux données préliminaires obtenues au laboratoire (Thèse J. Penin) montrant un ralentissement de la transition G2/M dans des cellules HeLa stressées, nous avons cherché à caractériser plus avant l'impact du stress sur la transition G2/M/G1 en lien avec les cinétiques de perte et de remise en place des marques répressives au locus 9q12, et d'expression des ARNs *SATIII*.

Nous avons également cherché à déterminer l'impact du stress sur la ségrégation des chromosomes en mitose avec une attention particulière portée au chromosome 9.

Le stress thermique induisant des blocages dans la progression des fourches de réplication (Zhu et al., 2011), nous avons appliqué un stress à une population de cellules en phase G2. La synchronisation des cellules a été réalisée par double blocage à la thymidine.

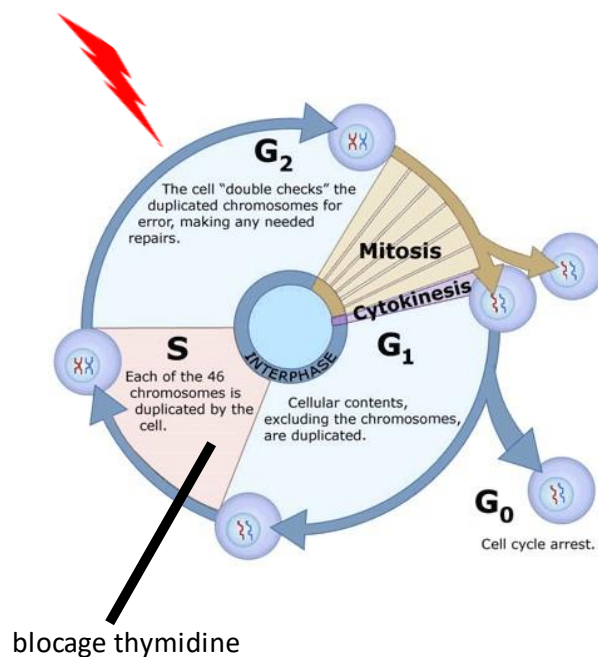


Schéma de la stratégie utilisée pour notre étude.

Nous avons dans un premier temps cherché à confirmer les résultats préliminaires, montrant un allongement de la phase G2 dans les cellules stressées.

Nous avons déterminé le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire par cytométrie de flux, après marquage de l'ADN avec de l'iodure de propidium. Cette analyse a été réalisée à différents temps après synchronisation des cellules en G1/S et relargage de la thymidine (Figure 45). Les informations ainsi obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel FCS Express.

Cette analyse nous a permis de déterminer le temps optimal à l'obtention d'un pourcentage élevé de cellules en G2 et dans une fenêtre de temps précédent l'apparition des cellules en G1 (Figures 45 et 46). Ainsi pour les cellules HeLa, nous avons choisi d'appliquer un stress thermique entre 5h30 et 6h après relargage de la thymidine.

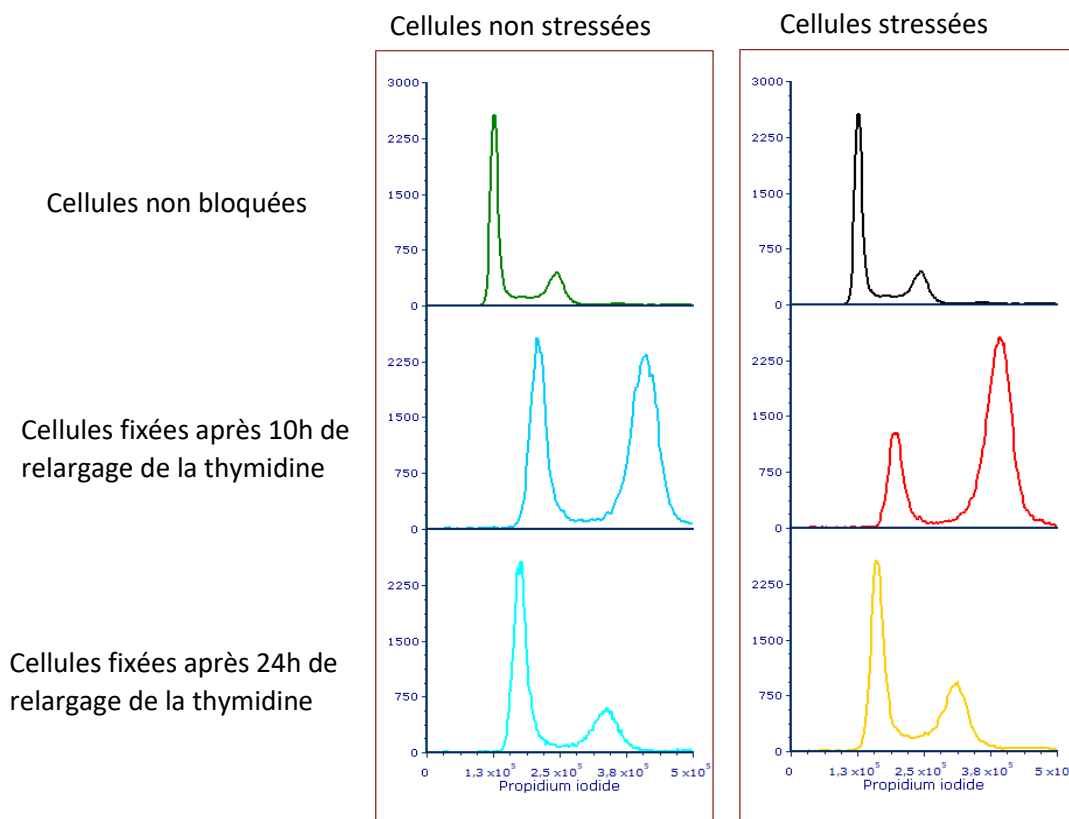


Figure 45 : Exemple d'un profil obtenu par FACS à partir d'une population de cellules, synchronisées et non stressées ou stressées, après relargage de la thymidine.

Les cellules ont été fixées à différents temps après relargage, et leur ADN marqué avec de l'iodure de propidium. A chaque point de la cinétique, 50 000 cellules ont été analysées.

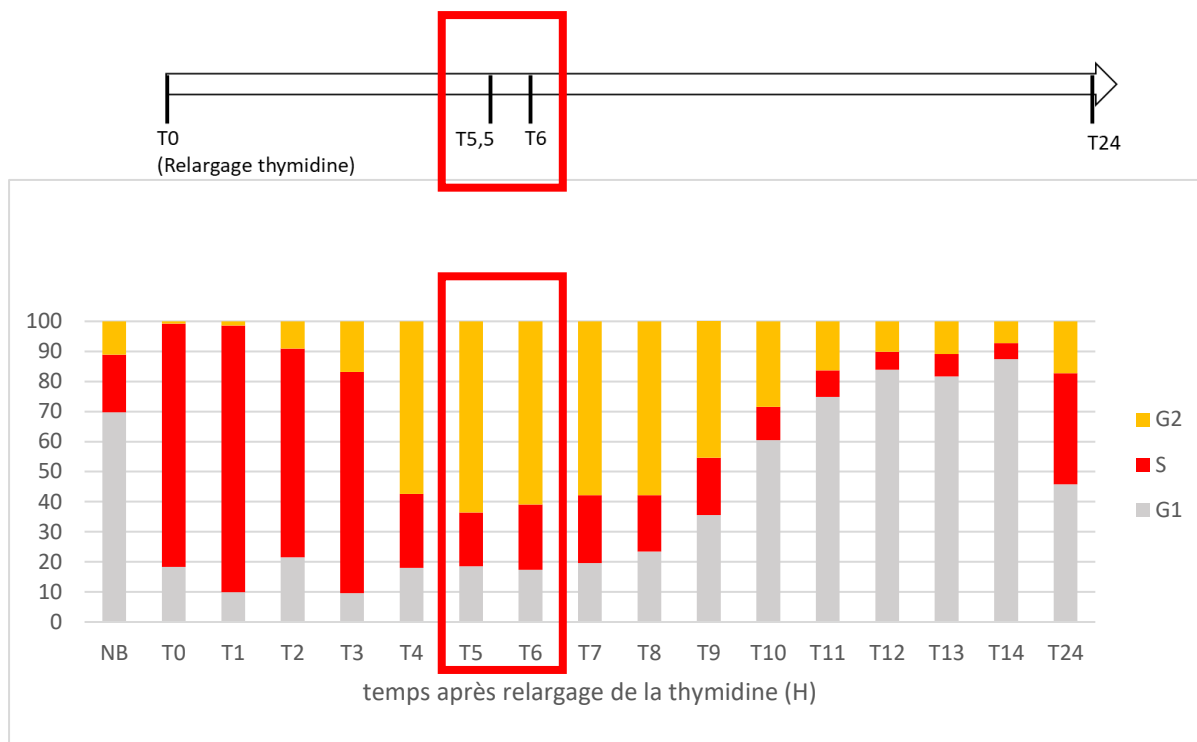


Figure 46 : Evolution du cycle cellulaire d'une population de cellules HeLa, synchronisées et non stressées, après relargage de la thymidine.

Pour chaque point de la cinétique, 50 000 cellules ont été fixées et analysées par FACS. Le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle a été déterminé à l'aide du logiciel FCS Express. Le temps de relargage nécessaire à l'obtention d'un maximum de cellules en G2 avant la transition G2/M est encadré en rouge. Abréviations : NB = non synchronisées, T= temps après relargage de la thymidine.

III-C-1- Un choc thermique appliqué en G2 provoque l'allongement de la transition G2/M.

Nous avons ensuite analysé l'impact d'un stress réalisé majoritairement pendant la phase G2 (entre 5h30 et 6h après relargage de la thymidine), sur la transition G2/M du cycle cellulaire.

Dans les cellules HeLa non stressées, un passage de G2 à G1 est observé à partir de 8h de relargage de la thymidine, et le passage en S, est amorcé entre 15h et 18h après relargage.

En revanche, dans les cellules stressées, le passage en G1 est retardé de 3h à 4h par rapport aux cellules non stressées. Une augmentation de la fraction de cellules en G1 est observée entre 12h et 13h après relargage de la thymidine, contre 8h pour les cellules non stressées (Figures 46 et 47).

Un maximum de cellules en G1 est atteint après 15h de relargage pour les cellules non stressées et après 27h de relargage de la thymidine pour les cellules stressées, suggérant un fort ralentissement du cycle.

Nous notons également une augmentation générale de la proportion de cellules dans la phase S dans la population de cellules stressées, conséquence possible d'une perte d'une fraction de cellules lors de la transition G2/M/G1.

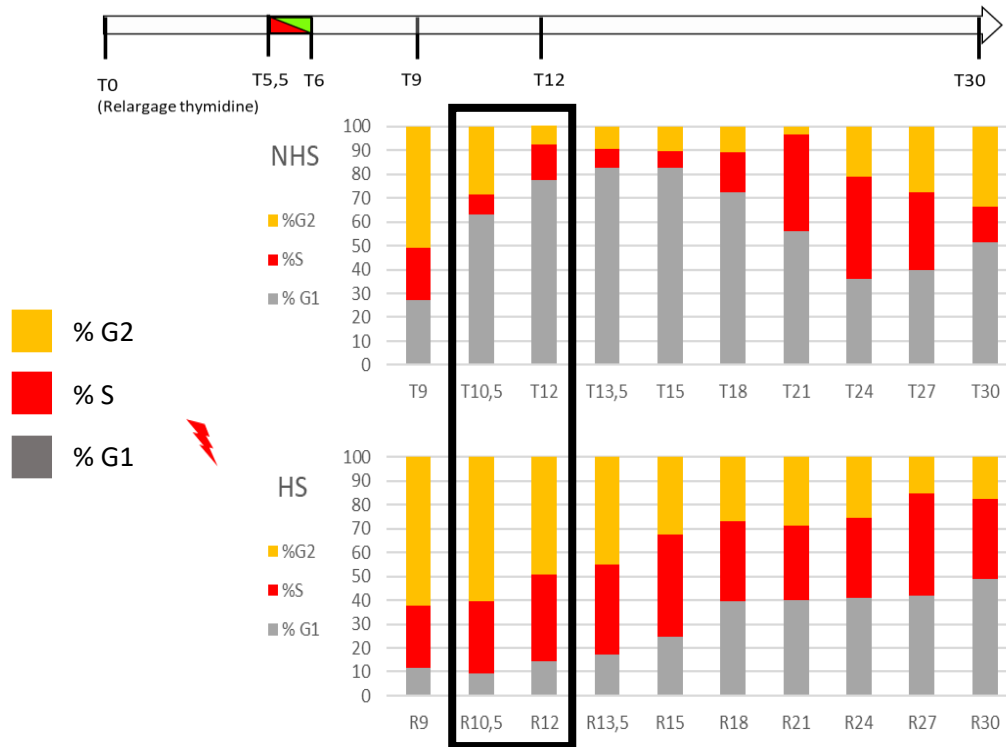


Figure 47 : Evolution du cycle cellulaire de populations de cellules HeLa synchronisées non stressées et stressées, après relargage de la thymidine.

En haut, cellules HeLa non-stressées, en bas, cellules soumises à un stress de 30min à 43°C, 5h30 après relargage de la thymidine, analysées dans les conditions décrites Figure 46. Alors que les cellules non stressées ont effectué leur transition G2/M, la progression dans le cycle des cellules stressées est fortement retardée (encadré noir).

Abréviations : NB = non synchronisées, NHS = non stressées, HS = stressées, T = temps après relargage de la thymidine dans les cellules non stressées, R = temps après relargage de la thymidine dans des cellules soumises à un stress.

Afin d'élargir l'analyse à d'autres lignées cellulaires, nous avons appliqué la même analyse sur la lignée HFF2-TERT, fibroblastes immortalisés issus de cellules non cancéreuses, et la lignée HT1080, lignée cancéreuse mâle issue d'un fibrosarcome.

Pour chacune de ces deux lignées, nous avons déterminé le temps après relargage de la thymidine permettant d'obtenir le maximum de cellules en G2. (Figure 48).

Ainsi, nous avons choisi de stresser les cellules HFF2-TERT entre 6h15 et 7h après relargage de la thymidine et entre 5h30 et 6h pour les cellules HT1080. Nous avons ensuite comparé les cinétiques de progression des cellules dans le cycle, à différents temps après relargage de la thymidine, pour les cellules non stressées et stressées.

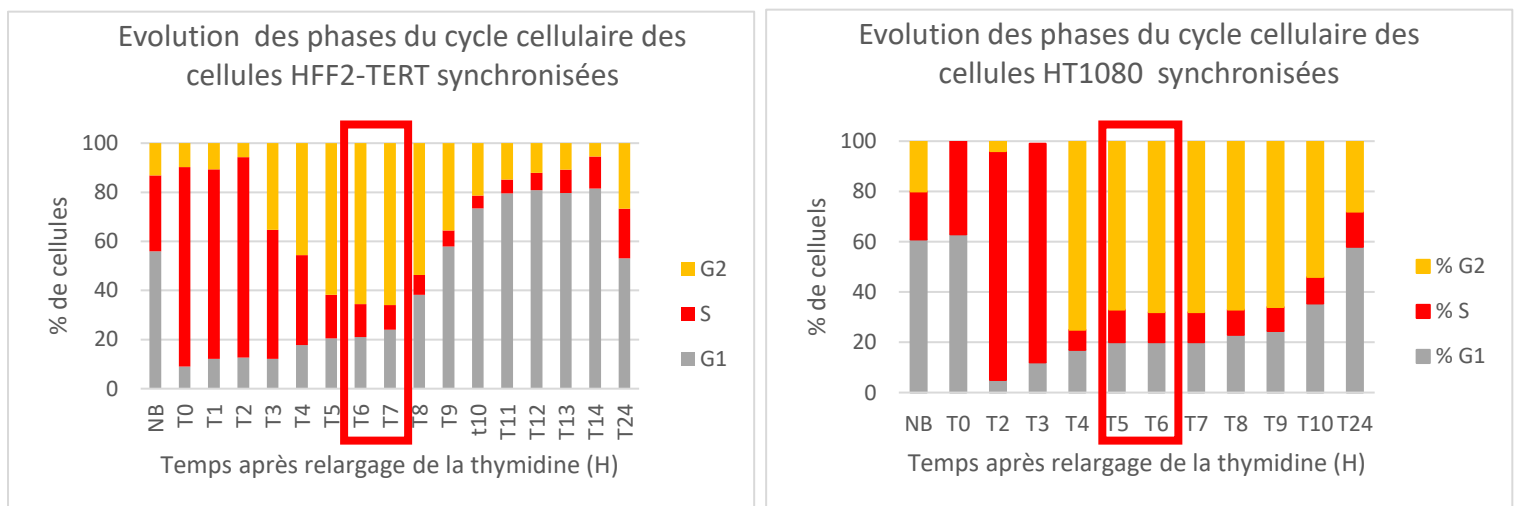


Figure 48 : Evolution du cycle cellulaire de populations de cellules HFF-TERT et HT1080, synchronisées et non stressées, après relargage de la thymidine.

A gauche, cellules HFF2-TERT, à droites cellules HT1080 soumises à un stress de 30 min à 43°C, analysées dans les conditions décrites pour la Figure 46.

Le temps de relargage nécessaire à l'obtention d'un maximum de cellules en G2 avant la transition G2/M est encadré en rouge.

Ainsi, pour les cellules HFF2-TERT non stressées, le passage des cellules de G2 à G1 est observé entre 7h et 10h après relargage de la thymidine. Pour les cellules stressées une augmentation de la proportion de cellules en G1 n'est observée qu'après 12h de relargage de la thymidine, traduisant un ralentissement de quelques heures des cellules dans leur progression vers la phase G1 (Figure 49), similaire à celui observé dans les cellules HeLa.

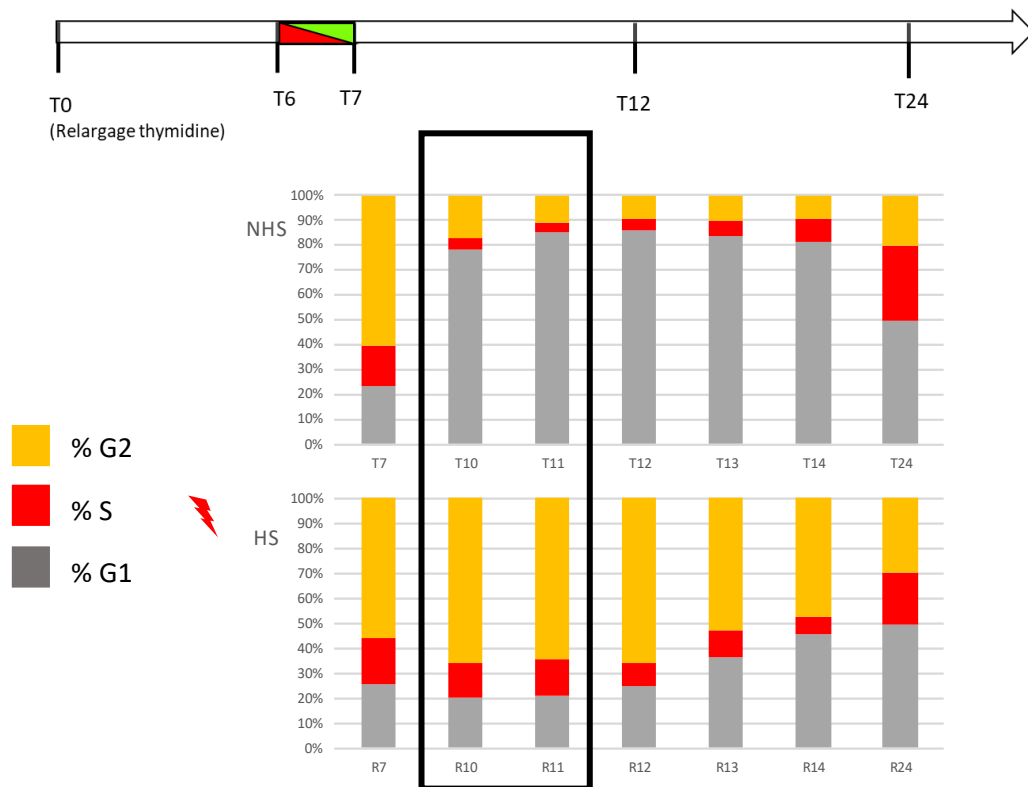


Figure 49 : Evolution du cycle cellulaire de populations de cellules HFF2 synchronisées stressées ou non stressées, après relargage de la thymidine.

Les cellules HFF2-TERT non-stressées (haut) ou soumises à un stress de 45 min à 43°C appliqué 6h15 après relargage de la thymidine (bas), analysées dans les conditions décrites pour la Figure 46.

Alors que les cellules non stressées ont effectué leur transition G2/M, la progression dans le cycle des cellules stressées est retardée (encadré noir).

Abréviations : NB = non synchronisées, NHS = non stressées, HS = stressées, T = temps après relargage de la thymidine dans les cellules non stressées, R = temps après relargage de la thymidine dans des cellules soumises à un stress.

Un retard de la progression des cellules en G1 est également observé dans les cellules synchronisées de la lignée HT1080, (Figure 50). Après 10h de relargage de la thymidine, les cellules soumises à un stress sont encore bloquées en G2 contrairement aux cellules non stressées qui commencent à entrer en G1. Ces données traduisent un ralentissement du cycle cellulaire, induit par le stress, indépendant du statut tumoral ou non des cellules.

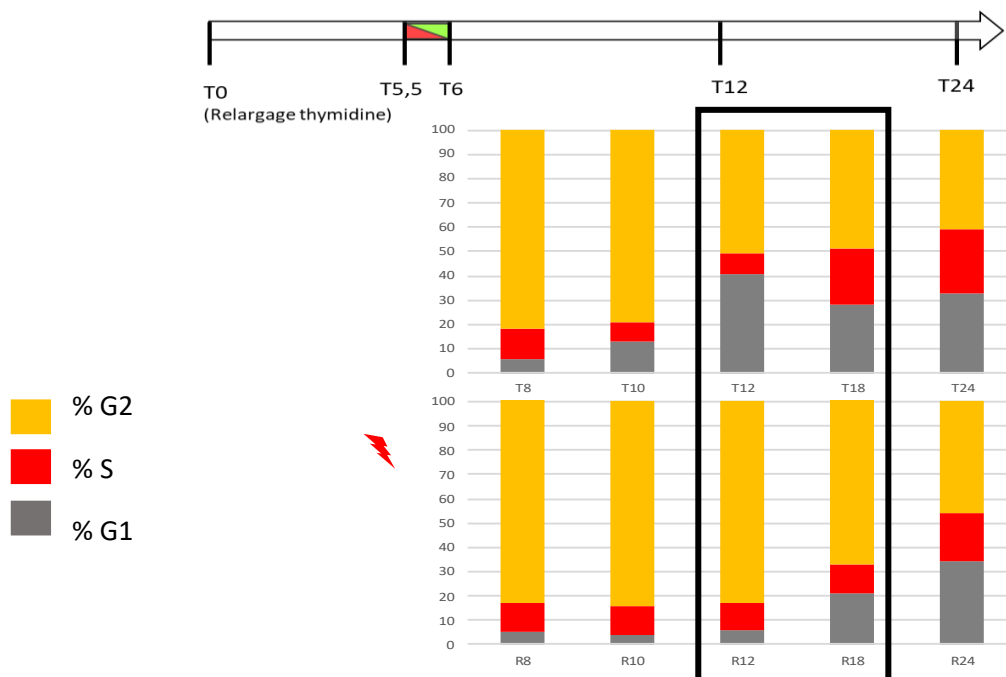


Figure 50 : Evolution du cycle cellulaire de cellules HT1080, synchronisées, stressées ou non stressées, après relargage de la thymidine.

Cellules non-stressées (haut) ou soumises à un stress de 30 min à 43°C 5h30 après relargage de la thymidine (bas) analysées dans les conditions décrites pour la Figure 46.

Alors que les cellules non stressées ont effectué leur transition G2/M, la progression dans le cycle des cellules stressées est retardée (encadré noir).

Abréviations : NB = non synchronisées, NHS = non stressées, HS = stressées, T = temps après relargage de la thymidine dans les cellules non stressées, R = temps après relargage de la thymidine dans des cellules soumises à un stress.

Un stress appliqué en G2 dans les lignées HeLa, HFF2-TERT ou HT1080 induit un retard de plusieurs heures des cellules dans leur passage en G1. Nous avons alors cherché à mettre en lien le retard dans la transition G2/M des cellules avec l'expression des ARNs *SATIII* sens et antisens au cours de la HSR.

III-C-2 Impact de l'accumulation des transcrits *SATIII* induits par le stress sur l'entrée en mitose des cellules synchronisées.

Afin de corrélérer les retards de la transition G2/M des cellules stressées, avec le profil d'accumulation des transcrits *SATIII*, nous avons réalisé une nouvelle cinétique d'accumulation des transcrits *SATIII* induits par le stress dans les différentes lignées cellulaires synchronisées.

Nous avons analysé par FISH ARN le pourcentage de cellules exprimant des transcrits *SATIII* sens dans le noyau des cellules synchronisées avec ou sans stress, et à différents temps de récupération après stress, par FISH ARN (Figure 51).

L'utilisation d'une sonde spécifique des régions *SATIII* du chromosome 9 ne nous a pas permis de détecter une accumulation de transcrits sens dans des cellules non stressées.

Cependant 100% des cellules synchronisées HeLa et HT1080, et 50% des cellules HFF2-TERT, présentent un pic d'accumulation de transcrits sens dès la fin du stress thermique (Figure 51).

Le pourcentage de cellules contenant des foyers de transcrits *SATIII* sens diminue significativement en récupération jusqu'à atteindre 30% 9h après le stress c'est-à-dire 15h après le relargage de la thymidine (R15) pour les cellules HeLa. Les foyers de transcrits *SATIII* sens ont totalement disparu 6h après stress, c'est à dire 12h après le relargage de la thymidine (R12) pour les cellules HT1080.

Dans la lignée HFF2-TERT le pourcentage de cellules contenant des foyers de transcrits *SATIII* sens augmente transitoirement dans les premières phases de la période de récupération, jusqu'à atteindre 90% après 3h de récupération au stress soit 10h après relargage de la thymidine (R10). Ce pourcentage diminue dès lors progressivement avec seulement 30% des cellules marquées à R15.

Ainsi les profils d'expression des ARNs *SATIII* sens que nous avons obtenus sont similaires à ceux obtenues dans les lignées non synchronisées (Figure 52).

Une diminution du pourcentage de cellules présentant des foyers d'ARN *SATIII* est observée 15h après relargage de la thymidine soit 9h après avoir appliqué un stress sur les cellules.

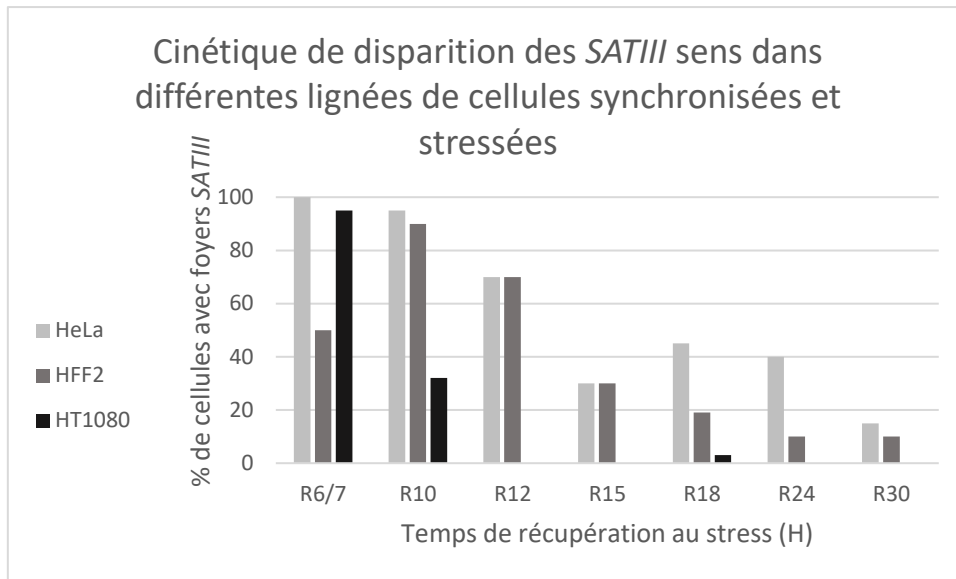


Figure 51 : Analyse comparative des profils d'accumulation des transcrits *SATIII sens* par RNA FISH dans les cellules HeLa, HFF-TERT, et HT1080 synchronisées et stressées, après relargage de la thymidine.

Cellules HFF2-TERT non-stressées (haut) ou soumises à un stress de 45min à 43°C 6h15 après relargage de la thymidine (bas). Pour chaque lignée et chaque point de la cinétique, 100 noyaux ont été analysés. (2 cinétiques indépendantes ont été réalisées pour les cellules HeLa, 1 cinétique a été réalisée pour les cellules HFF2-TERT et HT1080).

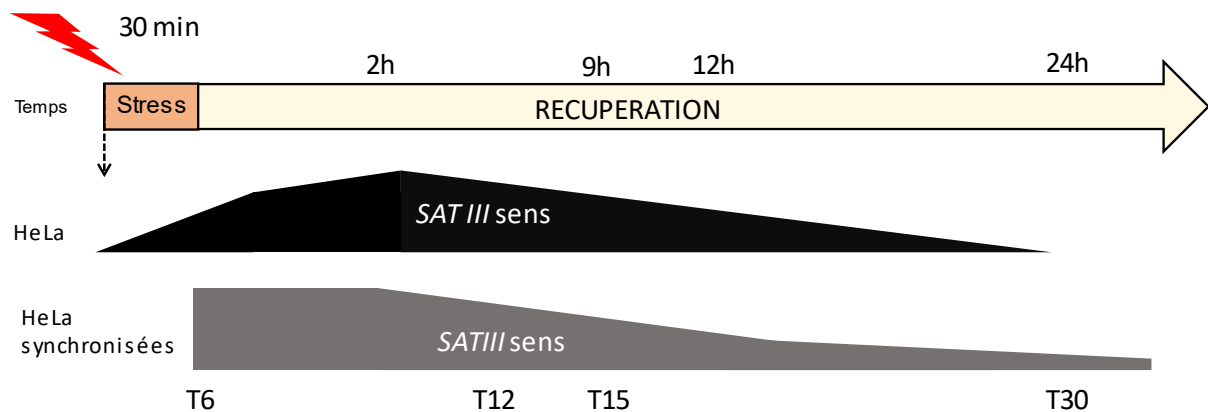


Figure 52 : Profil d'accumulation des transcrits *SATIII sens* au cours d'une cinétique de récupération au stress dans des cellules HeLa non synchronisées (en haut) et synchronisées (en bas).

En confrontant ces données avec celles obtenues par FACS, il apparaît que le passage en mitose des cellules synchronisées stressées est observé 12h à 15h après relargage de la thymidine, soit au moment même où les foyers d'accumulation *SATIII sens* commencent à disparaître des noyaux des cellules (Figure 53).

Cette corrélation suggère une fonction possible des transcrits *SATIII* sens dans la transition G2/M/G1, l'accumulation des transcrits (en lien avec l'évolution des marques répressives au locus 9q12) pourrait constituer des signaux susceptibles de bloquer le passage des cellules en mitose jusqu'à disparition des transcrits sens et/ou remise en place des régions d'hétérochromatine.

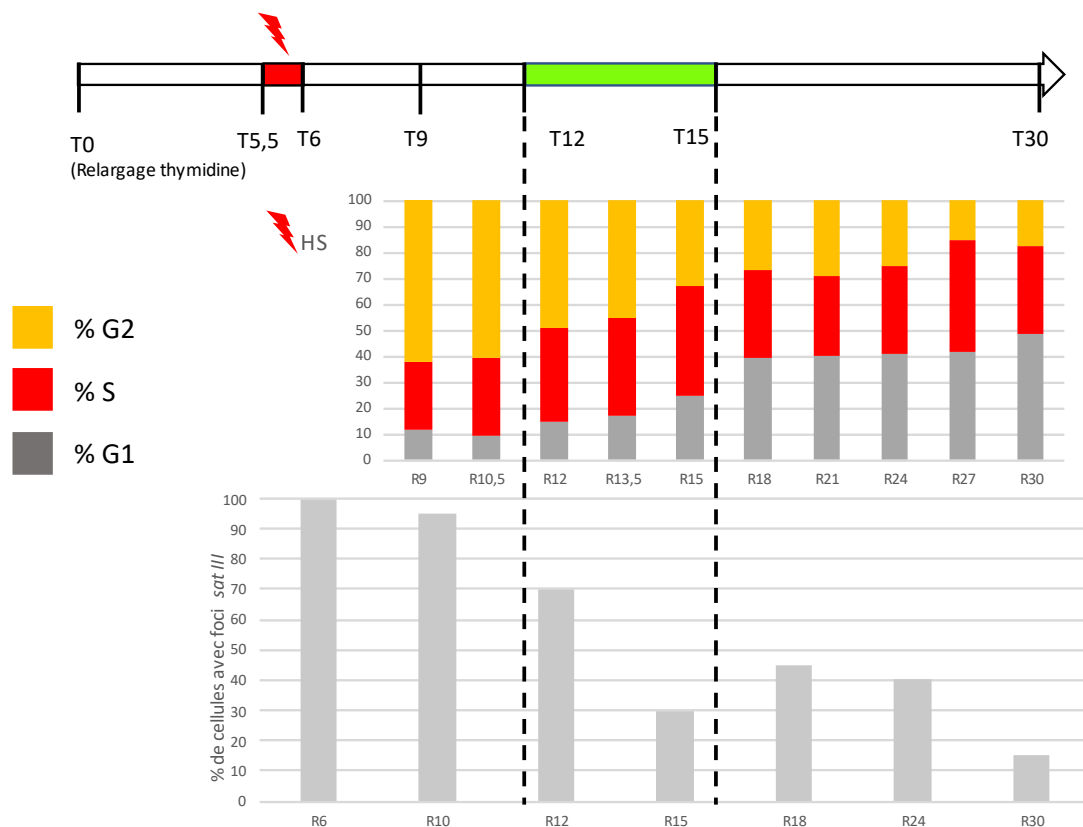


Figure 53 : L'évolution du pourcentage de cellules en phase M au cours de la période de récupération au stress, est inversement corrélée à la cinétique de disparition des foyers de transcrits *SATIII* sens dans les cellules HeLa synchronisées.

En haut : analyse du cycle cellulaire par FACS. En bas : pourcentage de cellules présentant des foyers nucléaires de transcrits *SATIII* sens.

Dans des cellules HFF2-TERT synchronisées, nous pouvons noter la présence de transcrits *SATIII* sens dans seulement 50% de cellules dès la fin de la période d'exposition au stress. Ce pourcentage de cellules transcrits *SATIII* sens augmente pour atteindre 90% après 3 heures de récupération au stress puis décroît de manière similaire à ce qui est observé dans les cellules HeLa (Figure 54).

Il est très probable que dans cette lignée, HFF2-TERT, le taux d'expression des transcrits *SATIII* sens soit plus faible que dans les HeLa, rendant plus difficile leur détection dès la fin du stress.

Nous observons néanmoins qu'à l'instar des cellules HeLa, le passage en G1 des cellules HFF2-TERT soumises à un stress est corrélé à une baisse significative du pourcentage des cellules exprimant des transcrits *SATIII* sens (observé à partir de 12h après relargage de la thymidine).

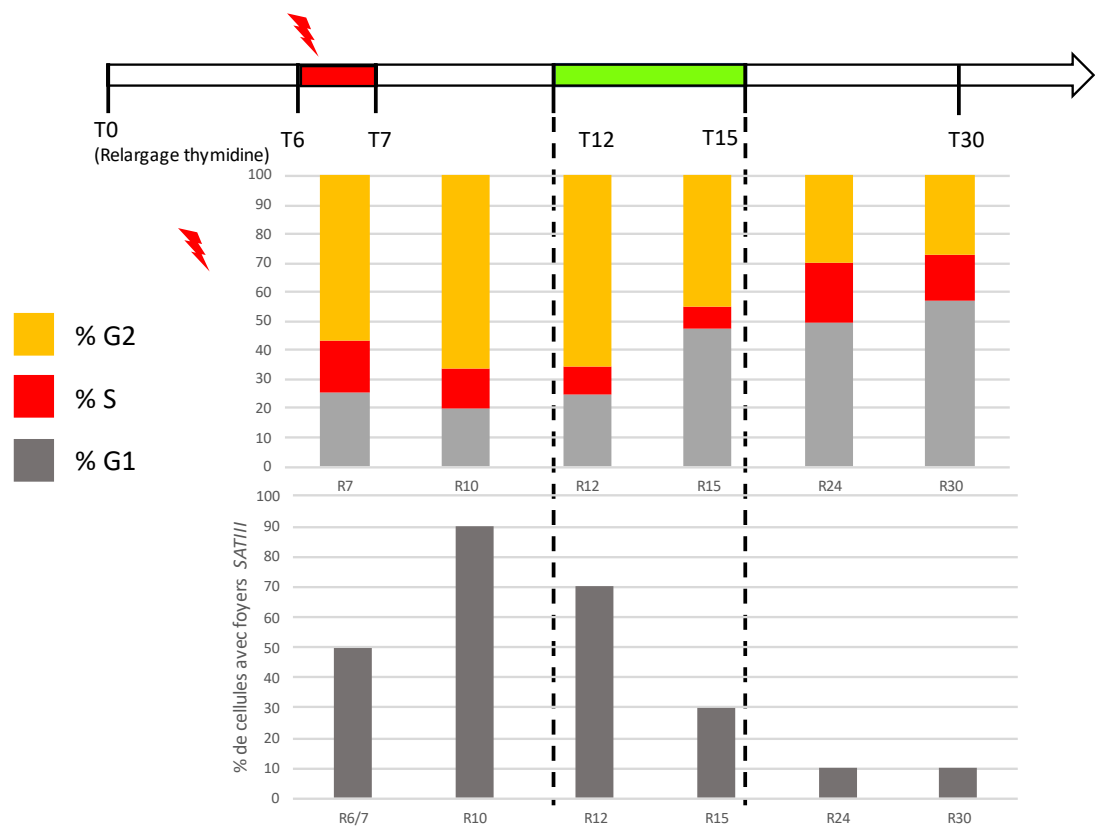


Figure 54 : L'augmentation du pourcentage de cellules HFF2-TERT en phase G2/M au cours de la période de récupération au stress, est corrélée à la disparition des foyers de transcrits *SATIII* sens dans les cellules HeLa synchronisées.

En haut : analyse du cycle cellulaire par FACS. En bas : pourcentage de cellules présentant des foyers nucléaires de transcrits *SATIII* sens.

III-C-3 Les transcrits *SATIII* antisens s'accumulent au moment de l'entrée en mitose.

Nous avons observé une accumulation de transcrits antisens dans des cellules HeLa soumises à un stress pendant la récupération tardive, nous avons alors cherché à déterminer le profil d'accumulation des transcrits *SATIII* antisens dans les cellules synchronisées.

Dans les cellules HeLa non stressées, nous ne détectons pas, par FISH ARN, de transcrits *SATIII* antisens au moment du relargage de la thymidine (T0) (Figure 55).

En revanche, nous détectons un pourcentage élevé (40%) de cellule présentant des transcrits *SATIII* antisens 8h (T8) après relargage de la thymidine, avec une diminution de ce pourcentage jusqu'à 12h (T12) après relargage de la thymidine. Ce pourcentage augmente de nouveau à T24 puis diminue à T30 (Figure 56).

Ce pic d'accumulation de transcrits *SATIII* antisens coïncide avec la cinétique de passage en mitose des cellules. Le second pic observé à T24 est susceptible de correspondre au passage des cellules en mitose au cycle suivant (Figure 56).

Comme chez la souris, la transition de G2 vers M s'accompagne ainsi d'une transcription des régions péri-centriques, et plus particulièrement dans notre cas, d'une accumulation d'ARN *SATIII* antisens.

Ce pic de transcription correspond à un moment précis du cycle, ce qui pourrait expliquer la raison pour laquelle, dans des cellules HeLa non synchronisées et non stressées, nous ne détectons pas les transcrits antisens de manière uniforme.

Dans les lignées HFF2-TERT et HT1080 synchronisées et non stressées, un pic d'accumulation des transcrits *SATIII* antisens est également observé à l'entrée des cellules en mitose, corrélation particulièrement marquée dans le cas des cellules HT1080 (Figure 56).

Dans les cellules HFF2, les signaux sont de faible intensité et visibles après 8h de relargage de la thymidine, et dans un deuxième temps à 24h. Ainsi, le profil d'accumulation de ces transcrits est une caractéristique commune à l'ensemble des lignées étudiées.

Nous avons par la suite complété cette étude en étudiant l'effet d'un stress thermique sur la cinétique d'accumulation des ARNs *SATIII* antisens dans des cellules synchronisées par traitement à la thymidine.

Dans les cellules stressées l'apparition du pic d'accumulation des ARNs *SATIII* antisens est retardé de 6 heures (Figure 57). Les transcrits *SATIII* antisens commencent à s'accumuler au moment où les transcrits *SATIII* sens commencent à disparaître.

Ces données montrent que les cinétiques d'accumulation des transcrits sens et antisens, sont inversement corrélées et suggèrent un rôle possible des *SATIII* antisens dans le passage des cellules en mitose.

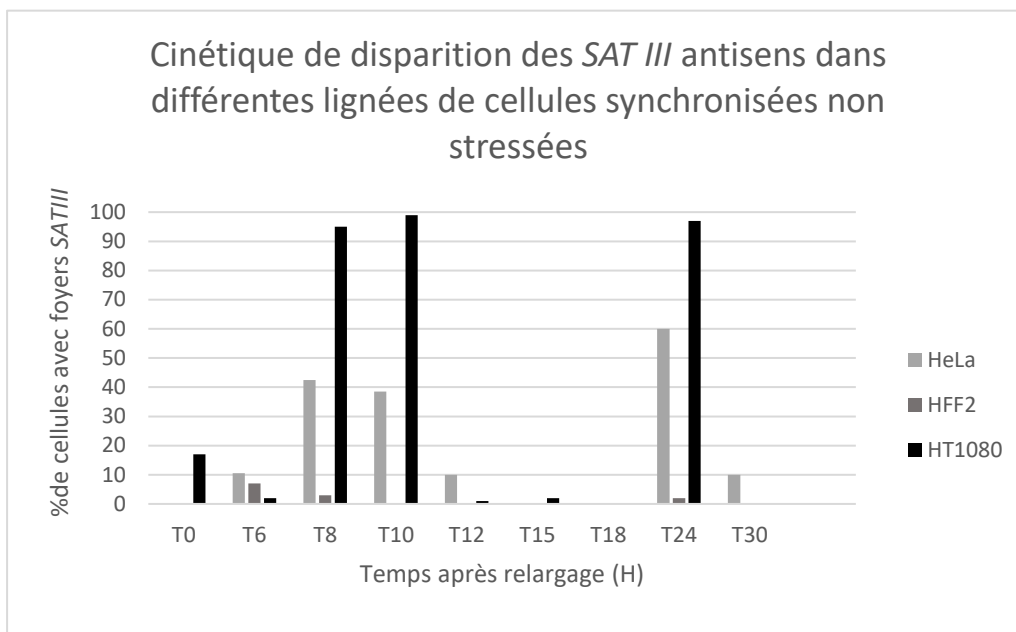


Figure 55 : Analyse comparative du profil d'accumulation des transcrits *SATIII antisens* dans les cellules HeLa, HFF2-TERT et HT1080 synchronisées en absence de stress.

Pour chaque lignée les transcrits *SATIII antisens* ont été détectés par ARN FISH. Pour chaque point de cinétique, un comptage a été réalisé à partir de 100 noyaux (le comptage a été réalisé sur 2 expériences indépendantes pour les cellules HeLa). Ordonnée : pourcentage de cellules présentant des foyers *SATIII antisens*.

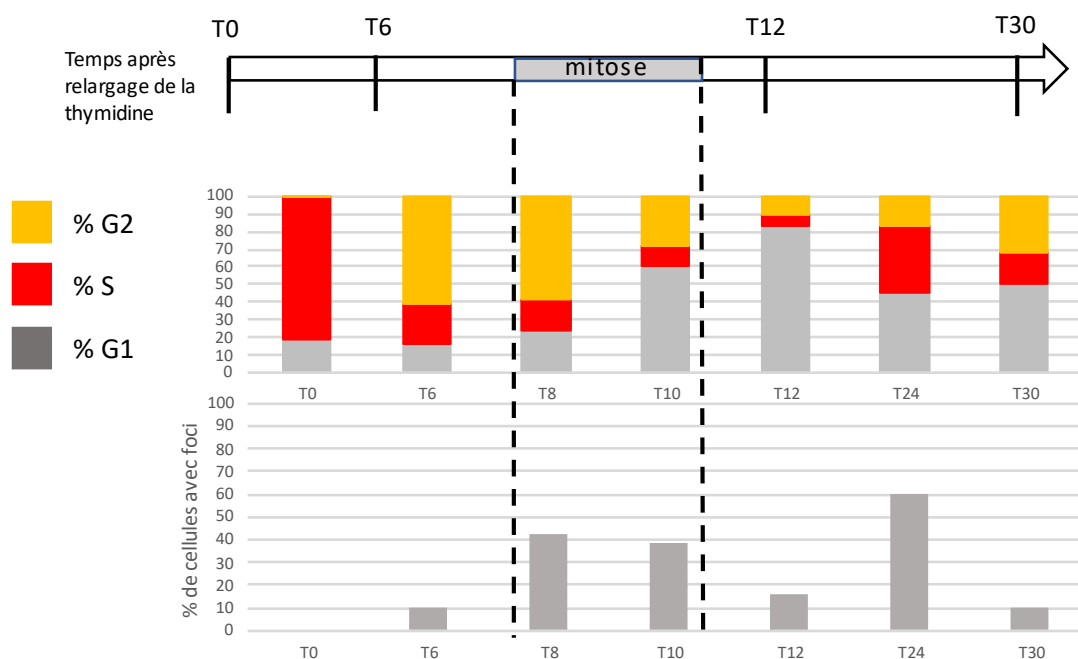


Figure 56 : La cinétique de l'entrée en mitose des cellules HeLa synchronisées non stressées est corrélée au profil d'accumulation des transcrits *SATIII antisens*.

En haut : analyse du cycle cellulaire par FACS. En bas : pourcentage de cellules présentant des foyers nucléaires de transcrits *SATIII antisens*. Pour chaque point de cinétique, un comptage a été réalisé à partir de 100 noyaux. En ordonnée : pourcentage de cellules avec foyers de transcrits *SATIII antisens*, en abscisse : Temps après relargage de la thymidine.

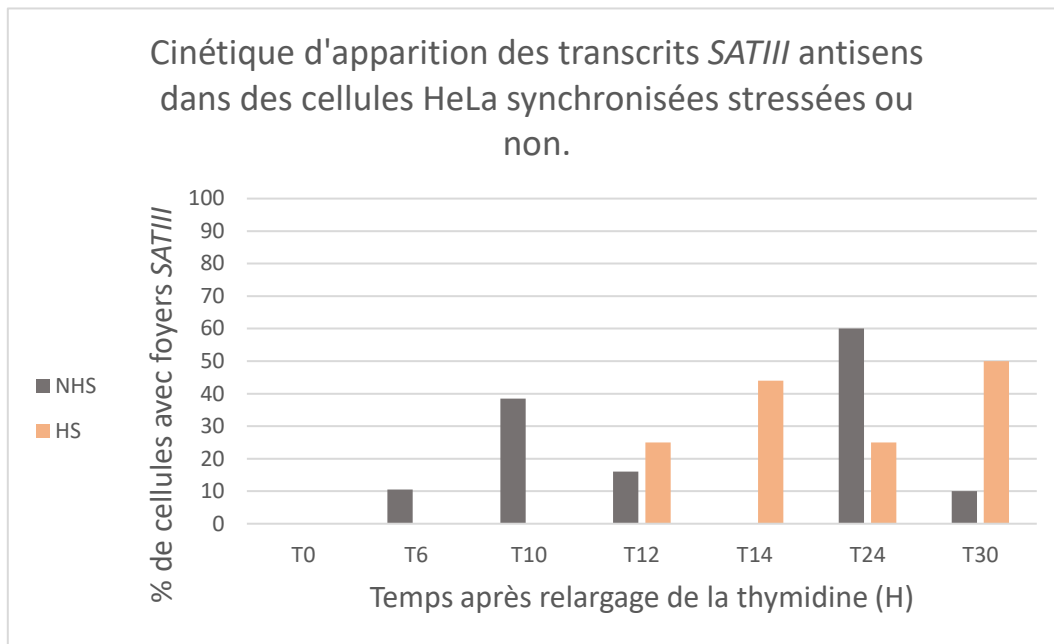


Figure 57 : Dans les cellules HeLa synchronisées, et stressées, la cinétique d'accumulation des transcrits *SATIII* antisens est retardé par rapport à ce qui est observé pour les mêmes cellules non stressées. Les ARN *SATIII* antisens ont été détectés par FISH ARN. Pour chaque point de cinétique, un comptage a été réalisé à partir de 100 noyaux. En abscisse : Temps après relargage de la thymidine, en ordonnée, pourcentage de cellules avec foyers *SATIII* antisens.

III-C-4 La présence des transcrits *SATIII* sens est associée des instabilités chromosomiques.

Afin d'analyser plus précisément la nature du ralentissement du cycle observé dans les cellules stressées et de déterminer l'impact de l'accumulation des transcrits *SATIII* sur le processus mitotique, nous avons analysé plus en détail la qualité des cellules mitotiques.

Nous avons en particulier cherché à déterminer si le blocage observé était temporaire ou s'il s'accompagnait d'un accroissement de la mortalité cellulaire. Des données préliminaires obtenues au laboratoire, ainsi que dans la littérature (Giordano et al. 2020) révèlent la présence de défauts mitotiques engendrés par le stress dans des cellules HeLa.

Nous avons utilisé les méthodes de FISH ADN et FISH ARN pour mettre en évidence la présence d'instabilités chromosomiques (CIN), plus particulièrement la présence de chromosomes retardataires dans des cellules synchronisées, stressées et soumises à différents temps de récupération.

Nous avons détecté simultanément les chromosomes 9 et 1 par FISH ADN car la région péricentrique du chromosome 1 (1q12) n'est pas transcriptionnellement activée en réponse au stress. Ainsi, la région 1q12 a été utilisée comme contrôle négatif (Figure 58).

Dans les cellules HeLa non stressées, 3.3% des mitoses analysées présentent un chromosome mal aligné sur la plaque équatoriale. Dans des cellules stressées puis soumises à une période de récupération de 4, 6 ou 9h en récupération (R10, R12 et R15), le pourcentage de mitoses associées à la présence d'un chromosome retardataire augmente, concernant 62% ces cellules (Figure 59). Ainsi, seul le chromosome 9 a été identifié comme chromosome retardataire.

Les analyses de FISH ARN indiquent que dans 99% des mitoses présentant des défauts, le chromosome retardataire est associé aux transcrits *SATIII* sens.

Nous avons utilisé la même approche (synchronisation, stress et FISH ADN ou ARN) sur une lignée issue de cellules non cancéreuses, HFF2-TERT, et sur une lignée issue de cellules cancéreuses mâles HT1080.

De manière intéressante, nous n'avons pas mis en évidence de défauts mitotiques causés par la réponse au stress dans ces deux dernières lignées. Toutefois, de manière intéressante, les cellules mitotiques sont difficiles à visualiser en microscopie dans la lignée HT1080 suggérant un blocage de l'entrée des cellules en mitose associée à l'accumulation d'ARNs *SATIII*.

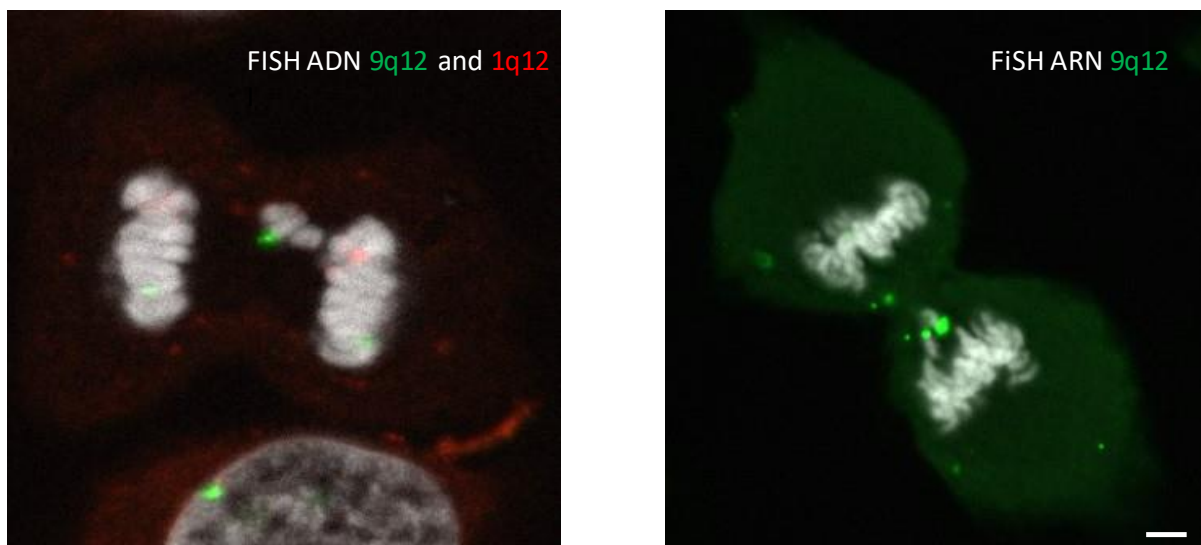


Figure 58 : L'accumulation des transcrits *SATIII* sens à la région 9q12 est associée à un défaut de ségrégation du chromosome 9 au cours de la mitose, dans les cellules HeLa soumises à un stress.

Détection des chromosomes 1 et 9 par DNA FISH (à gauche) et détection par FISH ARN des transcrits *SATIII* (à droite) dans des cellules HeLa synchronisées, soumises à une période de 6h de récupération au stress.

En outre, dans les cellules HeLa, les chromosomes 9 retardés sont associés à des transcrits *SATIII* dans 99% des cas. L'analyse a été réalisée à partir de 50 figures mitotiques pour chaque condition : En absence de stress (NHS), 4 ou 6h après stress (R10 et R12) pour les deux lignées et 4, 6 et 9h (R10, R12, R15) pour les cellules HeLa.

	NHS	R10	R12	R15
HeLa	3,3 %	16,67 %	36,3 %	62%
HFF2/HT1080	0	0	0	-

Figure 59 : Tableau récapitulatif du pourcentage de mitose présentant des défauts de ségrégation dans des cellules HeLa, HFF2 et HT1080

L'analyse a été réalisée à partir de 50 figures mitotiques pour chaque condition : en absence de stress, 4h ou 6h après stress (R10 et R12) pour les deux lignées et 4, 6 et 9h (R10, R12, R15) pour les cellules HeLa.

III-C-5-Analyse par vidéomicroscopie de l'effet du stress sur des cellules synchronisées.

Pour renforcer notre étude, nous avons réalisé des expériences de vidéomicroscopie permettant l'observation du comportement des lignées cellulaires HeLa, HFF2-TERT, et HT1080 synchronisées, soumises ou non à un stress thermique sur une période de 24h.

En conditions non stressées les cellules passent en mitose entre 8 et 10h de relargage de la thymidine ce qui est parfaitement cohérent avec les données obtenues par FACS.

Suite à un stress, nous observons un comportement différent selon les lignées. Globalement, dans les lignées HT1080 et HFF2-TERT, le stress engendre un blocage des cellules dans leur cycle, et donc un retard dans le passage en mitose par rapport aux cellules non stressées. Dans ces deux lignées en revanche, nous n'avons pas mis en évidence d'excès de mortalité et donc d'excès de perte de cellules.

Les cellules stressées HFF2-TERT entrent en mitose à partir de 12h de relargage de la thymidine (R12-R15), les cellules HT1080 semblent rester bloquées en G2 bien plus longtemps et avoir des difficultés à passer en mitose.

En revanche, dans les cellules HeLa stressées, nos observations de vidéomicroscopie montrent qu'une partie des cellules entrent en apoptose entre R10 à R12, c'est-à-dire dans les premières heures de récupération au stress. Ce temps correspond à l'entrée en mitose des cellules non stressées. Environ 2h plus tard (R14) les cellules HeLa entrent en mitose.

Les cellules HeLa semblent capables d'opérer un passage en mitose en dépit de la présence des transcrits *SATIII* sens présent au locus 9q12. La conséquence observée est une mitose imparfaite, associée à une éviction du chromosome 9. En raison de leur statut tumoral, certaines cellules filles semblent capable d'adapter à la présence de défauts mitotiques tandis que d'autres entrent en apoptose. Cependant nos analyses ne nous permettent pas d'exclure formellement la présence de cellules en mitose issues de la phase S ou de la phase G2. Nous avons regardé l'effet d'un knock-Down des transcrits *SATIII* sur le passage en mitose de cellules HeLa synchronisées avec ou sans stress, par vidéomicroscopie, en utilisant des LNA dirigés contre les transcrits sens et antisens dont nous avons vérifié (uniquement dans le cas des ARN *SATIII* sens) l'efficacité par ARN FISH. Un LNA contrôle dirigé contre l'ARN codant pour la GFP ont été utilisé (Figure 60).

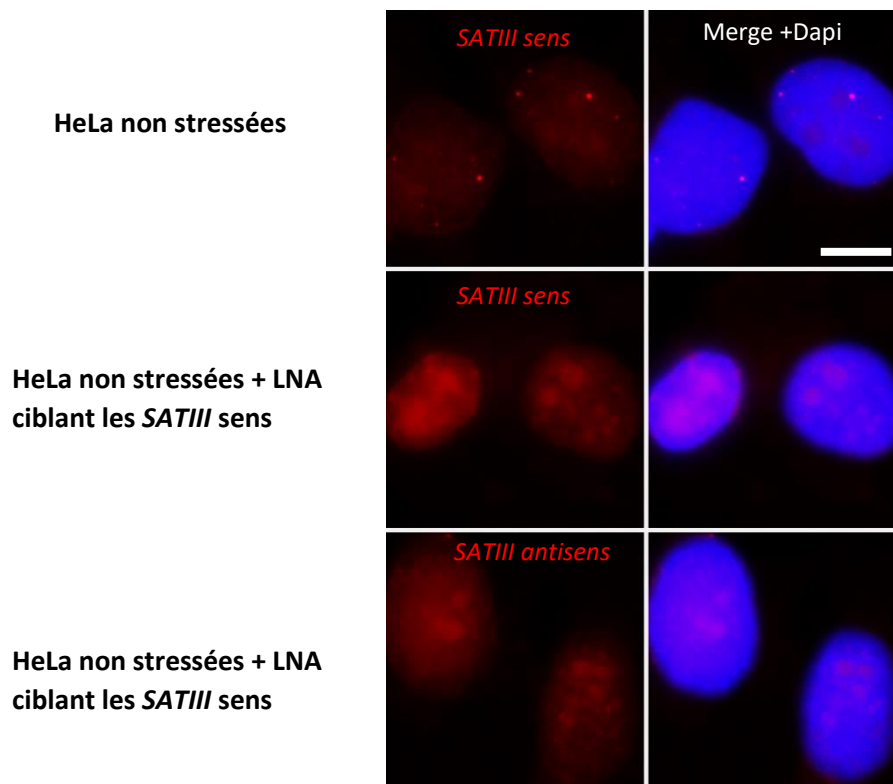


Figure 60 : Efficacité d'un knock-down de l'expression des *SATIII* sens sur l'accumulation des transcrits *SATIII* sens et antisens dans des cellules HeLa non stressées.

Les ARN *SATIII* sens et antisens sont détectés par FISH ARN, dans des cellules HeLa traitées ou non avec des LNA dirigés contre les transcrits *SATIII* sens. L'image est obtenue par microscopie à fluorescence (barre d'échelle 5µm).

Toutefois, à notre surprise, l'effet d'un stress thermique combiné à un KD des transcrits sens est toxique pour la totalité des cellules synchronisées qui ne passent jamais la mitose et entrent en apoptose (figure 61).

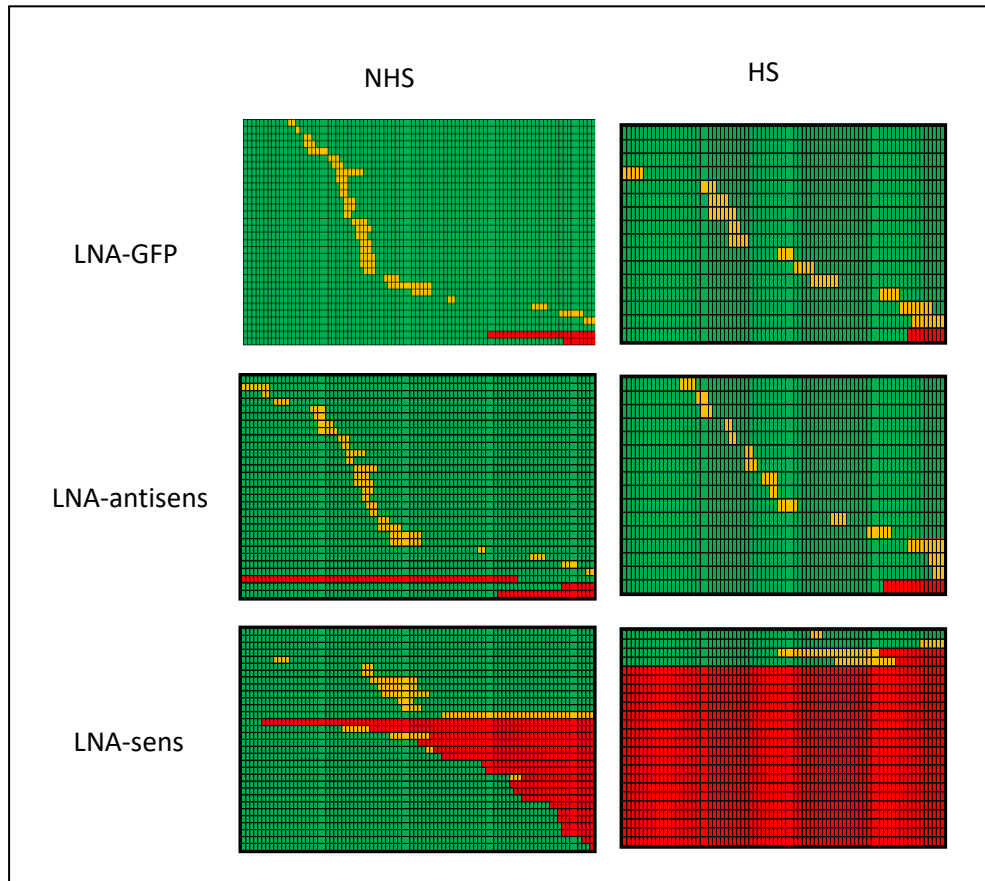


Figure 61 : Analyse par vidéomicroscopie de l'effet d'un Knock-Down des transcrits *SATIII* sens et antisens sur le passage en mitose de cellules HeLa non stressées et stressées.

De haut en bas, les cellules transfectées avec des LNA-GFP (contrôle), des LNA spécifiques des transcrits antisens (LNA-antisens) et contre les transcrits sens (LNA-sens). Chaque ligne correspond au suivi d'une cellule sur un période de 24h, pour les cellules non stressées et 22h pour les cellules stressées, avec une acquisition d'image toutes les 15 minutes. L'entrée en mitose d'une cellule est indiquée par le code couleur jaune et le destin cellulaire par la couleur rouge (apoptose) ou verte (survie).

Nos données révèlent l'importance pour les cellules synchronisées de contrôler le niveau d'expression des transcrits *SATIII*. En effet, une accumulation des transcrits *SATIII* avant la mitose entraîne des perturbations dans la progression du cycle cellulaire, et l'apparition de d'instabilités chromosomiques dans les cellules HeLa, alors qu'un Knock-Down de ces transcrits a des conséquences drastiques sur la survie cellulaire.

Dans les lignées diploïdes (HT1080 et HFF2-TERT), nous n'avons pas observé d'instabilités chromosomiques dans les cellules stressées. Le stress appliqué en G2 bloquerait les cellules dans leur progression dans le cycle, jusqu' à élimination des transcrits.

Il semble donc que les transcrit servent d'alerte d'une mauvaise conformation de l'hétérochromatine pour le passage en mitose, ils joueraient un rôle de « checkpoint » mitotique.

Dans les cellules HeLa, en revanche les points de contrôles du cycle étant déficient, comme c'est le cas dans la plupart des cellules tumorales, la cellule peut entrer en mitose et survivre aux instabilités chromosomiques. Néanmoins l'effet drastique d'un KD des transcrits sens sur la survie cellulaire ne nous permet pas aujourd'hui d'évaluer le rôle spécifique des *SATIII* dans le contrôle du « Checkpoint » G2/M/G1.

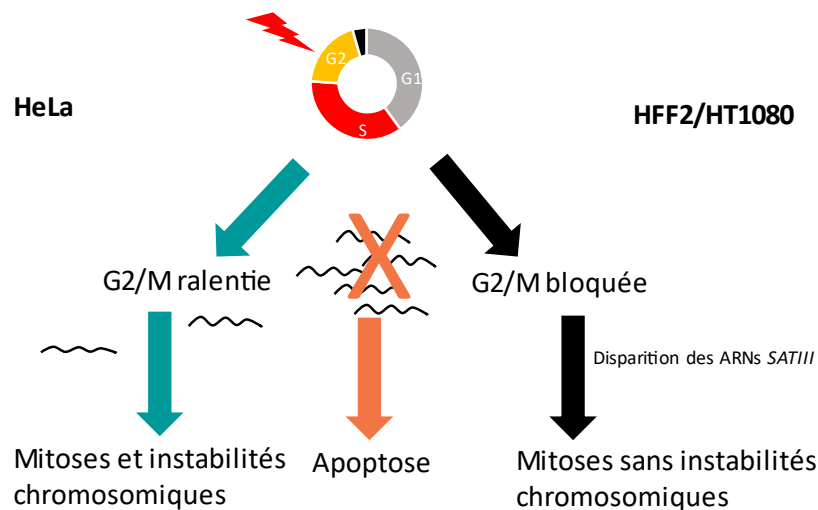


Schéma récapitulatif du rôle de « checkpoint » des ARNs *SATIII* dans la transition G2/M

Dans les cellules HeLa, un excès de transcrits *SATIII* sens induit par le stress est corrélé au ralentissement de la transition G2/M, et un KD de ces transcrits a un effet drastique sur la survie des cellules. Dans les lignées HFF2-TERT et HT1080 qui contrairement aux cellules HeLa sont des lignées diploïdes, un excès de transcrits bloque le passage en mitose.

III-D– Identification d'un nouvel acteur (YTHDC1) impliqué dans la reprogrammation de l'expression génique au cours de la HSR.

En réponse à un stress protéotoxique, la cellule, en vue de préserver son homéostasie, met en œuvre une reprogrammation drastique de son expression génique (Mahat et al., 2016) ; au niveau transcriptionnel, des centaines de gènes sont activés alors que des milliers d'autres sont réprimés (Vihervaara et al., 2017).

Depuis longtemps, HSF1 est considéré comme l'un des acteurs à l'origine de cette adaptation. Suite à un stress thermique, ce facteur de transcription orchestre la réponse cellulaire (HSR) en activant la transcription de ses gènes cibles, mettant ainsi en place simultanément une

réponse codante à travers l'expression de protéines de protection (Heat shock Protéines ou HSPs), et une réponse non codante à travers la formation de foyers nucléaires de stress (nSBs), dont un des rôles est la séquestration de facteurs de transcription et de facteurs d'épissage de type protéine SR (Metz et al., 2004). Ces dernières années, des données plus complètes obtenues après analyse à l'échelle du génome ont mis en lumière la complexité et l'ampleur de la régulation des mécanismes cellulaires de la réponse au stress :

Tout d'abord, la reprogrammation perdure pendant la période de récupération au stress, et intervient dans de multiples processus cellulaires, comme la régulation du cycle, l'apoptose ou encore la réorganisation du cytosquelette (Mahat et al., 2016).

Au cours de la HSR, une partie de l'activation des gènes codants ne met pas directement en jeu une liaison d'HSF1 aux promoteurs (Trinklein et al. 2004 ; Vihervaara et al., 2017 ; (Vihervaara, Duarte, et Lis 2018). L'activation de gènes non codants est aussi impliquée dans la régulation de l'épissage, plus particulièrement dans les processus menant à la rétention d'introns. En effet, les transcrits *SATIII* formeraient une plateforme de recrutement aux nSBs pour de nombreux facteurs impliqués dans l'épissage, comme les protéines SR et la kinase CLK1, impactant ainsi l'expression de plusieurs centaines de gènes (Ninomiya et al., 2020) (voir chapitre I). Plus généralement, il a également été montré que le stress a un impact sur l'épi-transcriptome :

Le niveau d'ARN modifiés par la marque m6A (N6-methyladenosine RNA méthylation), la méthylation la plus répandue des ARN messagers, varie en fonction du stress (Zhou et al., 2018 ; Knuckles et al. 2017) et la présence de cette marque est déterminante pour le destin cellulaire de ces ARNm.

La protéine YTHDC1, très conservée, est un « reader » nucléaire de la marque m6A et est également fortement impliquée dans la régulation des ARNs (Widagdo, Anggono, et Wong 2022).

L'ensemble de ces données suggère qu'au-delà de la réponse transcriptionnelle médiée par HSF1, d'autres éléments contribuent, de manière indépendante ou indirecte, à la régulation de l'expression génique en réponse à un stress. Dans ce contexte, notre intérêt s'est plus particulièrement porté sur le potentiel rôle de la protéine YTHDC1 dans la reprogrammation de l'expression génique induite par le stress, en lien avec la signalisation m6A. Nos études ont donné lieu à une publication en cours de révision (Voir Annexe).

Chromatin-associated YTHDC1 m6A reader coordinates heat-induced reprogramming of gene expression

Kalina Timcheva, Solenne Dufour, Leila Touat-Todeschini, Callum Burnard, Marie-Christine Carpentier, Florent Chuffart, Rémy Merret, Marion Helmsmoortel, Sabrina Ferré, Aude Grézy, Yohann Couté, Sophie Rousseau, Saadi Khochbin, Claire Vourc'h, Cécile Bousquet-Antonelli, Rosemary Kiernan, Daphné Seigneurin-Berny and André Verdel.

Ce travail montre le rôle essentiel de la protéine YTHDC1 dans la réponse cellulaire au stress. En particulier, l'absence de YTHDC1 a pour conséquence un changement important du profil d'expression des gènes, entraînant un défaut d'accumulation des protéines HSPs.

La caractérisation fonctionnelle de la protéine YTHDC1 a été réalisée dans des lignées de cellules exprimant ou non la protéine YTHDC1, et par combinaison d'approches de biologie moléculaire et biochimie (ChIP-seq, RIP, RNA-seq et RT-qPCR, western blot et ImmunoPrécipitation).

Ainsi, l'équipe a mis en évidence l'association d'YTHDC1 à la chromatine et à des complexes de maturation des ARNs, l'existence de cibles génomiques d'YTHDC1 différentes dans les cellules stressées, l'importance de la liaison d'YTHDC1 à m6A indispensable à l'activation des gènes induits par le stress, et enfin la contribution d'YTHDC1 au processus de rétention d'introns qui est mis en place en réponse au stress.

Ma participation au projet, essentiellement via des analyses *in situ*, a été de montrer l'impact d'un stress thermique sur la distribution intracellulaire d'YTHDC1 et de caractériser les liens entre YTHDC1 et les ARNs non codants *SATIII* induits par le stress.

Nous nous sommes intéressés à la localisation subcellulaire de YTHDC1 au cours de HSR. Nous avons montré qu'**YTHDC1 se relocalise massivement dans les nSBs** en période de récupération après stress.

Nos observations d'immunofluorescence au cours d'une cinétique de récupération post-stress de 0 à 24h indiquent que YTHDC1 est fortement relocalisée dans les nSBs (visualisés par HSF1) à partir des premières heures de la récupération (figure 62). 100% des foci enrichis en facteur HSF1 sont également enrichis en YTHDC1 dans les cellules soumises à 3h et 6h de récupération. L'expression de YTHDC1 (donnée obtenue par western blot) ne semble pas varier en période de stress ou en période de récupération.

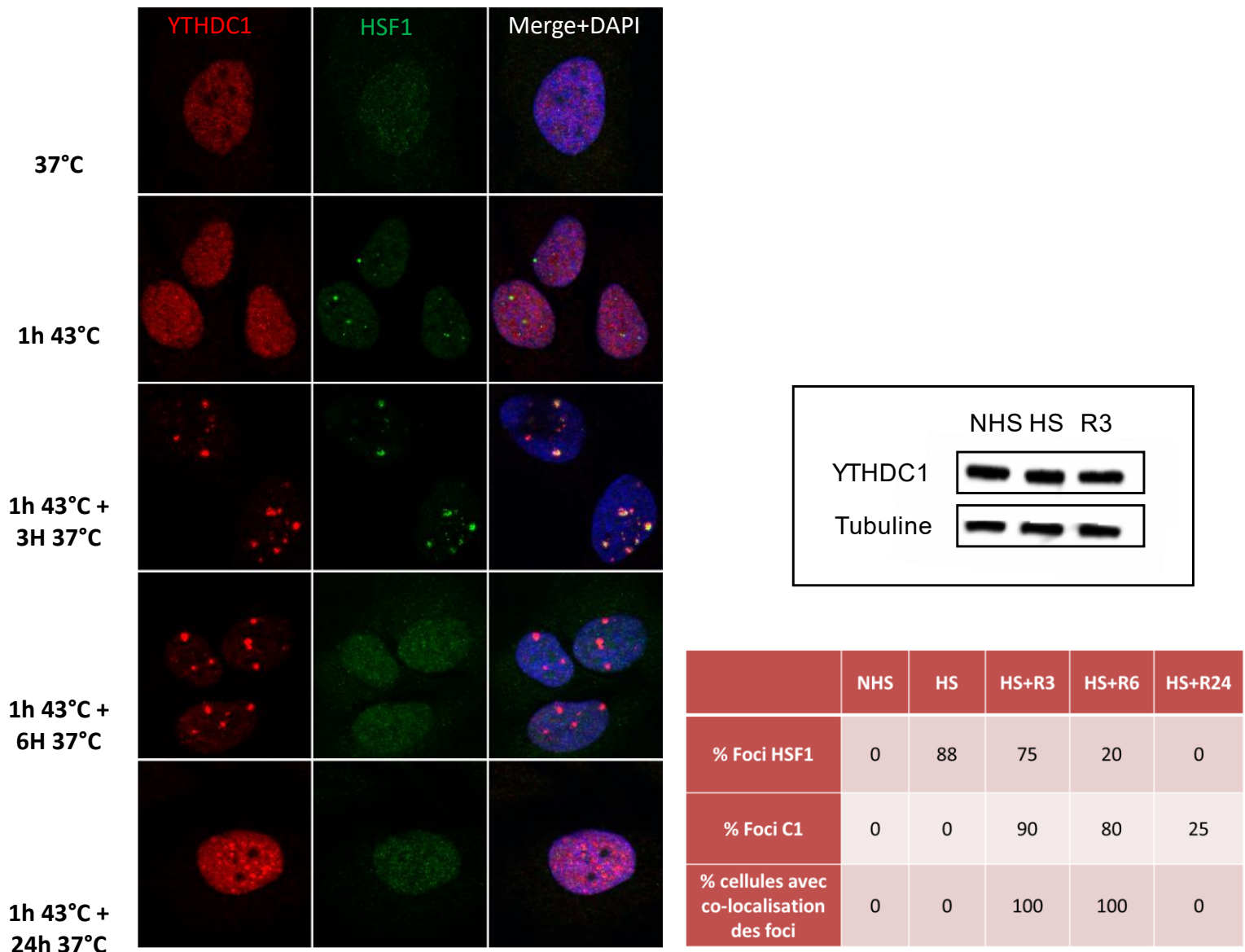


Figure 62 : Relocalisation d'YTHDC1 aux nSBs après 3 heures de récupération à un stress thermique. A gauche, analyse par microscopie confocale de la localisation des protéines YTHDC1 (rouge) et HSF1 (vert) au cours d'une cinétique de récupération au stress. Les signaux sont obtenus par immunofluorescence et visualisés par microscopie confocale (Apotome Zeiss, logiciel AxioVision) (barre d'échelle 10 μ m). En haut à droite, analyse par western blot de l'expression d'YTHDC1 au cours de la réponse au stress. En bas à droite, pourcentage de cellules contenant des foyers YTHDC1 et / ou HSF1, visualisés par immunofluorescence, comptage de 100 noyaux par condition.

Des données obtenues par FISH et immunofluorescence réalisés de manière séquentiels (figure 63), permettant de visualiser à la fois ADN et protéines, ou ARN et protéines, confirment la relocalisation de YTHDC1 au locus 9q12, lieu de formation des nSBs, à 3 heures de récupération post-stress. YTHDC1 est également présente aux sites d'accumulation des transcrits *SATIII* issus du locus 9q12.

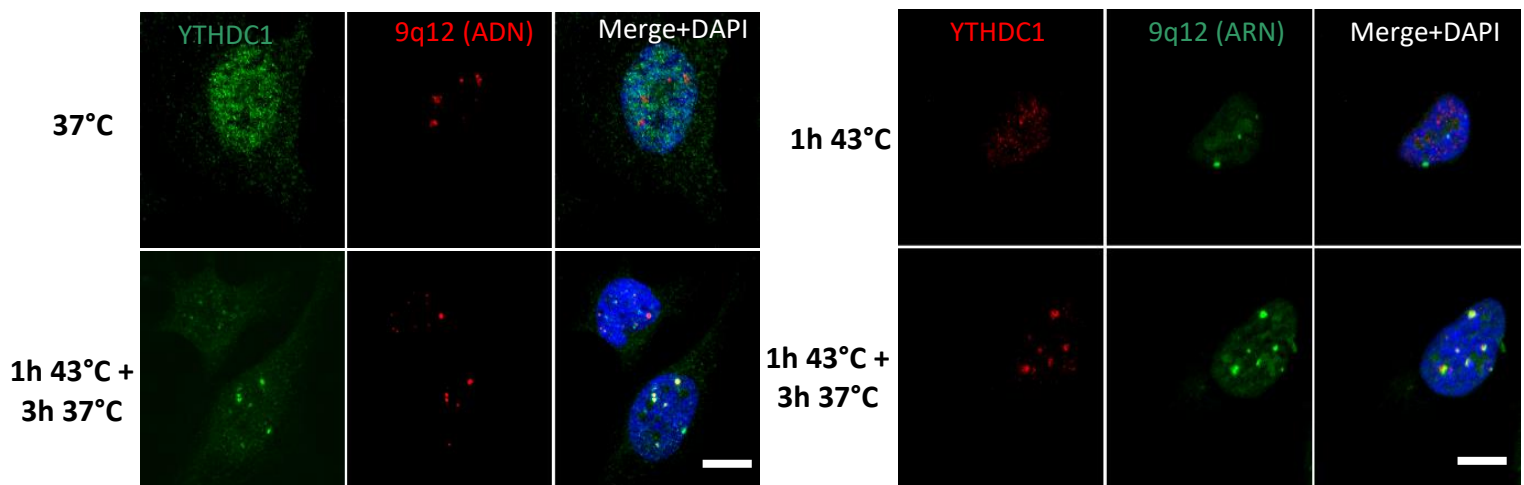


Figure 63 : Redistribution d'YTHDC1 au locus 9q12 dans des cellules stressées puis soumises à une période de 3 heures de récupération à 37°C.

A gauche, codétection d'YTHDC1 par immunofluorescence et du locus 9q12 (région SATIII) par FISH ADN en condition non stressée, et à 3 heures de récupération.

A droite, codétection d'YTHDC1 par immunofluorescence et des transcrits *SATIII* dans des cellules soumises à un stress et à un période de 3h de récupération au stress. Dans les deux cas, les signaux sont analysés par microscopie confocale (Apotome Zeiss, logiciel AxioVision) (barre d'échelle 10 µm).

Nous avons étendu nos observations à d'autres lignées cellulaires humaines et diploïdes, la lignée mâle cancéreuse HT1080, et la lignée mâle issue de fibroblastes normaux immortalisés HFF2-TERT (Figure 64).

Ces deux lignées répondent au stress de façon similaire à la lignée HeLa (relocalisation de HSF1 sur ses séquences cibles, formation de nSBs, transcription en ARNs *SATIII*).

Ces deux lignées présentent des cinétiques d'activation des séquences *SATIII* en réponse au stress, légèrement différentes de ce que nous observons pour les lignées HeLa (voir partie A des résultats).

Dans ces deux lignées humaines, nous observons, comme dans les cellules HeLa une relocalisation massive d'YTHDC1 aux nSBs (visualisés par HSF1) suite au stress thermique. Cette relocalisation est plus précoce que dans les cellules HeLa stressées et perdure également pendant la période de récupération au stress.

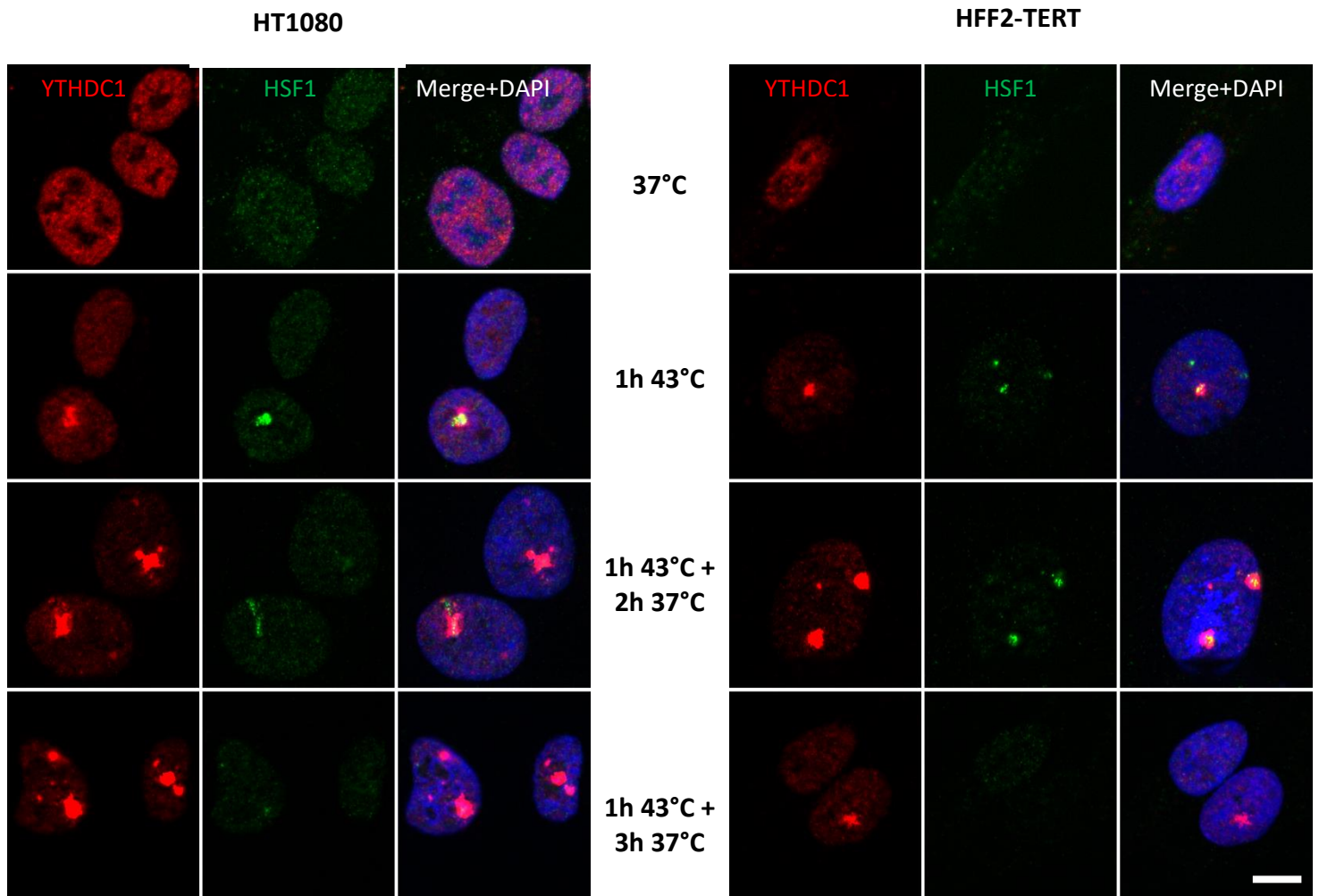


Figure 64 : Localisation des protéines YTHDC1 (rouge) et HSF1 (vert) au cours d'une cinétique de récupération au stress.

A gauche, la lignée HT1080, à droite la lignée HFF2-TERT.

Les signaux sont obtenus par immunofluorescence et visualisés par microscopie confocale (Apotome Zeiss, logiciel AxioVision) (barre d'échelle 10 μ m).

Nous avons alors cherché à déterminer **le rôle des ARNs induits par HSF1 dans la redistribution d'YTHDC1 aux nSBs.**

Lors de la HSR, l'accumulation de transcrits *SATIII* au niveau du locus 9q12 joue un rôle dans l'adressage et la séquestration provisoire de facteurs d'épissage de type protéine SR (Serine Rich proteins) (Metz et al. 2004) . Ces protéines SR ont aussi été identifiées dans l'interactome de YTHDC1 suggérant également un rôle des transcrits *SATIII* dans l'adressage de YTHDC1 aux nSBs soit directement, soit via des intermédiaires protéiques recrutés aux nSBs.

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons observé l'impact d'une déplétion en ARNs *SATIII* HSF1-induits sur la redistribution de YTHDC1 en période de récupération :

Pour cela nous avons utilisé des cellules déplétées en HSF1 (lignée stable HeLa KD HSF1), qui n'expriment pas de transcrits *SATIII* suite à un stress, et des cellules surexprimant un mutant dominant négatif de HSF1, la protéine de fusion GFP-HSF1-DBD-trim (voir modèle décrit dans la partie A des résultats), cette protéine mutée se fixe sur les cibles d'HSF1 et empêche la transcription des séquences *SATIII*.

En absence des transcrits *SATIII*, YTHDC1 ne se relocalise pas aux nSBs, suggérant que l'adressage de YTHDC1 aux nSBs est dépendant de la transcription par HSF1 des séquences *SATIII* (Figure 65).

Pour confirmer cette hypothèse nous avons regardé par immunofluorescence la localisation de YTHDC1 dans des cellules stressées puis déplétées en ARN par un traitement RNase.

La perte des ARNs affecte la relocalisation de YTHDC1 aux nSBs que nous observons à 3 heures de récupération. L'adressage et/ou le maintien de YTHDC1 aux nSBs semble bien être *SATIII* - dépendant (Figure 66).

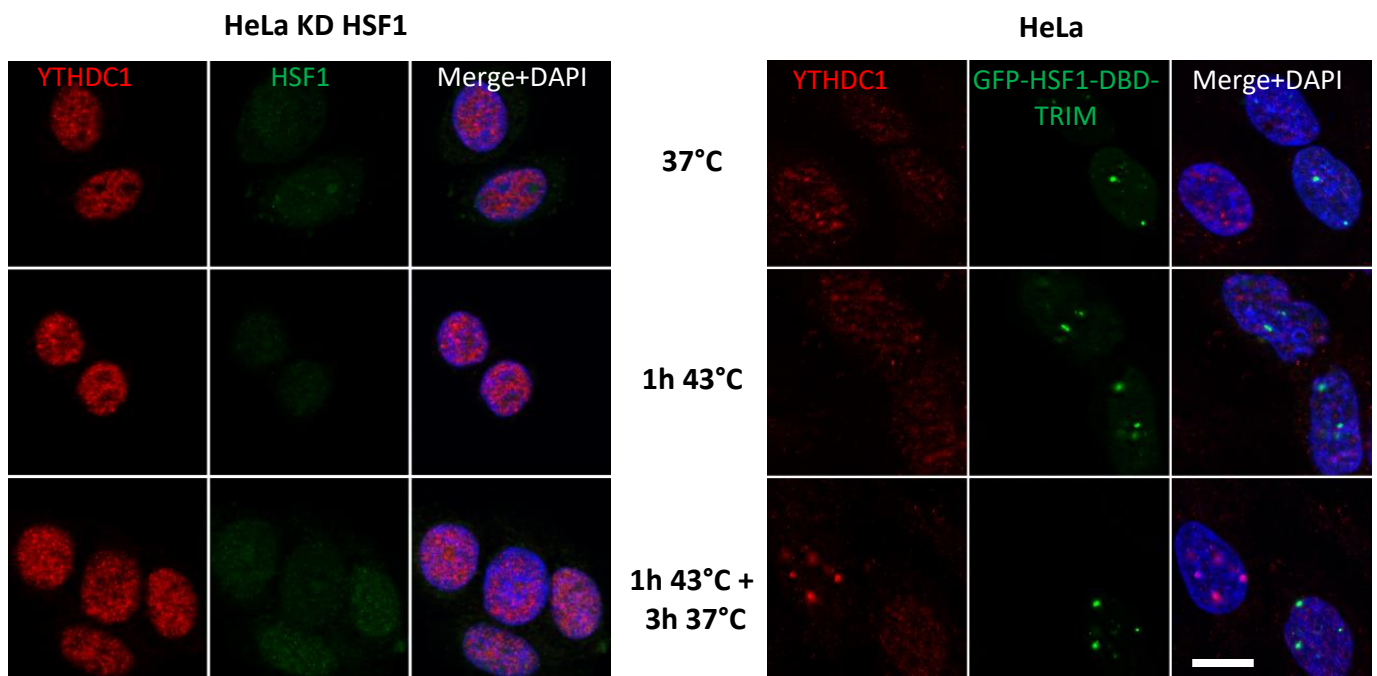


Figure 65 : Distribution de YTHDC1 (Rouge) et de HSF1 (vert) dans les cellules HeLa soumises ou non à un stress et à une période de récupération.

A gauche, dans des cellules KD HSF1, à droite dans des cellules transfectées avec GFP-HSF1-DBD-TRIM. Les signaux sont obtenus par immunofluorescence et visualisés par microscopie confocale (Apotome Zeiss, logiciel AxioVision) (barre d'échelle 10 μ m).

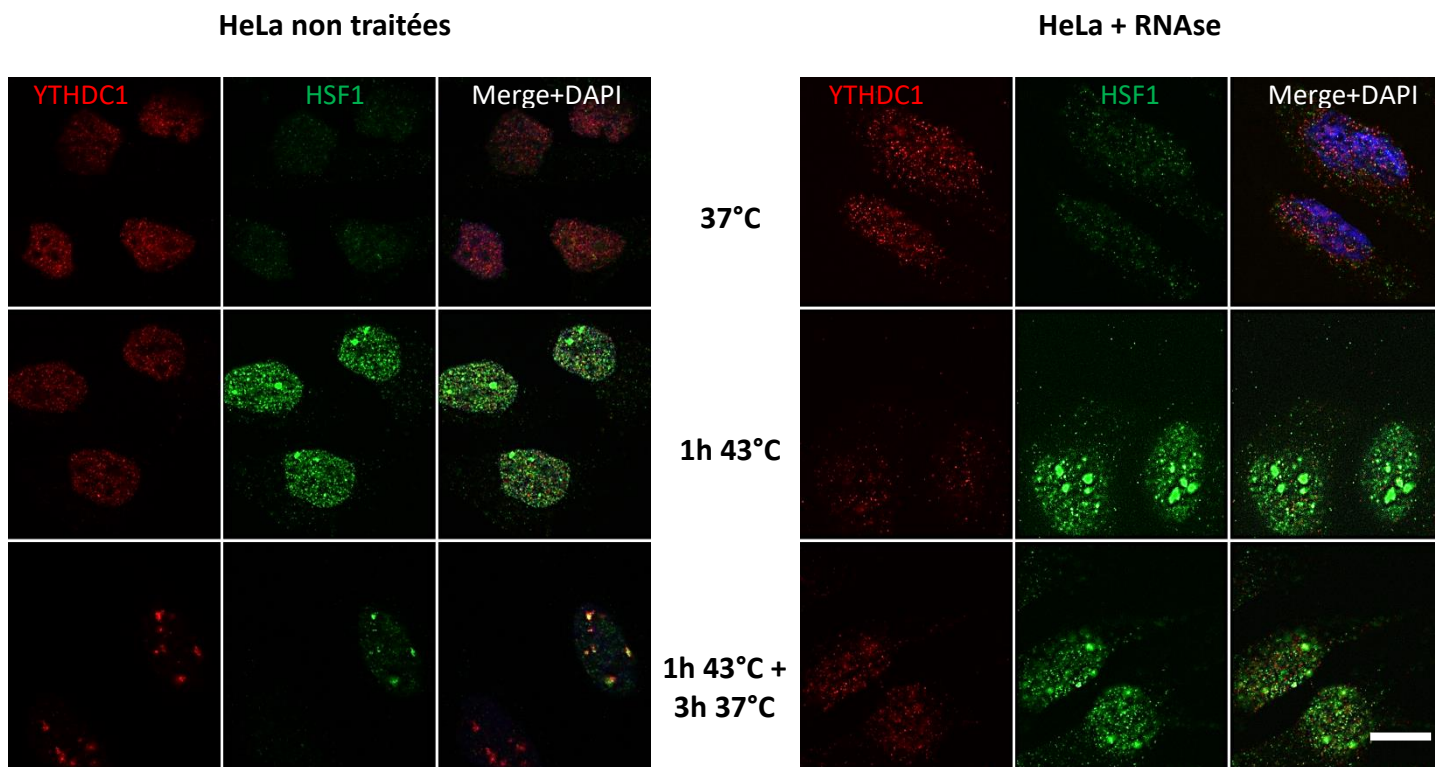


Figure 66 : Analyse de la distribution nucléaire des protéines YTHDC1 (rouge) et HSF1 (vert) au cours d'une cinétique de récupération au stress, par microscopie confocale.

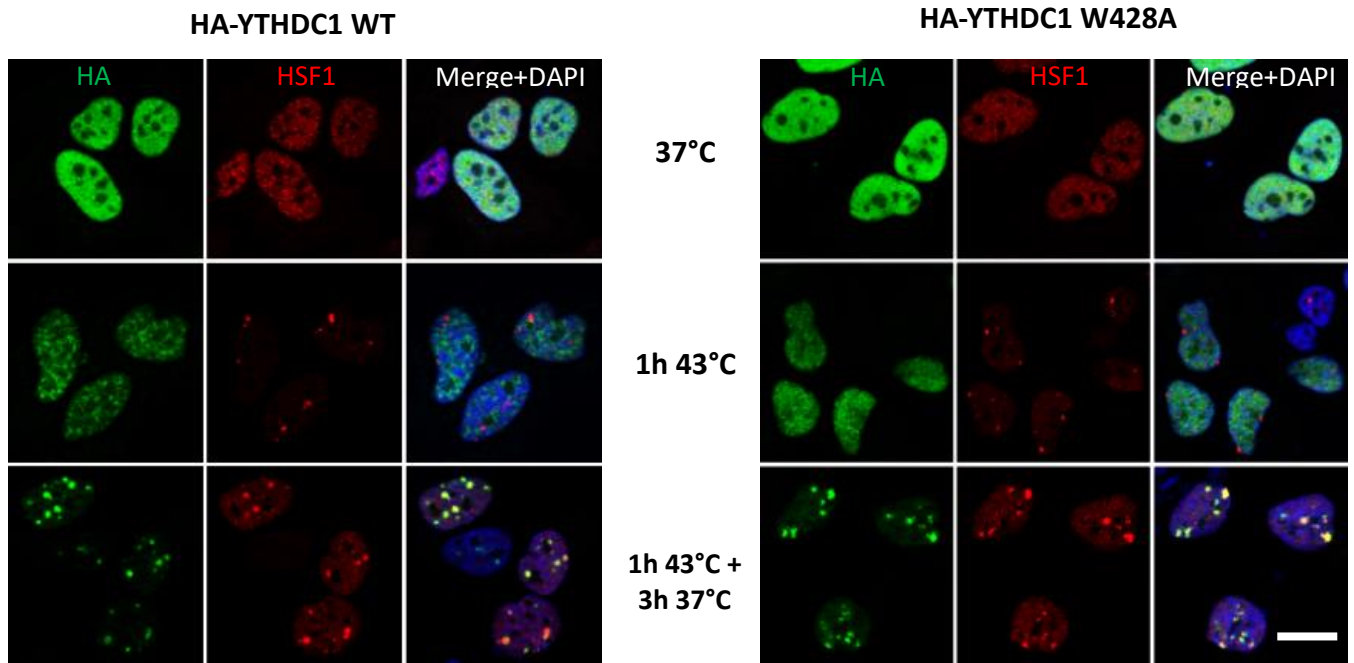
A gauche dans des cellules HeLa sans traitement, à droite dans des cellules HeLa traitées 10 minutes avec une solution de RNase (1mg/ml) avant fixation. Les signaux sont obtenus par immunofluorescence et visualisés par microscopie confocale (Apotome Zeiss, logiciel AxioVision) (barre d'échelle 10 µm).

Nous nous sommes ensuite intéressés à **l'implication de la marque m6a** dans la relocalisation d'YTHDC1 aux nSBs.

Pour cela nous avons utilisé deux approches : 1/ l'analyse de la relocalisation d'une protéine YTHDC1 mutée au niveau d'un acide aminé nécessaire pour sa liaison à m6A exprimée dans des cellules déplétée transitoirement pour la protéine YTHDC1 endogène, 2/ des cellules déplétée transitoirement en METTL3, la principale méthylase responsable du dépôt de la marque m6A (Figures 67 et Figure 68).

Les données obtenues dans des cellules stressées puis soumises à 3h de récupération montrent que la forme mutée d'YTHDC1 se relocalise toujours en foyers (Figure 67). En revanche, cette relocalisation est fortement diminuée pour la protéine endogène dans un KD METTL3 (Figure 68). En parallèle, par des approches de RIP (RNA immunoprécipitation) YTHDC1 et m6A suivies de RT-qPCR, nous avons montré qu'YTHDC1 se lie directement aux ARNs *SATIII*, dont la méthylation augmente en réponse au stress.

Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent que la redistribution aux nSBs d'YTHDC1 lors de la récupération au stress est facilitée par la méthylation des ARNs *SATIII* sans être un prérequis absolu.



Kalina Timcheva

Figure 67 : Distribution de YTHDC1 (vert) WT et mutée dans son domaine de liaison à m6A, et d'HSF1 (rouge) dans des cellules stressées et soumises ou non à une période de récupération au stress.

A gauche, cellules déplétées en YTHDC1 endogène puis transfectées avec le gène exprimant YTHDC1 sauvage. A droite cellules déplétées en YTHDC1 endogène puis transfectées avec le gène codant pour la forme mutée d'YTHDC1. Les signaux sont obtenus par immunofluorescence et analysés par microscopie confocale (Apotome Zeiss, logiciel AxioVision) (barre d'échelle 10 μ m).

Dans le contexte de la HSR, nous avons regardé si après production, les ARNm des gènes *HSP70* et *DNAJB1*, cibles de YTHDC1 et également fortement induits par le stress, transitaient par les nSBs. Des études préliminaires faites au laboratoire montrent que les sites de transcription de ces deux gènes ne se situent pas au niveau des nSBs, néanmoins nous n'avons pas de données concernant la localisation de leurs ARNm en période de récupération. Nous avons donc co-déTECTÉ par FISH ARN les transcrits *HSP70* et *SATIII* et les transcrits *DNAJB1* et *SATIII* dans des cellules HeLa stressées et soumises à récupération.

Nos résultats de microscopie confocale confirment que les transcrits *HSP70* et *DNAJB1* ne se localisent pas aux nSBs dans des cellules stressées, et ne mettent pas non plus en évidence une co-localisation entre les ARNm de ces deux HSPs et les transcrits *SATIII* à 3 heures de récupération post-stress (Figure 69).

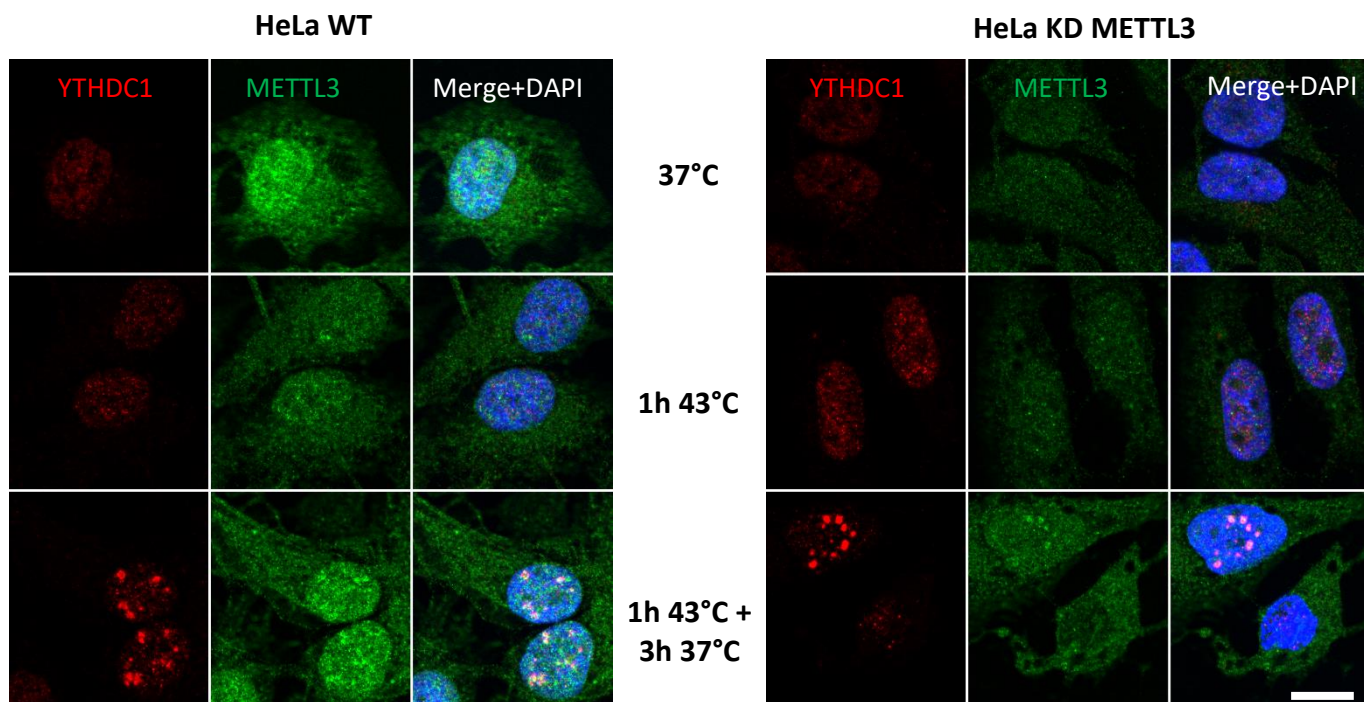


Figure 68 : Distribution de YTHDC1 (rouge) et de METTL3 (vert) dans des cellules stressées et soumises ou non à une période de récupération au stress.

A gauche, cellules HeLa wt, à droite cellules HeLa KD METTL3. Les signaux sont obtenus par immunofluorescence et analysés par microscopie confocale (Apotome Zeiss, logiciel AxioVision) (barre d'échelle 10 μ m).

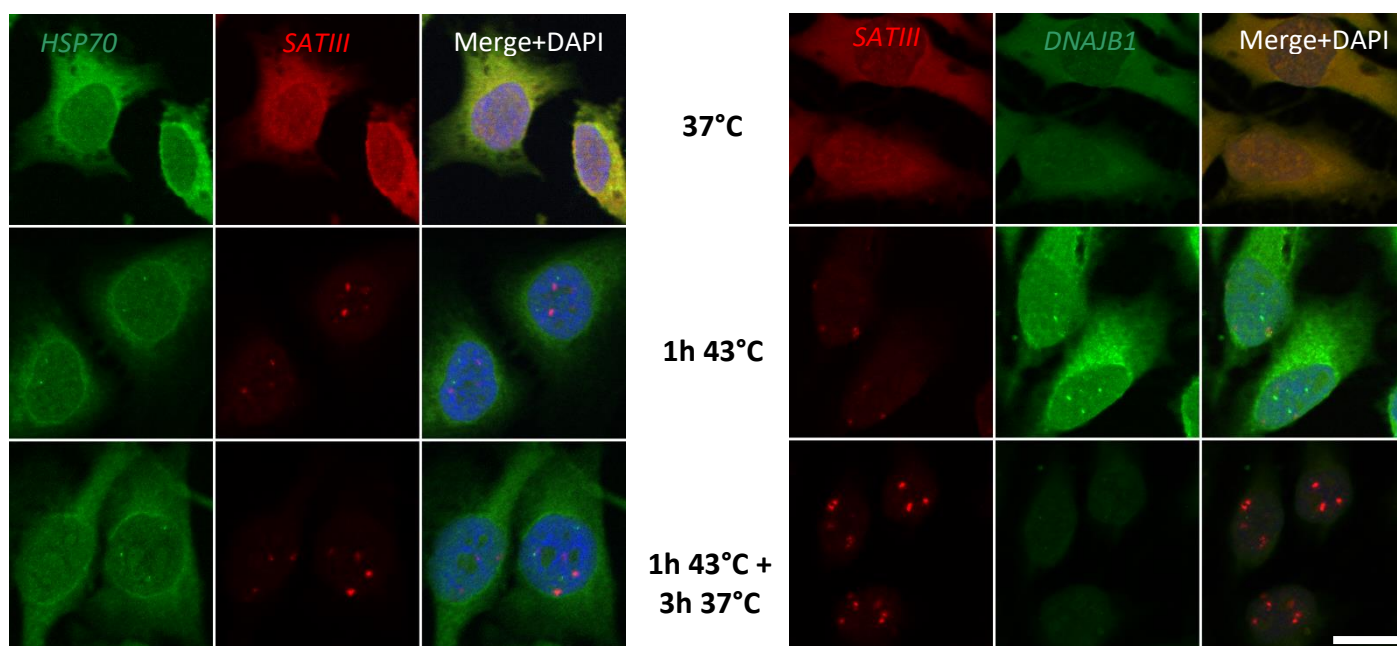


Figure 69 : Distribution des transcrits non codants SATIII (rouge) et des transcrits codants pour des protéines HSP (vert) au cours d'une cinétique de récupération au stress.

A gauche, co-détection des ARNs SATIII et HSP70, à droite co-détection des ARNs SATIII et DNAJB1. Les signaux sont obtenus par FISH ARN et visualisés par microscopie confocale (Apotome Zeiss, logiciel AxioVision) (barre d'échelle 10 μ m).

En conclusion, ce travail décrit le rôle d'YTHDC1, protéine « reader » de la marque m6A, dans l'activation de l'expression des HSPs en réponse à un stress thermique. Il suggère également l'implication de YTHDC1 dans le processus de rétention d'introns impliquant les nSBs en période de récupération au stress.

De manière plus large, ce projet, soumis à révision, révèle dans sa globalité l'importance de la voie de signalisation m6A dans l'orchestration de la reprogrammation génique suite à un stress thermique.

III-E-Identification d'une nouvelle cible d'HSF1 impliquée dans la réponse au stress.

Comme abordé précédemment, la réponse à un stress thermique via le facteur de transcription HSF1, engage une activation transcriptionnelle de gènes codants pour des protéines de protection de type HSPs, mais également la transcription de plusieurs mégabases d'hétérochromatine constituées de séquences répétées en tandem, et située principalement sur le chromosome 9 (locus 9q12).

Cette activation transcriptionnelle non codante a été identifiée dans des cellules humaines tumorales et normales, et conduit à l'accumulation à leur site de transcription, de longs ARN non codants appelés ARNs *SATIII* au sein de structures nucléoprotéiques connues sous le nom de nuclear Stress Bodies (nSBs) présentes dans le noyau des cellules stressées.

Les séquences cible d'HSF1, les HSEs (Heat shock Element), bien que majoritairement présentes sur le chromosome 9, ont été identifiées dans des régions d'hétérochromatine SATII ou SATIII de plusieurs autres chromosomes, et sont également associées à la formation de nSBs en réponse à un stress thermique. Ces nSBs sont appelés foyers secondaires de stress, les foyers principaux se situant sur le chromosomes 9, et leur nombre est taille varient en fonction de l'intensité du stress appliqué, et du niveau d'expression de la protéine HSF1 (Eymery et al., 2010).

Dans cette étude nous montrons que dans 4 lignées humaines différentes soumises à un stress thermique (fibroblastes, amniocytes, cellules tumorales) l'hétérochromatine du chromosome Y peut servir de cible primaire, voire exclusive, à l'activation transcriptionnelle par HSF1, à la production d'ARN *SATIII*, et à la formation de nSBs.

Nos observations suggèrent que, dans des cellules humaines stressées, différentes régions d'hétérochromatine peuvent être transcriptionnellement activées via le facteur HSF1. Dans des cellules femelles, les cibles préférentielles d'HSF1 se situent sur le chromosome 9 et dans des lignées mâles, le chromosome Y apparaît également comme une cible majeure.

Dans des lignées humaines, l'activation des régions péricentriques fait partie intégrante de la réponse au stress thermique, et la nature du chromosome ciblée n'est pas déterminante.

Ce travail a fait l'objet d'une publication (voir à la fin du document),

Chromosome Y pericentric heterochromatin is a primary target of HSF1 in male cells

Jessica Penin, Solenne Dufour, Virginie Faure, Sabrina Fritah, Daphné Seigneurin-Berny, Edwige Col, André Verdel, Claire Vourc'h.

CHAPITRE IV : DISCUSSION et PERSPECTIVES

Caractéristique du profil d'expression des transcrits SATIII sens et antisens

Le travail réalisé confirme l'existence d'une accumulation des ARNs SATIII sens et antisens dans les cellules stressées indépendamment de leur statut cancéreux ou non. De manière intéressante, nos analyses confirment l'existence d'un schéma d'expression sophistiqué des séquences SATIII, plus complexe qu'initialement décrit dans la littérature.

Nos résultats mettent en effet en évidence, au cours de la récupération au stress, l'existence d'un pic d'accumulation de transcrits SATIII dans une orientation antisens, postérieure dans le temps à l'accumulation des transcrits SATIII dans une orientation sens.

Nos résultats montrent également que l'accumulation des transcrits SATIII sens et antisens est sous le contrôle de l'ARN POLII, et que seule l'accumulation des ARNs dans une orientation sens est sous le contrôle d'HSF1.

L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la phase d'initiation et d'élongation de la transcription par l'ARN POLII révèle également qu'un blocage de l'élongation de la transcription sens par l'ARN POLII dans les cellules stressées, provoque une accumulation massive de transcrits antisens.

De manière inattendue, notre travail apporte également des éléments nouveaux et intéressants concernant la transcription sens et antisens dans les cellules non stressées. En effet nos résultats suggèrent que l'élongation de la transcription sens constitue un obstacle à la mise en place d'un nombre accru de complexes d'initiation de la transcription nécessaires à une transcription antisens.

Ainsi, il semble que la transcription à bas niveau des régions péri-centriques dans une orientation sens dans les cellules non stressées, empêche la transcription antisens. Des expériences de RT-qPCR sont actuellement en cours qui nous permettraient d'apprécier de manière précise le niveau d'expression constitutif des transcrits SATIII sens et antisens. L'intensité des signaux d'hybridation obtenus par RNA FISH suggèrent qu'il existe dans les cellules non stressées un grand nombre de sites d'initiation capable d'initier une transcription antisens, sites masqués, même dans les cellules non stressées par l'existence d'une

transcription sens constitutive de faible niveau. Toutefois, cette transcription serait suffisante pour rendre inaccessible les sites d'initiation nécessaires à la transcription antisens.

La présence des transcrits SATIII sens peut être visualisée par la technique de FISH ARN.

En revanche, nous avons beaucoup de difficultés à détecter les transcrits *SATIII* antisens par FISH ARN. De même, nous avons aujourd'hui encore des difficultés à détecter les transcrits *SATIII* sens (dans les cellules non stressées) et antisens par northern blot (dans les cellules stressées et non stressées). Enfin, nous ne disposons que de très peu d'information concernant la structure des transcrits antisens et nous utilisons jusqu'à présent pour leur détection des sondes contenant des répétitions en tandem du motif répété « AUUCC ». La séquence de la région 9q12 qui vient d'être publiée (NurK et al., 2021) susceptible de nous apporter de nouveaux outils d'analyses. Il serait intéressant de poursuivre les analyses sur des fractions de petits ARNs purifiés, de séquencer également les transcrits antisens obtenus en récupération tardive.

Profil d'expression des transcrits SATIII sens et antisens et statut des marques répressives de l'hétérochromatine péricentrique.

Nos données mettent en lumière une cinétique d'expression très spécifique des transcrits *SATIII* sens et antisens au cours de la période de récupération au stress.

L'accumulation des transcrits *SATIII* sens est corrélée à la diminution de marques répressives H3K9me3 et HP1 α , l'accumulation des transcrits *SATIII* antisens, à leur remise en place. Les régions péricentriques jouent un rôle essentiel dans la cohésion des chromatides sœurs en mitose (Koch et al., 2018), et la perte des marques répressives a été montrée comme étant associée à des défauts mitotiques (Bouzinba-Segard et al., 2006). Il est essentiel pour la cellule de contrôler le statut épigénétique de ces régions dans les cellules avant leur engagement en mitose.

La corrélation que nous observons entre la cinétique de remise en place des marques répressives et la cinétique d'accumulation des ARNs sens et antisens au cours de la période de récupération tardive est très intrigante. Nous avons établi à ce stade des analyses corrélatives robustes. Nous avons observé, de manière extrêmement claire, un retard de l'engagement des cellules stressées en mitose, retard que nous montrons être très clairement corrélé à une baisse de la quantité de transcrits sens, à une accumulation de transcrits antisens

et un retour des marques répressives au locus 9q12. Il est tentant d'imaginer que la présence d'ARNs antisens soient impliqués dans le recrutement de complexes répresseurs. Ce recrutement pourrait impliquer la protéine HP1 α , protéine capable de se lier avec des ARNs au niveau de son domaine charnière. Il est intéressant de noter que le même type de schéma, mettant en jeu la production d'ARN satellite dans une orientation sens et antisens, a été décrit chez la souris, au cours du développement précoce (Santenard et al., 2010).

Nous pouvons donc imaginer un schéma dans lequel le passage des cellules à travers la mitose dépendrait du recrutement, par les ARNs d'origine péracentriques, de complexes répresseurs et de la restauration des marques répressives associés aux histones.

Nous avons tenté d'identifier les protéines associées à la région 9q12 de cellules soumises à un stress grâce à la technique de PICh (Proteomics of Isolated segment Chromatin) qui permet d'isoler les complexes protéiques associés à un locus précis. Ce travail préliminaire que j'ai réalisé en collaboration avec le laboratoire de Jérôme Déjardin (IGH Montpellier) n'a malheureusement pas donné les résultats attendus en raison d'un enrichissement insuffisant de la fraction chromatinienne correspondant au locus 9q12 (un enrichissement des loci télomériques et des protéines associées au télomères ayant été par ailleurs obtenu) (résultats présentés en données supplémentaires). Une approche de type RNA pull down pourrait être envisagée pour déterminer les protéines associées à des temps de récupération au stress tardifs, afin de déterminer si les transcrits antisens sont en effet associés à des protéines associées à des complexes répresseurs.

Il serait intéressant de poursuivre les analyses de caractérisation des transcrits sens et antisens à partir de fractions de petits ARNs purifiés, voire, de séquencer également les transcrits antisens obtenus en récupération tardive afin d'obtenir potentiellement des outils plus performant à la détection et à la purification de complexes protéiques associés, y compris dans la dégradation cytoplasmique des transcrits sens et antisens. En effet, nos données ne permettent pas de conclure quant à la présence de transcrits *SATIII* au sein des exosomes. Pourtant la présence de transcrits *SATIII* au sein d'exosomes suggèrerait un rôle de signalisation possible de ces transcrits dans les cellules stressées. Les différentes pistes que nous avons explorées ne nous ont pas permis d'identifier les acteurs pouvant être associées au transcrits *SATIII* sens cytoplasmiques. Nous envisageons néanmoins de rechercher à l'avenir la présence des transcrits *SATIII* dans le transcriptome d'exosomes purifiés.

Profil d'accumulation des transcrits SATIII, progression des cellules en mitose et défauts mitotiques.

Nos résultats mettent en évidence l'existence de défauts mitotiques, spécifiquement associés à la présence de chromosomes 9 retardataires. De manière intéressante, ces chromosomes retardataires sont associés aux transcrits *SATIII* sens suggérant que la présence de ces ARNs perturbe l'attachement des chromosomes aux fuseaux mitotiques ou/et la cohésion des chromatides sœurs au moment de la mitose.

Les altérations observées sont tout à fait significatives. Elles concernent 66 % des mitoses pour les cellules HeLa et dans une très large proportion (99 %) spécifiquement le chromosome 9. De manière intéressante, nous n'observons pas ces défauts de ségrégations en mitose dans les cellules HT1080 et dans les cellules fibroblastes immortalisées. Dans ces cellules, l'entrée en mitose des cellules ne se fait que lorsque les transcrits *SATIII* sens ont été éliminés.

Dans les expériences mises en œuvre, nous avons cherché à appliquer le stress thermique sur des fractions de cellules en G2. Il reste néanmoins possible que des cellules en phase S soient également à l'origine des défauts observés en mitose. Il reste néanmoins vrai qu'une fraction de cellules en fin de phase S est toujours présente dans les cellules soumises à un stress, susceptibles également d'être à l'origine des défauts observés.

Nos résultats suggèrent que les transcrits *SATIII* jouent une double fonction au cours de la récupération tardive au stress : bloquer la progression du cycle de cellules encore stressées et permettre la restauration de marques répressives par recrutement de complexes répresseurs. La fonction des transcrits *SATIII* serait à double tranchant, et des cellules disposant de système de contrôle du cycle défectueux pourraient s'engager dans le cycle avant restauration de ces marques, au risque de générer des défauts mitotiques impliquant en particulier le chromosome 9.

Nous pensons que les cellules qui s'engagent malgré la présence de transcrits *SATIII* associés, participent à l'évolution génétique des tumeurs, possiblement à l'origine d'un phénotype plus sévère.

Ainsi, il serait important de caractériser avant et après stress le statut génétique des lignées dans lesquelles une instabilité du chromosome 9 est observée et de regarder si des anomalies spécifiquement associées à des défauts de ploïdie du chromosome 9 et plus généralement des chromosomes porteurs enrichis en séquences *Satellite III* est observé (dans les cellules tumeurs exprimant des taux élevés d'ARNs *satellites*). A noter également, à la différence des

lignées HT1080, la voie de signalisation p53 des cellules HeLa est déficiente, il serait pertinent d'étudier les liens entre expression des *SATIII* et p53 qui est fortement impliquée dans la régulation du cycle cellulaire.

Transcrits SATIII sens et antisens, et impact sur la viabilité cellulaire

Les expériences que nous avons cherché à mettre en œuvre utilisant des LNAs ciblant les transcrits *SATIII* sens et antisens n'ont malheureusement pas permis de tester le rôle sélectif des transcrits sens et/ou antisens dans le blocage du cycle cellulaire. Toutefois, les expériences de videomicroscopie révèlent un rôle essentiel d'une expression constitutive des transcrits sens, non seulement dans les cellules stressées (ce qui était attendu), mais également en absence de stress. Les effets spectaculaires que nous observons dans les cellules synchronisées suggèrent un impact de ces transcrits dans la transition G2/M/G1. Il est évidemment très tentant d'étendre notre étude à l'étude de cellules non prolifératives.

Nous ne nous sommes que très peu intéressés jusqu'à présent, au laboratoire, au rôle de l'expression constitutive des séquences satellite dans les cellules non stressées. Ces travaux ouvrent un champ d'investigation aux perspectives thérapeutiques importantes.

CHAPITRE V : ANNEXE



Chromosome Y pericentric heterochromatin is a primary target of HSF1 in male cells

Jessica Penin¹ · Solenne Dufour¹ · Virginie Faure¹ · Sabrina Fritah^{1,2} · Daphné Seigneurin-Berny¹ · Edwige Col¹ · André Verdel¹ · Claire Vourc'h¹

Received: 21 June 2020 / Revised: 28 December 2020 / Accepted: 1 January 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

The heat shock factor 1 (HSF1)-dependent transcriptional activation of human pericentric heterochromatin in heat-shocked cells is the most striking example of transcriptional activation of heterochromatin. Until now, pericentric heterochromatin of chromosome 9 has been identified as the primary target of HSF1, in both normal and tumor heat-shocked cells. Transcriptional awakening of this large genomic region results in the nuclear accumulation of satellite III (*SATIII*) noncoding RNAs (ncRNAs) and the formation *in cis* of specific structures known as nuclear stress bodies (nSBs). Here, we show that, in four different male cell lines, including primary human fibroblasts and amniocytes, pericentric heterochromatin of chromosome Y can also serve as a unique primary site of HSF1-dependent heterochromatin transcriptional activation, production of *SATIII* ncRNA, and nucleation of nuclear stress bodies (nSBs) upon heat shock. Our observation suggests that the chromosomal origin of *SATIII* transcripts in cells submitted to heat shock is not a determinant factor as such, but that transcription of *SATIII* repetitive units or the *SATIII* ncRNA molecules is the critical element of HSF1-dependent transcription activation of constitutive heterochromatin.

Keywords HSF1 · Heterochromatin · ncRNA · nSB · Human

Introduction

Cell exposure to proteotoxic stress, such as heat shock, induces major and transient changes in gene expression. This response is under the control of a key transcription factor, named heat shock factor 1 (HSF1) (Akerfelt et al. 2010a; Li et al. 2017; Barna et al. 2018). Upon heat shock, HSF1 becomes hyperphosphorylated, trimerizes, and transactivates

stress-induced genes, including heat shock protein (*HSP*) coding genes (Akerfelt et al. 2010a). In addition, a transcriptional activation of pericentric heterochromatin enriched in satellite III repeated DNA sequences has also been described (Jolly et al. 2004; Rizzi et al. 2004; Eymery et al. 2009). *SATIII* sequences are characterized by repetitive GGAAT motifs organized in tandem and head to tail orientation. Pericentric heterochromatin contains a large number of transcription units

Jessica Penin and Solenne Dufour are co-first authors

✉ André Verdel
andre.verdel@univ-grenoble-alpes.fr

✉ Claire Vourc'h
claire.vourch@univ-grenoble-alpes.fr

Jessica Penin
jessica.penin@gmail.com

Solenne Dufour
solenne.guerin@univ-grenoble-alpes.fr

Virginie Faure
virginie.faure@univ-grenoble-alpes.fr

Sabrina Fritah
sabrina.fritah@lih.lu

Daphné Seigneurin-Berny
daphne.berny@univ-grenoble-alpes.fr

Edwige Col
ecol@chu-grenoble.fr

¹ RNA and Epigenetics Team, Institute for Advanced Biosciences (IAB), Centre de Recherche UGA / Inserm U 1209 / CNRS UMR 5309, La Tronche BP170, 39042 Grenoble Cedex, France

² Department of Oncology, Luxembourg Institute of Health, NORLUX Neuro-Oncology Laboratory, L1526 Luxembourg, Luxembourg

covering several megabases. This unique configuration allows an in situ characterization of the different actors involved in the transcriptional activation of these sequences. Likewise, upon heat shock, the recruitment of HSF1, histone acetyltransferases (Goenka et al. 2016; Col et al. 2017), and RNA polymerase II (RNAPII) to pericentric heterochromatin lead to the formation of stress-specific structures known as nuclear stress bodies (nSBs) (Biamonti and Vourc'h 2010). nSBs can be easily detected by immunofluorescence using anti-HSF1 or anti-acetylated histone antibodies (Rizzi et al. 2004; Jolly et al. 2004). *SATIII* transcripts are ncRNAs, heterogeneous in size with a large fraction in the 2 to 5 kb range (Jolly et al. 2004; Rizzi et al. 2004). Once transcribed, they accumulate at transcription sites, suggesting a role for these transcripts in *cis*, possibly linked to the maintenance and/or reformation of heterochromatin in stressed cells. Additionally, recruitment of various splicing factors to nSBs and their interaction with *SATIII* transcripts suggest that *SATIII* transcripts may also undergo post-transcriptional maturation or that this recruitment may contribute to a reprogramming of nuclear functions through their transient sequestration at nSBs (Biamonti and Vourc'h 2010; Metz et al. 2004; Ninomiya et al. 2020).

In normal heat-shocked female human cells, nSBs are detected at heterochromatic regions of chromosome 9 (9q12 locus) (Jolly et al. 2002). In contrast, in heat-shocked female and male cancer cells, several secondary nSBs are also detected. Furthermore, the number and intensity of these secondary nSBs increases with the level of HSF1 expression within the cells (Eymery et al. 2010). Based on in vitro reconstitution of nSBs, obtained by incubating metaphase chromosome spreads with purified active HSF1, a number of chromosomes, all containing *SATII* and *SATIII* sequences, have been identified as HSF1 targets, including chromosome Y (Eymery et al. 2010). Likewise, in stressed rodent/human hybrid cell lines containing a unique human chromosome, nSBs are observed when *SATII/SATIII*-containing chromosomes are present, confirming their potential to form nSBs in an independent and autonomous fashion (Eymery et al. 2010). Yet, whether they may exert functions similar to the primary nSBs linked to the 9q12 locus remains unknown.

Here, we identify pericentric heterochromatin of chromosome Y as a primary target of HSF1, and not only as a HSF1 secondary target, in both cancer and primary cell lines. Moreover, our observation that nSBs form on chromosome Y and not on chromosome 9 in stressed HT1080 cells suggests that the protective role of nSBs goes through the act of transcription of *SATIII* DNA repeats and/or the selective recruitment of transcription and RNA processing factors, regardless of the very nature of the chromosome on which they form.

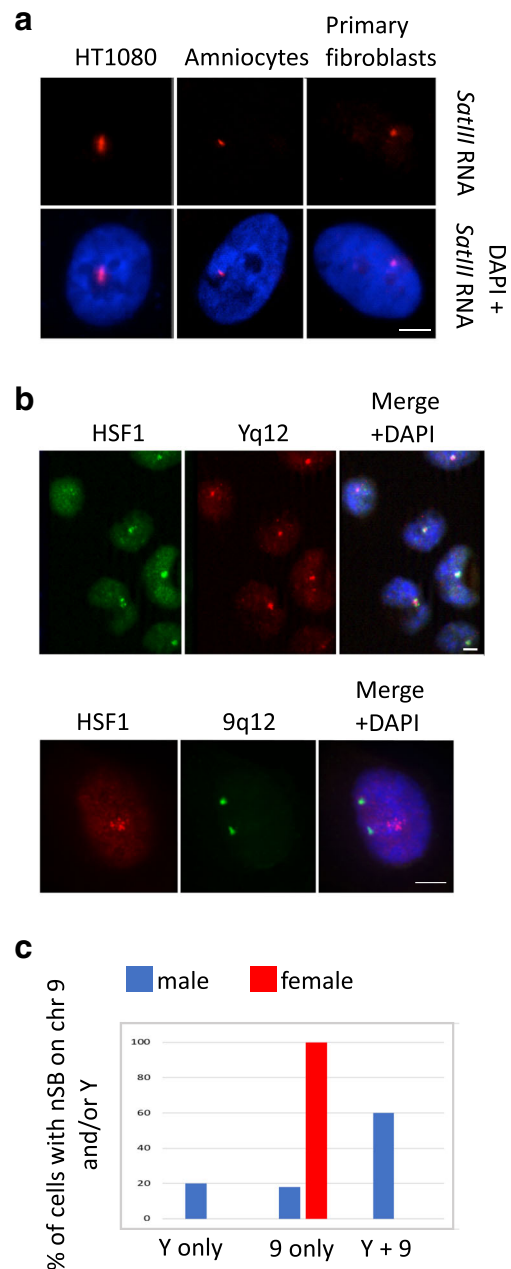


Fig. 1 Heat-shocked HT1080 cells display a unique HSF1 foci on chromosome Y. **a** Unique *SATIII* RNA foci are observed in the nucleus of cell lines of male origin (bar = 5 μ m). *SATIII* RNA (red signals) are detected by RNA FISH with a fluorescent oligonucleotide recognizing (GGAAU)_n motifs, on male cells of different origin (HT1080 cells, amniocytes and primary fibroblasts). **b** HSF1 detected by immunofluorescence in HT1080 cells colocalizes with the Yq12 locus and not with the 9q12 locus detected by DNA FISH. Upper image Yq12 locus (red signals), HSF1 (green signal) (bar = 5 μ m). Lower image 9q12 locus (green signal), HSF1 (red signal) (bar = 5 μ m). **c** Graph giving the percentage of nSBs present on chromosome 9, chromosome Y, or both, in normal fibroblasts. HSF1 foci were codetected by immunofluorescence and FISH in human primary stressed male and female fibroblasts (total of 200 nuclei analyzed on three independent analyses)

Results

nSBs formation on chromosome Y in heat-shocked cells

Until now, the q12 locus of chromosome 9 has always been reported as the main site for nSBs formation in stressed cells, i.e., the locus where nucleation of HSF1 foci is initiated over time, suggesting that the accumulation of HSF1 at the 9q12 locus could have a role specifically related to the chromosome 9 itself. However, we uncovered that male cell lines, in particular fibrosarcoma HT1080 cells, often display a single *SATIII* RNA nuclear foci, which is not consistent with nSBs formation at 9q12 since these diploid cells possess two 9q12 loci (Fig. 1a). This prompted us to further characterize the chromosomal origin of these unique foci. Combining immunofluorescence to detect HSF1 and fluorescence in situ hybridization (FISH) to detect chromosome Y-specific *SATIII* sequences, we found that, in HT1080 male stressed cells, HSF1 forms primary foci on chromosome Y and not on chromosome 9 (Fig. 1b). Interestingly though, HSF1 still has the capacity to bind to the 9q12 loci in in vitro HSF1-binding assays performed with purified HSF1 on mitotic chromosomes from HT1080 cells (Fig. S1). Similar to HT1080 cells, primary HSF1 foci forming on chromosome Y (and not on chromosome 9) were also observed in the H460 cell line of lung origin (Fig. S2). In contrast to HT1080 and H460 cells, HSF1 foci were found to match either with chromosome 9, chromosome Y, or both chromosomes in normal male fibroblasts. Indeed, in these cells, the same percentage of cells displaying a primary nSB on chromosome 9 (19%) or chromosome Y (21%) was observed, with a large percentage of cells displaying signals on both chromosomes 9 and Y (60%), suggesting that, in normal male fibroblasts, both chromosomes 9 and Y are primary targets for HSF1 (Fig. 1c).

Formation of nSBs at 9q12 locus in HT1080 cells depends on the cellular level of HSF1

We further investigated why, in contrast to normal male fibroblast cells, pericentric heterochromatin of chromosome Y is primarily targeted by HSF1 in HT1080 cells. Sequencing of a HSF1 cDNA sequence prepared from HT1080 cells did not show any specific feature in the coding sequence that could have explained HSF1 preferential targeting on chromosome Y in these cells (data not shown). We also confirmed that HT1080 cells do contain chromosome 9-specific *SATIII* sequences by conducting DNA FISH experiment with a probe specific for chromosome 9 *SATIII* sequences on metaphase spreads (Fig. 2a). Noticeably, we found that the formation of nSBs on chromosome 9 occurs in HT1080 male cells when these cells are transiently transfected with a plasmid expressing the HSF1-GFP fusion protein (Fig. 2b). This later result

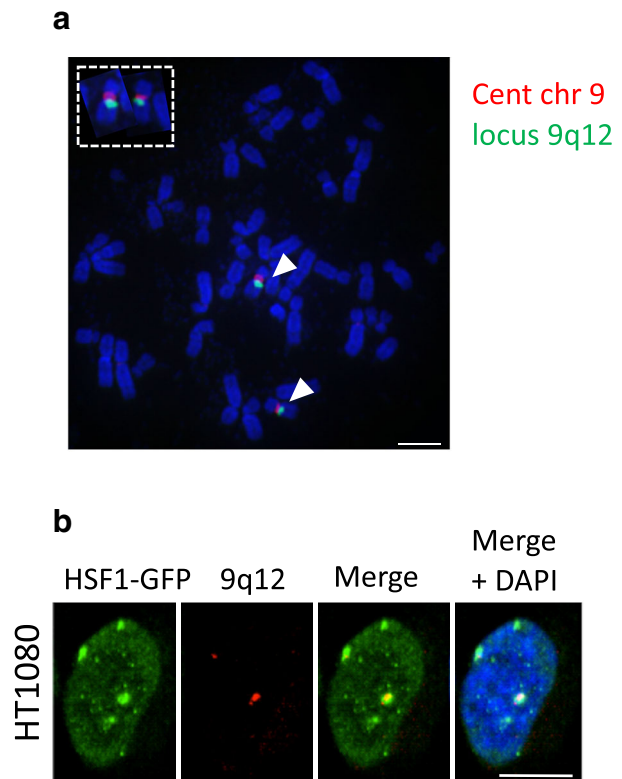


Fig. 2 HSF1 overexpression leads to its binding to pericentric regions of chromosome 9 in HT1080 cells. **a** HT1080 cells do not lack chromosome-9-specific *SATIII* genomic sequences. Simultaneous detection of *SATIII* sequences from chromosome 9 pericentric regions detected with the pHuR98 probe (red signal) and of alphaoid sequences from chromosome 9 centromeric regions with the pMR9A (green signal) on mitotic spreads from HT1080 cells. The two chromosomes 9 are also enlarged (bar = 5 μ m). **b** HT1080 cells transiently transfected with a HSF1-GFP expression vector display HSF1 foci (green signals) at the 9q12 loci detected by FISH (red signal) (bar = 10 μ m)

indicates that, in HT1080 cells, an increase in expression of HSF1 is sufficient to restore the formation of nSBs at chromosome 9. Since the level of endogenous HSF1 in HT1080 cells is similar in HeLa cells (Fig. S3), and since HSF1 foci at chromosome 9 are restored in HT1080 cells when overexpressing HSF1, the lack of HSF1 binding on chromosome 9 likely reflects the existence of a preferential binding of HSF1 on chromosome Y, at least in these cells.

Yq12 *SATIII* DNA repeats are required for formation of nSBs on chromosome Y

Binding of HSF1 on chromosome Y has been reported at multicopy genes in mouse (Akerfelt et al. 2010). We therefore tested whether the formation of nSBs on chromosome Y depends on the presence of *SATIII* sequences, and not just on the presence of other chromosome Y repetitive elements (Akerfelt et al. 2010). This was investigated in two ways. We first tested the presence of nSBs in two different human/hamster somatic

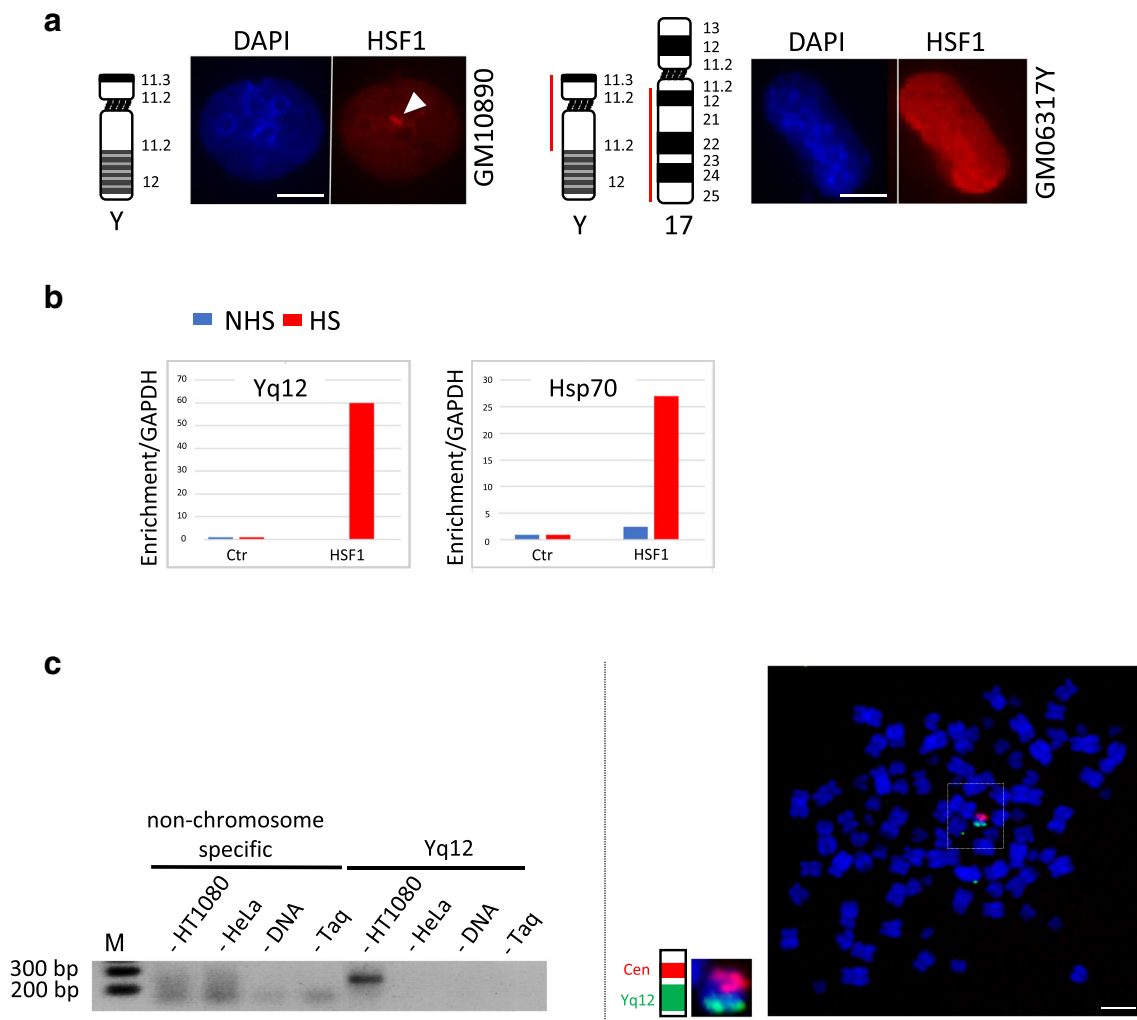


Fig. 3 HSF1 binds chromosome Y *SATIII* sequences upon heat shock. **a** HSF1 detection by immunofluorescence on somatic hamster/human hybrid cell lines containing either chromosome Y (GM10890 cells) or only the Yp->Yq11::17q12->17qter (GM06317Y cells) region of chromosome Y. HSF1 foci were only detected in hybrid cell lines containing the Yq12 locus (bar = 10 μ m). **b** ChIP experiments with anti-HSF1 antibody performed on unstressed (NHS) and heat shock (HS) HT1080 cells (anti-IgG antibody were used as a control, Ctr). PCR amplifications were performed with primers specific to either chromosome-Y-specific *SATIII* sequences or to the *HSP70* gene. **c** The enrichment of genomic *SATIII* sequences of chromosome Y origin in anti-HSF1 ChIP experiments was assessed. First (left image), a PCR

product, here analyzed by electrophoresis, was only obtained with genomic DNA from stressed HT1080 cell line of male origin and not with genomic DNA from stressed HeLa cells of female origin. Controls are shown in which the amplification reactions were performed with no DNA or no DNA polymerase (Taq). A PCR product is only obtained with genomic DNA of male origin. Second (right image), the PCR product obtained from HT1080 cells was labeled and used for a DNA FISH experiment on metaphase spreads from HT1080 cells (green signal). A centromeric probe was also used to identify chromosome Y (red signal) (bar = 5 μ m). The PCR product hybridizes to chromosome Y when used as a probe in a DNA FISH experiment

hybrid cell lines, either containing the entire chromosome Y (GM10890 cells) as the only human material or containing a truncated chromosome Y depleted of its Yq12 band and thus depleted of its *SATIII* sequences (GM06317Y cells) (Fig. 3a). Since HSF1 does not form foci in hamster cell lines, human/hamster hybrid cells represent powerful tools to test the importance of human genomic sequences in recruiting HSF1 (Eymery et al. 2010).

Importantly, in contrast to GM10890 cells, in which HSF1 forms foci upon heat shock, no HSF1 foci were detected in stressed GM06317Y cells, suggesting that *SATIII* DNA repeats present on chromosome Y are absolutely required for the recruitment of HSF1 and the formation of nSBs (Fig. 3a). We next directly searched for the presence of heat shock element (HSEs) (Kroeger and Morimoto 1994; Trinklein et al. 2004) within

chromosome Y-specific genomic *SATIII* sequence. In agreement with a direct binding of HSF1 to the *SATIII* region of chromosome Y, four perfect HSEs were detected on a 3564-bp-long genomic *SATIII* sequence localizing within the Yq12 locus (GenBank: X06228.1, Nakahori et al. 1986). This prompted us to examine whether a region of chromosome Y containing a putative HSF1 binding site is indeed targeted by HSF1 upon heat shock, by conducting chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments with an anti HSF1 antibody (Fig. 3b). Chromosome Y-specific *SATIII* primers were designed, delineating a 154-bp region positioned 241 bp upstream of a putative heat shock element (Fig. S4a and b). Activation of HSF1 in heat-shocked HT1080 cells was monitored by western blot using an anti-HSF1 antibody (Fig. S4c) while binding of HSF1 to the promoter of the HSP70 gene was used as a positive control of ChIP experiment (Fig. 3b, right). As expected, we only found enrichment of Y-chromosome *SATIII* sequences in ChIP experiments conducted on male genomic DNA (HT1080 cells) but not from HeLa cells, used as a negative control (Fig. 3c), left. To check for the specificity of the PCR product obtained on HT1080 cells, this PCR product was further used as a probe in a FISH experiment on male mitotic chromosome spreads from HT1080 cells. Importantly, a unique hybridization signal was observed on chromosome Y (Fig. 3c, right). Thus, collectively, these results strongly suggest that upon heat shock, HSF1 binds HSE elements

interspersed within the *SATIII* sequences of chromosome Y to form nSBs in HT1080 cells.

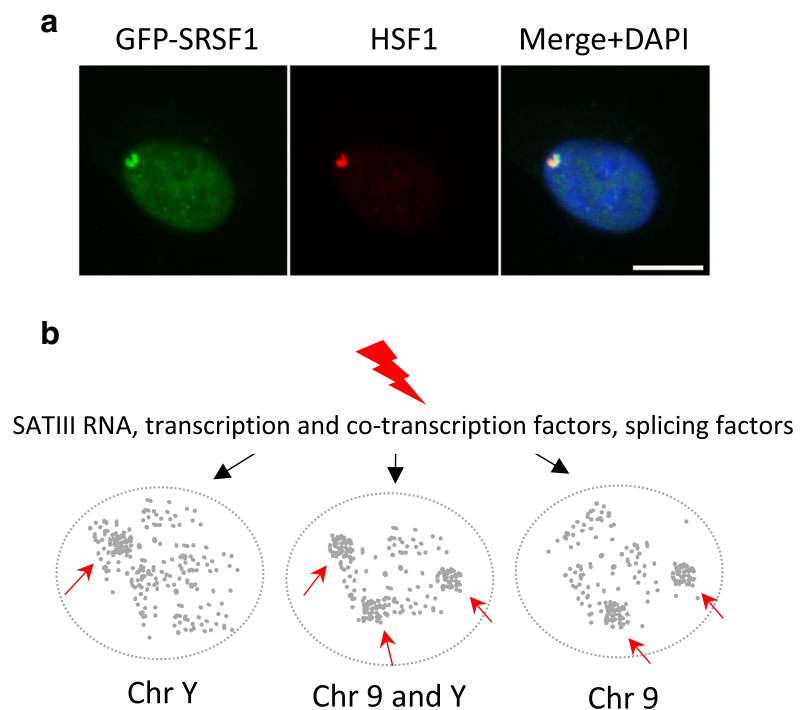
Splicing factor SRSF1 is recruited to active *SATIII* transcription sites in HT1080-stressed cells

In female cells, heat shock leads to HSF1 binding to chromosome 9 *SATIII*-rich genomic region, which in turn activates transcription of the region. *SATIII* RNA accumulation allows the massive recruitment of splicing factors to the nascent RNA *SATIII* (Biamonti and Vourc'h 2010). We thus checked whether HSF1-activated transcription of the Yq12 genomic region also led to the recruitment of RNA splicing factors such as the SR proteins. Indeed, as shown in Fig. 4a, in HT1080 cells, the SR protein SRSF1 (SF2/ASF) is recruited in a heat shock-dependent manner to chromosome Y (Metz et al. 2004). This later result indicates that *SATIII* transcripts from chromosome Y are able to direct the formation of functional nSBs. Hence, in male cells, functional nSBs form at either chromosome 9, chromosome Y, or both.

Discussion

Until now, chromosome 9 has been considered in the literature to be the primary target of HSF1, while several secondary nSBs have been reported on other chromosomes enriched in *SATII* and *SATIII* sequences (Eymery et al. 2010). We now bring evidence that chromosome Y,

Fig. 4 SRSF1 is recruited to chromosome-Y-specific active *SATIII* transcription sites in human cells upon heat shock. **a** SRSF1-GFP splicing factors form unique foci (green signal) colocalizing with HSF1 (red signal) detected by immunofluorescence in stressed HT1080 cells (bar = 10 μ m). **b** Model of formation or primary nSBs on either chromosome 9, chromosome Y, or both chromosomes 9 and Y. In stressed cell of male origin, pericentric regions of either chromosome 9, chromosome Y, or both are actively transcribed. The transcription of *SATIII* repetitive sequences at nSBs results in the titration of transcription and splicing factors from the rest of the nucleus



and more specifically chromosome Y-specific *SATIII* sequences, also constitute a primary target for HSF1 in male human cells and that these sequences are actively transcribed upon heat shock. The presence of canonical HSEs on *SATIII* sequences of chromosome Y, together with our finding that HSF1 is recruited to these sequences upon heat shock, indicates that, as for chromosome 9, chromosome Y-specific *SATIII* DNA repeats are binding sites for HSF1 in response to stress. The reason why, in HT1080 cells, primary nSBs exclusively form on chromosome Y, and not on chromosome 9, as in all other normal and tumor cells investigated so far, is intriguing. Clearly, the 9q12 region in HT1080 cells still displays a capacity to bind HSF1 in *in vitro* experiments in which HT1080 mitotic chromosome spreads were incubated with purified HSF1 (Fig. 2a). Our *in vivo* data suggest that the absence of HSF1 binding to the 9q12 region in HT1080 cells relies on a lower affinity of HSF1 for the 9q12 region compared with the Yq12 region, since binding to 9q12 does occur when HSF1 is overexpressed. Accordingly, in normal male fibroblasts, this lower affinity of HSF1 to chromosome 9, compared with chromosome Y, could explain why, despite the presence of two chromosome 9 and of a unique chromosome Y, the same percentage of cells displaying nSBs at chromosome Y and 9 is observed (Fig. 1c). A possible explanation for this differential affinity could be the presence of more HSEs at Yq12 compared with 9q12. Alternatively, it is also possible that in the case of H1080 or H460 cells, a cofactor is either assisting HSF1 toward chromosome Y targeting or, alternatively, reducing HSF1 binding to chromosome 9. The possibility of polymorphisms affecting the HSEs present on 9q12 or Yq12 themselves is unlikely given the large number of repetitive motifs, thus limiting the impact of a few mutational events at the Yq12 locus. Intriguingly, on the basis of a recent article showing that *cis* accumulation of *SATIII* transcripts causes the mis-segregation of the chromosome from which they originate (Giordano et al. 2020), the expression of *SATIII* RNAs and formation of primary nSBs on chromosome Y may represent a significant source of instability for this chromosome too. However, while we were able to confirm the large percentage of chromosome lagging affecting chromosome 9 on HeLa cells used as a control, we were not able to detect chromosome instability in H1080 cell line submitted to heat shock followed or not to different time of recovery at 37 °C (data not shown). The reasons underlying these differences are still unclear and need further investigations.

In conclusion, our study reveals that *SATIII* sequences of both chromosome 9 and Y can be primary targets of HSF1 (Fig. 4b). Regardless of the exact mechanisms underlying the selectivity of nSBs formation on either the 9q12 or Yq12

regions, we have found that the expression level of HSF1 is an important variable in this selectivity of binding. Although we cannot exclude that an enrichment in acetylated histone marks, at the pericentric regions of either chromosome 9 or Y, may have a direct impact on chromatin cohesion in stressed cells, this study strongly supports the idea that, the transcription of *SATIII* DNA, resulting in the accumulation of *SATIII* RNA and of RNA binding factors at the site of transcription (Vourc'h and Biamonti 2011; Col et al. 2017) are the key determinants in the heat shock response that may act as, or be part of, a checkpoint to preserve genome integrity and prevent cell progression into mitosis (Jolly and Lakhota 2006; Biamonti and Vourc'h 2010). Our study strongly supports the fact that the exact nature and location of the *SATIII*-enriched genomic region targeted by HSF1 and forming a primary nSB are rather accessory.

Material and methods

Cell culture and heat shock treatment

HeLa, HT1080, and male amniocyte cells (Grenoble CHU) were grown in DMEM 10% SVF and McCoy's 5A (Gibco™) 10% SVF, respectively. Normal skin fibroblasts (Coriell Institute, USA) were grown in EMEM 15% SVF. Rodent-human somatic cell hybrids (Antonacci et al. 1995) were grown in RPMI 10% fetal bovine serum, 50 µg/mL gentamicin, and 2 mM L-glutamine.

For FISH and immunofluorescence experiments, cells were grown on glass slides. Metaphase spreads were prepared from HT1080 cells according to standard cytogenetic techniques. Heat shock was performed by immersing the slides for 1 h (HT1080 cells and normal fibroblasts and amniocytes) or 30 min in a water-bath set at the desired temperature (43 °C for tumor cell lines, 45 °C for primary cells).

Immunofluorescence, DNA FISH, and RNA FISH

Detection of HSF1 by immunofluorescence was performed on 4% formaldehyde-fixed cells as previously described (Jolly et al. 2004). Rabbit anti-HSF1 antibodies 1:250 (Cell signaling) were detected with Goat Anti-Rabbit Dylight 549 nm 1:500 (Vector Laboratories, Inc.).

Probes specific for the *SATIII* sequences of chromosome 9 (pHuR98) (Grady et al. 1992), for chromosome Y (Cooke et al. 1982) or for alphoid sequences of chromosome 9 (pMR9A) (Rocchi et al. 1991), for *SATIII* sequences (cy3-labeled oligonucleotides 5'-ATTCCATTCCATTCCATTCCATTCCATTCCATTCCATTCCATTCCATTCC-3', were used. Samples were mounted with a Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Inc.) containing 250 ng/µL DAPI.

Combined DNA FISH and immunofluorescence was performed as follows: immunofluorescence was first performed on formaldehyde-fixed cells. After detection with the secondary antibody cells were fixed again in 4% formaldehyde for 10 min, and processed for DNA FISH on ethanol dehydrated cells. Briefly, 200 ng of biotin-labeled probe was precipitated together with 10 µg of salmon sperm DNA, and resuspended in 50% formamide/2× SSC/20% dextran sulfate, and added on the slide. Samples were denatured 5 min on a heating plate at 86 °C, and hybridized overnight at 37 °C. Probes were detected with streptavidin-Alexa 488 or anti-dig alexa 486 (Molecular probes).

RNA was performed as follows: cells were fixed in 4% formaldehyde for 10 min, incubated for 20 min in 20% glycerol/PBS, permeabilized by four successive freezing–thawing cycles in liquid nitrogen, and subsequently dehydrated and hybridized.

Images were acquired with a Zeiss apotome microscope using the 63×, 1.25 NA oil immersion objective. Alternatively, when immunofluorescence signals were not altered by the DNA FISH procedure, DNA FISH and immunofluorescence signals were imaged at the same time.

In vitro reconstitution of HSF1 foci on mitotic from HT1080 cells was performed as previously described (Eymery et al. 2010). Metaphase chromosome spreads were incubated at 37 °C for 3 h with 100 ng of recombinant human HSF1 protein (Stressgen, Assay Designs Inc.) resuspended in Hepes 50 mM pH 7.4, EDTA 0.1 mM, NaCl 200 mM. Slides were subsequently processed for immunofluorescence as described above.

Chromatin immunoprecipitation

ChIP were performed with a rabbit anti-HSF1 antibody at a concentration of 300 ng/µL. A rabbit antibody against IgG was used as a control. Chromatin fractions (500 bp fragments) were then incubated for 4 h at 4 °C with magnetic beads coupled to protein G (Stressgen). Beads were pelleted and then successively washed for 5 min at 4 °C on a wheel with a nuclear lysis buffer (50 mM Hepes pH 7.9/140 mM NaCl/1 mM EDTA/1% Triton X-100/0.1% Na deoxycholate/0.1% SDS) with a nuclear lysis buffer containing 0.5 M NaCl (2×), with a washing buffer (20 mM Tris-HCl pH(8)/250 nM LiCl/1 mM EDTA/0.5% NP-40) (2×), and finally with an elution buffer Tris-HCl pH(8)/1 mM EDTA (1×). Quantitative PCR were then performed on the precipitated DNA fractions with the Sybergreen kit (Roche) with the following set of probes: the *HSP70* promoter gene (Rev: 5'-CCCTGGGCTTTTATAAGTCG-3'; for: 5'-GAAGACTCTGGAGAGTTCTG-3'), the *GAPDH* promoter gene (Rev: 5'-ATGGTTGCCACTGGGGATCT-3'; for: 5'-TGCCAAAGCCTAGGGGAAGA-3') and the Yq12 region: (Rev: 5'-GAGTCAATTCCTTTTCGACACCC-3'; for: 5'-TGGA CAGGCCTGGAATAAAGTGAA-3'). ChIP experiments were performed on three independent experiments.

Western blot

Ten micrograms of whole protein extracts prepared in 8 M urea were fractionated by SDS-8% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE). Western blots were performed with anti-HSF1 (1:1000; Enzo Life Sciences, ADI-SPA-901) and anti-tubulin (1:1000; Sigma, T5168). Following washes, membranes were incubated with secondary horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (1:5000; GE Healthcare). Detection was performed with a Biorad Chemidoc and quantification was performed with ImageJ.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00412-021-00751-2>.

Acknowledgments The authors thank J.-M. Escudier (Plateforme de synthèse d'Oligonucléotides modifiés de l'Interface Chimie Biologie de l'ITAV-Toulouse-France) for the synthesis of labeled oligonucleotide probes for in situ analysis. The authors thank Dr Florence Amblard (Grenoble CHU), Béatrice Eymine and Amani Schreim (IAB, Grenoble), and Pr Mariano Rocchi (University of Bari, Italy), for providing us with amniocytes and human/hamster hybrid cell lines, respectively, and Quentin Royer for its experimental contribution to this work as a graduate student.

Funding This work was funded by Université Grenoble Alpes, Inserm, the Association de la Recherche sur le cancer (French cancer research association (ARC) (contract # 3686) and the “RNAgermSilence” (13-BSV2-0012) from the French Agence National pour la Recherche (ANR).

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Akerfelt M, Vihervaara A, Laiho A et al (2010) Heat shock transcription factor 1 localizes to sex chromatin during meiotic repression. *J Biol Chem* 285(45):34469–34476
- Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L (2010a) Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:545–555
- Antonacci R, Marzella R, Finelli P, Lonoce A, Forabosco A, Archidiacono N, Rocchi M (1995) A panel of subchromosomal painting libraries representing over 300 regions of the human genome. *Cytogenet Cell Genet* 68:25–32

- Barna J, Csemely P, Vellai T (2018) Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response. *Cell Mol Life Sci* 75(16):2897–2916
- Biamonti G, Vourc'h C (2010) Nuclear stress bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(6):a0000695
- Col E, Houghoughi N, Dufour S, Penin J, Koskas S, Faure V, Ouzounova M, Hernandez-Vargash H, Reynoird N, Daujat S, Folco E, Vigneron M, Schneider R, Verdel A, Khochbin S, Herceg Z, Caron C, Vourc'h C (2017) The bromodomain protein BRD4 regulates splicing during heat shock. *Nucleic Acids Res* 45:382–394
- Cooke HJ, Schmidtko J, Gosden JR (1982) Characterisation of a human Y chromosome repeated sequence and related sequences in higher primates. *Chromosoma* 87(5):491–502.
- Eymery A, Callanan M, Vourc'h C (2009) The secret message of heterochromatin: new insights into the mechanisms and function of centromeric and pericentromeric repeat sequence transcription. *Int J Dev Biol* 53:259–268
- Eymery A, Souchier C, Vourc'h C, Jolly C (2010) Heat shock factor 1 binds to and transcribes satellite II and III sequences at several pericentromeric regions in heat-shocked cells. *Exp Cell Res* 316:1845–1855
- Giordano M, Infantino L, Biggiogera M, Montecucco A, Biamonti G (2020) Heat shock affects mitotic segregation of human chromosomes bound to stress-induced satellite III RNAs. *Int J Mol Sci* 21(8):E2812
- Grady DL, Ratliff RL, Robinson DL, McCanlies EC, Meyne J, Moyzis RK (1992) *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1695–1699
- Jolly C, Lakhota SC (2006) Human sat III and *Drosophila* hsr omega transcripts: a common paradigm for regulation of nuclear RNA processing in stressed cells. *Nucleic Acids Res* 34:5508–5514
- Jolly C, Konecny L, Grady DL, Kutsikova YA, Cotto JJ, Morimoto RI, Vourc'h C (2002) In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress. *J Cell Biol* 156:775–781
- Jolly C, Metz A, Govin J, Vigneron M, Turner BM, Khochbin S, Vourc'h C (2004) Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol* 164:25–33
- Kroeger PE, Morimoto RI (1994) Selection of new HSF1 and HSF2 DNA-binding sites reveals difference in trimer cooperativity. *Mol Cell Biol* 14(11):7592–7603
- Li J, Labbadia J, Morimoto RI (2017) Rethinking HSF1 in stress, development, and organismal health. *Trends Cell Biol* 27(12):895–905
- Metz A, Soret J, Vourc'h C, Tazi J, Jolly C (2004) A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. *J Cell Sci* 117:4551–4558
- Nakahori Y, Mitani K, Yamada M, Nakagome Y (1986) A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides. *Nucleic Acids Res* 14:7569–7580
- Ninomiya K, Adachi S, Natsume T, Iwakiri J, Terai G, Asai K, Hirose T (2020) LncRNA-dependent nuclear stress bodies promote intron retention through SR protein phosphorylation. *EMBO J* 39(3):e102729
- Rizzi N, Denegri M, Chiodi I, Corioni M, Valgardsdottir R, Cobiainchi F, Riva S, Biamonti G (2004) Transcriptional activation of a constitutive heterochromatic domain of the human genome in response to heat shock. *Mol Biol Cell* 15:543–551
- Rocchi M, Archidiacono N, Ward DC, Baldini A (1991) A human chromosome 9-specific alphoid DNA repeat spatially resolvable from satellite 3 DNA by fluorescent in situ hybridization. *J Genom* 9(3):517–523
- Seal RL, Chen LL, Griffiths-Jones S, Lowe TM, Mathews MB, O'Reilly D, Pierce AJ, Stadler PF, Ulitsky I, Wolin SL, Bruford EA (2020) A guide to naming human non-coding RNA genes. *EMBO J* 39(6):e103777
- Trinklein ND, Murray JI, Hartman SJ, Botstein D, Myers RM (2004) The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol Biol Cell* 15(3):1254–1261
- Vourc'h C, Biamonti G (2011) Transcription of satellite DNAs in mammals. *Prog Mol Subcell Biol* 51:95–118

Note

Satellite III sequences and RNA are named as *SATIII* in this paper, according to the recent recommendations by Seal et al. (Seal et al. 2020).

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

Review

HSF1-Activated Non-Coding Stress Response: Satellite lncRNAs and Beyond, an Emerging Story with a Complex Scenario

Claire Vourc'h^{1,*}, Solenne Dufour², Kalina Timcheva², Daphné Seigneurin-Berny² and André Verdel^{2,*}¹ Université de Grenoble Alpes (UGA), 38700 La Tronche, France² Institute for Advanced Biosciences (IAB), Centre de Recherche UGA/Inserm U 1209/CNRS UMR 5309, Site Santé-Allée des Alpes, 38700 La Tronche, France; solenne.guerin@univ-grenoble-alpes.fr (S.D.); kalina.timcheva@kuleuven.be (K.T.); daphne.berny@univ-grenoble-alpes.fr (D.S.-B.)

* Correspondence: claire.vourch@univ-grenoble-alpes.fr (C.V.); andre.verdel@univ-grenoble-alpes.fr (A.V.)

Abstract: In eukaryotes, the heat shock response is orchestrated by a transcription factor named Heat Shock Factor 1 (HSF1). HSF1 is mostly characterized for its role in activating the expression of a repertoire of protein-coding genes, including the heat shock protein (HSP) genes. Remarkably, a growing set of reports indicate that, upon heat shock, HSF1 also targets various non-coding regions of the genome. Focusing primarily on mammals, this review aims at reporting the identity of the non-coding genomic sites directly bound by HSF1, and at describing the molecular function of the long non-coding RNAs (lncRNAs) produced in response to HSF1 binding. The described non-coding genomic targets of HSF1 are pericentric Satellite DNA repeats, (sub)telomeric DNA repeats, Short Interspersed Nuclear Element (SINE) repeats, transcriptionally active enhancers and the NEAT1 gene. This diverse set of non-coding genomic sites, which already appears to be an integral part of the cellular response to stress, may only represent the first of many. Thus, the study of the evolutionary conserved heat stress response has the potential to emerge as a powerful cellular context to study lncRNAs, produced from repeated or unique DNA regions, with a regulatory function that is often well-documented but a mode of action that remains largely unknown.

Keywords: HSF1; lncRNA; SATIII; eRNA; SINE; TERRA; NEAT1

Citation: Vourc'h, C.; Dufour, S.; Timcheva, K.; Seigneurin-Berny, D.; Verdel, A. HSF1-Activated Non-Coding Stress Response: Satellite lncRNAs and Beyond, an Emerging Story with a Complex Scenario. *Genes* **2022**, *13*, 597. <https://doi.org/10.3390/genes13040597>

Academic Editors: Manuel A. Garrido-Ramos, Miroslav Plohl and Eva Šatović-Vukšić

Received: 9 February 2022

Accepted: 19 March 2022

Published: 27 March 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The cellular response mediated by Heat Shock transcription Factor 1 (HSF1) is involved in a large number of biological processes and is widespread within the eukaryotic kingdom. Initially described in the context of the cellular response to thermal stress, the involvement of HSF1 has been rapidly extended to a large number of other environmental and cellular stresses and physio-pathological contexts [1–4]. Genes encoding Heat Shock Proteins (HSPs) are major effectors of the stress response and of HSF1 [5]. HSPs maintain protein homeostasis in a disturbed physiological context through their action on protein folding [6]. In addition, non-HSP protein-coding genes targeted by HSF1 have been identified with roles in the regulation of apoptosis, cellular defense against Reactive Oxygen Species (ROS), and cell membrane and chromatin organization [7–9].

Today, the emerging view is that, in addition to the well-known response of inducing the expression of specific protein-coding genes, HSF1 also mediates a non-coding response to stress (non-coding referring to the fact that the transcripts generated here do not code for proteins). This non-coding response may be involved in the rapid and coordinated reshaping of protein-coding gene expression through a potentially large range of mechanisms [10]. Indeed, besides the HSP and other proteins, diverse long non-coding RNAs (lncRNAs) have been identified, mostly over the last two decades, as direct genomic targets

of HSF1. These transcripts include Satellite III transcripts (*SATIII*) emanating from pericentric heterochromatin (Figure 1A) [11,12] as potential effectors of the heat shock response. The biological relevance of this HSF1-mediated non-coding response, and the mechanisms involving the regulatory lncRNAs produced, are only starting to be understood.

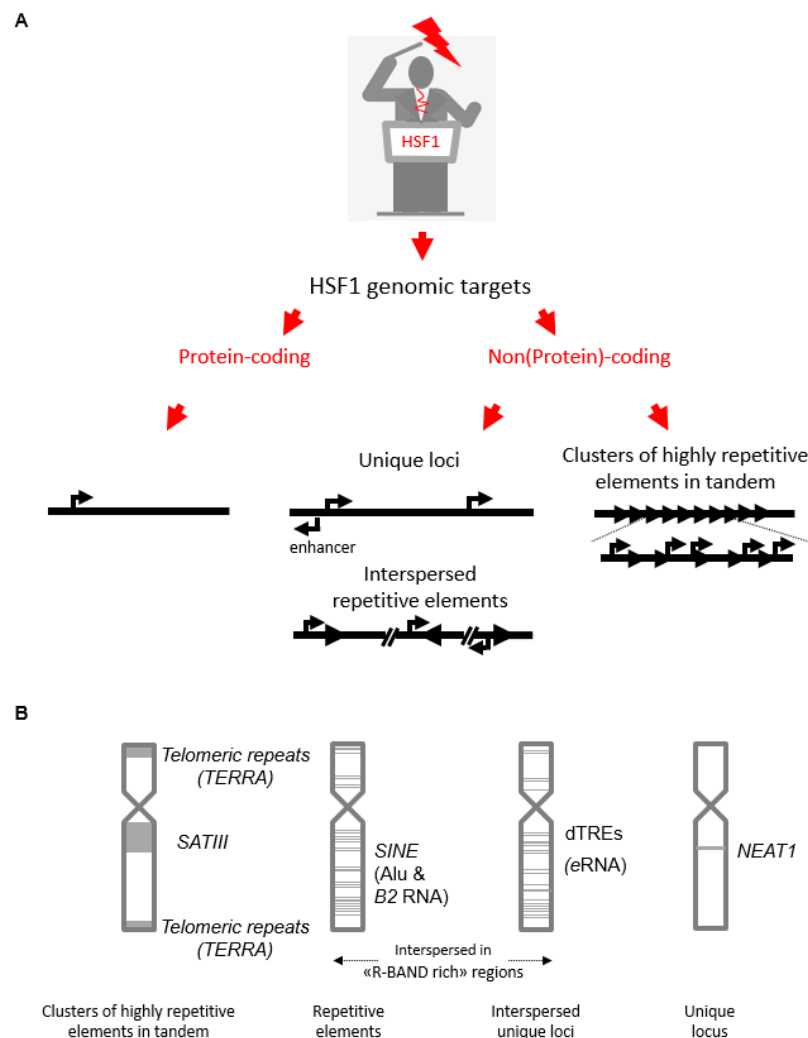


Figure 1. Genomic targets of the HSF1-mediated heat-shock response. **(A)** Several types of genomic sequences are targeted and transcribed by HSF1. They include protein-coding genes, such as HSP genes, and non(protein)-coding sequences. This later group includes non-repetitive elements present at a single locus (e.g., *NEAT1*, *distal Transcription Regulatory elements (dTREs) transcribed into eRNAs*) and repetitive interspersed elements, present as a thousand copies within gene-rich regions (e.g., *SINEs*). Finally, non-coding sequences also include clusters of highly repetitive elements in tandem such as *SATIII* and Telomeric repeats (transcribed into *TERRA*), located at pericentric and telomeric regions. **(B)** Distribution of non-coding sequences along human chromosomes. *SATIII* lncRNA and *TERRA* are transcribed from large regions located at pericentric and telomeric regions, respectively (primarily from chromosome 9 in the case of *SATIII* lncRNA). *SINE* sequences are mainly present in the gene-rich and GC-rich regions (R-bands). *eRNAs* are transcribed from the dTREs present upstream of the promoter and gene transcription start sites (TSS) and are, therefore, likely to be widespread and possibly more abundant in gene-rich regions. The *NEAT1* gene is present at a single locus.

This review focuses primarily on the known mammalian lncRNA effectors of the HSF1 response, with the aim of providing an updated view of their role and mode of action in the HSF1-dependent stress response. The first part reports and briefly describes the lncRNAs whose production is directly activated by HSF1 (Figure 1A,B). These lncRNAs are

the *SATIII* and *TERRA* transcripts expressed from DNA repeats in pericentric [11,12], and (sub)telomeric heterochromatin [13,14], respectively, the Short Interspersed Nuclear Elements (*SINEs*) transcripts that are expressed from repetitive sequences scattered throughout the genome [15,16], enhancer RNAs (*eRNAs*) [8,9] and the two lncRNA isoforms, *NEAT1.1* and *NEAT1.2*, expressed from the single-copy *NEAT1* gene [17]. The second part of the review presents the emerging mechanisms by which these lncRNAs may contribute to HSF1-dependent stress-response.

2. The Genomic Noncoding Sequences Transcribed under the Direct Control of HSF1

Scheme 1: directly controls expression of a set of genes not coding for proteins. These assumptions rely on computational genomic analyses allowing an identification of putative HSF1-binding sites known as Heat Shock Elements (HSE), Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) to evaluate the binding of HSF1 to their promoter and, finally, comparative analysis of their levels of expression in cells expressing HSF1 or not. We will provide here a short description of these lncRNAs and the findings indicating that the genes encoding these lncRNAs are directly upregulated by HSF1 (Table 1).

Table 1. List of ncRNAs that have their production activated by HSF1-induced transcription. Note: For genes and RNAs we follow the recommendation of Seal and coauthors [18].

ncRNA Production Activated by HSF1.	Length	Internal Repetitive Elements	Multiple Copies	HSE within Promoter Region	Genome Localization	Molecular Function in HS Cells
<i>SATIII</i>	from 2 kb to 5 kb and more	Yes (Tandem repeats, 5 b long)	Yes	Yes (in silico)	Multiple sites at heterochromatin pericentric regions	Titration of transcription factors
						Reorientation of splicing decision
						Maintenance of centromeric heterochromatin
						Maintenance of repressive histone marks
<i>Alu</i>	~280 b	No	Yes	Yes (ChIP)	Multiple and dispersed sites	RNAPII inhibition
						Impact of gene expression through antisens RNA
						Impact on transcriptional elongation
						Recruitment of repressive transcriptional complexes
<i>eRNA</i>	From 50 b to 2 kb	No	No	Yes (ChIP)	Multiple and dispersed sites	Alteration genome integrity through retrotransposition
						Control of gene expression
<i>NEAT1</i>	~3 kb (<i>NEAT1-1</i>) ~20 kb (<i>NEAT1-2</i>)	No	No	Yes (ChIP)	Unique locus	miRNA biogenesis
						HSP genes down regulation following HS
<i>TERRA</i>	From 100 b to less than 100 kb	Yes (Tandem repeats, 6 b unit)	Yes	Yes (ChIP)	Multiple sites at telomeres	Genome protection through telomere protection
						Telomeric heterochromatin reformation by recruiting repressive chromatin marks

2.1. Satellite lncRNAs

Satellite DNA sequences, present at pericentric regions, are enriched in tandem repeats organized in a “head-to-tail” orientation.

In humans, the size and sequence of pericentric regions varies between chromosomes. The majority of them contain, as a major component, a single family of simple repeated satellite (SAT) sequences formed by the classical *satellites I, II and III*. Of these, *SATIII* are characterized by the high frequency of the *sat3* motif [19–21] (also see Table 2, associated references [20–29]).

Table 2. General characteristics (sequence, size, chromosome distribution) of mouse and human satellite repetitive units of pericentric and pericentric origin.

Human		
centromeric repetitive motif ([20])		
<i>Minor SAT</i> (120 bp)	all chromosomes	GGAAAATGATAAAAACACACTGTAGAACATATTAGATGAGT GAGTTACTGAAAAACACATTTCGTTGGAAACGGGATTTG TAGAACAGTGATATCAATGAGTTACAATGAGAAACAT
pericentric repetitive motif ([21])		
<i>Major SAT</i> (234 bp)	all chromosomes	CCTGGAATATGGCGAGAAAACGAAAATCACGGAAA ATGAGAAATACACACTTTAGGACGTGAAATATGGCGAGAAAAC TGAAAAAGGTGGAAAATTTAGAAATGTCCACTGTAGGACGTGGAATATGGCA AGAAAACGAAAATCATGGAAAATGAGAAACATCCACTTGACGAC TTGAAAATGACGAAATCACTAAAAAACGTGAAAAAT GAGAAATGCACACTGAAGGA
Mouse		
centromeric repetitive motif ([19])		
<i>Alphoid</i> (171 bp)	all chromosomes	CTTCTGTCTAGTTTTTATATGAAGATATCCCGTTTCCAACCAAGGC CTCAAAGCGTCCAAATATCCACAAGCTGATTCTACAAAAAGAGTGT CAAACTGCTCTATGAAAAGGAAGGTTCAACTCTGTGAGTTGAATGT ATACATCACAAAGAAGTTTCTGAGAATG
pericentric satellite repetitive motif ([22–27])		
<i>SATI</i>	chrs 3, 4, 13, 14, 15, 21, 22, Y	Alternance of fragments A (17 bp) = ACATAAAATATG/CAAAGT and B (25 bp) B1: ACAT/CCCAAATATAG/TATTA/TTATA/TCTGT and B2: ACCCAAAGT/GCCATAT/GCATTA/CTATACT
<i>SATII</i>	chrs 1, 2, 7, 10, 15, 16, 17, 22	(CATTC)n degenerated
<i>SATIII</i>	chrs 1, 3, 5, 7, 9, 10, 17, Y, acrocentric	(CATTC)n

More recent sequencing analysis of human satellite regions led to a more refined identification of chromosome-specific satellite 2 and 3 motifs with the identification of 10 subfamilies, each displaying specific chromosome-specific distributions [27]. In mouse, pericentric regions of ~6 Mb are made of a repetition of 234 bp of AT-rich sequences, known as the major satellite motif [23]. Pericentric regions are enriched in methylated DNA, [30] and other repressive marks, such as H3K9me2/3 and Heterochromatin Protein 1 (HP1) [19,31,32]. In addition, repression at pericentric regions also involves a BRCA1-mediated H2A monoubiquitinylation [33,34]. The very recent complete sequencing of human pericentric regions reveals that, as in mouse, these sequences cover several megabases, much longer in size than initially estimated [35]. For example, the largest region containing *SATIII* repeats, found within the chromosome 9 pericentric heterochromatin, is around 27 megabases long [35].

HSF1 in the Control of Human *SATIII* Repeats' Expression

Human *SATIII* repeats have been found to be up-regulated by HSF1 [11,12]. In heat-shocked cells, a pericentric region of chromosome 9 (locus 9q12) [11,12,36] and, more recently, of chromosome Y (locus Yq12) [37] were both characterized as primary targets of HSF1. However, additional transcription sites form on pericentric regions of other chromosomes in cells overexpressing HSF1 and in cells under more severe stress, suggesting that low-affinity HSF1-binding sites also exist on other pericentric regions [38]. The total number of HSF1-binding sites at these loci is unknown. However, an analysis of genomic sequences from the 9q12 locus revealed the presence of putative Heat Shock Elements (HSEs) over stretches of *SATIII* repetitive motifs (our unpublished observation). *SATIII* are transcribed by RNAPII into a pool of *SATIII* lncRNAs ranging in size from 2 Kb to 5 Kb and beyond [11,12]. *SATIII* DNA repeats are predominantly transcribed in one orientation (enriched in the pentanucleotide repeat motif GGAAU). Interestingly, a slight increase in the level of *SATIII* lncRNAs in an antisense ((AUUCC)n-rich) orientation was also observed in stressed cells [11,12,39], but there is no evidence to date for a direct role of HSF1 in up-regulating antisense *SATIII* lncRNAs.

In addition, different cellular contexts involving pericentric satellite lncRNAs' accumulation have also been described, but for which a direct role of HSF1 has not been demonstrated so far. For instance, in mouse, an accumulation of major satellite RNA from pericentric heterochromatin has been reported during late G1/S and mitotic stages of the cell cycle [40] and during early development [41]. Transcripts produced from pericentric regions are also present in both mouse [42] and human [43,44] testis. Finally, an accumulation of satellite transcripts, including *SATIII*, was also observed in a variety of human tumor tissues [44–46].

2.2. Telomeric Repeat Containing RNA (TERRA) lncRNAs

Telomeric heterochromatin consists of tandem repeats of the TTAGGG hexanucleotide motif [47,48]. These repeats form the “telomeric tract” that spans several kilobases at the ends of chromosomes. In stressed cells, telomeric and subtelomeric regions are transcribed by RNAPII into heterogeneous lncRNAs called Telomeric Repeat-containing RNA (*TERRA*), which range in size from 100 bases to >100 Kb [49,50]. *TERRA* production is initiated in specific regions of the chromosome located approximately 1 Kb upstream of the telomeric tract. *TERRAs* therefore contain chromosome-specific sequences in addition to a common telomeric tract [50]. *TERRAs* have been found to be expressed from several human chromosome ends [51–54] and *TERRA* are associated with telomeric DNA repeats [55,56].

HSF1 in the Control of Human *TERRAs*' Expression

The first observation that heat shock increases transcription at telomeres was reported in *Chironomus thummi* [57] then confirmed in mouse [56] and human [14]. The direct implication of HSF1 in the up-regulation of *TERRA* was then reported in human [13]. In human cells, HSF1 binding and HSF1-dependent transcriptional activation of telomeric repeats was observed specifically at telomeres containing HSEs, which are only present in 40% of all sub-telomeres [13].

2.3. Short Interspersed Nuclear Element (SINE)-Containing lncRNAs

SINEs are present as thousands of copies interspersed in the genome of mouse and higher primates [58,59]. In mouse, they include *B1*- and *B2*-like elements. *B1*-like elements are ancestrally derived from the *7SL* gene, which is a component of the signal-recognition particle (SRP) ribonucleoprotein complex with a role in protein synthesis [15]. *B2*-like elements are derived from tRNA precursors and are present in mouse and rabbit. In human, *B1*-like elements are known as *Alu* elements [60]. *Alu* elements are approximately 280 bases in length, and are formed by two tandem repeats separated by a central A-tract [15]. Sequences encoding *Alu* elements have an internal RNA polymerase III (RNAPIII) promoter that has the potential to initiate transcription of the *Alu* sequence. Since *Alu* sequences lack a termination site for transcription, they are transcribed into RNAs of heterogeneous length depending on the location of nearby transcription terminator [61]. Under normal growth conditions, the internal RNAPIII promoter is necessary but not sufficient for transcription, and *Alu* sequences are not transcribed, unless they are fortuitously positioned near appropriate strong enhancers [62]. Furthermore, the repressive histone H3 lysine 9 trimethylation (H3K9me3) mark seems to silence the majority of *SINE* sequences, such that only a very low level of *SINE* RNAs is produced from the internal RNAPIII promoter, at dispersed loci in mouse and human [63]. However, because of their ubiquitous interspersion within RNAPII transcribed units, *SINEs* are also abundantly expressed as short-lived RNA as part of intronic sequences of nuclear transcripts [60,64].

HSF1 in the Control of *SINEs*' Expression

An increase in *Alu* elements and *Alu* retrotransposition events has been described in response to genotoxic stresses [65]. Importantly, in humans, the targeting of *Alu* sequences by HSF1, inducing their expression upon heat stress, was demonstrated by means of

primer extension upon exposure to mild heat shock [16]. Likewise, HSEs were identified at conserved sites in different *Alu* subfamilies within *Alu* sequences [66].

2.4. Enhancer RNAs (*eRNAs*)

Enhancer RNAs represent an emerging class of ncRNAs produced at distal Transcription Regulatory Elements (dTREs), which are defined as genomic regions, localized outside of gene promoters, that increase transcription of neighboring genes [67]. dTREs are transcribed bi-directionally by RNAPII within domains preferentially enriched in H3K4me1 and H3K27ac [68,69]. Based on their size (in the 50 bp–2 Kb sized-range), *eRNAs* belong mostly to the category of lncRNAs.

HSF1 in the Control of *eRNAs*' Expression

Interestingly, two recent papers report HSF1 binding to enhancers that produce *eRNAs* in both mouse and human cells [8,9]. In a model of human myeloid/erythroid leukemia K562 cells submitted or not to heat shock, precision run-on and sequencing (PRO-seq) experiments identified thousands of dTREs that include enhancer regions, in both unstressed and stressed cells. In this study, more than 5000 dTREs were found to be significantly up-regulated upon heat-shock [8]. Noticeably, a repertoire of around 400 dTREs observed in heat-shocked cells and encompassing HSF1-binding sites showed a higher density of RNAPII and a higher level of histone acetylation [8], suggesting that they are direct targets of HSF1.

2.5. Nuclear-Enriched Abundant Transcript 1 (*NEAT1*)

The human *NEAT1*/Men ϵ/β gene codes for two overlapping 3.7 Kb and 22.3 Kb lncRNA isoforms called *NEAT1-1* and *NEAT1-2*, respectively, which are generated from the same promoter [70]. In mammalian tissues and cells, the *NEAT1-2* isoform localizes in specific nuclear structures called paraspeckles [71–73]. Paraspeckles are spherical membrane-less ribonucleoprotein structures formed by the association of *NEAT1* lncRNAs and various proteins. *NEAT1-2* RNA is essential for the formation and maintenance of paraspeckles [74,75]. *NEAT1-1* lncRNA is not essential for paraspeckles formation but enhances paraspeckles formation when *NEAT1-2* is present [74]. Unlike *NEAT1-2*, *NEAT1-1* can be found outside of paraspeckles in tissue culture cells, further suggesting that it may have different biological functions than *NEAT1-2* [76]. The *NEAT1* gene sequence is not well conserved between human and mouse but in both organisms, a common strong propensity for long-range intramolecular base-pairing was recently found to contribute to paraspeckle scaffolding [77]. An average of 5–20 paraspeckles (0.5–1 μm in diameter) are present in unstressed human cells with the exception of human embryonic stem cells (hESC), the only mammalian cell type reported to be devoid of paraspeckles [78].

HSF1 in the Control of Human *NEAT1* Expression

Recently, a direct HSF1-dependent up-regulation of *NEAT1-1* and *NEAT1-2* lncRNAs was described in human breast cancer MCF7 cells submitted to a mild 30-min heat shock at 43 °C followed by a recovery period of 2 h at 37 °C [17]. Interestingly, the Heat Shock Element (HSE)-binding sites found at the *NEAT1* promoter were also present within *NEAT1* promoters in other eukaryotes [17].

3. Molecular Functions of HSF1-Driven Production of lncRNAs in Response to Heat Stress

In this second part of the review, we present how this non-coding fraction of the genome directly targeted by HSF1 for transcription activation may act in the heat shock response. What are the common features, if any, of the lncRNAs identified so far? With the exception of *NEAT1* lncRNAs, they are transcribed from a large number of genomic repeats, either distributed along all chromosomes (*Alu* RNAs, *eRNAs*), or at more specific and relatively large genomic loci (*TERRA*, *SATIII* lncRNAs). In addition, two of them (*TERRA*,

SATIII lncRNAs) consist of a high density of tandem repeats units of a short nucleic acid motif. At least two of them (*SATIII* lncRNAs, *NEAT1*) are essential scaffolding elements for the formation of sub-nuclear and membrane-less compartments [79,80] (see Table 1).

3.1. *LncRNA-Dependent Nuclear Relocation of Factors Involved in the Control of Transcription*

In human stressed cells, *SATIII* lncRNAs remain at their site of transcription, even several hours after mild stress exposure (30 min exposure at 43 °C). The nuclear structures that form at sites of *SATIII* transcription are referred to as nuclear Stress Bodies (or nSBs) [81]. This name embraces the notion that these structures are enriched in various transcription and co-transcription factors (including HSF1, HATs and BET proteins) and RNA-binding factors [79,82–84].

The accumulation of transcriptional and co-transcriptional factors at nSBs may contribute to a global deacetylation of the two core histone proteins H3 and H4 [85,86] detected by western blot [85] or immunofluorescence performed on stressed cells [11,12]. Indeed, massive recruitment of HSF1 and its associated Histone Acetyl Transferases (HATs), especially at the 27-megabases-long 9q12 pericentric locus that is highly enriched in *SATIII* DNA repeats, could represent an efficient way of promoting a genome-wide reduction in acetylation and, thus, controlling genome-wide expression. Several HATs (Gcn5, CBP/p300 and Tip60) [11,87], and chromatin readers, such as Bromodomain extra-terminal domain (BET)-containing proteins [84,87], are recruited to nSBs in an HSF1-dependent manner [11,87] (Figure 2A). Furthermore, stress-induced global deacetylation of core histones throughout the whole genome is temporally coupled with increased acetylation of core histones at the *SATIII*-enriched 9q12 locus [7,87,88]. This deacetylation process is rapid and impacts lysine residues present in the N-terminal or histone fold regions. Histone acetylation loosens histone–DNA interactions by neutralizing the positive charges of lysine and also provides docking sites for histone-binding proteins that play an important role in the recruitment or activity of essential transcription factors [89]. While a knock-down of *SATIII* lncRNAs partially releases the heat-induced repression of a series of genes, overexpression of ectopic *SATIII* lncRNAs triggers gene repression in both unstressed and stressed cells and results in a significant decrease in the survival of stressed cells [88].

3.2. *LncRNA-Dependent Nuclear Relocation of Factors Involved in the Control of Splicing*

Similarly, the specific impact of heat stress on the alteration of the intranuclear distribution of components of the splicing machinery has been known for a long time and illustrated in a number of selected target RNAs and organisms [90–94], with heat stress found to block constitutive pre-mRNA splicing but also to affect the regulation of alternative splicing [82]. The stress-induced dephosphorylation of SRSF10 (SRP38) plays an important role in the heat-induced inhibition of splicing [95]. Dephosphorylated serine- and arginine-rich protein SRSF10 (SRP38) binds to U1 snRNP-associated protein U1 70K, and prevents the interaction of U1 70K with other SR proteins [96].

In addition, other serine-rich (*SR*) proteins, including (SF2/ASF-SRSF1), Srp30c (SRSF9), 9G8 (SRSF7) and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNPs-hnRNPA1)-interacting proteins (HAP/SAF-B and hnRNPM), with essential roles in constitutive and alternative pre-mRNA splicing, are massively recruited to HSF1-dependent nSBs in human stressed cells. The recruitment of these alternative splicing factors to nSBs is selective and proteins with constitutive roles in splicing are not recruited [97]. Different mechanisms may be involved in the recruitment of these factors at nSBs. For example, while the interaction of SAFB, SRSF1, SRSF7, SRSF9 and HNRNPM with *SATIII* lncRNAs is potentially direct [98], involving, in the case of SRSF1, a defined RNA-binding domain [12,99], other proteins such as HAP are recruited through protein/protein interactions [100]. Furthermore, the deposition of N⁶-methyladenosine (m⁶A) RNA modification on *SATIII* lncRNAs may also recruit proteins such as YTHDC1 [101] (and unpublished data from our team). These different modes of recruitment may explain the differences in the kinetics of recruitment of these proteins to nSBs, relative to the timing of accumulation of *SATIII* lncRNAs [79,81].

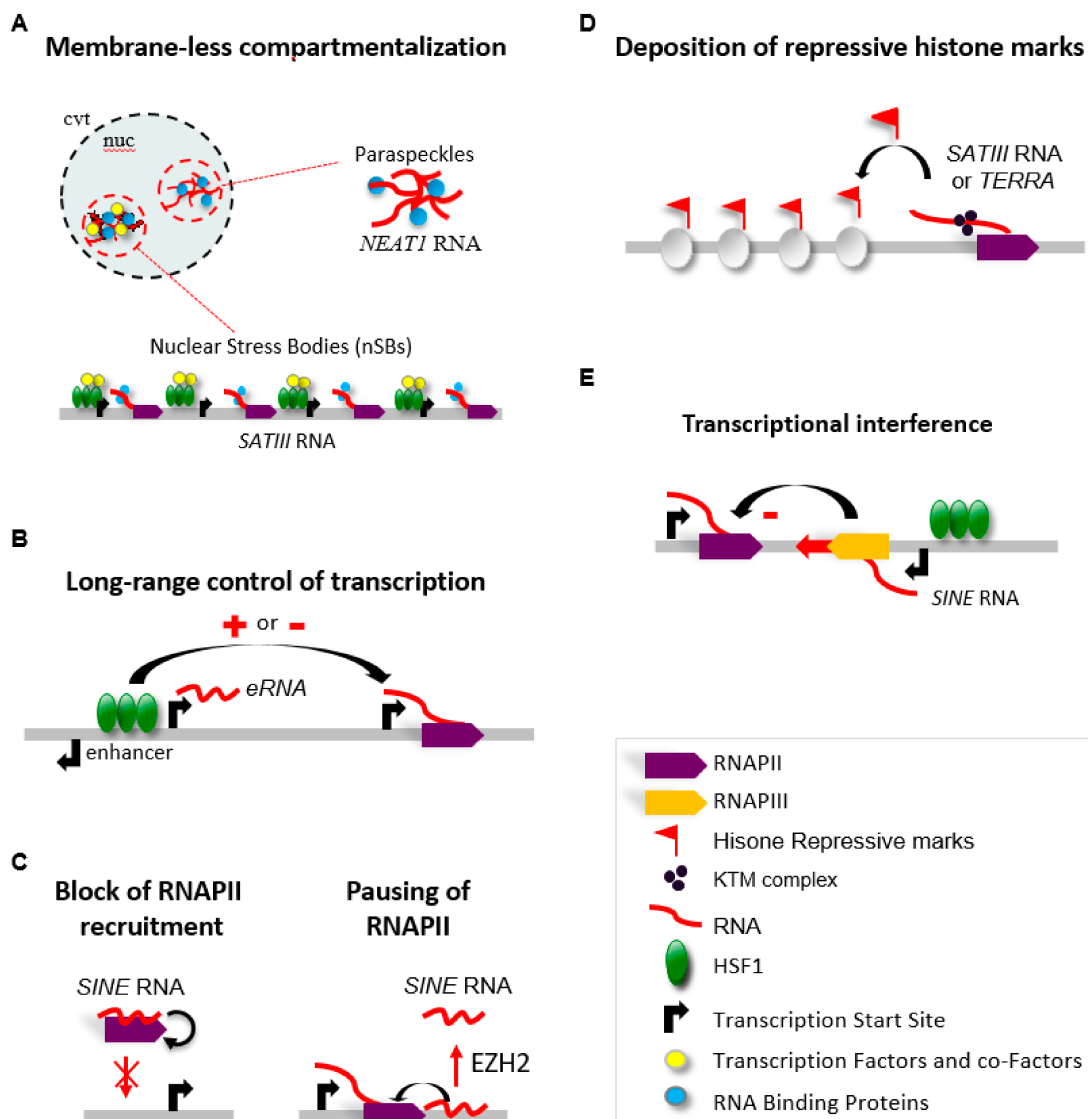


Figure 2. Molecular roles assigned to the non(protein)-coding RNAs in the heat shock response. (A) The ncRNAs produced at pericentric regions are thought to play a role in *cis* through the recruitment, and possible sequestration, of transcriptional repressive complexes. Transcriptional and co-transcriptional regulators as well as RNA-binding factors such as splicing factors accumulate at *SATIII* transcribed genomic sites upon HS. The resulting transient accumulation of transcription and splicing factors at these sites is thought to possibly form membrane-less compartments and cause a rapid and reversible depletion/concentration of these factors from the rest of the nucleus. Likewise, the nuclear accumulation of *NEAT1* lncRNA allows the formation of membrane-less nuclear structures known as paraspeckles, with a role in microRNA processing. (B) HSF1-dependent bi-directional transcription of *dtREs* into *eRNAs* may promote or repress transcription by RNAPII of protein-coding genes, upon heat shock. (C) *SINE* RNAs are thought to repress transcription by disrupting contacts between RNAPII and promoter DNA. In addition, specific *SINE* RNA-binding sites have been identified at many genic and intergenic targets proximal to RNAPII pausing, where they may prevent transcriptional elongation. (D) The lncRNAs produced at pericentric regions and telomeric regions are thought to play a role in *cis* through the recruitment, and possible sequestration, of transcriptional repressive complexes. (E) HSF1-dependent transcriptional activation of *SINE* sequences in an “antisense” orientation may also cause gene repression of the genes transcribed in a “sense” orientation.

It is possible that recruitment of these splicing proteins is intended to regulate the splicing of *SATIII* lncRNAs [102]. However, no direct evidence exists that *SATIII* transcripts are subjected to a complete splicing reaction [99]. Instead, an alternative view could be that, through a selective recruitment of splicing factors, *SATIII* lncRNAs may impact the balance between SR and hnRNP proteins, and thereby regulate the alternative splicing of many protein-coding transcripts containing introns [79,82]. In favor of this possibility, a more complete picture of the impact of heat shock on splicing, based on transcriptome-wide approaches, has emerged recently with studies performed on mouse [103] and human cells [84,98,101]. In both models, a widespread inhibition of alternative splicing has been observed in heat-shocked cells, mostly characterized by a high percentage of intron-retention [84,98,103]. Interestingly, intron retention is even greater in human heat-shocked cells' knock-down for *SATIII* expression [84]. This suggests that the accumulation of *SATIII* lncRNAs protects pre-mRNAs from splicing alterations [84].

In addition, during recovery from stress, CDC-like kinase 1 (CLK1) is recruited to nSBs. *SATIII* lncRNAs, appear to act as platforms that can concentrate SRSFs in a small fraction of the nucleus for their efficient and timely phosphorylation by CLK1, in a manner that promotes a rapid adaptation of gene expression, through the control of intron excision, following thermal stress exposure [98].

As with *SATIII*, *NEAT1* lncRNAs also seem to play a role in RNA processing. Indeed, *NEAT1* lncRNAs have been found to anchor the DROSHA-DGCR8 microprocessor complex to paraspeckles via a pri-miR-612 (and possibly additional) stem-loop structure(s) present within the *NEAT1* sequence [104]. Other proteins, including NONO (P54NRB) and PSF (or-SFPQ), both involved in pri-miRNA processing and identified as key component of paraspeckles, may assist in the transport and processing of other pri-miRNAs to the paraspeckles [80,104]. Up-regulation of miRNAs resulting from HSF1-induced accumulation of *NEAT1* could also be involved in the control of gene expression in stressed cells (64). Indeed, a reduction in almost all expressed miRNAs was observed in cells lacking *NEAT1* [104] and could be related to the up-regulation of HSP genes, reported in stressed cells knocked down for *NEAT1* [17] (Figure 2A). The exact implication of *NEAT1* up-regulation in terms of miRNA-mediated changes in gene expression in heat-shocked cells, however, remains to be determined.

What might be the advantage of regulating these RNA-based processes through the sequestration of key players? Transient sequestration of RNA processing factors and RNA regulators could be less metabolically demanding than the degradation of these factors followed by their synthesis and could allow rapid adaptation to stressful environments. Such regulation might actually be conserved through evolution. In *Drosophila*, the heat shock RNA omega (*hsw*) gene, encoding *hsw* lncRNAs, is upregulated in heat-shocked cells [105–107]. Although transcribed from a single-copy gene, they also accumulate within nuclear structures called omega speckles [108]. Similarly to nSBs, omega speckles act as dynamic storage sites for various hnRNPs and other RNA processing and regulatory proteins [108], raising the attractive hypothesis that *SATIII* and *hsw* lncRNAs may represent functional analogs in the regulation of RNA processing and function upon stress [109,110].

3.3. Interaction of lncRNAs with the Transcriptional Machinery

The cellular response to stress is characterized by major and rapid changes in gene transcription, as demonstrated in mouse [9] and human [8], with Precision nuclear Run-On sequencing (PRO-seq). This technique allows a fine profiling of the dynamic regulation of the transcriptionally engaged RNA polymerase transcription across the genome [111]. Likewise, in human K562 myeloid erythroid cells, exposure to moderate thermal shock induces a down-regulation of a large fraction of protein-coding gene expression (estimated at 36% of the total number of genes analyzed) and, conversely, an up-regulation of a much smaller fraction of protein-coding genes (4.6%) [8].

HSF1-dependent transcriptional activation is primarily modulated at the level of promoter-proximal pause and release, with HSF1 increasing RNAPII release from promoter-

proximal pause [8,9] and dissociation of the 330-nucleotide-long 7SK RNA from positive Transcription Elongation Factor b (pTEFb) [112]. Different types of mechanisms involving a direct impact of lncRNAs on the transcriptional machinery have been described in stressed cells. LncRNAs have been shown to play a role in the 3D-structuration of functional promoter regions in the control of transcription initiation and elongation.

The production of Enhancer RNA, at HSF1-binding sites located in the enhancer regions of stress-induced genes, is thought to bring together transcription factors present in the distal promoter region's elements and in the core promoter [113] or to maintain transcription-binding sites in an open chromatin configuration [114,115] (Figure 2B).

Additionally, *SINE* RNAs have been found to impact RNAPII-dependent transcription at different levels. *SINE* RNAs have been shown to affect RNAPII-recruitment at the preinitiation complex. Observations in human and mouse heat-shocked cells revealed that *SINE* transcripts (produced by RNAPIII and not RNAPII) establish a direct interaction with RNAPII [116,117]. More specifically, *B2* RNA (mouse) and *Alu* RNA (human) disrupt contacts between RNAPII and promoter DNA [118,119] (Figure 2C, left). The interaction between *SINEs* RNA and RNAPII prevents the formation of preinitiation complexes [118]. Furthermore, still in stressed cells, *B2* RNA can also control transcriptional elongation levels by another mechanism. Indeed, *B2* RNA-binding sites have been identified at many genic and intergenic targets, including at heat-responsive genes in mouse [120], just proximal to the sites of RNAPII pausing [9]. *EZH2* is a member of the polycomb complex that is involved in gene repression and which catalyzes the addition of methyl groups to H3K27. Upon heat shock, *EZH2* possesses an additional RNA processing function and is able to trigger rapid cleavage of *B2* RNA, allowing RNAPII elongation (Figure 2C, right) [120]. Since a binding of *B2* RNA to chromatin is not detected in the gene body of *HSP* genes, up-regulated genes controlled by *B2* RNA and up-regulated genes controlled by HSF1 likely represent different subsets of genes [120].

3.4. LncRNA-Dependent Recruitment of Repressive Complexes

Non-coding transcripts produced from pericentric heterochromatin are known to be essential actors in the maintenance of heterochromatin in mouse [121,122]. Major Satellite lncRNAs (which are thought to be functionally equivalent to human *SATIII* lncRNAs) are essential in setting up pericentric heterochromatin and chromocenter formation in early embryonic development and play an important role in the deposition of the repressive H3K9me3 histone mark to pericentric heterochromatin regions at that stage [41,123]. In this context, although not demonstrated yet, the hypothesis that *SATIII* lncRNAs may participate in the reformation of pericentric heterochromatin in the recovery period from stress is, therefore, attractive at a stage when repressive marks need to be restored.

In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, a model of choice to study heterochromatin, RNA of pericentric origin is required to initiate and maintain heterochromatin. In this case, pericentric lncRNAs form double-stranded RNAs that are diced into small interfering RNAs (siRNAs, which are around 20 bases long) and also serve as a platform to recruit a repressive complex. So far, we have no evidence that RNAi mechanisms involving *SATIII* RNA also occur in early development or in the recovery period of stress. In addition, the precise biological context in which the RNAi pathway participates or not in the maintenance of heterochromatin at centromeric regions is still unclear in higher eukaryotes. In unstressed mouse ES cells, small centromeric and pericentric double-stranded RNA (dsRNA) molecules, with predominant signals at 150 nt and 25–30 nt, are only detected in DICER-expressing cells [124]. Still in mouse ES cells, an accumulation of transcripts of pericentric origin is observed in DICER^{-/-} cells [124,125], thus suggesting a DICER-dependent silencing mechanism for centromeric heterochromatin [125]. In human cells, the accumulation of human centromeric and pericentric specific transcripts, ranging in size from 20–30 nt up to several Kb, was observed in a chicken–human hybrid cell line model [126], while siRNA-targeting DICER A and B isoforms were not found to lead to an accumulation of *SATIII* RNA in human HeLa cells [44]. In HeLa cells, an accumulation

of *SATIII* RNAs molecules ranging in size from 25 to 75 nt (detected as a ladder with a regular 5 nt increment) was also described in the recovery period from stress [127]. While in human cells, no evidence exists that DICER is involved in the accumulation of *SATIII* RNA in stressed cells, a rapid accumulation of small 21–30 nt siRNAs originating from major DNA components of centromeric and pericentric regions (TCAST) was reported in the beetle *Tribolium castaneum* submitted to a transient heat shock stress [128]. This accumulation correlates with the enrichment of H3K9me2 and H3K9me3 at pericentric heterochromatin following stress, suggesting a possible implication of TCAST 21–30 nt siRNAs in the reformation of silent chromatin marks [128]. Based on these data, a clarification regarding the possible implication of siRNAs in heterochromatin reformation in mammals remains necessary. Differences in the mechanisms of heterochromatin formation exist among eukaryotes and what is true in flies may not be necessarily transposable to mammals.

Another non-mutually exclusive possibility is that heterochromatin reformation after stress may involve the use of lncRNAs without the involvement of a process such as RNAi. These lncRNAs would then solely act as platforms to recruit proteins necessary for the formation of heterochromatin, similar to what has been described for the *Xist* (X inactivating specific transcripts) lncRNAs that coat the inactive X chromosome within the Barr body in female mammals [129]. In the same line, TERRAs could be exerting the same recruiting platform function [51,52,130]. Chromatin at telomeres is enriched with the repressive histone marks of H3K9me3, and TERRAs have been detected in an enzymatic complex catalyzing H3K27 trimethylation at the telomeres. H3K27me3 is required in turn for the establishment of H3K9me3, H4K20me3 and HP1 binding at the telomeres (Figure 2D) [131–133].

The discovery of the accumulation of SINE transcripts in heat-shocked cells also raised the possibility that these transcripts may regulate gene expression in *cis* [66]. Indeed, *Alu* elements containing HSE-binding sites are frequently positioned downstream of the transcription start site of genes, suggesting that HSF1 may contribute to the down-regulation of sense transcripts in heat-shocked cells by promoting the production of antisense lncRNAs. In support of this hypothesis, a knockdown of antisense transcripts produced at several of these loci was found to increase the expression of the corresponding sense RNA [66] (Figure 2E).

3.5. lncRNA-Dependent Control of Genome Integrity

A source of HSF1-driven genomic instability could result from the stress-induced alteration of centromeric regions (including centromeric regions and pericentric heterochromatin regions) caused by the transcription of *SATIII* DNA repeats. Evidence exists that lncRNAs of centromeric origin are important players in kinetochore complex stability, kinetochore assembly and spindle assembly and that these RNAs represent an integral part of centromere identity [134–141]. However, a tight control of the lncRNA expression of centromeric origin is required for normal functional centromeres in unstressed and stressed cells. Indeed, both an overexpression [142,143] or a silencing [138] of centromeric transcripts leads to chromosome segregation defects. In *Drosophila*, centromeric *SATIII* lncRNAs that span several megabases on the X chromosome are also required for correct localization of the centromere-defining proteins CENP-A and CENP-C, as well as for outer kinetochore proteins [144], and a knock down of *Drosophila SATIII* transcripts causes mitotic defects [144].

The need for a better characterization of the impact of stress-induced *SATIII* lncRNAs accumulation on the structure and function of centromeres in human cells appears to be an important issue. We have no evidence so far that, as observed in *Drosophila*, human *SATIII* lncRNAs play a role in the stability of kinetochore. However, a recent publication reports that a transient prometaphase arrest occurs in stressed HeLa cells, the duration of which correlates with the level of *SATIII* lncRNAs accumulation [127]. Noticeably, HeLa cells that go through mitosis before the level of *SATIII* lncRNAs has returned to

normal show chromosome-9-specific segregation defects [127]. In this context, stress-induced *SATIII* lncRNAs accumulation appears to be a double-edged sword, as *SATIII* lncRNAs' accumulation may be part of a checkpoint, which is eventually bypassed in cancer cells, and thus provide a source of chromosomal instability. The impact of heat stress on chromosome instability may also result from an alteration of DNA replication. Indeed, several publications point to the impact of *SATIII* RNAs on DNA replication. For example, loss of BRCA1 in breast tumor correlates with an upregulation of *SATIII* RNA resulting in chromosome instability [34]. Overexpression of *SATIII* RNAs in breast cancer deficient for BRCA1 was found to destabilize replication forks through the interaction of *SATIII* RNA with the members of the complex required for DNA replication composed of BRCA1-interacting protein [145]. The titration of members of the BRCA1 complex away from stalled replication forks results in the formation of RNA–DNA hybrids and in the accumulation of γ H2AX (a marker for DNA damage) at the replication forks [145].

Finally, *SATIII* lncRNAs appear as interesting therapeutic markers in cancer therapy. Together with heat-shocked cells, cancer cells overexpressing *SATIII* RNA as a consequence of DNA hypomethylation at pericentric heterochromatic regions are resistant to etoposide, a topoisomerase IIa (TOP2a) inhibitor. The interaction of TOP2a with *SATIII* RNA at nSBs protects TOP2A against interaction with etoposide, preventing increased DNA damage in etoposide-treated cells [46].

The possibility that the HSF1-induced accumulation of lncRNAs may play a role in genome protection is perhaps best illustrated in the case of *TERRA*. In unstressed cells, *TERRA* transcripts are thought to play a role in telomere stability, telomere replication and the telomeric DNA damage response [51]. In many eukaryotes, telomeres are protected from double-stranded breaks and end-fusions by a protein complex, the shelterin complex [146]. The interaction of *TERRA* with the shelterin components TRF1 and TRF2 (Telomere Repeat binding Factors 1 and 2) contributes to telomere length homeostasis and protection [146], and may also anchor *TERRA* to chromosome ends, sustaining the enzymatic activities of *TERRA*-binding factors at telomeres [147]. Yet, many questions remain regarding the source of *TERRA* production, its distribution and its role [133,148].

Interestingly, an HSF1-dependent up-regulation of *TERRA* has been observed at specific telomeres in stressed cells [13,14,56]. Heat shock induces the partial loss of TRF2 at the telomeres [13], which is also dependent on HSF1. TRF2 is a member of the Shelterin complex, which specifically prevents telomeres' recognition as double-stranded DNA breaks [51,52], by repressing the activation of the ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) kinase signaling pathway [54]. Moreover, TRF2 protects telomeres against end-fusions elicited by the non-homologous end-joining pathway [54] and assists replication fork progression through pericentric regions, by preventing the accumulation of G-quadruplex-like structures [149]. While a loss of HSF1 does not prevent TRF2 dissociation, a higher number of telomere dysfunction-induced foci (TIF) was detected in HSF1 knock-down stressed cells [13]. TIF correspond to regions enriched in the phosphorylated protein, γ H2AX, mostly known as a biomarker of double DNA-strand breaks but also possibly enriched at stress-induced arrested replication forks [150,151]. The up-regulation of *TERRA* correlates with the recruitment of LSD1, a lysine-specific demethylase, at telomeres [54]. LSD1 directly interacts with *TERRA* and Mre11, a H3K4 methyltransferase subunit of the MRE11/RAD50/NBS1 (MRN) repair complex that may promote telomere fusions [54]. Whatever is the signal that triggers γ H2AX enrichment at telomeres, this enrichment reveals a critical role for HSF1 in telomere protection in stressed cells, which is possibly related with its role on *TERRA* upregulation [13]. Finally, a protective role for *TERRA* may also rely on its ability to recruit, as mentioned previously [129–131], repressive chromatin complexes to telomeres, and thereby promote the formation of more compact chromatin with greater resistance to stress-induced damage (Figure 2D).

Other stress-induced lncRNAs may also have a direct impact on genome stability. For example, *Alu* sequences have been found to undergo retrotransposition upon stress [65]. Unlike Long Interspersed Nuclear Elements (*LINE*), another class of interspersed repetitive

sequences, also present in thousands of copies in AT-rich and gene-poor genomic regions, *SINEs* are not capable of retrotransposition by themselves. However, with the help of *LINE* sequences, which provide them with the necessary elements for transposition, transposition of *Alu* elements has been reported. Retrotransposition of *Alu* elements was observed in human cells submitted to etoposide [65] and one cannot exclude that this type of event could occur in the same way in heat-shocked cells. Heat shock was also found to promote transposition events in other organisms including plants [152] and insects [153]. In *Arabidopsis thaliana*, the heat-shock-induced transposition of *ONSEN*, a *Ty1/copia-like* retrotransposon [154], and of its homolog that is also present in *Vigna angularis* [152] has been observed, representing a mechanism that may help the organisms to adapt to new environmental conditions [155,156]. At least in *Arabidopsis thaliana*, this transposition is mediated by the Heat Shock transcription Factor A2 (HSFA2), a functional equivalent of HSF1 [154]. However, this stress-induced transposition has only been reported in plants deficient in RNA-directed DNA methylation (RdDM) (a mechanism involving double-stranded 21–24 bases long small interfering RNAs (siRNAs) that guide methylation to silence retro-transposons) [154]. Although the retro-transposition of pericentromeric human *sat2* motifs has been found to expand locally and genome-wide in primary human colon cancer samples [157], there is no evidence that heat shock is able to trigger a retrotransposition of *SINE* and of *SATIII* sequences in human cells.

4. Conclusions

An emerging view of the HSF1-mediated non-coding response to stress is that it plays a global role in controlling gene expression by regulating transcriptional and post-transcriptional processes. The HSF1-mediated non-coding response should also be considered for its impact on genome stability. The non-coding fractions of eukaryotic genomes have long been neglected in genomic and gene expression studies. While only a small number of lncRNAs have been considered so far as direct effectors of HSF1 in stressed cells, it already appears that these RNAs are important actors of the heat shock response. The functional analysis of some of these RNAs is still hampered by the difficulty to efficiently knock-down nuclear RNAs and by the fact that they may be transcribed from multiple genomic loci, e.g., in genomic regions that are highly enriched in Satellite DNA repeats. The development of new tools such as CRISPR-Cas9 to knock out genomic sequences [158] and CRISPR-Cas13 to specifically target and knock-down nuclear and chromatin-associated transcripts represent promising new approaches to better study regulatory lncRNAs, especially in response to stress [159]. An important aspect will be to better define the different physiological and pathophysiological contexts of their accumulation. In this perspective, the study of Satellite lncRNAs clearly illustrates the difficulties and black holes. Different classes of Satellite transcripts from pericentric origin accumulate in both cancer tissues and heat-stressed cells. However, we do not know to what extent these Satellite sequences are structurally and functionally equivalent or not, in both cellular contexts. More generally, since these sequences are not conserved through evolution, a comparative analysis of their roles in different eukaryotes is often difficult and the molecular and functional characterization of their mode of action is an exciting challenge. Other aspects including the possibility that the accumulation of these lncRNAs may be linked to the regulation of the epi-transcriptome [101,160], a new dimension in the control of gene expression as well as translation, must also be considered. Finally, growing attention is also being paid to the contribution of lncRNAs in nucleating, maintaining and regulating the formation of membrane-less nuclear compartments through liquid–liquid phase separations (LLPS) [161–163]. The solidification of HSF1 foci within a sustained stressing environment was found to have a negative impact on *HSP* gene expression [164]. Trapping of HSF1 within nSBs was proposed to mark the cells with excessive proteotoxic damage and turn a reversible response into a signal to apoptosis with irreversible outcome [164]. Other types of HSF1-dependent stress-induced non-coding transcription, such as *NEAT1* transcription [165], may serve as effective entities to orchestrate and reshape gene expression. In addition, at

least one microRNA (miRNA) has already been identified as a direct target of HSF1 in a human cervical cancer cell line [166]. Knowing that miRNA can regulate several mRNA targets, an extended identification of the microRNA genes targeted by HSF1 and the impact of these miRNAs in the HSF1-dependent regulation of gene expression certainly represents another important perspective [167,168].

The extraordinary diversity of the new regulators, issued from the emerging population of ncRNAs accumulating in response to a stress and the HSF1-dependent activation of their transcription, such as *SATIII* lncRNAs, brings a new dimension to the orchestration of the cellular response to stress by HSF1. Finally, HSF1 overexpression and activation was also observed in cancer cells while the knock-out of HSF1 was found to protect mice from tumorigenesis induced by mutations of the RAS oncogene or by a hot spot mutation in the tumor suppressor p53 [169]. It is, therefore, tempting to consider that HSF1-dependent production of lncRNAs may also produce effectors that play key roles in the protumoral effect of the HSF1 signaling pathway.

Author Contributions: Conceptualization, writing and original draft preparation, C.V. with the help of A.V.; review and editing, C.V., S.D., K.T., D.S.-B. and A.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Our work on HSF1, heat shock response and ncRNAs was supported by “HeatEpiRNA” (17-CE-0007) and “MTREC” (21-CE11-0021) grants from the French Agence National pour la Recherche (ANR), and grants from la Ligue Contre le Cancer Comité de l’Isère, the University Grenoble-Alpes (Programme AGIR), the Région Auvergne-Rhône-Alpes (PAI-2021) and from MSD Avenir (ERiCAN, Epigenetic Reprogramming of Cancer Cell Plasticity and Resilience).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We apologize to the authors whose original work could not be cited because of the space constraint. We thank Genevieve Fourel and all members of the “RNA, Epigenetics and Stress” team for their feedback and helpful discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ciocca, D.R.; Arrigo, A.P.; Calderwood, S.K. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: An update. *Arch. Toxicol.* **2012**, *87*, 19–48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Calderwood, S. HSF1, a versatile factor in tumorigenesis. *Curr. Mol. Med.* **2012**, *12*, 1102–1107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Nakai, A. Molecular basis of HSF regulation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2016**, *23*, 93–95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gomez-Pastor, R.; Burchfiel, E.T.; Thiele, D.J. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 4–19. [[CrossRef](#)]
5. Hartl, F.U.; Bracher, A.; Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **2011**, *475*, 324–332. [[CrossRef](#)]
6. Joutsen, J.; Sistonen, L. Tailoring of Proteostasis Networks with Heat Shock Factors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2019**, *11*, a034066. [[CrossRef](#)]
7. Åkerfelt, M.; Morimoto, R.I.; Sistonen, L. Heat shock factors: Integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 545–555. [[CrossRef](#)]
8. Vihervaara, A.; Mahat, D.B.; Guertin, M.J.; Chu, T.; Danko, C.G.; Lis, J.T.; Sistonen, L. Transcriptional response to stress is pre-wired by promoter and enhancer architecture. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1–16. [[CrossRef](#)]
9. Mahat, D.B.; Salamanca, H.H.; Duarte, F.M.; Danko, C.G.; Lis, J.T. Mammalian Heat Shock Response and Mechanisms Underlying Its Genome-Wide Transcriptional Regulation. *Mol. Cell* **2016**, *62*, 63–78. [[CrossRef](#)]
10. Kopp, F.; Mendell, J.T. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell* **2018**, *172*, 393–407. [[CrossRef](#)]
11. Jolly, C.; Metz, A.; Govin, J.; Vigneron, M.; Turner, B.M.; Khochbin, S.; Vourc’h, C. Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J. Cell Biol.* **2003**, *164*, 25–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Rizzi, N.; Denegri, M.; Chiodi, I.; Corioni, M.; Valgardsdottir, R.; Cobiainchi, F.; Riva, S.; Biamonti, G. Transcriptional Activation of a Constitutive Heterochromatic Domain of the Human Genome in Response to Heat Shock. *Mol. Biol. Cell* **2004**, *15*, 543–551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Koskas, S.; Decottignies, A.; Dufour, S.; Pezet, M.; Verdel, A.; Vourc'H, C.; Faure, V. Heat shock factor 1 promotes TERRA transcription and telomere protection upon heat stress. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 6321–6333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Horard, B.; Eymery, A.; Fourel, G.; Vassetzky, N.; Puechberty, J.; Roizes, G.; Lebrigand, K.; Barbry, P.; Laugraud, A.; Gautier, C.; et al. Global analysis of DNA methylation and transcription of human repetitive sequences. *Epigenetics* **2009**, *4*, 339–350. [[CrossRef](#)]
15. Deininger, P.L. Alu elements: Know the SINEs. *Genome Biol.* **2011**, *12*, 1–12. [[CrossRef](#)]
16. Liu, W.-M.; Chu, W.-M.; Choudary, P.V.; Schmid, C.W. Cell stress and translational inhibitors transiently increase the abundance of mammalian SINE transcripts. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1758–1765. [[CrossRef](#)]
17. Lellahi, S.M.; Rosenlund, I.A.; Hedberg, A.; Kiaer, L.T.; Mikkola, I.; Knutsen, E.; Perander, M. The long noncoding RNA NEAT1 and nuclear paraspeckles are up-regulated by the transcription factor HSF1 in the heat shock response. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 18965–18976. [[CrossRef](#)]
18. Seal, R.L.; Chen, L.; Griffiths-Jones, S.; Lowe, T.M.; Mathews, M.B.; O'Reilly, D.; Pierce, A.J.; Stadler, P.F.; Ulitsky, I.; Wolin, S.L.; et al. A guide to naming human non-coding RNA genes. *EMBO J.* **2020**, *39*, e103777. [[CrossRef](#)]
19. Eymery, A.; Callanan, M.; Vourc'h, C. The Secret Message of Heterochromatin: New Insights into the Mechanisms and Function of Centromeric and Pericentric Repeat Sequence Transcription. *Int. J. Dev. Biol.* **2009**, *53*, 259–268. [[CrossRef](#)]
20. Prosser, J.; Frommer, M.; Paul, C.; Vincent, P. Sequence relationships of three human satellite DNAs. *J. Mol. Biol.* **1986**, *187*, 145–155. [[CrossRef](#)]
21. Vissel, B.; Choo, K.H. Human α Satellite DNA—Consensus Sequence and Conserved Regions. *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 6751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Wong, A.; Rattner, J. Sequence organization and cytological localization of the minor satellite of mouse. *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 11645–11661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Manuelidis, L. Consensus sequence of mouse satellite DNA indicates it is derived from tandem 116 basepair repeats. *FEBS Lett.* **1981**, *129*, 25–28. [[CrossRef](#)]
24. Prosser, J.; Reisner, A.; Bradley, M.; Ho, K.; Vincent, P. Buoyant density and hybridization analysis of human DNA sequences, including three satellite DNAs. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) Nucleic Acids Protein Synth.* **1981**, *656*, 93–102. [[CrossRef](#)]
25. Frommer, M.; Prosser, J.; Vincent, P.C. Human Satellite I Sequences Include a Male Specific 2.47 Kb Tandemly Repeated Unit Containing One Alu Family Member Per Repeat. *Nucleic Acids Res.* **1984**, *12*, 2887–2900. [[CrossRef](#)]
26. Lee, C.; Wevrick, R.; Fisher, R.B.; Ferguson-Smith, M.A.; Lin, C.C. Human centromeric DNAs. *Qual. Life Res.* **1997**, *100*, 291–304. [[CrossRef](#)]
27. Altemose, N.; Miga, K.H.; Maggioni, M.; Willard, H.F. Genomic Characterization of Large Heterochromatic Gaps in the Human Genome Assembly. *PLoS Comput. Biol.* **2014**, *10*, e1003628. [[CrossRef](#)]
28. Altemose, N. A Classical Revival: Human Satellite DNAs Enter the Genomics Era. *Preprints* **2022**, 2022020009. [[CrossRef](#)]
29. Hoyt, S.J.; Storer, J.M.; Hartley, G.A.; Grady, P.G.; Gershman, A.; de Lima, L.G.; Limouse, C.; Halabian, R.; Wojenski, L.; Rodriguez, M.; et al. From Telomere to Telomere: The Transcriptional and Epigenetic State of Human Repeat Elements. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
30. Saksouk, N.; Barth, T.K.; Ziegler-Birling, C.; Olova, N.; Nowak, A.; Rey, E.; Mateos-Langerak, J.; Urbach, S.; Reik, W.; Torres-Padilla, M.-E.; et al. Redundant Mechanisms to Form Silent Chromatin at Pericentromeric Regions Rely on BEND3 and DNA Methylation. *Mol. Cell* **2014**, *56*, 580–594. [[CrossRef](#)]
31. Probst, A.V.; Almouzni, G. Heterochromatin Establishment in the Context of Genome-Wide Epigenetic Reprogramming. *Trends Genet.* **2011**, *27*, 177–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Padeken, J.; Zeller, P.; Towbin, B.; Katic, I.; Kalck, V.; Methot, S.P.; Gasser, S.M. Syner-gistic Lethality between Brca1 and H3k9me2 Loss Reflects Satellite Derepression. *Genes Dev.* **2019**, *33*, 436–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ma, Y.X.; Fan, S.; Xiong, J.; Yuan, R.-Q.; Meng, Q.; Gao, M.; Goldberg, I.D.; Fuqua, S.A.; Pestell, R.G.; Rosen, E.M. Role of BRCA1 in heat shock response. *Oncogene* **2003**, *22*, 10–27. [[CrossRef](#)]
34. Zhu, Q.; Pao, G.M.; Huynh, A.M.; Suh, H.; Tonnu, N.; Nederlof, P.M.; Gage, F.H.; Verma, I.M. BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. *Nature* **2011**, *477*, 179–184. [[CrossRef](#)]
35. Nurk, S.; Sergey, K.; Arang, R.; Mikko, R.; Andrey, V.B.; Alla, M.; Mitchell, R.V.; Nicolas, A.; Lev, U.; Ariel, G.; et al. The Complete Sequence of a Human Genome. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
36. Jolly, C.; Konecny, L.; Grady, D.L.; Kutsikova, Y.A.; Cotto, J.J.; Morimoto, R.I.; Vourc'H, C. In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress. *J. Cell Biol.* **2002**, *156*, 775–781. [[CrossRef](#)]
37. Penin, J.; Dufour, S.; Faure, V.; Fritah, S.; Seigneurin-Berny, D.; Col, E.; Verdel, A.; Vourc'H, C. Chromosome Y pericentric heterochromatin is a primary target of HSF1 in male cells. *Chromosoma* **2021**, *130*, 53–60. [[CrossRef](#)]
38. Eymery, A.; Souchier, C.; Vourc'h, C.; Jolly, C. Heat Shock Factor 1 Binds to and Transcribes Satellite Ii and Iii Sequences at Several Pericentromeric Regions in Heat-Shocked Cells. *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 1845–1855. [[CrossRef](#)]
39. Valgardsdottir, R.; Chiodi, I.; Giordano, M.; Rossi, A.; Bazzini, S.; Ghigna, C.; Riva, S.; Biamonti, G. Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress response in human cells. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *36*, 423–434. [[CrossRef](#)]

40. Lu, J.; Gilbert, D.M.; Li, Z.; Wang, L.; Hays, T.S.; Cai, Y. Proliferation-dependent and cell cycle-regulated transcription of mouse pericentric heterochromatin. *J. Cell Biol.* **2007**, *179*, 411–421. [[CrossRef](#)]
41. Probst, A.V.; Okamoto, I.; Casanova, M.; el Marjou, F.; le Baccon, P.; Almouzni, G. A Strand-Specific Burst in Transcription of Pericentric Satellites Is Required for Chromocenter Formation and Early Mouse Development. *Dev. Cell* **2010**, *19*, 625–638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Rudert, F.; Bronner, S.; Garnier, J.M.; Dolle, P. Transcripts from Opposite Strands of γ Satellite DNA Are Differentially Expressed During Mouse Development. *Mamm. Genome* **1995**, *6*, 76–83. [[PubMed](#)]
43. Jehan, Z.; Vallinayagam, S.; Tiwari, S.; Pradhan, S.; Singh, L.; Suresh, A.; Reddy, H.M.; Ahuja, Y.; Jesudasan, R.A. Novel noncoding RNA from human Y distal heterochromatic block (Yq12) generates testis-specific chimeric CDC2L2. *Genome Res.* **2007**, *17*, 433–440. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Eymery, A.; Horard, B.; El Atifi-Borel, M.; Fourel, G.; Berger, F.; Vitte, A.-L.; Van den Broeck, A.; Brambilla, E.; Fournier, A.; Callanan, M.; et al. A transcriptomic analysis of human centromeric and pericentric sequences in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 6340–6354. [[CrossRef](#)]
45. Ting, D.T.; Lipson, D.; Paul, S.; Brannigan, B.W.; Akhavanfard, S.; Coffman, E.J.; Contino, G.; Deshpande, V.; Iafrate, A.J.; Letovsky, S.; et al. Aberrant Overexpression of Satellite Repeats in Pancreatic and Other Epithelial Cancers. *Science* **2011**, *331*, 593–596. [[CrossRef](#)]
46. Kanne, J.; Hussong, M.; Isensee, J.; Munoz-Lopez, A.; Wolffgramm, J.; Hess, F.; Grimm, C.; Bessonov, S.; Meder, L.; Wang, J.; et al. Pericentromeric Satellite l_{iii} Transcripts Induce Etoposide Resistance. *Cell Death Dis.* **2021**, *12*, 1–15. [[CrossRef](#)]
47. Blackburn, E.H. Telomere states and cell fates. *Nature* **2000**, *408*, 53–56. [[CrossRef](#)]
48. Cech, T.R. Beginning to Understand the End of the Chromosome. *Cell* **2004**, *116*, 273–279. [[CrossRef](#)]
49. Feuerhahn, S.; Iglesias, N.; Panza, A.; Porro, A.; Lingner, J. TERRA biogenesis, turnover and implications for function. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 3812–3818. [[CrossRef](#)]
50. Azzalin, C.M.; Reichenbach, P.; Khoriatuli, L.; Giulotto, E.; Lingner, J. Telomeric Repeat-Containing RNA and RNA Surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends. *Science* **2007**, *318*, 798–801. [[CrossRef](#)]
51. Bettin, N.; Oss Pegorar, C.; Cusanelli, E. The Emerging Roles of TERRA in Telomere Maintenance and Genome Stability. *Cells* **2019**, *8*, 246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Diman, A.; Decottignies, A. Genomic Origin and Nuclear Localization of Terra Telomeric Repeat-Containing RNA: From Darkness to Dawn. *FEBS J.* **2018**, *285*, 1389–1398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Nergadze, S.G.; Farnung, B.O.; Wischniewski, H.; Khoriatuli, L.; Vitelli, V.; Chawla, R.; Giulotto, E.; Azzalin, C.M. CpG-Island Promoters Drive Transcription of Human Telomeres. *RNA* **2009**, *15*, 2186–2194. [[CrossRef](#)]
54. Porro, A.; Feuerhahn, S.; Lingner, J. TERRA-Reinforced Association of LSD1 with MRE11 Promotes Processing of Uncapped Telomeres. *Cell Rep.* **2014**, *6*, 765–776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Schoeftner, S.; Blanco, R.; de Silanes, I.L.; Muñoz, P.; Gómez-López, G.; Flores, J.M.; Blasco, M.A. Telomere shortening relaxes X chromosome inactivation and forces global transcriptome alterations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 19393–19398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Schoeftner, S.; Blasco, M.A. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 228–236. [[CrossRef](#)]
57. Morcillo, G.; Baretino, D.; Carmona, M.J.; Carretero, M.T. Telomeric DNA sequences differentially activated by heat shock in two *Chironomus* subspecies. *Chromosoma* **1988**, *96*, 139–144. [[CrossRef](#)]
58. Batzer, M.A.; Deininger, P.L. Alu repeats and human genomic diversity. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 370–379. [[CrossRef](#)]
59. Dewannieux, M.; Heidmann, T. LINEs, SINEs and processed pseudogenes: Parasitic strategies for genome modeling. *Cytogenet. Genome Res.* **2005**, *110*, 35–48. [[CrossRef](#)]
60. Schmid, C.W. Does SINE evolution preclude Alu function? *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 4541–4550. [[CrossRef](#)]
61. Paulson, K.; Schmid, C.W. Transcriptional inactivity of Alu repeats in HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* **1986**, *14*, 6145–6158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Roy, A.M.; Carroll, M.L.; Nguyen, S.V.; Salem, A.-H.; Oldridge, M.; Wilkie, A.O.M.; Batzer, M.A.; Deininger, P.L. Potential Gene Conversion and Source Genes for Recently Integrated Alu Elements. *Genome Res.* **2000**, *10*, 1485–1495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Varshney, D.; Vavrova-Anderson, J.; Oler, A.J.; Cowling, V.H.; Cairns, B.R.; White, R.J. SINE transcription by RNA polymerase III is suppressed by histone methylation but not by DNA methylation. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 1–12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Weiner, A.M.; Deininger, P.L.; Efstratiadis, A. Nonviral Retroposons: Genes, Pseudogenes, and Transposable Elements Generated by the Reverse Flow of Genetic Information. *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 631–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Hagan, C.R.; Sheffield, R.F.; Rudin, C.M. Human Alu Element Retrotransposition Induced by Genotoxic Stress. *Nat. Genet.* **2003**, *35*, 219–220. [[CrossRef](#)]
66. Pandey, R.; Mandal, A.K.; Jha, V.; Mukerji, M. Heat Shock Factor Binding in Alu Repeats Expands Its Involvement in Stress through an Antisense Mechanism. *Genome Biol.* **2012**, *12*, 1–17. [[CrossRef](#)]
67. Kim, T.-K.; Hemberg, M.; Gray, J.M. Enhancer RNAs: A Class of Long Noncoding RNAs Synthesized at Enhancers: Figure 1. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, *7*, a018622. [[CrossRef](#)]

68. Creighton, M.P.; Cheng, A.W.; Welstead, G.G.; Kooistra, T.; Carey, B.W.; Steine, E.J.; Hanna, J.; Lodato, M.A.; Frampton, G.M.; Sharp, P.A.; et al. Histone H3k27ac Separates Active from Poised Enhancers and Predicts Developmental State. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 21931–21936. [[CrossRef](#)]
69. Wang, D.; Garcia-Bassets, I.; Benner, C.; Li, W.; Su, X.; Zhou, Y.; Qiu, J.; Liu, W.; Kaikkonen, M.; Ohgi, K.A.; et al. Reprogramming transcription by distinct classes of enhancers functionally defined by eRNA. *Nature* **2011**, *474*, 390–394. [[CrossRef](#)]
70. Hutchinson, J.N.; Ensminger, A.W.; Clemson, C.M.; Lynch, C.R.; Lawrence, J.B.; Chess, A. A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genom.* **2007**, *8*, 1–16. [[CrossRef](#)]
71. Fox, A.H.; Lam, Y.W.; Leung, A.K.; Lyon, C.E.; Andersen, J.; Mann, M.; Lamond, A.I. Paraspeckles: A Novel Nuclear Domain. *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 13–25. [[CrossRef](#)]
72. Fox, A.H.; Lamond, A.I. Paraspeckles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a000687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Sunwoo, H.; Dinger, M.E.; Wilusz, J.E.; Amaral, P.P.; Mattick, J.S.; Spector, D.L. Men Epsilon/ β Nuclear-Retained Non-Coding RNAs Are up-Regulated Upon Muscle Differentiation and Are Essential Components of Paraspeckles. *Genome Res.* **2009**, *19*, 347–359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Naganuma, T.; Nakagawa, S.; Tanigawa, A.; Sasaki, Y.F.; Goshima, N.; Hirose, T. Alternative 3'-End Processing of Long Noncoding RNA Initiates Construction of Nuclear Paraspeckles. *EMBO J.* **2012**, *31*, 4020–4034. [[CrossRef](#)]
75. Sasaki, Y.T.; Ideue, T.; Sano, M.; Mituyama, T.; Hirose, T. Menepsilon/ β Noncoding RNAs Are Essential for Structural Integrity of Nuclear Paraspeckles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2525–2530. [[CrossRef](#)]
76. Li, R.; Harvey, A.R.; Hodgetts, S.I.; Fox, A.H. Functional dissection of NEAT1 using genome editing reveals substantial localization of the NEAT1_1 isoform outside paraspeckles. *RNA* **2017**, *23*, 872–881. [[CrossRef](#)]
77. Lin, Y.; Schmidt, B.F.; Bruchez, M.P.; McManus, C.J. Structural Analyses of Neat1 LncRNAs Suggest Long-Range RNA Interactions That May Contribute to Paraspeckle Architecture. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, 3742–3752. [[CrossRef](#)]
78. Chen, L.L.; Carmichael, G.G. Altered Nuclear Retention of mRNAs Containing Inverted Repeats in Human Embryonic Stem Cells: Functional Role of a Nuclear Noncoding RNA. *Mol. Cell* **2009**, *35*, 467–478. [[CrossRef](#)]
79. Biamonti, G.; Vourc'H, C. Nuclear Stress Bodies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2*, a000695. [[CrossRef](#)]
80. Krol, J. Paraspeckles: Nuclear nests helping to raise mature miRNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24*, 783–784. [[CrossRef](#)]
81. Biamonti, G. Nuclear stress bodies: A heterochromatin affair? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5*, 493–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Biamonti, G.; Caceres, J.F. Cellular stress RNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* **2009**, *34*, 146–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Vourc'H, C.; Biamonti, G. Transcription of Satellite DNAs in Mammals. *Long Non-Coding RNAs* **2010**, *51*, 95–118. [[CrossRef](#)]
84. Hussong, M.; Kaehler, C.; Kerick, M.; Grimm, C.; Franz, A.; Timmermann, B.; Welzel, F.; Isensee, J.; Hucho, T.; Krobitsch, S.; et al. The bromodomain protein BRD4 regulates splicing during heat shock. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 382–394. [[CrossRef](#)]
85. Fritah, S.; Col, E.; Boyault, C.; Govin, J.; Sadoul, K.; Chiocca, S.; Christians, E.; Khochbin, S.; Jolly, C.; Vourc'H, C. Heat-Shock Factor 1 Controls Genome-wide Acetylation in Heat-shocked Cells. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 4976–4984. [[CrossRef](#)]
86. Miozzo, F.; Saberan-Djoneidi, D.; Mezger, V. HSFs, Stress Sensors and Sculptors of Transcription Compartments and Epigenetic Landscapes. *J. Mol. Biol.* **2015**, *427*, 3793–3816. [[CrossRef](#)]
87. Col, E.; Houghoughi, N.; Dufour, S.; Penin, J.; Koskas, S.; Faure, V.; Ouzounova, M.; Hernandez-Vargash, H.; Reynoird, N.; Daujat, S.; et al. Bromodomain Factors of Bet Family Are New Essential Actors of Pericentric Heterochromatin Transcriptional Activation in Response to Heat Shock. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–12. [[CrossRef](#)]
88. Goenka, A.; Sengupta, S.; Pandey, R.; Parihar, R.; Mohanta, G.C.; Mukerji, M.; Ganesh, S. Human satellite-III non-coding RNAs modulate heat shock-induced transcriptional repression. *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 3541–3552. [[CrossRef](#)]
89. Marmorstein, R.; Zhou, M.-M. Writers and Readers of Histone Acetylation: Structure, Mechanism, and Inhibition. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2014**, *6*, a018762. [[CrossRef](#)]
90. Bond, U. Heat shock but not other stress inducers leads to the disruption of a subset of snRNPs and inhibition of in vitro splicing in HeLa cells. *EMBO J.* **1988**, *7*, 3509–3518. [[CrossRef](#)]
91. Carmo-Fonseca, M.; Pepperkok, R.; Carvalho, M.T.; Lamond, A.I. Transcription-Dependent Colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 Snrnps in Coiled Bodies. *J. Cell. Biol.* **1992**, *117*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Chiodi, I.; Corioni, M.; Giordano, M.; Valgardsdottir, R.; Ghigna, C.; Cobianchi, F.; Xu, R.M.; Riva, S.; Biamonti, G. RNA Recognition Motif 2 Directs the Recruitment of Sf2/Asf to Nuclear Stress Bodies. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 4127–4141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Yost, H.; Lindquist, S. RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. *Cell* **1986**, *45*, 185–193. [[CrossRef](#)]
94. Matera, A.G.; Ward, D.C. Nucleoplasmic Organization of Small Nuclear Ribonucleoproteins in Cultured Human Cells. *J. Cell Biol.* **1993**, *121*, 715–727. [[CrossRef](#)]
95. Feng, Y.; Chen, M.; Manley, J.L. Manley. Phosphorylation Switches the General Splicing Re-pressor Srp38 to a Sequence-Specific Activator. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2008**, *15*, 1040–1048. [[CrossRef](#)]
96. Shin, C.; Feng, Y.; Manley, J. Dephosphorylated SRp38 acts as a splicing repressor in response to heat shock. *Nature* **2004**, *427*, 553–558. [[CrossRef](#)]
97. Weighardt, F.; Cobianchi, F.; Cartegni, L.; Chiodi, I.; Villa, A.; Riva, S.; Biamonti, G. A novel hnRNP protein (HAP/SAF-B) enters a subset of hnRNP complexes and relocates in nuclear granules in response to heat shock. *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 1465–1476. [[CrossRef](#)]

98. Ninomiya, K.; Adachi, S.; Natsume, T.; Iwakiri, J.; Terai, G.; Asai, K.; Hirose, T. LncRNA-Dependent Nuclear Stress Bodies Promote Intron Retention through Sr Protein Phosphorylation. *EMBO J.* **2020**, *39*, e102729. [[CrossRef](#)]
99. Metz, A.; Soret, J.; Vourc'H, C.; Tazi, J.; Jolly, C. A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 4551–4558. [[CrossRef](#)]
100. Denegri, M.; Chiodi, I.; Corioni, M.; Cobianchi, F.; Riva, S.; Biamonti, G. Stress-Induced Nuclear Bodies Are Sites of Accumulation of Pre-mRNA Processing Factors. *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 3502–3514. [[CrossRef](#)]
101. Ninomiya, K.; Iwakiri, J.; Aly, M.K.; Sakaguchi, Y.; Adachi, S.; Natsume, T.; Terai, G.; Asai, K.; Suzuki, T.; Hirose, T. M(6) a Modification of Hsattiii LncRNAs Regulates Temperature-Dependent Splicing. *EMBO J.* **2021**, *40*, e107976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Valgardsdottir, R.; Chiodi, I.; Giordano, M.; Cobianchi, F.; Riva, S.; Biamonti, G. Structural and Functional Characterization of Noncoding Repetitive RNAs Transcribed in Stressed Human Cells. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 2597–2604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Shalgi, R.; Hurt, J.A.; Lindquist, S.; Burge, C.B. Widespread Inhibition of Posttranscriptional Splicing Shapes the Cellular Transcriptome Following Heat Shock. *Cell Rep.* **2014**, *7*, 1362–1370. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Jiang, L.; Shao, C.; Wu, Q.J.; Chen, G.; Zhou, J.; Yang, B.; Li, H.; Gou, L.T.; Zhang, Y.; Wang, Y.; et al. Neat1 Scaffolds RNA-Binding Proteins and the Microprocessor to Globally Enhance pri-miRNA Processing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24*, 816–824. [[CrossRef](#)]
105. Lakhotia, S.C.; Mallik, M.; Singh, A.K.; Ray, M. The Large Noncoding Hsr omega-N Transcripts Are Essential for Thermotolerance and Remobilization of Hnrnp5, Hp1 and RNA Polymerase II during Recovery from Heat Shock in *Drosophila*. *Chromosoma* **2012**, *121*, 49–70. [[CrossRef](#)]
106. Mallik, M.; Lakhotia, S.C. The Developmentally Active and Stress-Inducible Noncoding Hsr omega Gene Is a Novel Regulator of Apoptosis in *Drosophila*. *Genetics* **2009**, *183*, 831–852. [[CrossRef](#)]
107. Lakhotia, S.C. Long non-coding RNAs coordinate cellular responses to stress. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2012**, *3*, 779–796. [[CrossRef](#)]
108. Prasanth, K.V.; Rajendra, T.K.; Lal, A.K.; Lakhotia, S.C. Omega Speckles—A Novel Class of Nuclear Speckles Containing Hnrnp5 Associated with Noncoding Hsr-Omega RNA in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* **2000**, *113*, 3485–3497. [[CrossRef](#)]
109. Jolly, C.; Lakhotia, S.C. Human sat III and *Drosophila* hsr omega transcripts: A common paradigm for regulation of nuclear RNA processing in stressed cells. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 2812. [[CrossRef](#)]
110. Singh, A.K.; Lakhotia, S.C. Dynamics of hnRNPs and omega speckles in normal and heat shocked live cell nuclei of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **2015**, *124*, 367–383. [[CrossRef](#)]
111. Kwak, H.; Fuda, N.J.; Core, L.J.; Lis, J.T. Precise Maps of RNA Polymerase Reveal How Promoters Direct Initiation and Pausing. *Science* **2013**, *339*, 950–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Peterlin, B.M.; Brogie, J.E.; Price, D.H. 7SK snRNA: A noncoding RNA that plays a major role in regulating eukaryotic transcription. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2011**, *3*, 92–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Cech, T.R.; Steitz, J.A. The Noncoding RNA Revolution—Trashing Old Rules to Forge New Ones. *Cell* **2014**, *157*, 77–94. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Aguilo, F.; Li, S.; Balasubramanian, N.; Sancho, A.; Benko, S.; Zhang, F.; Vashisht, A.; Rengasamy, M.; Andino, B.; Chen, C.-H.; et al. Deposition of 5-Methylcytosine on Enhancer RNAs Enables the Coactivator Function of PGC-1 α . *Cell Rep.* **2016**, *14*, 479–492. [[CrossRef](#)]
115. Tippens, N.D.; Vihervaara, A.; Lis, J.T. Enhancer Transcription: What, Where, When, and Why? *Genes Dev.* **2018**, *32*, 1–3. [[CrossRef](#)]
116. Allen, T.; Von Kaenel, S.; Goodrich, J.; Kugel, J.F. The SINE-encoded mouse B2 RNA represses mRNA transcription in response to heat shock. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 816–821. [[CrossRef](#)]
117. Espinoza, C.A.; Allen, T.A.; Hieb, A.R.; Kugel, J.F.; Goodrich, J.A. B2 RNA Binds Directly to RNA Polymerase II to Repress Transcript Synthesis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 822–829. [[CrossRef](#)]
118. Mariner, P.D.; Walters, R.D.; Espinoza, C.A.; Drullinger, L.F.; Wagner, S.D.; Kugel, J.F.; Goodrich, J.A. Human Alu RNA Is a Modular Transacting Repressor of mRNA Transcription during Heat Shock. *Mol. Cell* **2008**, *29*, 499–509. [[CrossRef](#)]
119. Yakovchuk, P.; Goodrich, J.A.; Kugel, J.F. B2 RNA and Alu RNA repress transcription by disrupting contacts between RNA polymerase II and promoter DNA within assembled complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 5569–5574. [[CrossRef](#)]
120. Zovoilis, A.; Cifuentes-Rojas, C.; Chu, H.-P.; Hernandez, A.J.; Lee, J.T. Destabilization of B2 RNA by EZH2 Activates the Stress Response. *Cell* **2016**, *167*, 1788–1802.e13. [[CrossRef](#)]
121. Maison, C.; Bailly, D.; Peters, A.H.; Quivy, J.P.; Roche, D.; Taddei, A.; Lachner, M.; Jenuwein, T.; Almouzni, G. Higher-Order Structure in Pericentric Heterochromatin Involves a Distinct Pattern of Histone Modification and an RNA Component. *Nat. Genet.* **2002**, *30*, 329–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Muchardt, C.; Guillemé, M.; Seeler, J.-S.; Trouche, D.; Dejean, A.; Yaniv, M. Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1 α . *EMBO Rep.* **2002**, *3*, 975–981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Probst, A.V.; Santos, F.; Reik, W.; Almouzni, G.; Dean, W. Structural Differences in Centromeric Heterochromatin Are Spatially Reconciled on Fertilisation in the Mouse Zygote. *Chromosoma* **2007**, *116*, 403–415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Kanellopoulou, C.; Muljo, S.A.; Kung, A.L.; Ganesan, S.; Drapkin, R.; Jenuwein, T.; Livingston, D.M.; Rajewsky, K. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 489–501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

125. Gutbrod, M.J.; Roche, B.; Steinberg, J.I.; Lakhani, A.A.; Chang, K.; Schorn, A.J.; Martienssen, R.A. Dicer promotes genome stability via the bromodomain transcriptional co-activator BRD4. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1–14. [[CrossRef](#)]
126. Fukagawa, T.; Nogami, M.; Yoshikawa, M.; Ikeno, M.; Okazaki, T.; Takami, Y.; Nakayama, T.; Oshimura, M. Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nat. Cell Biol.* **2004**, *6*, 784–791. [[CrossRef](#)]
127. Giordano, M.; Infantino, L.; Biggiogera, M.; Montecucco, A.; Biamonti, G. Heat Shock Affects Mitotic Segregation of Human Chromosomes Bound to Stress-Induced Satellite III RNAs. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2812. [[CrossRef](#)]
128. Pezer, Z.; Ugarkovic, D. Satellite DNA-associated siRNAs as mediators of heat shock response in insects. *RNA Biol.* **2012**, *9*, 587–595. [[CrossRef](#)]
129. da Rocha, S.T.; Heard, E. Novel Players in X Inactivation: Insights into Xist-Mediated Gene Silencing and Chromosome Conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, *24*, 197–204. [[CrossRef](#)]
130. Azzalin, C.M.; Lingner, J. Telomere functions grounding on TERRA firma. *Trends Cell Biol.* **2015**, *25*, 29–36. [[CrossRef](#)]
131. Schoeftner, S.; Blasco, M.A. A ‘Higher Order’ of Telomere Regulation: Telomere Heterochromatin and Telomeric RNAs. *EMBO J.* **2009**, *28*, 2323–2336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Tardat, M.; Déjardin, J. Telomere chromatin establishment and its maintenance during mammalian development. *Chromosoma* **2018**, *127*, 3–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Montero, J.J.; López-Silanes, I.; Megias, D.; Fraga, M.F.; Castells-García, Á.; Blasco, M.A. TERRA recruitment of polycomb to telomeres is essential for histone trimethylation marks at telomeric heterochromatin. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Biscotti, M.A.; Canapa, A.; Forconi, M.; Olmo, E.; Barucca, M. Transcription of Tan-demly Repetitive DNA: Functional Roles. *Chromosom. Res.* **2015**, *23*, 463–477. [[CrossRef](#)]
135. Catania, S.; Pidoux, A.L.; Allshire, R.C. Sequence Features and Transcriptional Stalling within Centromere DNA Promote Establishment of CENP-A Chromatin. *PLoS Genet.* **2015**, *11*, e1004986. [[CrossRef](#)]
136. Ferri, F.; Bouzinba-Segard, H.; Velasco, G.; Hubé, F.; Francastel, C. Non-coding murine centromeric transcripts associate with and potentiate Aurora B kinase. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 5071–5080. [[CrossRef](#)]
137. Grenfell, A.W.; Strzelecka, M.; Heald, R. Transcription brings the complex(ity) to the centromere. *Cell Cycle* **2017**, *16*, 235–236. [[CrossRef](#)]
138. Quénet, D.; Dalal, Y. A long non-coding RNA is required for targeting centromeric protein A to the human centromere. *Elife* **2014**, *3*, e03254. [[CrossRef](#)]
139. Rosic, S.; Erhardt, S. No longer a nuisance: Long non-coding RNAs join CENP-A in epigenetic centromere regulation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 1387–1398. [[CrossRef](#)]
140. Wong, L.H.; Brettingham-Moore, K.H.; Chan, L.; Quach, J.M.; Anderson, M.A.; Northrop, E.L.; Hannan, R.; Saffery, R.; Shaw, M.L.; Williams, E.; et al. Centromere RNA Is a Key Component for the Assembly of Nucleoproteins at the Nucleolus and Centromere. *Genome Res.* **2007**, *17*, 1146–1160. [[CrossRef](#)]
141. McNulty, S.M.; Sullivan, L.L.; Sullivan, B.A. Human Centromeres Produce Chromosome-Specific and Array-Specific α Satellite Transcripts That Are Complexed with Cenp-A and Cenp-C. *Dev. Cell* **2017**, *42*, 226–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Bouzinba-Segard, H.; Guais, A.; Francastel, C. Accumulation of small murine minor satellite transcripts leads to impaired centromeric architecture and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 8709–8714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Peters, A.H.; O’Carroll, D.; Scherthan, H.; Mechtler, K.; Sauer, S.; Schöfer, C.; Weipoltshammer, K.; Pagani, M.; Lachner, M.; Kohlmaier, A.; et al. Loss of the Suv39h Histone Methyltransferases Impairs Mammalian Heterochromatin and Genome Stability. *Cell* **2001**, *107*, 323–337. [[CrossRef](#)]
144. Rosic, S.; Kohler, F.; Erhardt, S. Repetitive Centromeric Satellite RNA Is Essential for Kinetochore Formation and Cell Division. *J. Cell Biol.* **2014**, *207*, 335–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Zhu, Q.; Hoong, N.; Aslanian, A.; Hara, T.; Benner, C.; Heinz, S.; Miga, K.H.; Ke, E.; Verma, S.; Soroczynski, J.; et al. Heterochromatin-Encoded Satellite RNAs Induce Breast Cancer. *Mol. Cell* **2018**, *70*, 842–853. [[CrossRef](#)]
146. de Lange, T. Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annu. Rev. Genet.* **2018**, *52*, 223–247. [[CrossRef](#)]
147. Deng, Z.; Wang, Z.; Stong, N.; Plasschaert, R.; Moczan, A.; Chen, H.-S.; Hu, S.; Wikramasinghe, P.; Davuluri, R.V.; Bartolomei, M.S.; et al. A role for CTCF and cohesin in subtelomere chromatin organization, TERRA transcription, and telomere end protection. *EMBO J.* **2012**, *31*, 4165–4178. [[CrossRef](#)]
148. Feretzaki, M.; Nunes, P.R.; Lingner, J. Expression and differential regulation of human TERRA at several chromosome ends. *RNA* **2019**, *25*, 1470–1480. [[CrossRef](#)]
149. Mendez-Bermudez, A.; Lototska, L.; Bauwens, S.; Giraud-Panis, M.J.; Croce, O.; Jamet, K.; Irizar, A.; Mowinkel, M.; Koundrioukoff, S.; Nottet, N.; et al. Ge-nome-Wide Control of Heterochromatin Replication by the Telomere Capping Protein Trf2. *Mol. Cell* **2018**, *70*, 449–461. [[CrossRef](#)]
150. Petrova, N.V.; Velichko, A.K.; Kantidze, O.L.; Razin, S.V. Heat Shock-Induced Dis-sociation of Trf2 from Telomeres Does Not Initiate a Telomere-Dependent DNA Damage Response. *Cell Biol. Int.* **2014**, *38*, 675–681. [[CrossRef](#)]
151. Velichko, A.K.; Petrova, N.V.; Kantidze, O.L.; Razin, S.V. Dual effect of heat shock on DNA replication and genome integrity. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 3450–3460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Masuta, Y.; Kawabe, A.; Nozawa, K.; Naito, K.; Kato, A.; Ito, H. Characterization of a heat-activated retrotransposon in *Vigna angularis*. *Breed. Sci.* **2018**, *68*, 168–176. [[CrossRef](#)]

153. Vasilyeva, L.A.; Bubenshchikova, E.V.; Ratner, V.A. Heavy Heat Shock Induced Retrotransposon Transposition in *Drosophila*. *Genet. Res.* **1999**, *74*, 111–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Cavrak, V.V.; Lettner, N.; Jamge, S.; Kosarewicz, A.; Bayer, L.M.; Mittelsten Scheid, O. How a Retrotransposon Exploits the Plant's Heat Stress Response for Its Activation. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, e1004115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Casacuberta, E.; González, J. The impact of transposable elements in environmental adaptation. *Mol. Ecol.* **2013**, *22*, 1503–1517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Chenais, B.; Caruso, A.; Hiard, S.; Casse, N. The Impact of Transposable Elements on Eukaryotic Genomes: From Genome Size Increase to Genetic Adaptation to Stressful Environments. *Gene* **2012**, *509*, 7–15. [[CrossRef](#)]
157. Bersani, F.; Lee, E.; Kharchenko, P.V.; Xu, A.W.; Liu, M.; Xega, K.; MacKenzie, O.C.; Brannigan, B.W.; Wittner, B.S.; Jung, H.; et al. Pericentromeric satellite repeat expansions through RNA-derived DNA intermediates in cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 15148–15153. [[CrossRef](#)]
158. Doudna, J.A.; Charpentier, E. Genome Editing. The New Frontier of Genome Engineering with Crispr-Cas9. *Science* **2014**, *346*, 1258096. [[CrossRef](#)]
159. Cox, D.B.T.; Gootenberg, J.S.; Abudayyeh, O.O.; Franklin, B.; Kellner, M.J.; Joung, J.; Zhang, F. RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* **2017**, *358*, 1019–1027. [[CrossRef](#)]
160. Helm, M.; Motorin, Y. Detecting RNA modifications in the epitranscriptome: Predict and validate. *Nat. Rev. Genet.* **2017**, *18*, 275–291. [[CrossRef](#)]
161. Larson, A.G.; Elnatan, D.; Keenen, M.M.; Trnka, M.J.; Johnston, J.B.; Burlingame, A.L.; Agard, D.A.; Redding, S.; Narlikar, G.J. Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature* **2017**, *547*, 236–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Hnisz, D.; Shrinivas, K.; Young, R.A.; Chakraborty, A.K.; Sharp, P.A. A Phase Separation Model for Transcriptional Control. *Cell* **2017**, *169*, 13–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Huo, X.; Ji, L.; Zhang, Y.; Lv, P.; Cao, X.; Wang, Q.; Yan, Z.; Dong, S.; Du, D.; Zhang, F.; et al. The Nuclear Matrix Protein SAFB Cooperates with Major Satellite RNAs to Stabilize Heterochromatin Architecture Partially through Phase Separation. *Mol. Cell* **2020**, *77*, 368–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Gaglia, G.; Rashid, R.; Yapp, C.; Joshi, G.N.; Li, C.G.; Lindquist, S.L.; Sarosiek, K.A.; Whitesell, L.; Sorger, P.K.; Santagata, S. Hsf1 Phase Transition Mediates Stress Adaptation and Cell Fate Decisions. *Nat. Cell Biol.* **2020**, *22*, 151–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Yamazaki, T.; Souquere, S.; Chujo, T.; Kobelke, S.; Chong, Y.S.; Fox, A.H.; Bond, C.S.; Nakagawa, S.; Pierron, G.; Hirose, T. Functional Domains of NEAT1 Architectural lncRNA Induce Paraspeckle Assembly through Phase Separation. *Mol. Cell* **2018**, *70*, 1038–1053.e7. [[CrossRef](#)]
166. Das, S.; Bhattacharyya, N.P. Heat Shock Factor 1 Regulates Hsa-miR-432 Expression in Human Cervical Cancer Cell Line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *453*, 461–466. [[CrossRef](#)]
167. Place, R.F.; Noonan, E.J. Non-coding RNAs turn up the heat: An emerging layer of novel regulators in the mammalian heat shock response. *Cell Stress Chaperones* **2014**, *19*, 159–172. [[CrossRef](#)]
168. Das, S.; Bhattacharyya, N. Heat Shock Factor 1-Regulated miRNAs Can Target Huntingtin and Suppress Aggregates of Mutant Huntingtin. *MicroRNA* **2016**, *4*, 185–193. [[CrossRef](#)]
169. Dai, C.; Whitesell, L.; Rogers, A.B.; Lindquist, S. Heat Shock Factor 1 Is a Powerful Multifaceted Modifier of Carcinogenesis. *Cell* **2007**, *130*, 1005–1018. [[CrossRef](#)]

Title:**Chromatin-associated YTHDC1 coordinates heat-induced reprogramming of gene expression****Authors:**

Kalina Timcheva¹, Solenne Dufour¹, Leila Touat-Todeschini¹, Callum Burnard², Marie-Christine Carpentier^{3,4}, Florent Chuffart⁵, Rémy Merret^{3,4}, Marion Helmsmoortel², Sabrina Ferré³, Aude Grézy¹, Yohann Couté³, Sophie Rousseaux⁵, Saadi Khochbin⁵, Claire Vourc'h¹, Cécile Bousquet-Antonelli^{3,4}, Rosemary Kiernan², Daphné Seigneurin-Berny^{1*} and André Verdel^{1†*}

1- RNA, Epigenetics and Stress, Institut pour l'Avancée des Biosciences, CR UGA/Inserm U1209/CNRS UMR5309, Site Santé - Allée des Alpes, 38700 La Tronche, France

2- Gene Regulation laboratory, Institut de Génétique Humaine, UMR9002, 141 rue de la Cardonille, Montpellier, 34396, France

3- Univ. Perpignan Via Domitia, LGDP-UMR5096, 58 Av. Paul Alduy, 66860 Perpignan, France

4- CNRS LGDP-UMR5096, UPVD, 58 Av. Paul Alduy, 66860 Perpignan, France

5- Epigenetic regulations, Institut pour l'Avancée des Biosciences, CR UGA/Inserm U1209/CNRS UMR5309, Site Santé - Allée des Alpes, 38700 La Tronche, France

6- Univ. Grenoble Alpes, CEA, Inserm, IRIG, BGE, Grenoble, 38054, France

(†) Lead contact; (*) Co-corresponding authors

Email addresses of the corresponding authors:

daphne.berny@univ-grenoble-alpes.fr

andre.verdel@univ-grenoble-alpes.fr

1 **Summary**

2 Heat stress (HS) induces a cellular response leading to profound changes in gene
3 expression. Here, we show that human YTHDC1, a reader of *N*⁶-methyladenosine (m⁶A)
4 RNA modification, binds chromatin, and HS induces a redistribution of YTHDC1 across the
5 genome, including to most heat-induced heat shock protein (HSP) genes. YTHDC1 binding
6 to m⁶A-modified HSP transcripts co-transcriptionally promotes expression of HSPs. During
7 HS, YTHDC1 also co-transcriptionally controls hundreds of heat-induced and m⁶A-dependent
8 intron retention events. Later as the heat-stressed cells transition to the recovery phase,
9 YTHDC1 concentrates within the chromatin-associated nuclear stress bodies (nSBs) where it
10 binds to m⁶A-modified *SATIII* non-coding RNAs (ncRNAs), produced in response to HS in a
11 HSF1-dependent manner. These findings reveal that HS induces a chromatin-associated
12 m⁶A-based reprogramming of gene expression in which YTHDC1 plays a central role.
13 Furthermore, they support the model where temporary sequestration of YTHDC1 calibrates
14 appropriately the heat-induced gene expression reprogramming.

15 **Introduction:**

16 The highly conserved heat shock response can be triggered by multiple external
17 stresses that include heat, hypoxia, protein aggregation, heavy metals as well as
18 physiopathological states (Akerfelt et al., 2010; Dai, 2018; Gomez-Pastor et al., 2018; Jolly
19 and Morimoto, 2000; Richter et al., 2010). Heat shock (HS) induces profound changes at key
20 stages of the gene expression process, going from the transcription (Mahat et al., 2016;
21 Vihervaara et al., 2018; Vihervaara et al., 2017), to the RNA processing (Hussong et al.,
22 2017; Shalgi et al., 2014; Yost and Lindquist, 1991), the mRNA export (Saavedra et al.,
23 1996; Zander et al., 2016) and the translation stages (Lindquist, 1981; Shalgi et al., 2013).
24 Genome-wide studies have shown that, upon HS, transcription of thousands of genes is
25 rapidly down-regulated while transcription of hundreds of others is activated (Mahat et al.,
26 2016; Tabuchi et al., 2008; Trinklein et al., 2004; Vihervaara et al., 2018; Vihervaara et al.,
27 2017). Heat shock protein (HSP) encoding genes are among the most upregulated stress-
28 responsive genes upon HS. HSPs, which are highly conserved across evolution, are
29 molecular chaperones whose primary function is to protect cells, notably by preventing
30 misfolded protein aggregation (Joutsen and Sistonen, 2019; Kampinga, 2006). Heat-induced
31 expression of HSPs is mainly driven by heat shock transcription factor 1 (HSF1) (Morimoto,
32 1998; Pirkkala et al., 2001). Beyond HSP genes, HSF1 directly activates transcription of
33 more than 200 stress-responsive genes in response to HS (Mahat et al., 2016; Vihervaara et
34 al., 2017). HSF1 also directly activates the transcription of non-coding regions of the genome
35 (Vourc'h et al., 2022) encompassing the peri-centromeric *SATIII* (Jolly et al., 2002) and
36 subtelomeric (Col et al., 2017) DNA repeats, enhancer regions (Vihervaara et al., 2018;
37 Vihervaara et al., 2017) or unique interspersed regions, such as the non-coding *NEAT1* gene
38 (Lellahi et al., 2018). Following HS, cells enter a recovery period during which the heat-
39 induced adoptive changes continue to take place. In human, a remarkable cytological feature
40 of the recovery period is the HSF1-dependent formation of subnuclear structures, known as
41 nuclear stress bodies (nSBs), at pericentric heterochromatin regions highly enriched in
42 satellite III (*SATIII*) DNA repeats (Cotto et al., 1997; Jolly et al., 2002). nSBs have been
43 proposed to contribute to the heat-induced reprogramming of gene expression by trapping

44 factors regulating transcription and RNA processing, especially splicing factors (Biamonti and
45 Vourc'h, 2010). During HS, HSF1 binds to the 9q12 *SATIII*-rich juxta-centromeric
46 heterochromatin (Cotto et al., 1997; Jolly et al., 2002) and triggers the recruitment of histone
47 acetyltransferases and readers of acetylated histones leading to transcription of *SATIII* DNA
48 repeats by RNA polymerase II (RNAPII) (Col et al., 2017; Hussong et al., 2017; Jolly et al.,
49 2004). The resulting *SATIII* non-coding RNAs (ncRNAs) remain bound to their site of
50 transcription and their *cis*-acting function is essential to the formation of nSBs (Jolly et al.,
51 2004; Rizzi et al., 2004). Recently, heat-induced accumulation of *SATIII* ncRNAs and
52 formation of nSBs were found to promote intron retention in more than 400 pre-mRNAs,
53 especially during the recovery period from heat stress (Ninomiya et al., 2020). This intron
54 retention regulation has been proposed to rely on serine and arginine-rich pre-mRNA splicing
55 factors (SRSFs) that concentrate on the *cis*-acting *SATIII* ncRNAs, which would facilitate
56 their phosphorylation by the heat-induced kinase CLK1 (Ninomiya et al., 2020). Expression
57 of CLK1 kinase is itself regulated by a heat-dependent intron retention regulation (Ninomiya
58 et al., 2011; Uzor et al., 2018). Importantly, earlier in the cellular response to HS, an even
59 larger number of RNAs undergo intron retention regulation and their export from the nucleus
60 to the cytoplasm is blocked (Shalgi et al., 2014). However, what controls this earlier heat-
61 induced intron retention and whether it is linked to the HSF1-mediated gene expression
62 control remains unknown.

63

64 *N*⁶-methyladenosine (m⁶A) RNA modification is a critical element of regulation of the heat
65 shock response (Knuckles et al., 2017; Meyer et al., 2015; Zhou et al., 2015). The m⁶A
66 modification is widely conserved and is the most prevalent internal RNA modification among
67 living species (Shi et al., 2019; Zaccara et al., 2019). In eukaryotes, m⁶A contributes to RNA
68 stability, splicing, export and translation as well as RNA-protein interactions (Duan et al.,
69 2019; Huang et al., 2020; Shi et al., 2019; Zaccara et al., 2019). The extent of m⁶A RNA
70 modification results from the antagonistic activities of m⁶A methyltransferases and
71 demethylases. METTL3 is the main cellular methyltransferase and deposits m⁶A co-
72 transcriptionally (Ke et al., 2017; Slobodin et al., 2017). The levels of m⁶A in specific RNAs

73 change upon cell stress-exposure such as heat (Knuckles et al., 2017; Yu et al., 2018; Zhou
74 et al., 2015), UV (Xiang et al., 2017), oxidative stress (Zhou et al., 2018) and chemical drugs
75 (Engel et al., 2018). In the case of heat stress, m⁶A levels increase at both the 5' and 3'
76 UTRs of mRNAs. The presence of m⁶A at the 5' UTR of HSP mRNAs promotes their cap-
77 independent translation (Meyer et al., 2015; Zhou et al., 2015), while 3' UTR m⁶A has been
78 linked to degradation of the modified mRNAs (Knuckles et al., 2017). The *SATIII* ncRNAs
79 produced in a HSF1-dependent fashion in response to HS were also recently reported to be
80 m⁶A-methylated by METTL3 (Ninomiya et al., 2021). Most of the molecular and cellular
81 functions of m⁶A rely on proteins reading this mark. The best characterized m⁶A readers are
82 members of the YTH-domain-containing protein family, which are expressed from yeast to
83 humans (Huang et al., 2020; Shi et al., 2019; Zaccara et al., 2019). Mouse and human
84 express five members of the YTH protein family, known as YTHDC1-2 and YTHDF1-3. The
85 cytoplasmic m⁶A reader YTHDF2 has been implicated in heat-induced cap-independent
86 translation of m⁶A-modified HSP mRNAs (Meyer et al., 2015; Zhou et al., 2015) while the
87 nuclear m⁶A reader YTHDC1 has been implicated in heat-induced splicing control during the
88 recovery period from heat stress (Ninomiya et al., 2021).

89

90 Here, we show that the human m⁶A reader YTHDC1 is a chromatin-bound protein and a key
91 player in the coordination of the heat-induced reprogramming of gene expression triggered by
92 the HS. Upon HS, YTHDC1 distribution across the genome changes leading to a marked
93 enrichment at heat stress-responsive genes, in particular HSP genes. Upregulation of HSP
94 expression induced by HS requires YTHDC1 binding to their m⁶A-modified transcripts and
95 YTHDC1 promotes their m⁶A-dependent expression in *cis*. In addition, YTHDC1 controls
96 heat-induced retention of thousands of introns during both HS and recovery periods,
97 including introns in HSP pre-mRNAs and *CLK1* pre-mRNA. YTHDC1 localizes to many of
98 their gene and associates to the pre-mRNAs in a m⁶A-dependent fashion during HS,
99 indicating that at least part of the YTHDC1-dependent regulation of intron retention takes
100 place in *cis*. Furthermore, we show for several transcripts that they remain bound to
101 chromatin when subjected to heat-induced intron retention. Finally, we show that

102 subsequently to the induction of the YTHDC1-dependent upregulation of HSP transcripts and
103 intron retention regulation, which occur as an instant response to HS, YTHDC1 relocates to
104 the chromatin-associated nSBs. This intranuclear redistribution of YTHDC1 correlates with a
105 decrease in YTHDC1 binding to HSP mRNAs and a strong increase in its binding to the
106 nSBs-associated and m⁶A-modified *SATIII* ncRNAs. Altogether, these results show that
107 YTHDC1 chromatin-associated functions coordinates a m⁶A-dependent reprogramming of
108 gene expression, induced in response to heat stress. In addition, our data highlight that
109 sequestration of YTHDC1 by m⁶A-modified *SATIII* ncRNAs within the nSBs may constitute
110 an efficient way to appropriately calibrate and stop the instant reprogramming of gene
111 expression that takes place in response to HS.

112

113 **Results**

114 **YTHDC1 associates with chromatin and co-transcriptionally acting RNA processing** 115 **complexes**

116 To investigate the function of the nuclear m⁶A reader YTHDC1, we first purified YTHDC1 to
117 identify its protein interactome by using mass spectrometry-based quantitative proteomic
118 analysis (Figure 1A and B). Protein extracts were subjected to DNase and RNase digestions
119 prior to the immunoprecipitation step. We identified 86 putative partners of YTHDC1 (Table
120 S1). Gene ontology revealed that proteins co-purifying with YTHDC1 are mostly involved in
121 the process of splicing and particularly in alternative splicing, with the presence of 10 out of
122 the 14 known SR/SRSFs proteins (Figure 1B, Figure S1A and B). The interaction between
123 endogenous YTHDC1 and SRSF1 or SRSF6 was confirmed by using co-
124 immunoprecipitation experiments (Figure S1C). Proteins previously identified as partners of
125 YTHDC1, such as SRSF3, SRSF10, CPSF6 and DDX39B were also identified (Kasowitz et
126 al., 2018; Lesbirel et al., 2018; Xiao et al., 2016). Among the remaining YTHDC1
127 interactants, proteins involved in other co-transcriptional RNA processing steps or RNA
128 export were also highly represented, such as subunits of the alternative polyadenylation
129 complex (CPSF5 and 6) and of the THO/TREX complex with its associated proteins (THOC
130 1, 2, 6 and 7, CHTOP, DDX39B, ERH, POLDIP3, SRRT) (Figure 1B, Figure S1A). Because

131 the YTHDC1 interactome showed a strong enrichment in proteins acting in co-transcriptional
132 processes we also examined whether YTHDC1 associates with chromatin using subcellular
133 fractionation. Accordingly, YTHDC1 was preferentially associated with the chromatin fraction
134 (Figure 1C). From these results, we conclude that YTHDC1 mainly acts on, or in close
135 proximity to, transcriptionally active chromatin where it may contribute to RNA processing.

136

137 **Heat shock reshapes YTHDC1's genomic localization**

138 In mouse, co-transcriptionally deposited m⁶A participates in the heat shock response
139 (Knuckles et al., 2017). To assess whether human YTHDC1 could participate in chromatin-
140 associated mechanisms of the response to heat stress, we further characterized YTHDC1
141 localization to chromatin in unstressed cells (non-heat-shocked, NHS) or heat-stressed (HS)
142 cells. Cell fractionation experiments showed that HS has no major impact on the overall
143 association of YTHDC1 with chromatin (Figure 2A and Figure S2A). To study YTHDC1
144 distribution along the genome we then performed chromatin immunoprecipitation
145 experiments coupled to massively parallel sequencing (ChIP-seq) from unstressed and heat-
146 stressed cells. YTHDC1 ChIP-seq peaks predominantly matched with genomic regions
147 annotated as protein-coding or non-coding genes, in both NHS and HS conditions (Figure
148 S2B). The genomic association of YTHDC1 was however subjected to a significant
149 redistribution between the NHS and HS conditions with 2368 genes enriched in YTHDC1 in
150 NHS which increased to include 6923 genes under HS (Figure 2B), with 1648 genes that
151 were targeted by YTHDC1 in both conditions (Figure S2C). In both NHS and HS conditions,
152 approximately 75% of YTHDC1 target genes were protein-coding genes (Figure 2B).
153 Further analysis of the localization of YTHDC1 on chromatin was performed by ranking
154 protein-coding genes according to the extent of binding of YTHDC1 over the gene body
155 (normalized ChIP-seq reads over the gene body + 500 bp on both ends) in both HS and NHS
156 conditions. Genes displaying the highest normalized YTHDC1 ChIP-seq signal (top 30% of
157 genes) in each condition were selected for further analysis. Based on these criteria, genes
158 strongly associated with YTHDC1 in either NHS, HS, or both conditions were identified
159 (Figure 2C, red, black and yellow dots, respectively). Gene ontology (GO) analysis showed

160 that protein-coding genes enriched in YTHDC1 in unstressed cell were associated with
161 translation and cell cycle regulation (Figure S2D, top panel). Upon HS, YTHDC1 was
162 associated with genes involved in stress responses, translation, apoptosis, cell cycle and
163 RNA processing (Figure S2D, lower panel). These different categories of genes correspond
164 to those whose expression is the most affected upon heat stress in mouse and human cell
165 lines (Mahat et al., 2016; Vihervaara et al., 2017).

166 We then determined the transcriptional status of the genes bound by YTHDC1, by
167 considering their association with RNA Polymerase II (RNAPII), in both NHS and HS
168 conditions (Salifou et al., 2020). Among YTHDC1 genomic targets, approximately 75% were
169 also associated with RNAPII in both NHS and HS conditions (Figure S2E). Conversely, less
170 than 25% of the RNAPII-associated genes were enriched in YTHDC1, both in NHS and HS
171 conditions (Figure S2F). Thus, these results indicate that the presence of RNAPII is not
172 sufficient to recruit YTHDC1 to transcriptionally active regions of the genome since most
173 RNAPII-occupied genes do not show an enrichment for YTHDC1.

174 We next analyzed co-variations of RNAPII and YTHDC1 occupancy on protein-coding genes
175 upon HS. Genes were ranked following the change in normalized ChIP-seq reads of RNAPII
176 or YTHDC1 upon HS. Remarkably, among the genes showing the greatest increase in
177 RNAPII occupancy during HS a significant portion of them also exhibited the greatest
178 increase in YTHDC1 occupancy (Figure 2D, middle panel, top deciles, top left square and
179 Figure S2G). Similarly, genes with the most important reduction in RNAPII occupancy during
180 HS also showed the greatest reduction in YTHDC1 association (Figure 2D, middle panel,
181 bottom deciles, bottom right square). Interestingly, stress-responsive genes, in particular
182 HSP genes, were highly enriched in the upregulated category (Figure 2D, left panel), while
183 genes implicated in translation, and to a lesser extent in RNA processing, were enriched in
184 the downregulated category (Figure 2D, right panel). Averaged profiles of YTHDC1
185 occupancy across target genes showed that YTHDC1 localization also strongly diverged
186 depending on whether the genes were up or down regulated upon HS. For the 500 genes
187 that were the most upregulated upon HS, YTHDC1 and RNAPII average occupancies were
188 high across the gene and at both their 5' and 3' ends (Figure 2E, left panel). Noticeably, in

189 the case of HSP upregulated genes, they tended to accumulate at their 3' end upon HS, as
190 shown for example at *DNAJB1* gene (Figure 2F, left panel). In contrast, for the most 500
191 downregulated genes, YTHDC1 and RNAPII accumulate at the 5' end, near the transcription
192 start site (Figure 2E, right panel), as shown for the downregulated *RPL13* gene (Figure 2F,
193 right panel). Overall, these results show that YTHDC1 localizes to a subset of RNAPII-
194 occupied genes and that HS induces a genome-wide redistribution of YTHDC1, as well as a
195 relocation within the gene body itself depending on whether the gene is upregulated or
196 downregulated in response to HS.

197

198 **YTHDC1 binding to m⁶A controls in cis the heat-induced expression of HSPs**

199 Given the pronounced heat-induced enrichment of YTHDC1 at HSP genes and their
200 importance in the heat shock response, we wished to determine the role of YTHDC1 in
201 controlling HSPs expression. We first focused on *DNAJB1* and *HSPA1A* genes, which
202 showed strong enrichment of YTHDC1 in response to HS (Figure 2F, left panel, and Figure
203 S3A). While *DNAJB1* and *HSP70* proteins accumulate upon HS in different cell lines this
204 accumulation was strongly reduced in the corresponding YTHDC1 KD cells (Figure 3A, WT
205 and C1 KD; Figure S3B and C). To test whether YTHDC1 binding to m⁶A plays a role in the
206 accumulation of HSPs, we established a cellular system that allows the KD of the
207 endogenous YTHDC1 and its replacement with an ectopic wild-type (C1 WT) or mutated
208 (C1-W428A) version of YTHDC1. Ectopic YTHDC1 is resistant to RNA interference (RNAi)
209 KD due to silent nucleotide mutations introduced in the coding sequence (see Materials and
210 Methods). Structural studies have demonstrated that YTHDC1 W428A mutation, which is
211 located within the hydrophobic cage of the YTH domain, disrupts YTHDC1 binding to m⁶A
212 without significantly changing the structure of the domain (Xu et al., 2014). Importantly, while
213 the ectopic expression of WT YTHDC1 rescued the heat-induced accumulation of *DNAJB1*
214 and *HSP70* proteins, expression of YTHDC1-W428A mutant did not (Figure 3A, compare C1
215 KD + C1 WT and C1 KD + C1-W428A), indicating that YTHDC1 m⁶A recognition is critical for
216 the proper accumulation of *DNAJB1* and *HSP70* proteins in response to HS. In agreement
217 with YTHDC1 and m⁶A acting directly on *DNAJB1* and *HSP70* (*HSPA1A*) mRNAs, the

218 abundance of these transcripts decreased in YTHDC1 KD cells (Figure 3B). Moreover,
219 YTHDC1 interacted with both transcripts in a METTL3-dependent manner (Figure 3C) and
220 the m⁶A level on *DNAJB1* and *HSPA1A* mRNAs increased upon HS (Figure 3D).

221 We then broadened this study by conducting RNA-seq analysis on wild-type (WT), YTHDC1
222 and METTL3 knockdown in unstressed and heat-stressed cells (Figure S3D-F). Importantly,
223 among the 29 HSP transcripts found to accumulate in response to HS, 25 required both
224 YTHDC1 and METTL3 for their heat-induced accumulation (Figure 3E), showing that
225 YTHDC1 together with METTL3 are required for the upregulation of the vast majority, if not
226 all, of the heat-induced HSP genes.

227 Interestingly, we found that YTHDC1 was enriched at 21 of the 25 HSP genes upregulated in
228 a YTHDC1- and METTL3-dependent fashion upon HS (Figure 3E), indicating that YTHDC1
229 may upregulate expression of HSP proteins by acting on their genes. In support of this
230 possibility, the levels of chromatin-associated *DNAJB1* and *HSPA1A* transcripts decreased in
231 YTHDC1 KD cells (Figure S3G). ChIP-qPCR experiments that detected RNAPII
232 phosphorylated on serine 2 of its C-terminal repeat (RNAPII-S2P), the elongating form of
233 RNAPII, showed that RNAPII-S2P occupancy was significantly reduced at the 3' end of
234 *DNAJB1* and *HSPA1A* genes relative to the rest of the gene and the downstream region, in
235 YTHDC1 KD stressed cells (Figure 3F). Additionally, RNA-seq experiments showed that the
236 number of reads within the gene body region of heat-induced HSP genes was more reduced
237 than within the adjacent downstream region in YTHDC1 KD and METTL3 KD cells (Figure
238 S3H), further suggesting that most of the heat-induced HSP genes were experiencing a
239 transcription or co-transcriptional defect at their 3' end, in the absence of YTHDC1 or
240 METTL3. Altogether, these results indicate that during HS YTHDC1 co-transcriptional activity
241 promotes the m⁶A-dependent production of HSP transcripts.

242 We note that the RNA-seq analysis also showed that the KD of YTHDC1 or METTL3
243 prevented or reduced the accumulation of approximately one third of the transcripts
244 accumulating during HS (37%, corresponding to 963 transcripts) or recovery (31%,
245 corresponding to 881 transcripts) in WT cells (Figure S3D and F, Table S2), suggesting that,

246 beyond HSP genes, hundreds of other genes may also rely on YTHDC1- and m⁶A for their
247 proper regulation expression in response to HS.

248

249 **HSF1, SATIII ncRNAs and METTL3 promote YTHDC1 relocation to nSBs**

250 To allow cells to properly recover, the cellular response continues several hours after the HS.
251 Interestingly, while YTHDC1 mostly displays an even distribution in the nucleus (with the
252 exception of the nucleoli) in unstressed and heat-stressed cells, we found that YTHDC1
253 concentrates in nuclear foci in cells undergoing the recovery phasis after the heat stress
254 (Figure 4A). This striking subcellular relocation of YTHDC1 is not accompanied by a
255 significant change in YTHDC1 protein level (Figure 4B). In human cells, a hallmark of the
256 recovery period is the appearance of nuclear Stress Bodies (nSBs) in which pre-mRNA
257 processing factors accumulate, especially regulators of alternative splicing (Biamonti and
258 Vourc'h, 2010; Ninomiya et al., 2020). We thus tested whether YTHDC1 also localize to
259 nSBs.

260 Formation of nSBs takes place predominantly on the juxta-centromeric heterochromatin of
261 chromosome 9 where HSF1 is massively recruited and activates transcription of the non-
262 coding SATIII DNA repeats (Biamonti and Vourc'h, 2010). After 3 hours of recovery, 85% of
263 the nuclei displayed HSF1 foci, and all of HSF1 foci colocalized with YTHDC1, suggesting
264 that YTHDC1 is recruited to the nSBs (Figure 4A). A similar relocation of YTHDC1 into foci
265 co-localizing with HSF1 foci was observed in several cell lines (Figure S4A). SATIII DNA and
266 RNA FISH experiments confirmed YTHDC1 relocation to nSBs during recovery (Figure 4C
267 and D). In agreement with the reversibility of the nSBs formation, YTHDC1 localization to
268 nSBs was lost twenty-four hours after HS, with YTHDC1 nuclear distribution resembling that
269 of unstressed cells (Figure 4A). In addition, we examined the subcellular distribution of the
270 other four human YTH-domain containing proteins, YTHDF1-3 and YTHDC2, fused to GFP,
271 using fluorescence microscopy. YTHDF2 cellular localization had been reported to change
272 upon heat stress (Zhou et al., 2015). Under HS, YTHDF2 showed indeed a change of its
273 location but only within the cytoplasm, while the other YTH proteins did not undergo major

274 subcellular relocation (Figure S4B). Thus, YTHDC1 is the only member of the YTH protein
275 family that displays a stress-dependent relocation to nSBs in response to a HS.

276 We next explored the mechanisms responsible for YTHDC1 relocation to nSBs. We found
277 that YTHDC1 co-localization with nSBs was lost when cells were subjected to RNase
278 digestion, suggesting that YTHDC1 localization to nSBs is RNA-dependent (Figure S5A and
279 B). HSF1-dependent activation of transcription of the 9q12 *SATIII* DNA repeats is essential to
280 the formation of nSBs (Jolly et al., 2002). Importantly, YTHDC1 did not form nuclear foci in
281 heat-stressed HSF1 KD cells (Figure 4E). Moreover, in cells expressing a dominant-negative
282 mutant form of HSF1 (HSF1-DBDtrim-GFP), no redistribution of YTHDC1 to the 9q12 locus
283 was observed in response to HS (Figure S5C). This dominant-negative mutant was
284 previously reported to still bind *SATIII* DNA repeats and to prevent wild-type HSF1 from
285 activating transcription of the *SATIII* DNA repeats (Jolly et al., 2002; Jolly et al., 2004).

286 Together with the fact that when HSF1 no longer associated with nSBs YTHDC1 still
287 concentrated into nuclear foci (Figure 4A, compare 6 hours of recovery with earlier time
288 points), these results indicate that the heat-induced RNA-based relocation of YTHDC1 to
289 nSBs depends on HSF1-activated transcription of *SATIII* DNA repeats, and that once located
290 YTHDC1 does not require HSF1 to stay within the nSBs.

291 Interestingly, we found also that METTL3 co-localized with YTHDC1 during the recovery
292 period and YTHDC1 signal at nSBs was reduced in METTL3 KD cells (Figure S5D),
293 suggesting that m⁶A-methylated *SATIII* ncRNAs might promote YTHDC1 recruitment to
294 nSBs. Accordingly, RNA-IP-qPCR experiments showed that YTHDC1 associated with *SATIII*
295 ncRNAs (Figure 4F). The enrichment of YTHDC1 on *SATIII* ncRNAs mirrored the enrichment
296 of m⁶A on *SATIII* ncRNAs, which increased steadily during HS and recovery (Figure 4F and
297 G). Moreover, YTHDC1 association with *SATIII* ncRNAs was impaired in METTL3 KD cells
298 (Figure 4F). Noticeably, the ectopic YTHDC1-W428A mutant protein, expressed in place of
299 the endogenous YTHDC1, still relocated to nSBs (Figure S5E and F). Thus, YTHDC1
300 association with m⁶A may facilitate YTHDC1 relocation to nSBs rather than being a
301 prerequisite. In support of this possibility, RNA-IP-qPCR experiments showed that METTL3
302 KD had lesser effect on YTHDC1 association with *SATIII* ncRNAs than on HSP transcripts

303 (compare Figure 4F and Figure 3C). Finally, RNA-IP-qPCR experiments also showed that
304 YTHDC1 enrichment on *SATIII* ncRNAs gradually increased from the HS to the recovery
305 period, while its enrichment on HSP transcripts was restricted to the HS period (compare
306 Figure 4F and Figure 3C). These later findings show that YTHDC1 concentration within nSBs
307 coincides with its dissociation from HSP transcripts and they strongly suggest that it is
308 promoted by METTL3-dependent m⁶A modification of *SATIII* ncRNAs, which is maximal
309 during recovery.

310

311 **YTHDC1 controls heat-induced intron retention**

312 The *SATIII* ncRNAs have been proposed to concentrate splicing regulators within nSBs to
313 facilitate their efficient and timely phosphorylation by the CLK1 kinase, during the recovery
314 period (Ninomiya et al., 2020). Our finding that YTHDC1 massively relocates to nSBs led us
315 to investigate whether YTHDC1 functions as a regulator of splicing in response to HS, and
316 whether this function might contribute to the global reprogramming of the genome expression
317 induced by HS. Remarkably, among the proteins found to be associated with *SATIII* ncRNAs
318 during recovery (Ninomiya et al., 2020), was YTHDC1 and 31 of its interacting proteins
319 (Figure 5A). Furthermore, 25 of these common proteins were involved in splicing, with 16
320 specifically implicated in alternative splicing. This led us to first test whether YTHDC1
321 participates in the recently reported *SATIII*-dependent regulation of intron retention, during
322 the recovery period (Ninomiya et al., 2020).

323 We examined *TAF1D* and *DNAJB9* pre-mRNAs, which were previously identified by RNA-
324 seq analysis and validated by RT-qPCR experiments, as pre-mRNAs subjected to heat-
325 induced *SATIII*-dependent intron retention during recovery (Ninomiya et al., 2020). Splicing
326 efficiency of *TAF1D* and *DNAJB9* pre-mRNAs was monitored before, during and after HS, in
327 WT and YTHDC1 KD cells. In NHS and HS cells, no noticeable difference was observed in
328 the monitored splicing events between WT and YTHDC1 KD cells (Figure S6A and B). In
329 contrast, during recovery, YTHDC1 KD cells experienced a delay in restoring the normal
330 level of intron retention compared to WT cells. This defect was intron-specific since it was not
331 observed with constitutively spliced introns of the same pre-mRNAs, indicating that YTHDC1

332 is required for the selective heat-induced retention of introns of *TAF1D* and *DNAJB9*
333 transcripts during recovery. Noticeably, analysis of the subcellular localization of *TAF1D* and
334 *DNAJB9* transcripts further showed that 18 to 20% of the spliced *TAF1D* and 35 to 50% of
335 the spliced *DNAJB9* transcripts accumulated in the nucleoplasm or cytoplasm. In contrast,
336 less than 5% of the retained intron-containing *TAF1D* and *DNAJB9* transcripts were present
337 in the nucleoplasm or cytoplasm (Figure 5B), indicating that *TAF1D* and *DNAJB9* transcripts
338 experiencing heat-induced intron retention mostly remained associated with chromatin. RNA-
339 seq data from WT, YTHDC1 KD and METTL3 KD cells were analyzed to identify the
340 differentially retained introns during the HS or recovery period (Figure 5C). Like *TAF1D* and
341 *DNAJB9* transcripts, a total of 272 transcripts required YTHDC1 for intron retention
342 regulation during the recovery period (Figure 5C and D).

343 Strikingly, during the HS period when most of the heat-induced intron retention regulation
344 takes place (Figure S6C), 412 transcripts, representing 63% of the transcripts experiencing
345 intron retention, required YTHDC1 for their retention (Figure 5D and Figure S6D, for an
346 example of intron retention). During this period, YTHDC1 predominantly promoted intron
347 retention (Figure 5C, compare the size of the four populations of differentially retained introns
348 of the HS correlation plots). When examined during the recovery period, more than 80% of
349 the introns showing YTHDC1-dependent retention were now properly spliced out (Figure
350 5D). Furthermore, most of the intron retention events regulated by YTHDC1 were
351 coregulated by METTL3 (Figure 5E). Importantly, in agreement with YTHDC1-regulated
352 intron retention taking place in *cis*, at the site of transcription, 45% of the respective genes
353 were in the top 30% of genes enriched in YTHDC1 during HS (Figure 5F). Thus, YTHDC1
354 controls a majority of the intron retention events taking place in response to HS. Moreover,
355 during HS, these YTHDC1-dependent events may occur at the site of transcription for a
356 sizeable portion of them.

357

358 **YTHDC1 indirect regulation of intron retention during recovery**

359 Our ChIP-seq experiments showed enrichment of YTHDC1 at *CLK1* gene during HS (Figure
360 6A). Moreover, the level of CLK1 protein which increased early in the recovery period in WT

361 cells did not in YTHDC1 KD cells (Figure 6B). Interestingly, these results, together with the
362 fact that *CLK1* kinase regulates heat-induced intron retention during recovery (Ninomiya et
363 al., 2011; Uzor et al., 2018), suggested that during recovery YTHDC1 might control intron
364 retention in an indirect manner by controlling the heat-induced expression of CLK1.

365 To further investigate how YTHDC1 might regulate heat-induced *CLK1* expression, we first
366 examined if YTHDC1 binds *CLK1* transcripts in response to HS. Indeed, YTHDC1 associated
367 with *CLK1* transcripts during HS and this association required METTL3 (Figure 6C).

368 Accordingly, the level of m⁶A enrichment on *CLK1* transcripts significantly increased during
369 HS (Figure 6D). Since the intron retention status of *CLK1* introns 3 and 4 was previously
370 reported to change between NHS and HS, as part of an autoregulatory loop that controls the
371 production of the catalytically active form of CLK1 kinase (Ninomiya et al., 2011; Uzor et al.,
372 2018), we checked their retention status in YTHDC1 KD cells. Our RNA-seq and RT-PCR
373 analyses showed that retention of these introns was independent of YTHDC1, except for the
374 latest time point during recovery (Figure S7A). Quite unexpectedly, our RNA-seq analysis
375 revealed that introns 5, 7 and 8 of *CLK1* also experienced a heat-induced retention, and in
376 this case specifically during HS in WT cells (Figure 6E and Figure S7B). Moreover, in
377 YTHDC1 KD and METTL3 KD cells the retention of introns of 5, 7 and 8 was now also
378 observed in the recovery period (Figure 6F). Noticeably, in correlation with YTHDC1-
379 dependent intron retention regulation of introns of 5, 7 and 8, *CLK1* spliced transcripts which
380 normally stayed associated with chromatin only during HS, in WT cells, were now also
381 retained within the chromatin fraction during recovery, in YTHDC1 KD cells (Figure 6G).

382 Collectively, these results show that the release of *CLK1* transcripts from chromatin and the
383 splicing of *CLK1* introns 5, 7 and 8 are both regulated by YTHDC1 during the recovery
384 period. They also suggest that heat-induced upregulation of CLK1 protein level during
385 recovery results from YTHDC1-dependent splicing and release of *CLK1* transcripts from
386 chromatin.

387 We noted that YTHDC1-dependent splicing and release of *CLK1* transcripts from chromatin
388 (Figure 6F and 6G) take place while YTHDC1 no more binds to *CLK1* transcript (Figure 6C),
389 suggesting that these YTHDC1 regulations taking place during recovery are indirect. We

390 investigated whether other transcripts might also be regulated by YTHDC1 in a similar
391 indirect manner. A total of 102 transcripts had, like *CLK1*, at least one intron retained
392 independently of YTHDC1 during HS but spliced in a YTHDC1-dependent manner during
393 recovery (Figure 6H). Remarkably, among them 68 also had their gene present in the top
394 30% of genes enriched in YTHDC1 during HS (Figure 6I), with the heat-induced HSP genes
395 over-represented in this set (Figure 6J). Thus, the indirect YTHDC1-dependent regulations of
396 intron retention and release from chromatin, that occur on *CLK1* transcripts during the
397 recovery period, potentially occur on dozens of other pre-mRNAs, especially HSP pre-
398 mRNAs.

399

400 **Discussion**

401 This study provides evidence that YTHDC1 and m⁶A signaling are key players in the
402 coordination of the heat-induced reprogramming of gene expression, with YTHDC1 and m⁶A
403 acting on, or in the close environment of, chromatin. The main findings are as follows: (1)
404 YTHDC1 is a chromatin-associated protein, and HS induces its redistribution across the
405 genome; (2) upon HS, YTHDC1 localizes to heat-induced genes, including HSP genes, and
406 heat-induced expression of HSPs is promoted co-transcriptionally by YTHDC1- and
407 METTL3; (3) upon HS, YTHDC1 also promotes a METTL3-dependent regulation of intron
408 retention of hundreds of different transcripts, and this control takes places, at least in part, at
409 the transcription site; (4) following HS, as the number of heat-induced intron retention events
410 diminishes, YTHDC1 loses its binding to HSP transcripts and concentrates into nSBs where
411 it associates with m⁶A-methylated *SATIII* ncRNAs; (5) during the recovery period, the release
412 of *CLK1* pre-mRNA from chromatin requires YTHDC1 and is tightly linked to YTHDC1-
413 dependent splicing of *CLK1* introns; (6) during the recovery period, *CLK1* pre-mRNA heat-
414 induced intron retention is regulated by YTHDC1 while YTHDC1 no more binds to *CLK1*
415 transcript, and a similar indirect YTHDC1-dependent regulation takes place on several *HSP*
416 transcripts. Below, we discuss the implication of these findings on our understanding of the
417 rapid and profound readjustment of gene expression taking place in response to HS. We also
418 discuss the role played by YTHDC1, m⁶A and nSBs as key components of a cellular system

419 orchestrating the reprogramming of gene expression by acting on or at proximity of chromatin,
420 over the course of the heat shock response.

421 Our initial characterization of YTHDC1 revealed that YTHDC1 predominantly associates to
422 chromatin both in unstressed and heat-stressed cells. This finding is in agreement with
423 recent studies showing that m⁶A is deposited co-transcriptionally on RNAs, in particular
424 during heat shock (Knuckles et al., 2017), and that it mediates co-transcriptional regulations
425 (Ke et al., 2017; Slobodin et al., 2017), such as RNA processing and degradation (Lee et al.,
426 2020; Shi et al., 2019; Zaccara et al., 2019) or deposition of repressive histone marks (Li et
427 al., 2020). Our CHIP experiments further showed that, during HS, YTHDC1 is enriched at
428 heat-induced HSP genes. Moreover, YTHDC1 promotes expression of HSPs in a METTL3-
429 dependent manner, by facilitating one or more co-transcriptional process occurring at the 3'
430 end of their genes, such as cleavage/polyadenylation, termination or transcript release from
431 the site of production. This may be related to what has been recently described for YTHDC1
432 in mouse (Kasowitz et al., 2018) and for other nuclear YTH proteins in plants (Parker et al.,
433 2020) and in fission yeast (Parker et al., 2020; Touat-Todeschini et al., 2017), indicating that
434 YTHDC1 chromatin-associated regulation of gene expression may be evolutionarily
435 conserved. In addition, YTHDF2 m⁶A reader and m⁶A modification of HSP mRNAs were
436 reported to promote translation of HSP mRNAs under HS (Meyer et al., 2015; Zhou et al.,
437 2015). This indicates that heat-induced expression of HSPs may result from a close
438 functional interplay between YTHDC1 and YTHDF2 m⁶A readers acting on the same HSP
439 mRNAs. Importantly, regardless of the intimate mechanisms involved in this m⁶A-based
440 regulation and their potential conservation, this study provides evidence that YTHDC1 plays
441 a key role in co-transcriptionally upregulating the expression of HSPs (Figure 7), and indicate
442 that expression of potentially hundreds of other heat-induced genes may be regulated in a
443 similar fashion.

444 In parallel, our study uncovered a critical and broad function for YTHDC1 in controlling intron
445 retention events triggered by HS. Heat-induced intron retention regulation was reported to
446 take place within hundreds to thousands of transcripts during HS (Hussong et al., 2017;
447 Shalgi et al., 2014) and recovery (Ninomiya et al., 2020; Ninomiya et al., 2021). Our findings

448 support a model whereby during the HS period YTHDC1 acts at the site of transcription of
449 many of these transcripts to mostly promote intron retention (Figure 7). Moreover, m⁶A
450 signaling is likely to play a predominant role in this splicing regulation as a majority of the
451 heat-induced intron retention events require YTHDC1 and METTL3. Importantly, the fact
452 that, during the recovery period, YTHDC1 controls the splicing and expression of *CLK1*
453 transcript, which encodes a key regulator of intron retention during this period, indicates that
454 YTHDC1 not only acts directly by regulating intron retention of the transcripts it binds to, but
455 also indirectly through a control of CLK1 expression. This indirect regulation of intron
456 retention is particularly relevant with the model where the primary function of YTHDC1's
457 relocation to nSBs is to sequester most of YTHDC1 to stop the YTHDC1-dependent intron
458 retention and the upregulation of HSPs, which take place during HS (Figure 7). In support of
459 such regulation, more than 80% of the introns that required YTHDC1 for their retention
460 during HS, are spliced when most of YTHDC1 relocated to nSBs. Furthermore, inhibition of
461 the formation of nSBs enhances heat-induced intron retention during HS (Hussong et al.,
462 2017).

463 Introns 3 and 4 of *CLK1* were previously defined as retained introns in unstressed cells
464 (Ninomiya et al., 2011). Our study identified *CLK1* introns 5, 7 and 8 as introns that are
465 retained only during HS in wild-type cells. Our subcellular fractionation experiments further
466 showed that *CLK1* transcripts as well as other transcripts containing one or more retained
467 intron stay associated to the chromatin fraction, indicating that at chromatin heat stress may
468 not only block protein expression by inhibiting transcription but also by inhibiting the release
469 of the transcripts from chromatin, by interfering with their splicing. Intriguingly, the splicing of
470 *CLK1* introns 5, 7 and 8 requires YTHDC1 when YTHDC1 association with *CLK1* transcripts
471 is lost. An intriguing possibility may be that YTHDC1-mediated splicing of introns 5, 7 and 8
472 is bookmarked during HS when YTHDC1 binds to *CLK1* transcript. Importantly, regardless of
473 what is the exact molecular mechanism is, our data also indicate that this regulation
474 potentially takes place on dozens of other transcripts, including HSP transcripts (Figure 7).
475 This study also sheds light on the mechanism by which YTHDC1 relocates to nSBs and on
476 the function of these membrane-less structures, as the cell progresses through the heat

477 shock response. Our study demonstrates that YTHDC1 relocation to nSBs relies on the
478 HSF1-dependent transcription of *SATIII* DNA repeats triggered by the HS. The nSBs have
479 long been proposed to regulate the splicing process via the relocation of splicing regulators
480 within the bodies (Biamonti and Vourc'h, 2010; Denegri et al., 2001; Metz et al., 2004).
481 Strikingly, by comparing the list of proteins co-purifying with YTHDC1 and with *SATIII*
482 ncRNAs (Ninomiya et al., 2020), it appeared that not only YTHDC1 but also several of its co-
483 purifying proteins that associate with *SATIII* transcripts, in particular, SRSFs proteins. In
484 addition, our study shows *in vivo* that YTHDC1 binds to *SATIII* ncRNAs and that METTL3
485 also relocates to nSBs. After our study was initially submitted for publication, Ninomiya and
486 co-workers provided evidence that METTL3 and YTHDC1 localize to nSBs in response to
487 HS, that *SATIII* are m⁶A-methylated by METTL3 and m⁶A-dependent *SATIII* sequestration of
488 YTHDC1 is part of the mechanism controlling splicing during the recovery period (Ninomiya
489 et al., 2021). Importantly, our study further uncovered that YTHDC1 regulation of the heat-
490 induced of intron retention actually plays a broad and major role during the HS. From these
491 findings, we propose that the primary function of m⁶A-dependent sequestration of YTHDC1
492 within nSBs is to inhibit both of YTHDC1 activities, in promoting intron retention and HSP
493 expression, as an immediate response to the HS (Figure 7). Noteworthy, this sequestration
494 mechanism is reminiscent to the rapid and reversible nuclear sequestration of the unique
495 YTH protein in fission yeast that governs entry into meiosis, and which, in this case, is
496 triggered by nutrient starvation stress and occurs on a *cis*-acting ncRNA, but in m⁶A-
497 independent fashion (Harigaya et al., 2006; Hiriart and Verdel, 2013).
498 Taken together our findings identify a regulatory system centered around YTHDC1 and m⁶A
499 signaling that, in response to HS, acts directly and indirectly at different genomic locations,
500 different stages of the gene expression process and at different times over the course of this
501 cellular response (Figure 7). In addition to HSF1 and potentially other transcription factors
502 that induce gene transcription upon heat shock (Mahat et al., 2016; Vihervaara et al., 2017),
503 YTHDC1, m⁶A signaling and nSBs constitute an elaborate regulatory system that ensures
504 proper orchestration of the heat-induced reprogramming of gene expression, at least in part, at
505 a co-transcriptional level. Since we found that YTHDC1 together with RNAPII co-occupy the

506 promoter region of the most downregulated genes in response to HS (Figure 2D), YTHDC1
507 and m⁶A may have an even broader role in the stress-dependent gene expression
508 reprogramming by also contributing to the heat-induced repression of genes (Mahat and Lis,
509 2017; Vihervaara et al., 2017). Finally, taken into consideration the contributions of HSF1, of
510 HSPs and of the heat shock response, in general, to the development of cancer (Alasady
511 and Mendillo, 2020; Gomez-Pastor et al., 2018; Lang et al., 2019; Puustinen and Sistonen,
512 2020), this study, which improves our understanding of the major reprogramming of gene
513 expression induced by heat stress, is susceptible to also provide insights into new oncogenic
514 mechanisms.

515 **Acknowledgements**

516 We thank L. Sistonen for HSF1 KD HeLa cells, J.M. Escudier (Plateforme de synthèse
517 d'Oligonucléotides modifiés de l'Interface Chimie Biologie de l'ITAV-Toulouse, France) for
518 the synthesis of oligonucleotide probes for *in situ* analysis. We thank Valérie Mezger,
519 Ramesh Pillai and members of the A.V. and R.K. laboratories for their helpful comments and
520 critical reading of the manuscript. We thank Cyril Boyault for his help with GO tools, Virginie
521 Faure for her initial input with ChIP, members of the cell imaging core facility (MicroCell) from
522 IAB for technical support with microscope analyses and the IAB InGeProt (Innovative
523 Genome editing and Protein purification) service. Most of the computations presented in this
524 paper were performed using the GRICAD infrastructure (<https://gricad.univ-grenoble->
525 [alpes.fr](https://gricad.univ-grenoble-alpes.fr)), which is supported by Grenoble research communities, the bioinformatics core
526 facility of the Bioenvironnement platform at Perpignan. This study was supported by grants
527 from the French Agence National pour la Recherche (ANR) "RNAgermSilence" to A.V. and
528 "Heat-EpiRNA" to C. B.-A. and A.V., from MSD Avenir (ERiCAN, Epigenetic Reprogramming
529 of Cancer Cell Plasticity and Resilience) to A.V., from ProFI (ANR-10-INBS-08-01 grant) to
530 Y.C., and from ANRS, MSD Avenir (Hide, Inflamm & Seq) and European Research Council
531 (CoG RNAmEdTGS) to R.K. Work conducted at LGDP (Perpignan) was set within the
532 framework of the "Laboratoires d'Excellences (LABEX)" TULIP (ANR-10-LABX-41) and of the
533 "École Universitaire de Recherche (EUR)" TULIP-GS (ANR-18-EURE-0019).

534

535 **Author contribution**

536 K.T., D.S.-B and A.V. planned the study and designed the experiments. K.T., M.-C.C., R.M.,
537 C.V., C.B.-A., R.K., D.S.-B. and A.V. analyzed the data. K.T., D.S.-B. and A.V. wrote the
538 paper and all authors refined the manuscript. D.S.-B. performed IPs and cell fractionations,
539 S.F. and Y.C. performed the mass spectrometry-based quantitative proteomic analyses,
540 D.S.-B and M.H. performed the ChIPs, K.T., C.B., M.H., R.K., D.S.-B. and A.V. performed
541 the analyses of the ChIP-seq data, M.-C.C., R.M., C.B.-A., D.S.-B. and A.V. performed the
542 analyses of the RNA-seq data, K.T. with the help of D.S.-B. performed western blots and

543 splicing assays, K.T., D.S.-B. and L.T.-T. designed and performed the RNAi and rescue
544 experiments, K.T., A.G. and D.S.-B. performed RNA analyses, R.M., L.T.-T., D.S.-B. and
545 A.V. performed the RNA IP-qPCR analyses, S.D. performed SATIII RNA/DNA-FISH, and
546 K.T. and S.D. performed immunofluorescence analyses. K.T., S.D., C.V., D.S.-B. and A.V.
547 planned and designed *in situ* experiments. F.C., S.R., S.K., D.S.-B. and A.V. conducted the
548 intron retention analyses. D.S.-B. performed most of the other experiments with help from
549 K.T.

550

551 **Conflict of interest**

552 No conflict of interest

553 **Figure Legends**

554

555 **Figure 1. YTHDC1 is physically connected to chromatin and co-transcriptional**
556 **processes.**

557 **A.** Silver-stained gel of YTHDC1 immunoprecipitation eluates obtained using an irrelevant
558 antibody (-) or a specific antibody against YTHDC1 (+). Asterisks: heavy and low chains of
559 IgG used for the immunoprecipitation.

560 **B.** Volcano plot of the proteins identified in YTHDC1 purification. Only proteins identified with
561 at least one unique peptide in three independent purifications and with more than four-fold
562 enrichment relative to the control purifications were considered. Each protein identified by
563 mass spectrometry analysis is represented as a single dot. Average enrichment
564 ($\text{Log}_2[\text{mean}(\text{IP})/\text{mean}(\text{CT})]$) was plotted along the X-axis and p-values [$-\text{Log}_{10}(\text{p-value})$],
565 obtained for each protein from 3 independent experiments, along the Y-axis (ProStaR
566 software tool). Proteins enriched in YTHDC1 IP and implicated in alternative splicing are in
567 orange. Enriched proteins with other functions are in grey. CT: control immunoprecipitation
568 done with irrelevant antibody.

569 **C.** Cell fractionation experiments showing YTHDC1 association with the chromatin fraction.
570 Left panel, Coomassie stained-gel of the cytosolic (Cy), nucleoplasmic (Np), and chromatin-
571 associated (Ch) fractions. Right panel, western blots from the indicated fractions, using
572 antibodies against YTHDC1, HSF1, H3 and Tubulin β .

573

574 **Figure 2. YTHDC1 associates with chromatin and heat shock reshapes YTHDC1**
575 **genomic localization with a marked enrichment to HSP genes.**

576 **A.** Extracts of unstressed (NHS) and heat stressed (HS) cells after separation into cytosolic
577 (Cy), nucleoplasmic (Np) and chromatin (Ch) fractions, were analyzed by immunoblotting
578 using the indicated antibodies.

579 **B.** Pie charts showing the distribution of YTHDC1 peaks in NHS and HS conditions into
580 protein-coding, pseudo, non-coding and uncategorized genomic regions. Total number of

581 genes associated with YTHDC1 in unstressed and heat-stressed cells are indicated in
582 brackets.

583 **C.** Scatter plot showing normalized YTHDC1 ChIP-seq reads of YTHDC1 targeted over gene
584 bodies +/- 500 bps in unstressed (NHS, No Heat Stress), heat-stressed (HS) or both
585 conditions. The top 30% of genes exclusively enriched in unstressed condition are in black,
586 in heat-stressed in red, and both in unstressed and heat-stressed in yellow. RPGC: read per
587 genomic content.

588 **D.** Analysis of the co-variation of RNAPII and YTHDC1 gene occupancy in heat-stressed
589 cells relative to unstressed cells. Middle panel, matrix showing changes (Z-score) in RNAPII
590 or YTHDC1 binding across genes in HS compared to NHS condition, and ranked by deciles
591 from the most up-regulated to the most down-regulated. The scale represents p-value for the
592 intersection of the number of genes determined for each decile, as shown in Figure S2G,
593 compared to expected. Lowest intersection is black while the highest is red (10^{-0} to 10^{-261} ,
594 Hypergeometric test). Left panel, GO enrichments for the 382 genes which have their highest
595 enrichments both for RNAPII and YTHDC1 (1st decile, left upper corner of the matrix). Right
596 panel, GO enrichments for the 262 genes which have their largest reduction of enrichments
597 for both RNAPII and YTHDC1 occupancy. GO enrichments are ranked according to the -
598 Log_{10} of their p-value.

599 **E.** Average profiles of RNAPII and YTHDC1 over the 500 protein-coding genes with the
600 largest increase (left panel) or the largest decrease (right panel) of RNAPII occupancy at
601 their transcript end site, in HS (red) compared to NHS (black) cells. Transcription start site
602 (TSS) and transcript end site (TES) are marked by the vertical grey lines.

603 **F.** Browser shots of YTHDC1 and RNAPII ChIP-seq reads at upregulated HSP gene
604 *DNAJB1* (left panel) and downregulated *RPL13* gene (right panel) from unstressed (NHS)
605 and heat stressed samples (HS). A scheme of *DNAJB1* and *RPL13* gene organization is
606 shown above the browser shots.

607

608 **Figure 3. YTHDC1 binding to m⁶A promotes heat-induced expression of HSPs in cis.**

609 **A.** Top panel, western blots showing the levels of DNAJB1, HSP70 and YTHDC1 proteins in
610 wild-type cells (WT), YTHDC1 knocked down cells (C1 KD), YTHDC1 knocked down cells
611 expressing an ectopic copy of wild-type YTHDC1 (C1 KD + C1 WT), or expressing an ectopic
612 mutant YTHDC1-W428A (C1 KD + C1-W428A), in unstressed (NHS, no heat shock) cells,
613 heat-stressed (HS) cells or heat-stressed cells subjected to 6 hours of recovery (R). Tubulin β
614 (TUBB) was used as loading control. Bottom panels, quantification of the western blot
615 signals. Graphs show the mean and standard error of the mean (SEM) of three independent
616 experiments.

617 **B.** RT-qPCR showing the level of *DNAJB1* and *HSPA1A* mRNAs in wild-type (WT) or
618 YTHDC1 knocked down (YTHDC1 KD) cells, in NHS, HS or R3 conditions. Variation of RNA
619 levels is expressed in fold-change relative to the NHS condition and normalized to *ActinB*
620 (*ACTB*). Graphs show the mean and SEM of three independent experiments.

621 **C.** RNA-IP qPCR showing the interaction of YTHDC1 with *DNAJB1* and *HSPA1A* RNAs in
622 wild-type cell (WT) or METTL3 knocked down (METTL3 KD) cells, in NHS, HS or R3
623 conditions. Variation of RNA levels is expressed in fold-change relative to control IP (with
624 irrelevant IgG) and normalized to tRNA (*TRS-CGA1-1* RNA). Graphs show the mean and
625 SEM of three independent experiments.

626 **D.** M⁶A-RIP(MeRIP)-qPCR showing the enrichment of m⁶A at *DNAJB1*, *HSPA1A* and *TUBB*
627 RNAs in wild-type cell in NHS, HS or R3 conditions. Variation of m⁶A RNA levels is
628 expressed as a percentage of enrichment compared to the input. Graphs show the mean and
629 SEM of three independent experiments.

630 **E.** RNA levels of 65 of the 79 HSP RNAs from cells subjected to HS or to HS and 3 hours of
631 recovery (R) vs NHS condition in WT cells (upper graph), in YTHDC1 KD (C1 KD) vs WT
632 cells (middle graph), and in METTL3 KD (M3 KD) vs WT cells (lower graph). RNAs were
633 ordered according to the variation of their levels during the recovery compared to the NHS
634 condition in WT cells. HSP RNAs accumulating in HS or R conditions and accumulating less
635 in both YTHDC1 KD cells and METTL3 KD cells are highlighted by red stars. HSP RNAs with
636 their genes targeted by YTHDC1 (ChIP-seq data) are highlighted by black triangles. Note the

637 strong overlap between the RNAs with a red star and RNAs with black triangle. These RNAs
638 are written in bold.

639 **F.** ChIP-qPCR showing the occupancy of the elongating form of RNAPII (RNAPII-S2P) at
640 *DNAJB1* gene, in wild-type (WT) or YTHDC1 knocked down (C1 KD) cells, in NHS and HS
641 conditions. The enrichment of elongating RNAPII was determined by qPCR amplification of
642 genomic DNA from their coding sequence (CDS, red segment), 3' UTR or beyond
643 (schematized by the A to E grey segments). Data show the fold enrichment normalized to
644 control IP (conducted with irrelevant IP) and to tDNA (*TRS-CGA1-1* gene). Values are mean
645 \pm standard error of the mean from three independent biological replicates. P-values were
646 calculated using a two-tailed Student's t-test. Only significant p-values are indicated. Left
647 panel, *: $p=0.042$; **: $p=0.006$. Right panel *: $p=0.041$.

648

649 **Figure 4. YTHDC1 relocates to nSBs and associates with SATIII ncRNAs.**

650 **A.** Microscopy images of YTHDC1 (red) and HSF1 (green) fluorescent immunostainings
651 showing their subcellular localization in cells not heat shocked (NHS), in cells subjected to a
652 heat shock (HS) or in cells subjected to a heat shock followed by 3, 6 or 24 hours of recovery
653 (R3, R6 or R24). Nuclear DNA was stained with DAPI (blue). Data shown are representative
654 of three independent experiments. Scale bar, 10 μ m.

655 **B.** Western blot showing YTHDC1 protein level in NHS, HS or R3 cells. Tubulin β (TUBB)
656 was used as a loading control.

657 **C and D.** DNA- and RNA-FISH images showing YTHDC1 co-localization with, respectively,
658 *SATIII* DNA repeats pericentromeric region or *SATIII* ncRNAs, during the recovery period 3
659 hours (R3) after a heat shock. Nuclear DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar, 10 μ m.

660 **E.** Microscopy images showing YTHDC1 (red) and HSF1 (green) fluorescent
661 immunostainings in HSF1 KD cells in NHS, HS and R3 conditions. Nuclear DNA was stained
662 with DAPI (blue). Scale bar, 10 μ m.

663 **F.** YTHDC1 RNA-IP-qPCR showing the enrichment of *SATIII* ncRNA in wild-type cell (WT) or
664 METTL3 knocked down (METTL3 KD) cells, in NHS, HS or R3 conditions. The enrichment is
665 expressed in fold-change relative to IP control (done with irrelevant IgG) and normalized to

666 tRNA (*TRS-CGA1-1* RNA). Graphs show the mean and standard error of the mean (SEM) of
667 three independent experiments.

668 **G.** MeRIP-qPCR showing the enrichment of m⁶A on *SATIII* ncRNA and *TUBB* RNA in WT
669 cell in NHS, HS or R3 conditions. The enrichment of m⁶A is expressed as a % of the input.

670

671 **Figure 5. YTHDC1 controls heat-induced intron retention both during and after HS.**

672 **A.** Venn diagram of YTHDC1 and *SATIII* protein interactomes. The proteins common to both
673 interactomes are listed below the diagram. For both interactomes only proteins identified by
674 mass spectrometry with at least one peptide in three independent purifications were
675 selected. Proteins involved in alternative splicing are in bold and italic.

676 **B.** Distribution of *TAF1D* and *DNAJB9* RNAs between the cytoplasmic (Cy), Nucleoplasmic
677 (Np) and chromatin-associated (Ch) fractions in unstressed cells (No Heat Shock, NHS),
678 heat-stressed (HS) or heat-stressed cells allowed to recover (R) for three hours, quantified
679 by RT-qPCR after their purification from the different fractions. The RNA distribution is
680 expressed as a percentage of the total RNA population. Graphs show the mean and
681 standard error of the mean (SEM) of three independent experiments.

682 **C.** Scatter plots showing intron retention (IR) changes between WT cells (X axis) versus
683 YTHDC1 KD cells or METTL3 KD cells (Y axis) in HS (left panel) or R3 (right panel)
684 compared to NHS condition. Introns with significantly different IR changes (10%) between
685 cells lines are plotted in red and their number indicated according to their variation between
686 WT and KD cells. The number of corresponding transcripts is shown in brackets and italic.
687 Note that one pre-mRNA can have several retained introns differently regulated and found in
688 different subgroups. The total of distinct RNAs with regulated retained introns YTHDC1
689 dependent is 412 in HS vs NHS conditions, 272 in R vs NHS conditions.

690 **D.** Pie chart showing the percentages of RNAs experiencing YTHDC1-dependent intron
691 retention only during HS or during HS and recovery.

692 **E.** Venn diagram showing the transcripts experiencing both YTHDC1- and METTL3-
693 dependent heat-induced intron retention regulation during HS (HS versus NHS) or during
694 recovery (R versus NHS).

695 **E.** Pie charts showing the percentage of RNAs experiencing both YTHDC1- and METTL3-
696 dependent heat-induced intron retention regulation (in HS vs NHS and R3 vs NHS) and
697 having at their gene enriched in YTHDC1 during HS.

698

699 **Figure 6. YTHDC1 promotes the splicing of *CLK1* and HSP introns retained during HS.**

700 **A.** Browser shot of YTHDC1 and RNAPII ChIP-seq reads at *CLK1* gene from non-heat-
701 stressed (NHS) and heat-stressed (HS) cells. A scheme of *CLK1* gene organization is shown
702 above the browser shot.

703 **B.** Western blots showing the levels of CLK1 protein in wild-type (WT) or YTHDC1 knocked
704 down (YTHDC1 KD) from non-heat-stressed (NHS) cells, heat-stressed (HS) cells or heat-
705 stressed allowed to recover (R) for 3 hours. Tubulin β (TUBB) is shown as loading control.

706 **C.** RNA-IP-qPCR showing YTHDC1 enrichment on *CLK1* RNA in WT or METTL3 KD cells, in
707 NHS, HS or R conditions. Variation of RNA signal is expressed as fold-change relative to IP
708 control (done with irrelevant IgG) and normalized to tRNA (*TRS-CGA1-1* RNA). Graphs show
709 the mean and standard error of the mean (SEM) of three independent experiments.

710 **D.** MeRIP-qPCR showing m⁶A enrichment on *CLK1* RNA in wild-type cell in NHS, HS or R3
711 conditions. The enrichment is expressed as a % of the input.

712 **E.** Browser shot showing RNA-seq reads at *CLK1* locus in WT, YTHDC1 KD and METTL3
713 KD cells in NHS, HS, or R conditions. The rectangle and the zoom shown below highlight the
714 pre-mRNA sequence where introns remain retained in YTHDC1 and METTL3 KD cells,
715 during the recovery period. A scheme of *CLK1* gene organization is shown above the
716 browser shots, with the positions of the exon and intron sequences that are highlighted and
717 the introns numbered from 1 to 12.

718 **F.** Volcano plots of *CLK1* introns 5-8 retention in YTHDC1 KD versus WT cells (circles) and
719 in METTL3 KD versus WT cells (triangles), in NHS, HS and R3 conditions. The average
720 intron retention change (Δ IR) from 3 independent experiments in KD vs WT cells is plotted
721 along the X-axis and p-values [-Log₁₀(p-value adjusted)] along the Y-axis. Introns with Δ IR >
722 0,1 or Δ IR < 0,1 and a -Log₁₀(p-value adjusted) >1,3 have their intron number indicated.

723 **G.** RT-qPCR showing the distribution of the *CLK1* transcripts, containing or not the intron 3,
724 between the chromatin-associated (Ch), nucleoplasmic (Np) and cytoplasmic (Cy) fractions
725 in WT and YTHDC1 KD cells, in NHS, HS or R3 conditions. The RNA distribution is
726 expressed as a percentage of the total *CLK1* RNA population found in the Ch, Np and Cy
727 fractions. Graphs show the mean and SEM of three independent experiments. P-value was
728 calculated using a two-tailed Student's t-test. * denotes the p-value=0.04 for the difference in
729 percentages of spliced *CLK1* transcript in WT cells in HS versus recovery. The same
730 percentages in YTHDC1 KD cells shows no significant difference.

731 **H.** Scatter plots showing, for the introns that have their retention regulated in response to HS
732 in WT cells in HS and R conditions (Figure S6C), the changes in intron retention (IR)
733 between WT cells (X axis) and YTHDC1 KD cells (Y axis), in HS (left panel) or R3 (right
734 panel) relative to NHS condition. Plotted in red are the 102 transcripts containing at least one
735 intron retained independently of YTHDC1 during HS and spliced in a YTHDC1-dependent
736 manner during recovery.

737 **I.** Pie charts showing that 68 RNAs among the 102 RNAs (identified in Figure 6H) have their
738 gene enriched in YTHDC1 during the HS period.

739 **J.** GO enrichments among the 68 genes (identified in Figure 6H) as targeted by YTHDC1
740 during HS.

741

742 **Figure 7. Model of YTHDC1 and m⁶A functions in coordinating heat-induced gene**
743 **expression reprogramming during both HS and recovery periods, and their regulation**
744 **by sequestration of YTHDC1 within nSBs.**

745 We propose that YTHDC1 and m⁶A are part of a cellular system that orchestrates major
746 changes in gene expression over the course of the heat shock response, by acting in the
747 close environment of chromatin. Heat shock triggers YTHDC1 relocation to stress-induced
748 genes, in particular HSP genes, and YTHDC1 controls HSPs expression in a m⁶A-dependent
749 fashion and by acting, at least in part, at the chromatin level. In parallel, YTHDC1 relocates

750 to hundreds of other genes where it promotes a broad co-transcriptional m⁶A-dependent
751 intron retention induced by HS. In addition, during HS YTHDC1 may also bookmark dozens
752 of transcripts experiencing YTHDC1-independent intron retention, including *CLK1* and HSP
753 transcripts, for their splicing later during the recovery period. In the meantime, METTL3 starts
754 depositing m⁶A methylation marks on the *cis*-acting non-coding *SATIII* RNAs, produced by a
755 HSF1-driven transcription, in response to HS. As the level of m⁶A on *SATIII* RNAs continues
756 to increase, YTHDC1 starts to concentrate within these bodies. As more YTHDC1 is
757 sequestered within nSBs, YTHDC1-dependent upregulation of HSPs and intron retention
758 functions, triggered by HS, are tuned down. During the recovery period, YTHDC1 continues
759 to regulate intron retention indirectly by the potential bookmarking mechanism that takes
760 place on *CLK1*, a key regulator of intron retention. YTHDC1 (C1), METTL3 (M3), m⁶A (red
761 dots), RNA polymerase II (PII).

762

763 **Supplementary Figure and Table Legends**

764 **Supplementary Figure 1 (related to Figure 1).**

765 **A.** Schematic representation of YTHDC1 protein interactome. The 86 proteins from YTHDC1
766 protein interactome are grouped according to their molecular function and protein complexes
767 in which they have been identified, as described in PubMed and UniProt databases. Proteins
768 implicated in alternative splicing are highlighted in bold and italic. Protein can be found in
769 different complexes and have several functions. The number of proteins associated with
770 each function is given in brackets.

771 **B.** GO analysis performed on YTHDC1 protein interactome. The analysis was done using
772 DAVID Bioinformatics Resources. Biological processes identified with a $-\text{Log}_{10}(\text{p-value}) > 5$
773 are shown.

774 **C.** Co-IP analysis of YTHDC1 with SRSF1 and SRSF6 by western blot. YTHDC1
775 immunoprecipitation eluates were obtained using an irrelevant antibody (-) or a specific
776 antibody against YTHDC1 (+). SE: 0.5% of soluble extract input.

777

778 **Supplementary Figure 2 (related to Figure 2).**

779 **A.** Coomassie-stained gel after SDS-PAGE of the proteins present in the cytoplasmic (Cy),
780 nucleoplasmic (Np) or chromatin-associated (Ch) fractions of cells grown in no heat shock
781 condition (NHS) or after one hour of heat shock (HS).

782 **B.** Distribution of YTHDC1 ChIP peaks, expressed as percentage of the total peaks, and
783 mapping at transcription start site (TSS), gene body (GB), transcript end site (TES), beyond
784 TES (Postgenomic) or other regions (Others). Total numbers of peaks in NHS and HS
785 conditions are indicated in brackets.

786 **C.** Venn diagram of genes enriched in YTHDC1 in NHS and HS conditions and identified by
787 peak-calling analysis.

788 **D.** GO enrichment (Biological Process using DAVID Bioinformatics Resources) conducted on
789 the top 30% of the genes ranked by their normalized YTHDC1 ChIP-seq reads of YTHDC1
790 targeted over gene bodies, in NHS and HS conditions. Common biological processes
791 identified in response to heat stress (Mahat and Lis, 2017; Vihervaara et al., 2017) are
792 indicated.

793 **E.** Pie charts showing the percentage of YTHDC1-associated genes that are occupied or not
794 occupied by RNAPII, in NHS or HS conditions.

795 **F.** Pie charts showing the percentage of RNAPII-associated genes that are occupied or not
796 occupied by YTHDC1, in NHS or HS conditions.

797 **G.** Analysis of the co-variation of RNAPII and YTHDC1 gene occupancy in heat-stressed
798 cells relative to unstressed cells. Left panel, decile matrix showing the change in RNAPII or
799 YTHDC1 binding as Z-scores at gene bodies in HS compared to NHS condition, ranked by
800 deciles from the most up-regulated to the most down-regulated. The numbers in each box
801 indicate the number of common genes in each decile. Right panel, decile matrix showing the
802 Log_{10} p-value for the intersection of the number of common genes determined for each decile
803 compared to expected. Lowest intersection is black while the highest is red (0 to 261,
804 Hypergeometric test).

805

806 **Supplementary Figure 3 (related to Figure 3).**

807 **A.** ChIP-qPCR showing the enrichment of YTHDC1 at the 3' end of *HSPA1A* and *DNAJB1*
808 genes in cells in non-heat-stressed (NHS) or heat-stressed (HS) cells. Data show the fold
809 enrichment normalized to control IP (done with irrelevant IgG) and *ACTB* gene used to
810 monitor the background. Values are mean \pm standard error of three independent biological
811 replicates.

812 **B.** Western blots showing the efficiency of YTHDC1 knockdown 48 and 72 hours post
813 transfection with 20 or 40 nM of YTHDC1-specific siRNAs.

814 **C.** Western blots showing the levels of DNAJB1 protein in wild-type (WT) or YTHDC1
815 knocked down (YTHDC1 KD) in HT1080 cells (top panels) or HFF2 cells (bottom panels) in
816 NHS, HS or recovery (R). Tubulin β (TUBB) was used as loading control. Quantification of the
817 western blot signals with protein levels expressed as fold-change relative to the protein levels
818 in HS condition (highlighted by the horizontal dotted line) are shown below the western blots.
819 Error bars represent standard error from three independent biological replicates.

820 **D.** Pie charts showing the distribution of the RNAs with their level increased in HS (Up in HS)
821 or in R (Up in R) according to the variation of their RNA level in YTHDC1 KD, METTL3 KD or
822 both KD cells, in HS or R condition. Lower: lower increase.

823 **E.** Western blots validating METTL3 knockdown. Expression of METTL3 protein was
824 analyzed 72h after transfection with 40 nM of specific METTL3 siRNAs. TUBB was used as
825 loading control.

826 **F.** Box plots showing the Log₂Fold Change (FC) for the RNAs having their level Up in WT
827 cells and that are deregulated in YTHDC1 and METTL3 KD cells, in HS vs NHS (963 RNAs)
828 or after 3 hours of recovery vs NHS (881 RNAs).

829 **G.** RT-qPCR showing the level of *DNAJB1* and *HSPA1A* RNA levels in the chromatin-
830 associated (Ch), nucleoplasmic (Np), cytoplasmic (Cy) fractions in wild-type (WT) or
831 YTHDC1 KD cells, in NHS, HS or 3 hours of recovery (R) after heat stress. Variation of RNA
832 levels is expressed in fold-change relative to the NHS condition and normalized to *ACTB*.
833 Graphs show the mean and SEM of three independent experiments.

834 **H.** Heatmap showing for individual heat-induced HSP genes the normalized ratio of the RNA
835 reads mapping their 15 kb genomic region downstream the gene over the RNA reads within

836 their gene body, in WT, YTHDC1 KD or METTL3 KD cells subjected to NHS, HS or 3 hours
837 of recovery (R) after heat stress. The genes were grouped as "Clean" when no other gene
838 was identified in the 15 kb genomic window downstream its 3'UTR and as "Not clean" in the
839 converse case. The HSP genes analyzed (25) have their RNAs that accumulate in HS or R,
840 compared to the NHS condition, and that accumulate less in HS or R condition in both
841 YTHDC1 KD and METTL3 KD cells.

842

843 **Supplementary Figure 4 (related to Figure 4).**

844 **A.** Microscopy images of YTHDC1 (red) and HSF1 (green) fluorescent immunostainings
845 showing their subcellular localization in HFF2 cells (left panel) and HT1080 cells (right panel)
846 in non-heat-stressed (NHS), heat-stressed (HS) or heat-stressed followed by 2 or 3 hours of
847 recovery (R2 or R3) conditions. Nuclear DNA was stained with DAPI (blue). Scale bar, 10
848 μm .

849 **B.** Microscopy images of YTHDF1, 2 and 3, and YTHDC1 and 2 fused to GFP showing their
850 subcellular localization in NHS, HS or R3 conditions, after being transfected with plasmids
851 expressing the YTH proteins. The GFP signal was used to detect the localization of the
852 ectopic expressed proteins. DAPI was used for staining the nucleus. Scale Bar, 10 μm .

853

854 **Supplementary Figure 5 (related to Figure 4).**

855 **A.** Microscopy images showing that the relocation of YTHDC1 to nSBs is strongly reduced in
856 cells treated with RNaseA. YTHDC1 (red) and HSF1 (green) were detected by
857 immunofluorescence in cells subjected to heat shock (HS) only or allowed to recover for 3
858 hours after the HS. Nuclear DNA stained with DAPI. Scale bar: 10 μm .

859 **B.** Microscopy images of RNA FISH experiments showing that the RNaseA treatment
860 strongly reduces *SATIII* RNA signal under HS. Scale bar: 10 μm .

861 **C.** Microscopy images of YTHDC1 (red) and HSF1-*DBDtrim*-GFP mutant (green) fluorescent
862 immunostainings showing the loss of YTHDC1 foci in cells expressing HSF1-*DBDtrim*-GFP.
863 The white star highlights a cell that expresses the HSF1-*DBDtrim*-GFP mutant, during the
864 recovery period (R3), while the other visible on the same image does not express the HSF1-

865 *DBDtrim*-GFP dominant negative mutant. Immunostainings were conducted on non-heat-
866 stressed (NHS), heat-stressed (HS) or heat-stressed followed by 3 hours of recovery (R3)
867 conditions. The arrows point to YTHDC1 and METTL3 foci. Nuclear DNA was stained with
868 DAPI. Scale bar, 10 μ m.

869 **D.** Microscopy images showing the nuclear localization of METTL3 (green) and YTHDC1
870 (red), analyzed by immunodetection, in WT (left panel) and METTL3 KD (right panel) cells in
871 NHS, HS or R3 condition. The star highlights a cell knocked-down for METTL3. Note that
872 while YTHDC1 signal still relocates to nSBs the signal is much weaker compared to the
873 neighboring cell which expresses METTL3 at a higher level and which concentrates within
874 the nSBs in R3. Nuclear DNA stained with DAPI. Scale bar: 10 μ m.

875 **E.** Microscopy images showing the relocation of ectopic HA-YTHDC1 or HA-YTHDC1-
876 *W428A* fusion proteins to nSBs in cells subjected to HS (HS) or HS followed by for 3 hours of
877 recovery (R). The expressed ectopic YTHDC1 proteins (green) and HSF1 (red) were
878 detected by immunofluorescence. Nuclear DNA was counterstained with DAPI. Scale bar: 10
879 μ m.

880 **F.** Microscopy images validating the loss of YTHDC1 signal in YTHDC1 KD cells. WT and
881 YTHDC1 KD cells were fixed 72h after transfection and analyzed by immunofluorescence
882 using specific antibody against YTHDC1 (red). Nuclear DNA stained with DAPI. Scale bar:
883 10 μ m.

884

885 **Supplementary Figure 6 (related to Figure 5).**

886 **A-B.** Analysis of *TAF1D* and *DNAJB9* pre-mRNAs splicing. Left panels, pictures of
887 agarose/TAE gels showing products of RT-PCR from WT and YTHDC1 KD cells, in no heat
888 stress (NHS), heat stress (HS) or heat stress followed by 3 or 6 hours of recovery (R3 or R6)
889 conditions. Red arrows indicate positions of the PCR primers used to detect, respectively,
890 intron 2 retention of *TAF1D* and intron 2 retention of *DNAJB9* pre-mRNAs. Black arrows
891 indicate positions of the PCR primers used to detect constitutive spliced intron on the three
892 transcripts. *ActinB* pre-mRNA was used as a control of constitutive splicing. Right panels,
893 quantification of the signals shown in the left panels using Fusion-Capt software (Vilber

894 Lourmat). Int2ret: intron 2 retention; Int1spl: intron 1 splicing. Error bars represent standard
895 deviation from three independent biological replicates. P-value was calculated using a two-
896 tailed Student's t-test. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$. Only significant p-values are indicated and are
897 for *TAF1D*: 0.048 (R3) and 0.0325 (R6) and for *DNAJB9*: 0.0204 (R3), 0.0325 (R6).

898 **C.** Volcano plots of retained introns in HS or R compared to NHS. Red dots are introns that
899 are differentially retained in WT cells subjected to HS (left panel) or after 3 hours of recovery
900 (R) after the HS (right panel), compared to non-heat shock condition (NHS). The number of
901 differentially retained introns is indicated in red. The average Intron Retention (IR) change
902 (Δ IR HS/NHS or Δ IR R/NHS) from 3 independent experiments was plotted along the X-axis,
903 and adjusted p-values [$-\text{Log}_{10}(\text{p-value adj})$] along the Y-axis.

904 **D.** Browser shots of RNA-seq reads at *SELENOW* gene shown as an example of the intron
905 retention deregulation ongoing in YTHDC1 KD or METTL3 KD vs WT cells in HS vs NHS
906 condition.

907

908 **Supplementary Figure 7 (related to Figure 6).**

909 **A.** Analysis of *CLK1* introns 3 and 4 splicing in response to HS. Upper panel, pictures of
910 products of RT-PCR from WT and YTHDC1 KD cells, in non-heat-stressed (NHS), heat-
911 stressed (HS) or heat-stressed followed by 3 or 6 hours of recovery (R3 or R6) conditions,
912 analyzed on agarose/TAE gels. Red arrows indicate positions of the PCR primers used to
913 detect introns 3-4 retention of *CLK1* pre-mRNAs. Black arrows indicate positions of the PCR
914 primers used to detect constitutive spliced intron on the three transcripts. *ACTB* pre-mRNA
915 was used as a control of constitutive splicing. Lower panel, quantification of the signals
916 shown in the panels using Fusion-Capt software (Vilber Lourmat). Int3-4ret: intron 3 and 4
917 retention; Int2spl: intron 2 splicing. Error bars represent standard deviation from three
918 independent biological replicates. P-value was calculated using a two-tailed Student's t-test.
919 *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$. Only significant p-values are indicated and are for *CLK1*: 0.00029
920 (R6).

921 **B.** Volcano plots of *CLK1* introns 3-4 and 5-8 retention in HS versus NHS (circles) and R3
922 versus NHS (triangles) in WT cells. The average intron retention (IR) change from 3

923 independent experiments conducted on WT cells in HS vs NHS (circles) and R3 vs NHS
924 (triangles) conditions is plotted along the X-axis and p-values [$-\text{Log}_{10}(\text{p-value adjusted})$]
925 along the Y-axis.

926

927 **Supplementary Table 1. List of proteins identified by label-free mass spectrometry.** List
928 of the proteins identified in three immunoprecipitations done with YTHDC1 antibody (IP1-3)
929 and three immunoprecipitations done with an irrelevant antibody (CT1-3). The columns
930 correspond to: Protein entries, Protein names, Gene names, Razor + unique peptides,
931 $\text{Log}_2(\text{Fold Change IP/CT})$, p-values, Measured intensities in control and YTHDC1
932 immunoprecipitations.

933

934 **Supplementary Table 2. List of genes up- or down-regulated by HS in YTHDC1 KD**
935 **and/or METTL3 KD cells and identified by RNA-seq.** Sheets “Up_HS” and “Up_R3”: Lists
936 of the transcripts significantly up-regulated during heat stress (HS) or after recovery (R),
937 using DEseq2. Sheet “C1-M3 dpt”: List of the 963 and 881 transcripts down-regulated in
938 YTHDC1 KD and METTL3 KD cell during HS or recovery period.

939

940 **Supplementary Table 3. Plasmids generated in this study.**

941

942 **Supplementary Table 4. DNA oligonucleotides and siRNA used in this study.**

943

944 **Supplementary Table 5. Antibodies used in this study.**

945 **Materials and Methods**

946 **Cell culture, RNA interference, and plasmid transfections**

947 Human HeLa cell line (cervix adenocarcinoma from American Type Culture Collection, VA,
948 USA), HT1080 cell line (human fibrosarcoma from American Type Culture Collection, VA,
949 USA) and HFF2-TERT (Human foreskin fibroblasts immortalized from Decottignies's Lab)
950 were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal
951 bovine serum and 2% glutamine, medium named "DMEM complete", under stable
952 physicochemical conditions (37°C, 5% CO₂, 95% humidity). Heat-shock experiments were
953 performed by immersion of the culture flasks or culture plates in a warm water bath for 1h at
954 43°C. Cells were then either harvested directly or returned to 37°C for recovery for the
955 indicated time. Stable HSF1 Knock Down (KD HSF1) HeLa cells (kindly provided by Lea
956 Sistonen (Sandqvist et al., 2009) were grown in HeLa wild type medium supplemented with
957 Geneticine antibiotic at 0.4%final concentration.

958 RNA interference experiments were performed using Lipofectamine RNAiMAX (Thermo
959 Fisher Scientific) according to the reverse transfection protocol provided by the
960 manufacturer. For each well of a 6 well-culture plate, 75 pmol of RNAi duplex were diluted in
961 500 µl of OptiMEM (Opti-MEM I Medium without serum), and then 5 µl of Lipofectamine
962 RNAiMAX were added. After mixing the solution and an incubation of 15 min at RT, 240 000
963 cells diluted in 2 mL of DMEM complete medium were added to each well. The final siRNA
964 concentration was 40 nM in each well (the same siRNA final concentration was used for
965 transfection of cells grown in 10 cm or 15 cm dishes). Cells were then incubated for 72
966 hours. Knockdowns were verified by western blot and IF analyses. All siRNAs were
967 purchased from Eurogentec. The sequences are shown in Table S4.

968 For transfection of plasmids coupled to RNA interference experiments, cells were first
969 transfected using jetPEI (Polyplus transfection) following the manufacturer's batch
970 transfection protocol. For each well in a 6-well plate 1 µL of jetPEI diluted in 100 µL 150 mM
971 NaCl (supplied with the jetPEI reagent) were added to 1 µg of plasmid DNA diluted in 100 µL
972 of 150 mM NaCl. After incubation for 15 min at RT, the mix jetPEI/DNA was added to

973 600 000 cells. After 24h, cells were diluted four times in DMEM complete medium transfected
974 with siRNA using Lipofectamine RNAiMAX and grown for 72h.

975 Transfection of plasmids coding for YTH-domain proteins fused to GFP was carried out using
976 jetPEI following the manufacturer's forward transfection protocol. For each well in a 6-well
977 plate 2 μ L of jetPEI were diluted in 100 μ L 150 mM NaCl and 1 μ g of plasmid DNA was
978 diluted in 100 μ L 150 mM NaCl. Solutions were mixed, vortexed briefly, incubated 15 min at
979 RT and the mix jetPEI/DNA was added to the cells at 50 % confluence.

980 Transfection of plasmid coding for protein HSF1-*DBDtrim* domains fused to GFP (Jolly et al.,
981 2002) was carried out using jetPEI following the manufacturer's forward transfection protocol.
982 For each well in a 24-well plate 0.5 μ L of jetPEI were diluted in 25 μ L 150 mM NaCl and 100
983 ng of plasmid DNA was diluted in 25 μ L 150 mM NaCl. Solutions were mixed, vortexed
984 briefly, incubated 15 min at RT and the mix jetPEI/DNA was added to the cells at 50 %
985 confluence. The HSF1-DBD-Trim-GFP construct retains both the DNA binding and
986 trimerization domains and is deleted of the C-terminal part of HSF1. This construct forms
987 granules in all cells, both at 37°C and 42°C without production of SATIII transcripts. This
988 mutant acts as a dominant negative, by preventing the endogenous HSF1 from accumulating
989 into the granules upon heat shock (described in (Jolly et al., 2004)).

990

991 **DNA constructs and mutagenesis**

992 Coding sequence for full-length human YTHDC1 (hYTHDC1; 727 aa; Accession number
993 NP_001026902) cDNA was amplified from a HEK cells cDNA library by reverse transcription-
994 PCR. The PCR product was then cloned into a mammalian modified pCI-neo plasmid
995 allowing the production of HA tagged proteins. Primers used are listed in the Table S4.
996 Nondegradable plasmids coding for an ectopically expressed form of YTHDC1, which cannot
997 be recognized by the siRNAs used for the transient knockdown of the endogenous protein
998 were obtained by site-directed mutagenesis (Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit, BioLabs)
999 using the following primers (Table S4): siC1_1immF and siC1_1immR; siC1_3immF and
1000 siC1_3immR (the mutated DNA sequence does not modify the amino acid sequence). From
1001 this nondegradable plasmid (called pCI-neo-HA-YTHDC1imm), we established by PCR-

1002 based mutagenesis YTHDC1 point mutants that lost its capacity to recognize m⁶A. The point
1003 mutation concerns the tryptophan 428 located in the hydrophobic cage of the YTH domain
1004 that recognizes m⁶A that was substituted by alanine (A) using the primers W428A_F and
1005 W428A_R (Table S4) to produce a point-mutant form of YTHDC1 named pCI-
1006 neohYTHDC1immW428A.

1007 The mammalian expression vector pEGFP-N3 (Addgene # 6080-1) was used to express the
1008 human YTH-domain proteins in fusion with GFP. Coding sequences for human YTHDC2
1009 (hYTHDC2; 1430 aa; Accession number NP_073739), YTHDF1 (hYTHDF1; 559 aa;
1010 Accession number NP_060268), YTHDF2 (hYTHDF2; 579aa ; Accession number
1011 NP_001166599) and YTHDF3 (hYTHDF3; 585 aa; Accession number NP_689971) cDNAs
1012 were amplified from a HEK cells cDNA library by reverse transcription-PCR using the
1013 following primers : YTHDC1_Xho and YTHDC1_Xma; YTHDC2-Xho and YTHDC2Bam;
1014 YTHDF1-Xho and YTHDF1-Bam; YTHDF2-Xho and YTHDF2-Bam; YTHDF3_Xho and
1015 YTHDF3_Bam (Table S4). The PCR products were digested by the restriction enzymes
1016 *XhoI-BamHI* (for hYTHDF1-2-3 and hYTHDC2 cDNAs) or *XhoI-XmaI* for hYTHDC1 cDNA.
1017 The fragments obtained were then inserted into the *XhoI-BamHI* or *XhoI-XmaI* digested
1018 pEGFP-N3 vector.

1019

1020 **RNA purification and analysis**

1021 Total RNA was extracted from cells using the TRizol Reagent (Invitrogen) following the
1022 manufacturer's instructions. Cells from 6-well plates or 10cm dishes were collected by
1023 trypsinization and centrifuged 5 min at 600 g. For 10⁵-10⁷ cells, 1 mL of Trizol reagent was
1024 added and the mix was thoroughly vortexed (at this step occasionally samples were frozen
1025 and stored at -80°C). After 5 min incubation, 0.2 mL of chloroform were added, the mix was
1026 vortexed and then incubated for another 2-3 min at RT. Following centrifugation at 12 000 g
1027 for 15 min at 4°C, the aqueous phase (containing RNA) was carefully transferred to a new
1028 tube. Isopropanol (0.5 mL) was added, the mix was vortexed and centrifuged for 10 min at 12
1029 000 g, 4°C. The pellet was then washed in 75% (v/v) EtOH and centrifuged at 7500g for 5
1030 min, 4°C. The RNA pellet was then air-dried, dissolved in 20-50 µL RNase-free water,

1031 incubated at 60°C for 10 min and stored at -20°C. RNA concentration and A260/280 ratio
1032 were determined using NanoDrop ND-1000 UV spectrophotometer. RNA integrity was
1033 evaluated by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gel using the GelGreen Nucleic Acid Stain
1034 (Biotium) dye following the manufacturer's instructions.

1035 Reverse transcriptase PCR was performed on 2 µg of RNA using Transcriptor Reverse
1036 Transcriptase (Roche). RNA was first subjected to DNase (Roche) treatment in the presence
1037 of 5X DNase buffer (100 mM Tris pH 8, 10 mM MgCl₂), 100 mM DTT (Invitrogen) and RNase
1038 inhibitor (Thermo Scientific) for 20 min at 37°C. Next 0.7 µL of 50 mM EDTA were added to
1039 the RNA-DNase mixture and incubated 10 min at 70°C. RNA was then hybridized with a mix
1040 of specific primers at 2 µM in the presence of 50 mM MgCl₂ for 10 min at 65°C. cDNA
1041 synthesis was performed by adding 10 mM dNTP (Thermo Scientific), RNase Inhibitor
1042 (Thermo Scientific), RT buffer (Roche) and Reverse Transcriptase (Roche) and subsequent
1043 incubation for 10 min at 25°C, 40 min at 55°C and 5 min at 85°C.

1044 For RNAseq analysis, RNA was subjected to DNase as described above and then purified
1045 by phenol/chloroform extraction. One volume of acid phenol:chloroform (5:1, pH 4.7) was
1046 added to RNA and the mix was thoroughly vortexed 5 sec. Following centrifugation at 12 000
1047 g for 5 min at 4°C, the aqueous phase (containing RNA) was carefully transferred to a new
1048 tube. One volume of chloroform was added, the mix was vortexed and centrifuged at 12 000
1049 g for 5 min at 4°C. The aqueous phase was recovered in a new tube. 1/10 volume of 3 M
1050 ammonium acetate was added and then 2 volumes of 100% ethanol. After mixing, RNA was
1051 precipitated by incubation 30 min at -80°C. After centrifugation 15 min at 12 000 g, 4°C, the
1052 pellet was washed in cold 70% (v/v) EtOH and centrifuged at 12 000 g for 5 min, 4°C. The
1053 RNA pellet was then air-dried, dissolved in 20-50 µL RNase-free water. RNA concentration
1054 and A260/280 ratio were determined using NanoDrop ND-1000 UV spectrophotometer.

1055 RNAseq libraries were made after depleting the total RNA population of ribosomal RNAs and
1056 by using multiplexing. Construction of the libraries and high throughput sequencing (NextSeq
1057 2000, Illumina) were performed at EMBL Genecore facility.

1058

1059 **Western-blot analysis**

1060 Cells were washed with PBS and collected by centrifugation 5 min at 600 g. Proteins were
1061 extracted using lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% (w/v) Triton
1062 X-100, 0.5% (w/v) sodium deoxycholate) supplemented with protease inhibitor (Roche) and
1063 benzonase (Merck Milipore, 1/100). After 15 min on ice, total protein extracts were quantified
1064 using a Pierce BCA Protein Assay Kit or a Bradford assay. Protein samples (10 µg) were
1065 then incubated at 95°C for 5 min in Laemmli sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10%
1066 (v/v) β-mercaptoethanol, 1% (v/v) SDS, 10% (v/v) glycerol and 0.1% (w/v) bromophenol
1067 blue), separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and analyzed using
1068 appropriate primary and secondary antibodies (listed in Table S5). Antibodies were diluted in
1069 TBS- 0.1% (v/v) Tween20- 1% (w/v) fat dry milk, and membranes were washed in TBS- 0.1%
1070 (v/v) Tween20.

1071 Enhanced chemiluminescence (ECL) detection was performed using reagents from Biorad
1072 (Clarity Western ECL kit) and revealed using ChemiDocMPSsystem (BioRad) or the Fusion
1073 FX (Vilber) camera. Signals were quantified with the corresponding software, the imageLab
1074 software (Biorad) or the Fusion-Capt software (Vilber Lourmat).

1075

1076 **Subcellular fractionation**

1077 Fractionation was performed to obtain cytosolic and nuclear fractions from WT, YTHDC1 KD
1078 and METTL3 KD cells. HeLa cells were seeded in 10 cm dishes and transfected transiently
1079 with control siRNA or siRNA against YTHDC1. 72 h after transfection, cells were submitted
1080 or not to heat shock treatment followed or not by a recovery period. Cells together with the
1081 dead floating cells were manually collected using a scraper, centrifuged for 5 min at 400 g
1082 and washed in cold 1xPBS (phosphate-buffered saline). On ice 150 µL of lysis buffer (10 mM
1083 Tris pH 7.5, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0,34 M sucrose, 650 µM spermidine, 2 mM EDTA, 0,5
1084 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 0.05% (w/v) TritonX-100 + 1 µL RNasin) were added
1085 gently to the cell pellet (obtained from one 10cm dish) and incubated for 10 min. After a 5
1086 min centrifugation at 400 g, the supernatant (cytosolic fraction) was collected and stored on
1087 ice. 200 µL of washing buffer (10 mM Hepes pH 7.5, 10 mM KCl, 0,3 M sucrose, 1,5 mM
1088 MgCl₂, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, + 1µL RNasin) were added carefully to the pellet and the

1089 suspension was centrifuged 5 min at 400 g to obtain a final pellet containing the washed
1090 nuclei.

1091 For purification of sub-nuclear fractions, the pellet containing the washed nuclei was
1092 resuspended into 75 μ L of nucleus lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 140 mM NaCl, 1,5 mM
1093 $MgCl_2$, 0,5% (w/v) NP-40), incubated 20 min on ice, and centrifuged 10 min at 20 000 g
1094 (4°C). The supernatant (nucleoplasm) was collected and stored on ice. The remaining pellet
1095 was resuspended into 75 μ L of 10 mM Tris pH 7.5, 700 mM NaCl, incubated 20 min on ice
1096 and then centrifuged for 5 min at 20 000 g at 4°C and the supernatant containing the
1097 chromatin associated fraction was recovered. For SDS-PAGE and WB analyses, one volume
1098 of cytosolic fraction and two volumes of nuclear fractions (nucleoplasm and chromatin
1099 associated) were loaded on gels. For RNA extraction, 1 mL of TRizol Reagent was added to
1100 each fraction, and the purification of RNA was performed as described above (RNA
1101 purification and analysis).

1102

1103 **Protein immunopurification**

1104 Cells from 4 T75 flasks, at 90% of confluence were trypsinized, washed in 1X PBS and lysed
1105 10 min on ice in 2 mL of lysis buffer (50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.5%
1106 (w/v) Na-deoxycholate, 1% (w/v) TritonX-100, 10% (w/v) glycerol, 1 mM PMSF and 1 mM
1107 DTT). The soluble total extract was recovered after centrifugation at 20 000 g for 10 min at
1108 4°C and nucleases (benzonase, Merck Millipore) were added to this extract to degrade
1109 nucleic acids. Magnetic beads coupled to protein A (Dynabeads Protein A, Thermo Fisher)
1110 were used for immunoprecipitation of YTHDC1 and the associated proteins. 7 μ L of beads
1111 per IP were washed in 1X PBS, 0.02% (w/v) Tween 20 and incubated with 10 μ L of the
1112 purified polyclonal rabbit antibody raised against the N-terminal part of YTHDC1 (homemade
1113 antibody) or with 5 μ L of rabbit polyclonal IgG (control experiment, diagenode C15410206)
1114 for 20 min at RT under agitation. The Dynabeads/antibody complexes were next equilibrated
1115 in the lysis buffer and then incubated with 1 mL of the soluble proteins extract per IP. After
1116 incubation for 6 hours at 4°C on a rotating shaker, the Dynabeads/antibody/antigen
1117 complexes were washed four time in 25 mM Tris pH 8.0, 1 mM $MgCl_2$, 150 mM NaCl, 0.01%

1118 (w/v) NP40 washing buffer and the antibody-antigen complexes were eluted by addition of 40
1119 μ L 2X Laemmli loading buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% (v/v) SDS, 10% (w/v) glycerol,
1120 10% (v/v) β -mercaptoethanol, 0.01% (w/v) bromophenol blue) and incubated 10 min at 70°C.
1121 10 μ L were loaded on SDS-PAGE followed by silver staining and 25 μ L were used for
1122 MS/MS analysis. For Co-IP analysis, the same protocol was used except that we used a
1123 commercial antibody (Anti-YTHDC1 A305-096A, Bethyl laboratories). 10 μ L of the eluate and
1124 5 μ L of a 1/25 dilution of the soluble extract were loaded on SDS-PAGE for the WB analysis.

1125

1126 **Microscopy analyses with immunofluorescence, RNA-FISH and DNA-FISH**

1127 For immunofluorescence, HeLa cells grown on coverslips were fixed in 4 %
1128 paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min at RT, washed three times
1129 5 min in PBS 1X and permeabilized with PBS, 0.5 % (v/v) Triton X-100, 0.5 % (w/v) Saponin
1130 for 15 min at RT, and washed again three times 5 min in PBS 1X. Unspecific sites were
1131 blocked 30 min at 37°C in PBS, 10% (v/v) FBS, 0.3 % (v/v) Triton X-100. Following this, cells
1132 were incubated 1 h at 37°C with appropriate primary antibody (listed in Table S5) diluted in
1133 PBS 1X, 1% (v/v) FBS. Cells were then washed three times 5 min in PBS 1X, 0.3 % (v/v)
1134 Triton X-100 and incubated 30 min at 37°C with a secondary goat anti-rabbit IgG Dylight 549
1135 antibody (Vector; 1:1000) or goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 antibody (Invitrogen;
1136 1:500). DNA was counterstained with 250 ng/mL DAPI. To have comparative analysis
1137 between cell samples submitted to different conditions, images were acquired with the same
1138 exposure time with an Apotome microscope using the 63x, oil immersion objective. Images
1139 were analyzed using Fiji software and a minimum of 100 cells were analyzed for each
1140 experimental condition.

1141 For RNA and DNA FISH to detect *SATIII* ncRNAs and DNA, respectively, the cells were fixed
1142 and permeabilized as described in the protocol used for immunofluorescence. Cells were
1143 then dehydrated by successive incubation for 3 min in 70% (v/v) ethanol, 90% (v/v) ethanol,
1144 100% ethanol. Coverslips were air-dried and DNA was denatured 10 min at 80°C in PBS
1145 50% formamide (for DNA FISH only). Then 5-10 μ L and precipitated probe were deposited
1146 on each coverslip. The cells were incubated overnight at 37°C. Next, cells were washed

1147 three times for 5 min in 50% (v/v) formamide, 2X SSC solution warmed to 45°C and three
1148 times for 5 min in 2X SSC at RT under agitation -for DNA FISH- or washed three times for 5
1149 min in 15% (v/v) formamide, 2X SSC solution and three times for 5min in 2X SSC at RT-for
1150 RNA FISH. For studies combining RNA or DNA FISH and protein immunostaining after the
1151 final washing steps of the FISH protocol, the cells were fixed again in PFA 4% (w/v), washed
1152 in PBS1X and then incubated with the blocking solution for IF and the IF protocol was
1153 applied as usual. A minimum of 100 cells were analyzed for each experimental condition.
1154 For RNase treatment, HeLa cells grown on coverslips were briefly washed with sterile CSK
1155 buffer (20 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 300 mM sucrose), then permeabilized 5 min at 4°C in
1156 CSK/0.5% (v/v) Triton X-100 solution, and briefly washed in PBS 1X. Cells were incubated
1157 10 min at room temperature with a 1 mg/mL RNase A solution (Merck 10109142001),
1158 washed with PBS1X, and fixed in 4 % paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS)
1159 for 10 min at RT, and finally washed three times 5 min in PBS 1X. RNA FISH or IF was
1160 performed as previously described.

1161

1162 **Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)**

1163 ChIP experiments were performed mainly as described previously (Motamedi et al., 2004)
1164 with the following modifications. HeLa cells (from two 15 cm dishes at 70-80 % confluency,
1165 around 2×10^7 cells) were cross-linked with 1% (v/v) formaldehyde (Sigma) at room
1166 temperature for 15 min. The reaction was quenched with glycine (Sigma) at a final
1167 concentration of 125 mM for 5 min at room temperature. Cells were collected, centrifuged for
1168 3 min at 1250 g, and the pellets washed twice in cold PBS. Cell pellets were resuspended in
1169 7 mL of cell lysis buffer (50 mM Hepes pH 7.5, 10 mM KCl, 0.1% (w/v) NP40, and protease
1170 inhibitors) and transferred to a chilled dounce homogenizer on ice and homogenized for 36
1171 strokes. The suspension was then centrifuged for 3 min at 1250 g at 4°C, and resuspended
1172 in 1 mL of nuclear lysis buffer (50 mM HEPES-KOH at pH 7.5, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA at
1173 pH 8.0, 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (v/v) sodium deoxycholate, 0.1% (v/v) SDS, and
1174 protease inhibitors). Lysates were sonicated for 10 min (30"on, 30"off) at 30% amplitude in a

1175 water bath sonicator (Active motif), centrifuged at 18 000 g for 10 min and the supernatant
1176 stored at -80°C. To obtain input DNA, 25 µL of clarified lysate was used.

1177 Each immunoprecipitation reaction was performed from 30 µg of sheared chromatin
1178 incubated overnight at 4°C on a wheel with 2 µg of specific antibody (Anti-RNA polymerase II
1179 subunit B1 (phospho CTD Ser-2) Antibody, clone 3E10, Millipore; Anti-YTHDC1 A305-096A,
1180 Bethyl laboratories) or irrelevant IgG (Rabbit polyclonal IgG, diagenode C15410206). Forty
1181 microliters of a 50% slurry of prewashed protA-Sepharose beads (nProteinA Sepharose 4
1182 Fast Flow, GE Health Care) were incubated with each lysate at 4°C for 1 h. Beads were
1183 washed two times in nuclear lysis buffer, once with 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.25 M LiCl,
1184 0.5% (v/v) NP-40, 0.5% (v/v) sodium deoxycholate, and 1 mM EDTA, and once with TE (10
1185 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) at room temperature. Immunopurified material was eluted
1186 by incubating with 100 µL of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, and 1% (v/v) SDS at
1187 65°C for 20 min. Eluate was transferred to a fresh tube and pooled with a final bead wash of
1188 150 µL of TE with 0.67% (v/v) SDS. For input DNA, 200 µL of TE with 1% (v/v) SDS was
1189 added to 25 µL of lysate. All samples were incubated at 65°C overnight before addition of
1190 200 µL of TE and 100 µg of Proteinase K (Roche), then incubated at 37°C for a further 2 h.
1191 After addition of 55 µL of 4 M LiCl, DNA samples were extracted once with
1192 phenol:chloroform:isoamyl alcohol and once with chloroform and then precipitated (1 mL
1193 100% (v/v) ethanol and 2 µL glycogen (20 mg/ml) were added to the recovered upper phase,
1194 incubated at -80°C for 20min, centrifuged at 4°C for 20 min and washed once with 70% (v/v)
1195 ethanol). Precipitated and washed DNA was resuspended in 50 µL 10 µg/ml RNase A (for
1196 the input) or 0.5 µg/mL RNase A (for IP) and incubated at 37°C for 1 hour.

1197 Quantitative PCR was conducted with 2 µL of a 1/2 dilution of the IP DNA. Relative
1198 enrichment was calculated as the ratio of signal of interest to signal of control IP. Primers
1199 used are listed in Table S4.

1200 Chromatin immunoprecipitation for whole-genome analysis was performed from HeLa cells
1201 using the "ChIP-IT High Sensitivity" kit from Active Motif following the manufacturer's
1202 instructions. Sheared chromatin was obtained using a probe sonicator (Active Motif) by 10
1203 cycles, 30 sec ON, 30 sec OFF at 63 W. ChIP were performed using 25 µg chromatin and 4

1204 µg of antibody detecting YTHDC1 (Table S5). CHIP-seq libraries were constructed using the
1205 Next Gen DNA Library Kit (Active Motif 53216 and 53264). Library quality was assessed
1206 using Agilent 2100 Bioanalyzer and Agilent High Sensitivity DNA assay. High throughput
1207 sequencing was performed by Sequence-By-Synthesis technique using a NextSeq 500
1208 (Illumina) at Genom'ic facility, Institut Cochin, Paris.

1209

1210 **RNA immunoprecipitation (RIP)**

1211 YTHDC1 RNA-IP experiments were performed on WT and METTL3 KD cells. Briefly, cells
1212 were seeded in 15 cm dishes were cross-linked with 1% (v/v) formaldehyde (Sigma) at room
1213 temperature for 15 min. The reaction was quenched with glycine (Sigma) at a final
1214 concentration of 125 mM for 5 min at room temperature. Cells were collected, centrifuged for
1215 3 min at 1250 g, and the pellets washed twice in cold PBS. Cell pellets were resuspended in
1216 400 µL of lysis buffer (50 mM HEPES-KOH at pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA at pH 8.0,
1217 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (v/v) sodium deoxycholate, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, and 100
1218 U/mL RiboLock (Thermofisher)) and incubated 10 min on ice. The lysed cells were sonicated
1219 in a water bath sonicator (Active motif), for 10 min (30"on, 30"off) at 30% amplitude
1220 centrifuged at 1000 g for 5 min and the supernatant is collected in new tubes. The pellet was
1221 resuspended in 400 µL of lysis buffer and the sonication, centrifugation and supernatant
1222 collection were repeated twice to obtain a final volume of 1.2 mL of cell lysate. The clarified
1223 lysate (1.2 mL) was DNase treated 1 hour at 30°C by the addition of 133 µL of 10x DNase
1224 Buffer and 700 Units of DNase I (RNase free, from Sigma). The DNase reaction was stopped
1225 by the addition of 80 µL EDTA 0.5 M, then the samples were centrifugated 5 min at 15 000 g
1226 and the supernatants were transferred to new tubes. The lysates were incubated at 4°C for
1227 1h with either with 10 µg of Anti-YTHDC1 (A305-096A, Bethyl Laboratories) or 10 µg of
1228 irrelevant IgG (Sigma I4506). 40 µL of a 50% slurry of prewashed protA-Sepharose beads
1229 (nProteinA Sepharose 4 Fast Flow, GE Health Care) were added to the lysates and
1230 incubated at 4°C for another 1 h. Beads were washed five times with, first, two washes with
1231 the lysis buffer, then one with the lysis buffer containing 500 mM of NaCl and 10 U/mL
1232 RiboLock, one with the wash buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.25 M LiCl, 0.5%

1233 (v/v) NP-40, 0.5% (v/v) sodium deoxycholate, and 5 mM DTT and 10 U/mL RiboLock), and
1234 finally one with TE-DTT (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 5 mM DTT and 10 U/mL
1235 RiboLock) at room temperature. Immunopurified material was eluted by incubating with 100
1236 μ L of 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 1% (v/v) SDS, 5 mM DTT and 10 U/mL
1237 RiboLock at 65°C for 20 min. The eluate was transferred to a fresh tube and pooled with a
1238 final bead wash of 150 μ L of TE with 0.67% (v/v) SDS, 5 mM DTT and 10 U/mL RiboLock. All
1239 samples were reverse crosslinked at 65°C overnight prior to their treatment for 30 min with
1240 100 μ g of Proteinase K (Roche). After addition of 55 μ L of 3 M NaOAc pH 5.2, RNA samples
1241 were extracted once with Acid-Phenol:Chloroform pH 4.5 (25:24:1, Thermofisher), once with
1242 chloroform. Nucleic acids from the recovered upper phase were precipitated in 1 mL 100%
1243 (v/v) ethanol and 2 μ L glycogen (20 mg/ml), incubated at -80°C for 20 min, centrifuged at 4°C
1244 for 20 min and washed once with 70% (v/v) ethanol. Precipitated and washed RNAs were
1245 resuspended in 20 μ L of TE with 5 mM DTT and 10U/mL RiboLock. The purified RNAs were
1246 subjected to analysis by qRT-PCR.

1247 For the MeRIP-qPCR analysis mRNAs were purified using Dynabeads mRNA Direct Kit
1248 (Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. 5 μ g of mRNAs were fragmented
1249 10 minutes at 96°C by alkaline hydrolysis (100 mM bicarbonate buffer pH 9.2). For
1250 immunoprecipitation, 100 μ L of Protein-G Dynabeads were blocked with 1 mL of blocking
1251 solution (1mg/mL BSA, 1X PBS). After two washes, beads were resuspended in 990 μ L of
1252 blocking solution. 10 μ L of m6A primary antibody (Synaptic Systems, 10 μ g/ μ l) was added to
1253 the beads. The mixture was incubated overnight at 4°C under constant agitation. Beads were
1254 then washed 3 times with 1 ml of cold blocking solution. After the final wash, beads were
1255 resuspended in 25 μ L of blocking solution. Fragmented mRNAs were then diluted in 975 μ L of
1256 immunoprecipitation buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% v/v Igepal, 40U RNase
1257 inhibitor) and added to beads. The mixture was then incubated overnight at 4°C under
1258 constant agitation. Beads were washed 2 times with 2 mL of immunoprecipitation buffer, 2
1259 times with 2 mL of low salt washing buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 0.1% v/v Igepal,
1260 0.1% v/v SDS) and 2 times with 2 mL of high salt washing buffer (10 mM Tris-HCl, 500 mM

1261 NaCl, 0.1% v/v Igepal, 0.1% v/v SDS) for a total of 6 washes. Elution was performed 3 times
1262 by adding each time 100 µl of elution buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% v/v
1263 Igepal, 40U RNase inhibitor, 6.7 mM N6-methyladenosine 5' monophosphate sodium salt).
1264 Each time, the mixture was incubated 1 hour at 4°C under constant agitation. Eluted fractions
1265 were then combined and precipitated overnight. After centrifugation, pellets were
1266 resuspended in RNase/DNase free water in a final volume of 15 µL.

1267

1268 **Bioinformatic Analysis for ChIP-seq data**

1269 For analysis of ChIP-seq data, sequencing reads were first filtered, using
1270 fastq_illumina_filter, and quality control of filtered reads was performed using FastQC
1271 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Filtered reads were then aligned
1272 to GRCh38 (Lander et al., 2001) using the Burrows-Wheeler Aligner (BWA, [http://bio-](http://bio-bwa.sourceforge.net/)
1273 [bwa.sourceforge.net/](http://bio-bwa.sourceforge.net/)) with default parameters. The sorted BAM files generated by SAM tools
1274 (<http://www.htslib.org>), keeping only reads with a mapping quality at least 30, were then
1275 normalized by DeepTools (Ramirez et al., 2016) bamCoverage function, with a bin size of 10
1276 bp. RPGC normalization was applied, with an effective genome size of 2913022398,
1277 according to DeepTools' user manual instructions. Files were then further normalized by
1278 subtracting an RPGC normalized input data file, using bigwigCompare. From these
1279 normalized data files, peak calling was performed using NormR's
1280 (<https://doi.org/10.1101/082263>) enrichR function, searching for enrichment of each BAM
1281 file of ChIP-seq reads against the input BAM file, using a False Discovery Rate (FDR)
1282 correction. Genomic Ranges (Lawrence et al., 2013) was then used to determine overlap
1283 between the peak range and genomic features of interest, such as genes with a transcription
1284 start site (TSS) and transcript end site (TES) from GRCh38. Profile matrices were extracted
1285 from the normalized data files using DeepTools' computeMatrix, using a bin size of 10 bp.
1286 Profiles were generated from -5kb of TSSs up to 5 kb after TESs. Further quantification of
1287 the normalized ChIP-seq reads was calculated from the start to end positions of gene bodies
1288 +/- 500 bp. Genomic elements and protein coding genes were obtained from Ensembl.

1289 Protein binding variation between conditions was calculated using Z-scores, which were
1290 calculated as follows: $Z\text{-score} = (HS - NHS) / \sqrt{((HS + NHS) / 2)}$ (*i.e.*, difference weighted
1291 by mean signal), which transforms the distribution of variations into a normal distribution,
1292 allowing for better statistical interpretation of the variations. Average binding profiles of
1293 proteins across genomic features of interest were generated using seqplots'
1294 (DOI:10.18129/B9.bioc.seqplots) plotAverage function.

1295 Decile matrices were created using color2D matplot from the plotrix package
1296 (<https://www.rdocumentation.org/packages/plotrix/versions/3.7-7>). Decile matrices were
1297 generated by ranking genes by Z-score of variation of RNAPII or YTHDC1 binding in HS
1298 versus NHS condition, followed by distribution by deciles. The number of genes in each
1299 decile, for both RNAPII and YTHDC1 variation, was used to generate a matrix (10 x 10). The
1300 number of genes in each intersection was tested for significance (number of genes found
1301 compared to expected) by hypergeometric test, generating a 10x10 matrix of p-values.

1302

1303 **Bioinformatic analysis of RNA-seq data**

1304 Raw reads were trimmed using Trimmomatic v0.39 (Bolger et al., 2014). Trimmed reads
1305 were filtered out read corresponding to mitochondrial sequences using bowtie2 v2.3.5
1306 (Langmead and Salzberg, 2012) in 'sensitive-local' mode. Reads mapping against GRCh38
1307 genome without gtf file was performed using Hisat2 v2.1.0 (Kim et al., 2015). Read count
1308 was performed using htseq-count v0.12.4 (Anders et al., 2015) in 'union' mode and
1309 normalized by total of mapped reads (reads per millions, rpm). Differential analysis was
1310 performed using Bioconductor R v4.1.2 package DESeq2 (Love et al., 2014) with a false
1311 discovery rate of 0.05. P values were corrected for multiple tests by the Benjamini-Hochberg
1312 rule (adjusted P value).

1313 Readthrough analysis. Counting of reads in the gene region or the 3 prime region (15 kb
1314 after the end of the gene) was performed by bedtools coverage v2.30.0 (Kim et al., 2015).
1315 Normalization was applied by dividing by the total mapped reads and the gene length (rpkm).
1316 To optimize the difference between region and condition, for each gene the difference was
1317 calculated between the Log2 of the mean count region and the mean of all Log2 counts in

1318 the 9 conditions. This difference was divided by the standard deviation of the Log₂ counts in
1319 the 9 conditions. The ratio of the RNA-seq reads of the 15 kb downstream the 3'UTR
1320 (Downstream) over the gene body (GB) was then calculated as follow $[[\text{Log}_2(\text{Reads}$
1321 $\text{Downstream}_n) - \text{mean}(\text{Log}_2\text{ReadsDownstream}_{n1-9})] / \text{sd}(\text{Log}_2\text{ReadsDownstream}_{n1-9})] -$
1322 $[[\text{Log}_2(\text{Reads GB}_n) - \text{mean}(\text{Log}_2\text{ReadsGB}_{n1-9})] / \text{sd}(\text{Log}_2\text{ReadsGB}_{n1-9})]$, where “n” corresponds to
1323 a given condition in which the reads over the corresponding regions are counted and “n1-9”
1324 corresponds to all 9 conditions taken together for the same gene. This value corresponds to
1325 normcount. The heat map was made by the geom_tile function in the ggplots2/tidyverse
1326 package (Wickham, 2016).

1327 Detecting intron retention from RNA-Seq experiments. Intron retention study were performed
1328 using IRFinder 1.3.0 (Middleton et al., 2017). The raw counts files were produced from fastq
1329 files using IRFinder binary with option -r REF/Human-GRCh38-release100 where
1330 REF/Human-GRCh38-release100 is the genome reference index provided by IRFinder
1331 authors (<https://github.com/williamritchie/IRFinder>). Delta_IR HS/NHS (resp. Delta_IR
1332 R/NHS) for a given condition (WT, YTHDC1 KD or METTL3 KD) is the result of the statistical
1333 analysis HS vs. NHS (ref.) (resp. R vs. NHS (ref.)) performed by DESeq2 (Anders and
1334 Huber, 2010; Love et al., 2014) and R (R Core Team. R: A language and environment for
1335 statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2017) script
1336 provided by IRFinder authors (<https://github.com/williamritchie/IRFinder>) in this condition.
1337 Only IR presenting variations between conditions in WT were kept, IR presenting variations
1338 meaning introns with $-\text{Log}_{10}(\text{padj}) > (-10 \text{ IR.changes} + 6)$, or $-\text{Log}_{10}(\text{padj}) > (10 \text{ IR.changes} +$
1339 $4)$ for HS vs. NHS (ref.) model, or $-\text{Log}_{10}(\text{padj}) > (-10 \text{ IR.changes} + 4)$, or $-\text{Log}_{10}(\text{padj}) > (10$
1340 $\text{IR.changes} + 2)$ for R vs. NHS (ref.) model, padj meaning 5% FDR adjusted p-values
1341 according to Benjamini-Hochberg procedure.

1342 1343 **Mass spectrometry (MS)-based quantitative proteomic analyses**

1344 Eluted proteins were separated by SDS-PAGE (4-12% NuPAGE, Life Technologies) and
1345 stained with Coomassie blue R-250 (Bio-Rad) before in-gel digestion using modified trypsin
1346 (Promega, sequencing grade) as previously described (Salvetti et al., 2016). For each

1347 sample, bands corresponding to light and heavy chains of immunoglobulins were processed
1348 separately from the rest. Resulting peptides were analyzed by online nanoliquid
1349 chromatography coupled to tandem MS (UltiMate 3000 and LTQ-Orbitrap Velos Pro, Thermo
1350 Scientific). Peptides were sampled on a 300 μm x 5 mm PepMap C18 precolumn and
1351 separated on a 75 μm x 250 mm C18 column (PepMap, Thermo Scientific) using a 25-min
1352 gradient for immunoglobulin-containing bands and a 120-min gradient for the rest of the
1353 eluates. MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Scientific).
1354 Peptides and proteins were identified and quantified using MaxQuant (version 1.5.3.30,
1355 (Tyanova et al., 2016) using the Uniprot database (Homo sapiens taxonomy, April 2017
1356 version) and the frequently observed contaminant database embedded in MaxQuant. Trypsin
1357 was chosen as the enzyme and 2 missed cleavages were allowed. Peptide modifications
1358 allowed during the search were: carbamidomethylation (C, fixed), acetyl (Protein N-ter,
1359 variable) and oxidation (M, variable). Minimum peptide length was set to 7 amino acids.
1360 Minimum number of peptides and razor + unique peptides were set to 1. Maximum false
1361 discovery rates - calculated by employing a reverse database strategy - were set to 0.01 at
1362 peptide and protein levels.
1363 Statistical analyses were performed using ProStaR (Wieczorek et al., 2017). Proteins
1364 identified in the reverse and contaminant databases, proteins only identified by site,
1365 immunoglobulin chains, and proteins exhibiting less than 3 intensity values in one condition
1366 were discarded from the list. After log₂ transformation, intensity values were normalized by
1367 median centering before missing value imputation (slsa algorithm for partially observed
1368 values in the condition and DetQuantile algorithm for totally absent values in the condition);
1369 statistical testing was conducted using Limma test. Differentially-expressed proteins were
1370 sorted out using a log₂ (fold change) cut-off of 2 and a p-value cut-off of 0.01, allowing to
1371 reach a FDR inferior to 2% according to the Benjamini-Hochberg procedure.

1372

1373 **Data and materials availability**

1374 ChIP-seq data have been deposited at GEO under GSE166456 for YTHDC1 and GSE
1375 143591 for RNAPII. The accession number for the RNA-seq data reported in this article is
1376 NCBI Bioproject PRJNA773186.

1377 **References**

- 1378 Akerfelt, M., Morimoto, R.I., and Sistonen, L. (2010). Heat shock factors: integrators of cell
1379 stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 545-555.
- 1380 Alasady, M.J., and Mendillo, M.L. (2020). The Multifaceted Role of HSF1 in Tumorigenesis.
1381 *Adv Exp Med Biol* 1243, 69-85.
- 1382 Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data.
1383 *Genome Biol* 11, R106.
- 1384 Anders, S., Pyl, P.T., and Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-
1385 throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31, 166-169.
- 1386 Biamonti, G., and Vourc'h, C. (2010). Nuclear stress bodies. *Cold Spring Harbor*
1387 *perspectives in biology* 2, a000695.
- 1388 Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina
1389 sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114-2120.
- 1390 Col, E., Hoghoughi, N., Dufour, S., Penin, J., Koskas, S., Faure, V., Ouzounova, M.,
1391 Hernandez-Vargash, H., Reynoird, N., Daujat, S., *et al.* (2017). Bromodomain factors of
1392 BET family are new essential actors of pericentric heterochromatin transcriptional
1393 activation in response to heat shock. *Sci Rep* 7, 5418.
- 1394 Cotto, J., Fox, S., and Morimoto, R. (1997). HSF1 granules: a novel stress-induced nuclear
1395 compartment of human cells. *J Cell Sci* 110 (Pt 23), 2925-2934.
- 1396 Dai, C. (2018). The heat-shock, or HSF1-mediated proteotoxic stress, response in cancer:
1397 from proteomic stability to oncogenesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 373.
- 1398 Denegri, M., Chiodi, I., Corioni, M., Cobianchi, F., Riva, S., and Biamonti, G. (2001). Stress-
1399 induced nuclear bodies are sites of accumulation of pre-mRNA processing factors. *Mol*
1400 *Biol Cell* 12, 3502-3514.
- 1401 Duan, H.C., Wang, Y., and Jia, G. (2019). Dynamic and reversible RNA N(6) -
1402 methyladenosine methylation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 10, e1507.
- 1403 Engel, M., Eggert, C., Kaplick, P.M., Eder, M., Roh, S., Tietze, L., Namendorf, C., Arloth, J.,
1404 Weber, P., Rex-Haffner, M., *et al.* (2018). The Role of m(6)A/m-RNA Methylation in
1405 Stress Response Regulation. *Neuron* 99, 389-403 e389.
- 1406 Gomez-Pastor, R., Burchfiel, E.T., and Thiele, D.J. (2018). Regulation of heat shock
1407 transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*
1408 19, 4-19.
- 1409 Harigaya, Y., Tanaka, H., Yamanaka, S., Tanaka, K., Watanabe, Y., Tsutsumi, C.,
1410 Chikashige, Y., Hiraoka, Y., Yamashita, A., and Yamamoto, M. (2006). Selective
1411 elimination of messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis. *Nature* 442,
1412 45-50.
- 1413 Hiriart, E., and Verdel, A. (2013). Long noncoding RNA-based chromatin control of germ cell
1414 differentiation: a yeast perspective. *Chromosome Res* 21, 653-663.
- 1415 Huang, H., Weng, H., and Chen, J. (2020). The Biogenesis and Precise Control of RNA
1416 m(6)A Methylation. *Trends Genet* 36, 44-52.
- 1417 Hussong, M., Kaehler, C., Kerick, M., Grimm, C., Franz, A., Timmermann, B., Welzel, F.,
1418 Isensee, J., Hucho, T., Krobitsch, S., *et al.* (2017). The bromodomain protein BRD4
1419 regulates splicing during heat shock. *Nucleic Acids Res* 45, 382-394.
- 1420 Jolly, C., Konecny, L., Grady, D.L., Kutsikova, Y.A., Cotto, J.J., Morimoto, R.I., and Vourc'h,
1421 C. (2002). In vivo binding of active heat shock transcription factor 1 to human
1422 chromosome 9 heterochromatin during stress. *J Cell Biol* 156, 775-781.
- 1423 Jolly, C., Metz, A., Govin, J., Vigneron, M., Turner, B.M., Khochbin, S., and Vourc'h, C.
1424 (2004). Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol* 164, 25-33.
- 1425 Jolly, C., and Morimoto, R.I. (2000). Role of the heat shock response and molecular
1426 chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 92, 1564-1572.
- 1427 Joutsen, J., and Sistonen, L. (2019). Tailoring of Proteostasis Networks with Heat Shock
1428 Factors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11.
- 1429 Kampinga, H.H. (2006). Chaperones in preventing protein denaturation in living cells and
1430 protecting against cellular stress. *Handb Exp Pharmacol*, 1-42.

1431 Kasowitz, S.D., Ma, J., Anderson, S.J., Leu, N.A., Xu, Y., Gregory, B.D., Schultz, R.M., and
1432 Wang, P.J. (2018). Nuclear m6A reader YTHDC1 regulates alternative polyadenylation
1433 and splicing during mouse oocyte development. *PLoS Genet* 14, e1007412.

1434 Ke, S., Pandya-Jones, A., Saito, Y., Fak, J.J., Vagbo, C.B., Geula, S., Hanna, J.H., Black,
1435 D.L., Darnell, J.E., Jr., and Darnell, R.B. (2017). m(6)A mRNA modifications are
1436 deposited in nascent pre-mRNA and are not required for splicing but do specify
1437 cytoplasmic turnover. *Genes Dev* 31, 990-1006.

1438 Kim, D., Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low
1439 memory requirements. *Nat Methods* 12, 357-360.

1440 Knuckles, P., Carl, S.H., Musheev, M., Niehrs, C., Wenger, A., and Buhler, M. (2017). RNA
1441 fate determination through cotranscriptional adenosine methylation and microprocessor
1442 binding. *Nat Struct Mol Biol* 24, 561-569.

1443 Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K.,
1444 Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the
1445 human genome. *Nature* 409, 860-921.

1446 Lang, B.J., Guerrero-Gimenez, M.E., Prince, T.L., Ackerman, A., Bonorino, C., and
1447 Calderwood, S.K. (2019). Heat Shock Proteins Are Essential Components in
1448 Transformation and Tumor Progression: Cancer Cell Intrinsic Pathways and Beyond.
1449 *Int J Mol Sci* 20.

1450 Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat*
1451 *Methods* 9, 357-359.

1452 Lawrence, M., Huber, W., Pages, H., Aboyoun, P., Carlson, M., Gentleman, R., Morgan,
1453 M.T., and Carey, V.J. (2013). Software for computing and annotating genomic ranges.
1454 *PLoS Comput Biol* 9, e1003118.

1455 Lee, Y., Choe, J., Park, O.H., and Kim, Y.K. (2020). Molecular Mechanisms Driving mRNA
1456 Degradation by m(6)A Modification. *Trends Genet* 36, 177-188.

1457 Lellahi, S.M., Rosenlund, I.A., Hedberg, A., Kiaer, L.T., Mikkola, I., Knutsen, E., and
1458 Perander, M. (2018). The long noncoding RNA NEAT1 and nuclear paraspeckles are
1459 up-regulated by the transcription factor HSF1 in the heat shock response. *J Biol Chem*
1460 293, 18965-18976.

1461 Lesbirel, S., Viphakone, N., Parker, M., Parker, J., Heath, C., Sudbery, I., and Wilson, S.A.
1462 (2018). The m(6)A-methylase complex recruits TREX and regulates mRNA export. *Sci*
1463 *Rep* 8, 13827.

1464 Li, Y., Xia, L., Tan, K., Ye, X., Zuo, Z., Li, M., Xiao, R., Wang, Z., Liu, X., Deng, M., *et al.*
1465 (2020). N(6)-Methyladenosine co-transcriptionally directs the demethylation of histone
1466 H3K9me2. *Nat Genet* 52, 870-877.

1467 Lindquist, S. (1981). Regulation of protein synthesis during heat shock. *Nature* 293, 311-314.

1468 Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and
1469 dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550.

1470 Mahat, D.B., and Lis, J.T. (2017). Use of conditioned media is critical for studies of regulation
1471 in response to rapid heat shock. *Cell Stress Chaperones* 22, 155-162.

1472 Mahat, D.B., Salamanca, H.H., Duarte, F.M., Danko, C.G., and Lis, J.T. (2016). Mammalian
1473 Heat Shock Response and Mechanisms Underlying Its Genome-wide Transcriptional
1474 Regulation. *Mol Cell* 62, 63-78.

1475 Metz, A., Soret, J., Vourc'h, C., Tazi, J., and Jolly, C. (2004). A key role for stress-induced
1476 satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress
1477 granules. *J Cell Sci* 117, 4551-4558.

1478 Meyer, K.D., Patil, D.P., Zhou, J., Zinoviev, A., Skabkin, M.A., Elemento, O., Pestova, T.V.,
1479 Qian, S.B., and Jaffrey, S.R. (2015). 5' UTR m(6)A Promotes Cap-Independent
1480 Translation. *Cell* 163, 999-1010.

1481 Middleton, R., Gao, D., Thomas, A., Singh, B., Au, A., Wong, J.J., Bomane, A., Cosson, B.,
1482 Eyraas, E., Rasko, J.E., *et al.* (2017). IRFinder: assessing the impact of intron retention
1483 on mammalian gene expression. *Genome Biol* 18, 51.

1484 Morimoto, R.I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk
1485 between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative
1486 regulators. *Genes Dev* 12, 3788-3796.

1487 Ninomiya, K., Adachi, S., Natsume, T., Iwakiri, J., Terai, G., Asai, K., and Hirose, T. (2020).
1488 LncRNA-dependent nuclear stress bodies promote intron retention through SR protein
1489 phosphorylation. *EMBO J* 39, e102729.

1490 Ninomiya, K., Iwakiri, J., Aly, M.K., Sakaguchi, Y., Adachi, S., Natsume, T., Terai, G., Asai,
1491 K., Suzuki, T., and Hirose, T. (2021). m(6) A modification of HSATIII lncRNAs regulates
1492 temperature-dependent splicing. *EMBO J* 40, e107976.

1493 Ninomiya, K., Kataoka, N., and Hagiwara, M. (2011). Stress-responsive maturation of Clk1/4
1494 pre-mRNAs promotes phosphorylation of SR splicing factor. *J Cell Biol* 195, 27-40.

1495 Parker, M.T., Knop, K., Sherwood, A.V., Schurch, N.J., Mackinnon, K., Gould, P.D., Hall,
1496 A.J., Barton, G.J., and Simpson, G.G. (2020). Nanopore direct RNA sequencing maps
1497 the complexity of Arabidopsis mRNA processing and m(6)A modification. *Elife* 9.

1498 Pirkkala, L., Nykanen, P., and Sistonen, L. (2001). Roles of the heat shock transcription
1499 factors in regulation of the heat shock response and beyond. *FASEB J* 15, 1118-1131.

1500 Puustinen, M.C., and Sistonen, L. (2020). Molecular Mechanisms of Heat Shock Factors in
1501 Cancer. *Cells* 9.

1502 Ramirez, F., Ryan, D.P., Gruning, B., Bhardwaj, V., Kilpert, F., Richter, A.S., Heyne, S.,
1503 Dundar, F., and Manke, T. (2016). deepTools2: a next generation web server for deep-
1504 sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res* 44, W160-165.

1505 Richter, K., Haslbeck, M., and Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge
1506 of death. *Mol Cell* 40, 253-266.

1507 Rizzi, N., Denegri, M., Chiodi, I., Corioni, M., Valgardsdottir, R., Cobianchi, F., Riva, S., and
1508 Biamonti, G. (2004). Transcriptional activation of a constitutive heterochromatic domain
1509 of the human genome in response to heat shock. *Mol Biol Cell* 15, 543-551.

1510 Saavedra, C., Tung, K.S., Amberg, D.C., Hopper, A.K., and Cole, C.N. (1996). Regulation of
1511 mRNA export in response to stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 10,
1512 1608-1620.

1513 Salifou, K., Burnard, C., Basavarajaiah, P., Helsmoortel, M., Mac, V., Depierre, D., Grasso,
1514 G., Franckhauser, C., Beyne, E., Contreras, X., *et al.* (2020). Chromatin-associated
1515 MRN complex protects highly transcribing genes from genomic instability. *bioRxiv*,
1516 2020.2005.2027.118638.

1517 Salvetti, A., Coute, Y., Epstein, A., Arata, L., Kraut, A., Navratil, V., Bouvet, P., and Greco, A.
1518 (2016). Nuclear Functions of Nucleolin through Global Proteomics and Interactomic
1519 Approaches. *J Proteome Res* 15, 1659-1669.

1520 Sandqvist, A., Bjork, J.K., Akerfelt, M., Chitikova, Z., Grichine, A., Vourc'h, C., Jolly, C.,
1521 Salminen, T.A., Nymalm, Y., and Sistonen, L. (2009). Heterotrimerization of heat-shock
1522 factors 1 and 2 provides a transcriptional switch in response to distinct stimuli. *Mol Biol*
1523 *Cell* 20, 1340-1347.

1524 Shalgi, R., Hurt, J.A., Krykbaeva, I., Taipale, M., Lindquist, S., and Burge, C.B. (2013).
1525 Widespread regulation of translation by elongation pausing in heat shock. *Mol Cell* 49,
1526 439-452.

1527 Shalgi, R., Hurt, J.A., Lindquist, S., and Burge, C.B. (2014). Widespread inhibition of
1528 posttranscriptional splicing shapes the cellular transcriptome following heat shock. *Cell*
1529 *reports* 7, 1362-1370.

1530 Shi, H., Wei, J., and He, C. (2019). Where, When, and How: Context-Dependent Functions
1531 of RNA Methylation Writers, Readers, and Erasers. *Mol Cell* 74, 640-650.

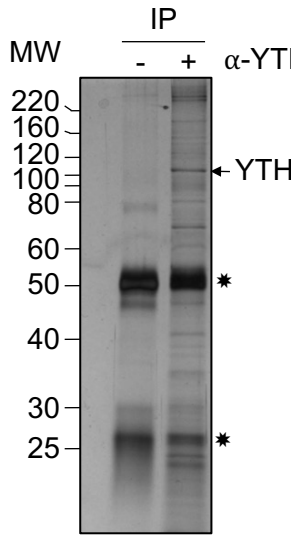
1532 Slobodin, B., Han, R., Calderone, V., Vrieling, J., Loayza-Puch, F., Elkon, R., and Agami, R.
1533 (2017). Transcription Impacts the Efficiency of mRNA Translation via Co-transcriptional
1534 N6-adenosine Methylation. *Cell* 169, 326-337 e312.

1535 Tabuchi, Y., Takasaki, I., Wada, S., Zhao, Q.L., Hori, T., Nomura, T., Ohtsuka, K., and
1536 Kondo, T. (2008). Genes and genetic networks responsive to mild hyperthermia in
1537 human lymphoma U937 cells. *Int J Hyperthermia* 24, 613-622.

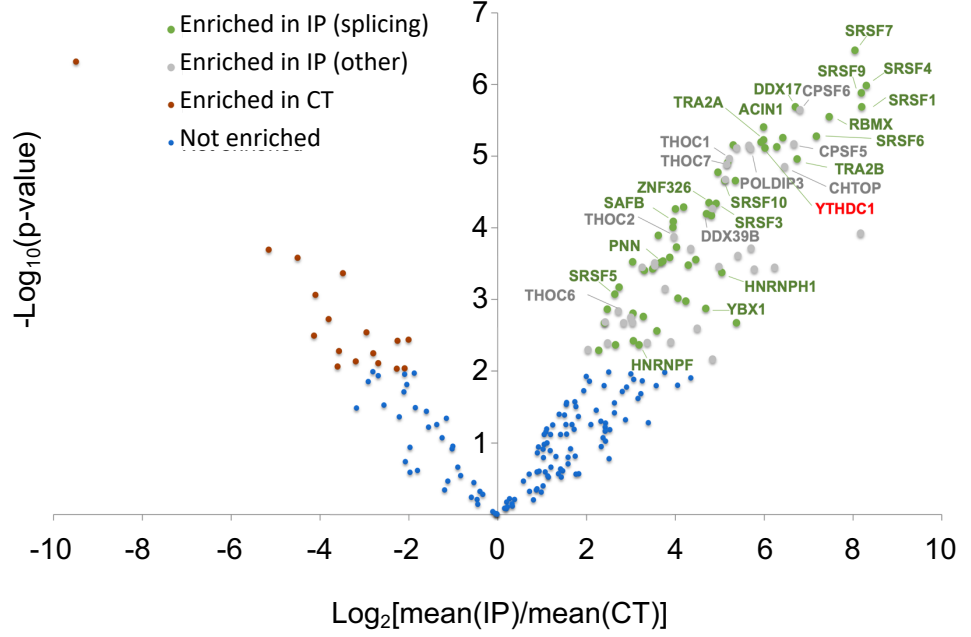
1538 Touat-Todeschini, L., Shichino, Y., Dangin, M., Thierry-Mieg, N., Gilquin, B., Hiriart, E.,
1539 Sachidanandam, R., Lambert, E., Brettschneider, J., Reuter, M., *et al.* (2017). Selective
1540 termination of lncRNA transcription promotes heterochromatin silencing and cell
1541 differentiation. *EMBO J* 36, 2626-2641.

Figure 1.

A



B



C

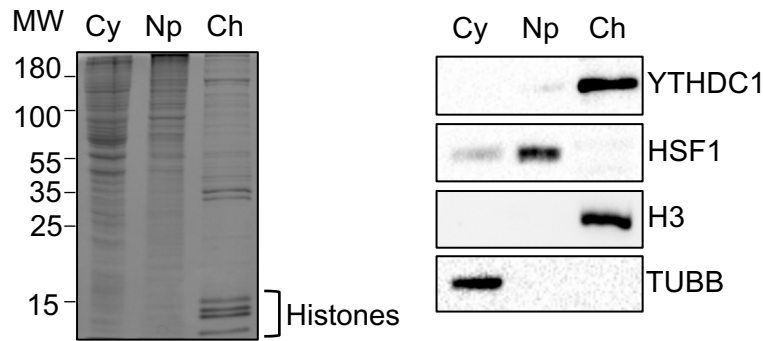


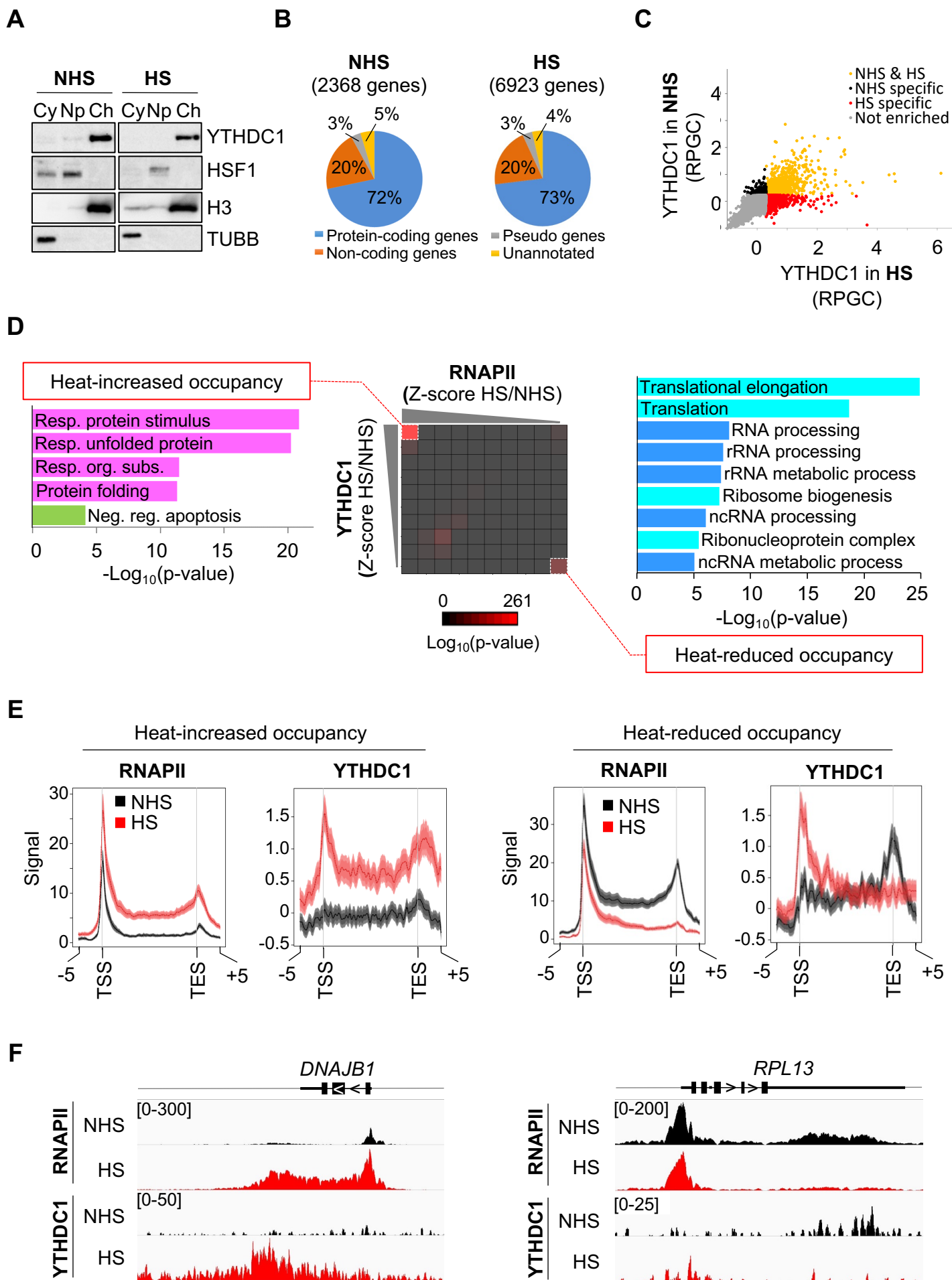
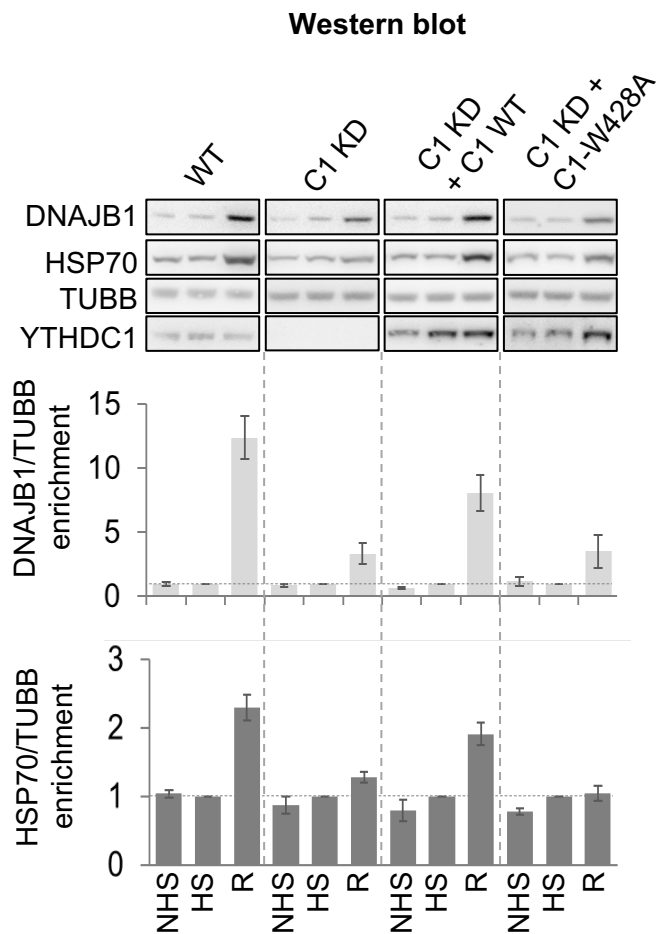
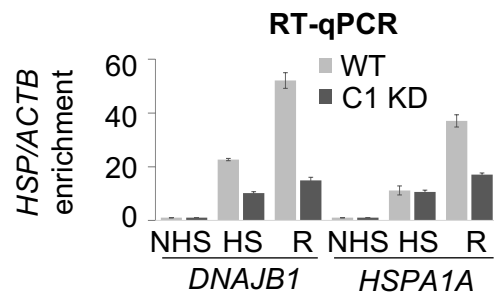
Figure 2.

Figure 3.

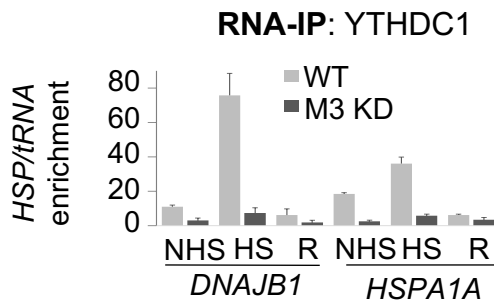
A



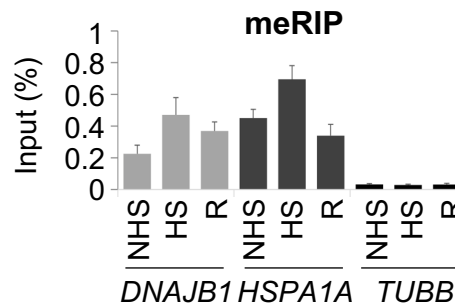
B



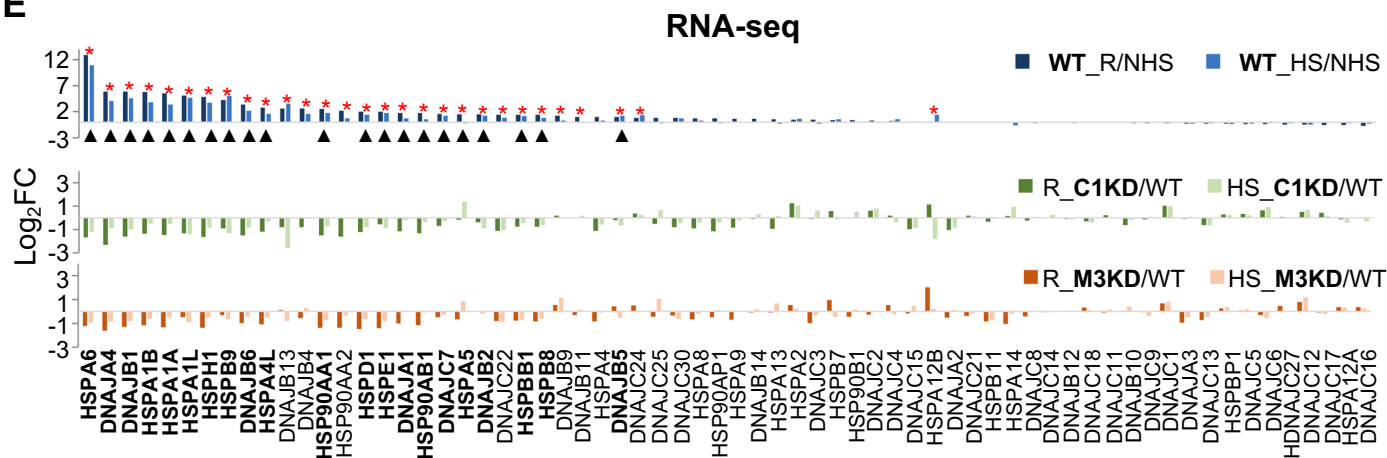
C



D



E



* HSP with heat-increased RNA level, ▲ targeted by YTHDC1 and deregulated in both C1 KD & M3 KD

F

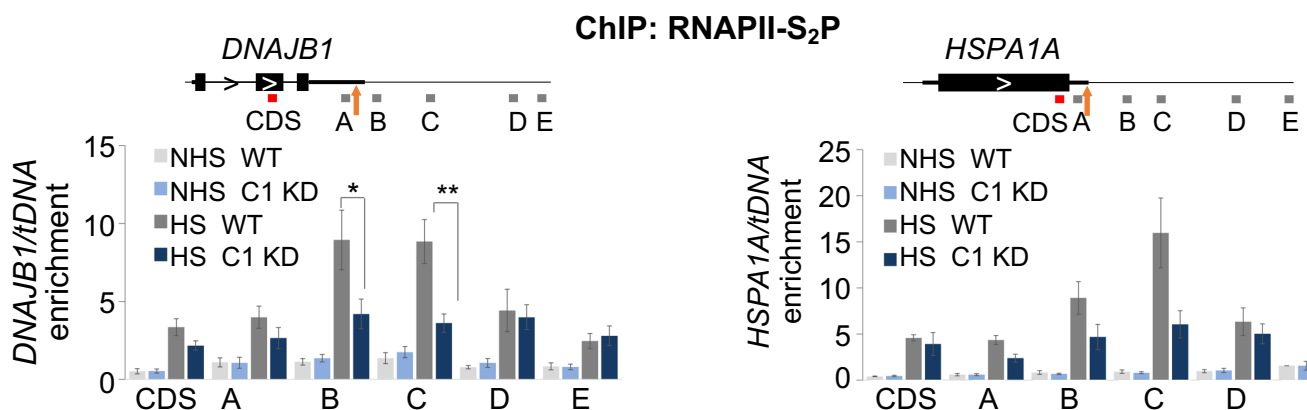


Figure 4.

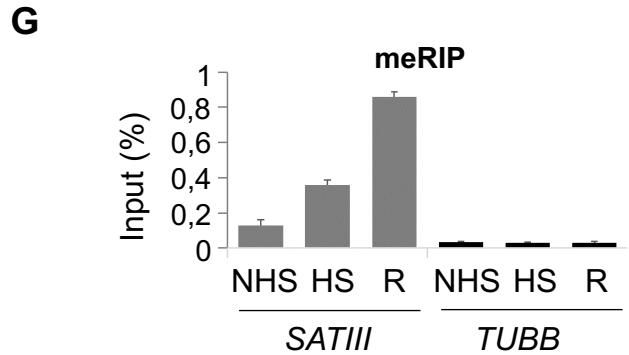
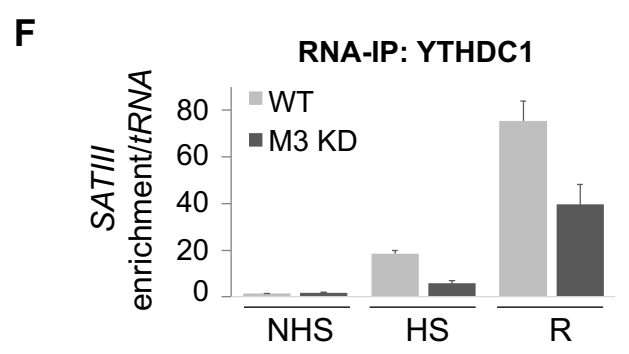
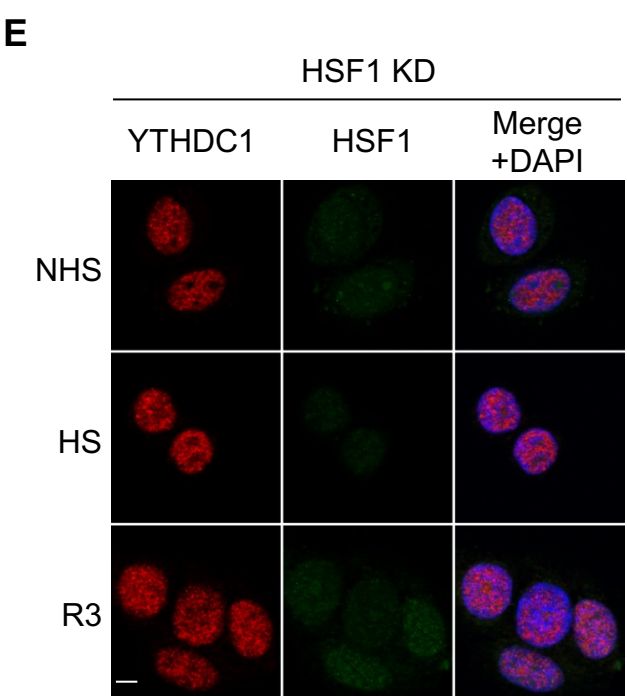
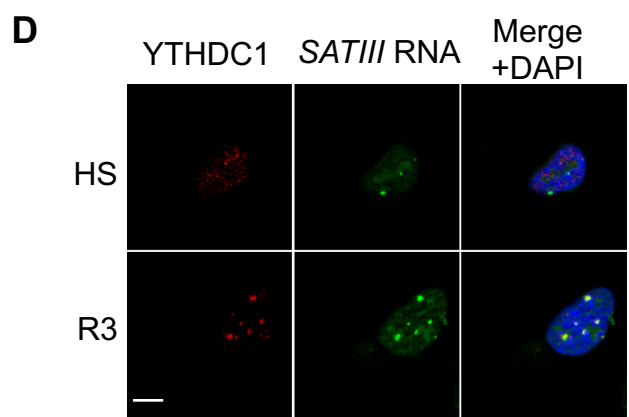
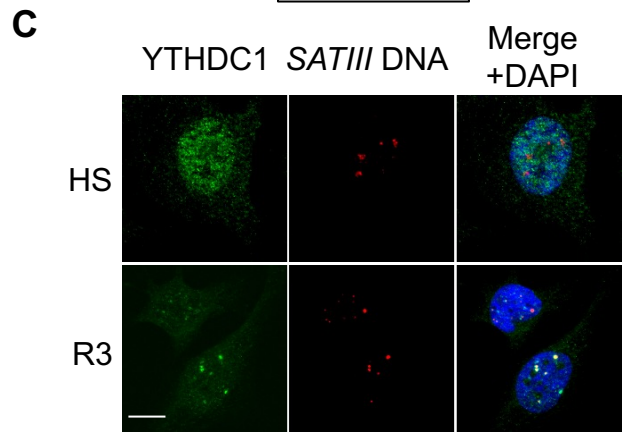
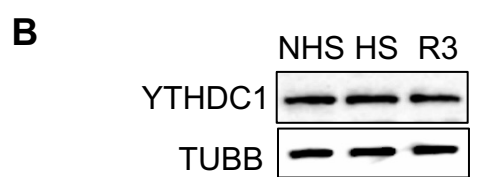
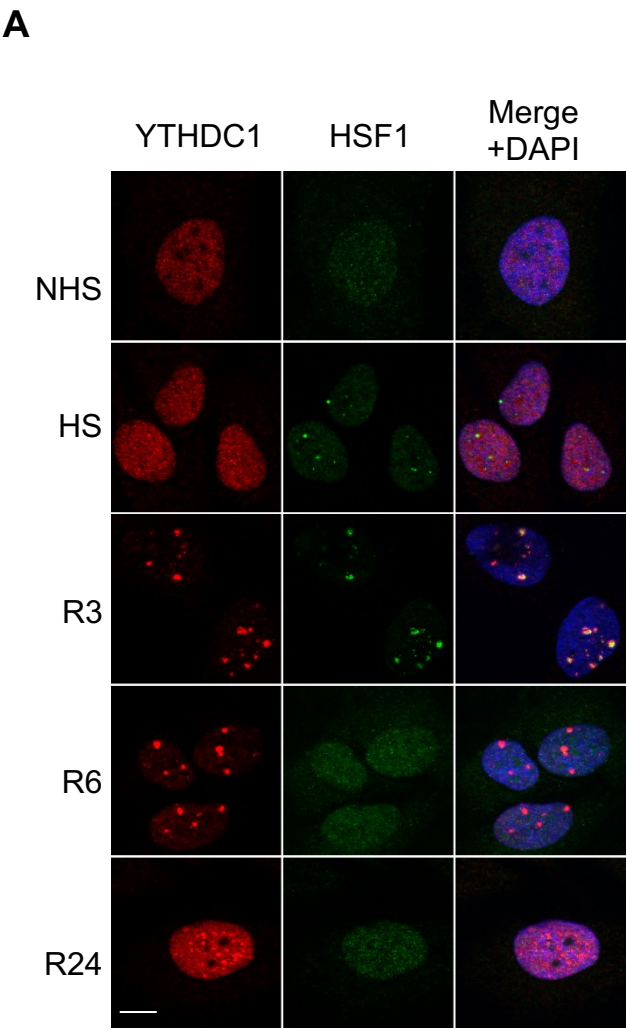
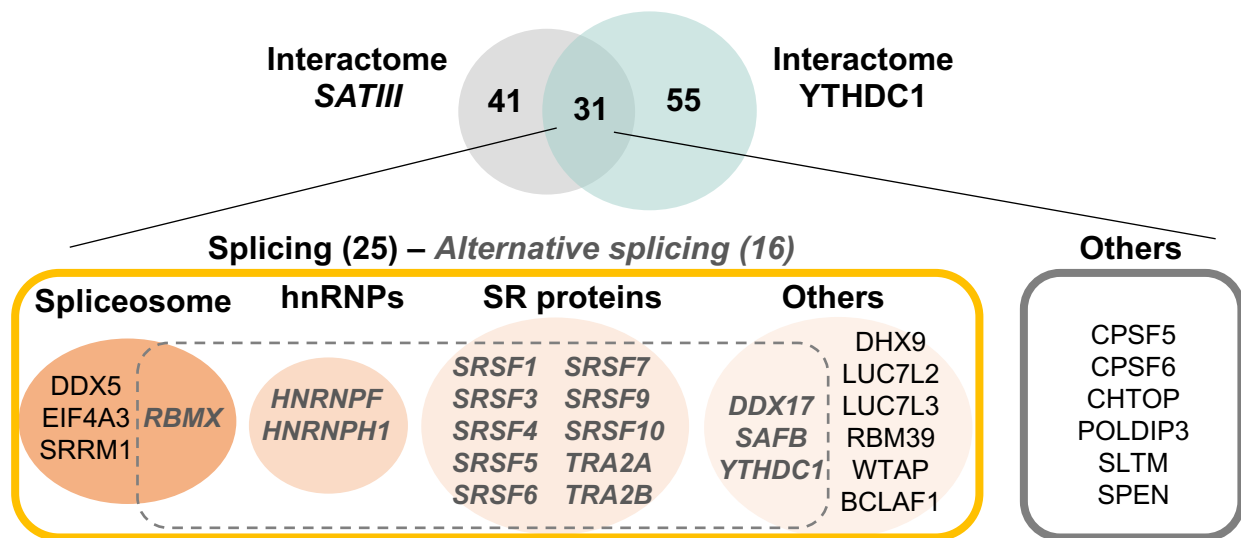
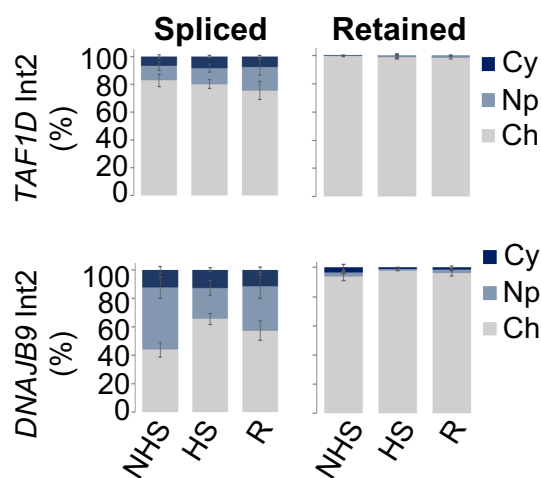


Figure 5.

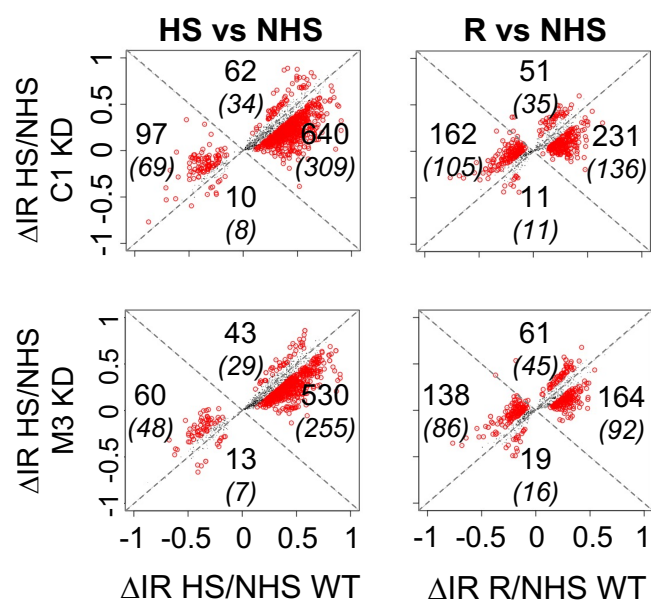
A



B

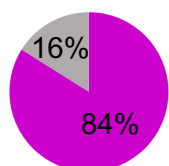


C



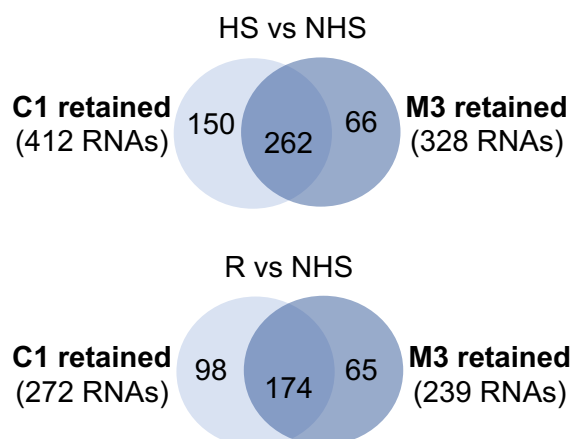
D

C1 retained introns



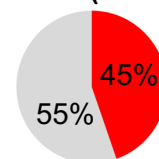
■ In HS
■ In HS & R

E

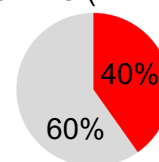


F

HS vs NHS (262 RNAs)



R vs NHS (174 RNAs)



■ **C1 target genes in HS**
■ Not C1 target

Figure 6

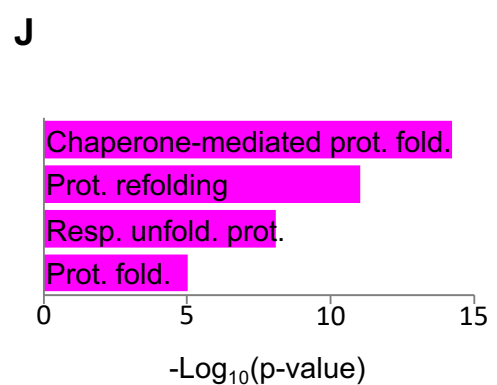
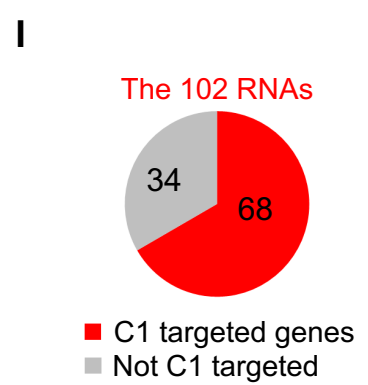
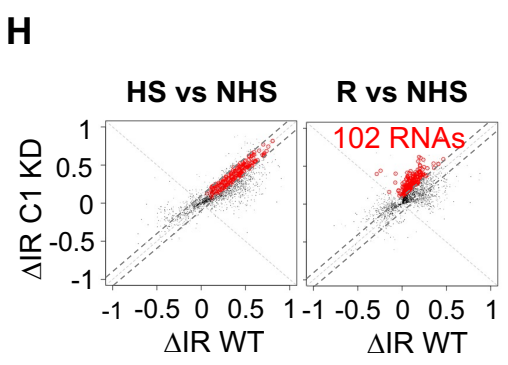
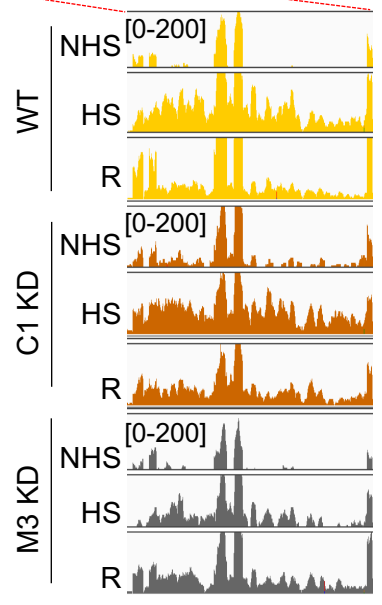
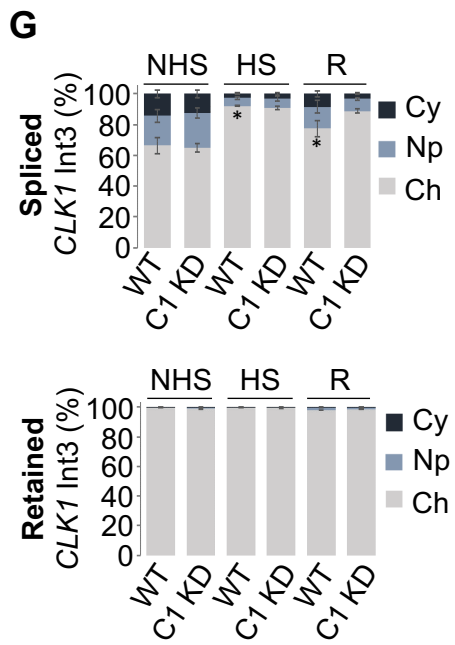
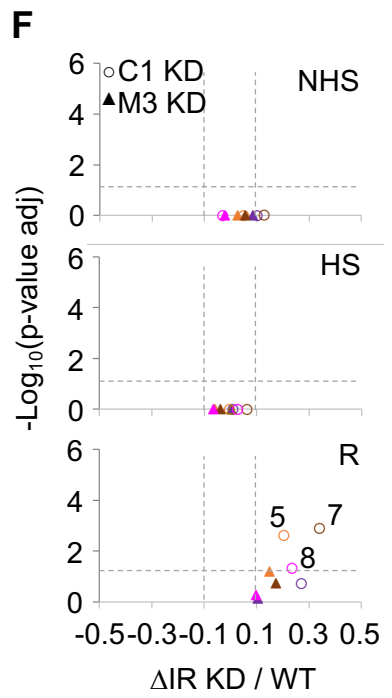
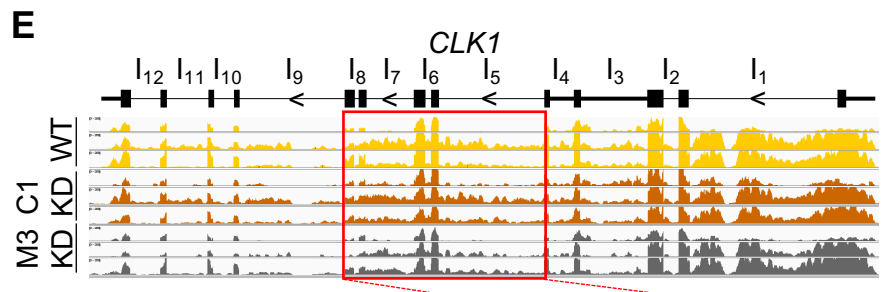
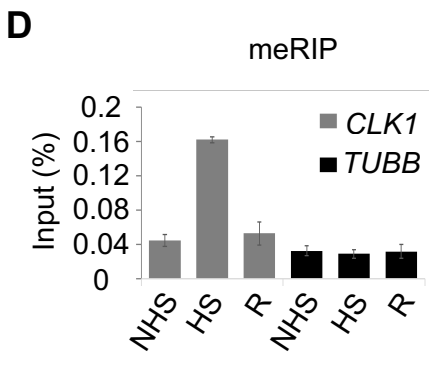
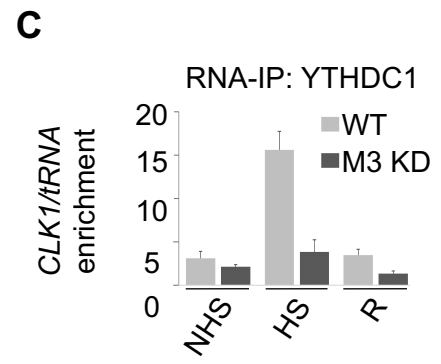
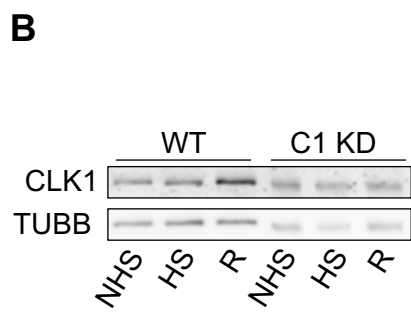
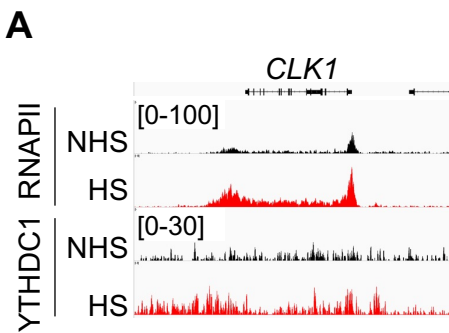
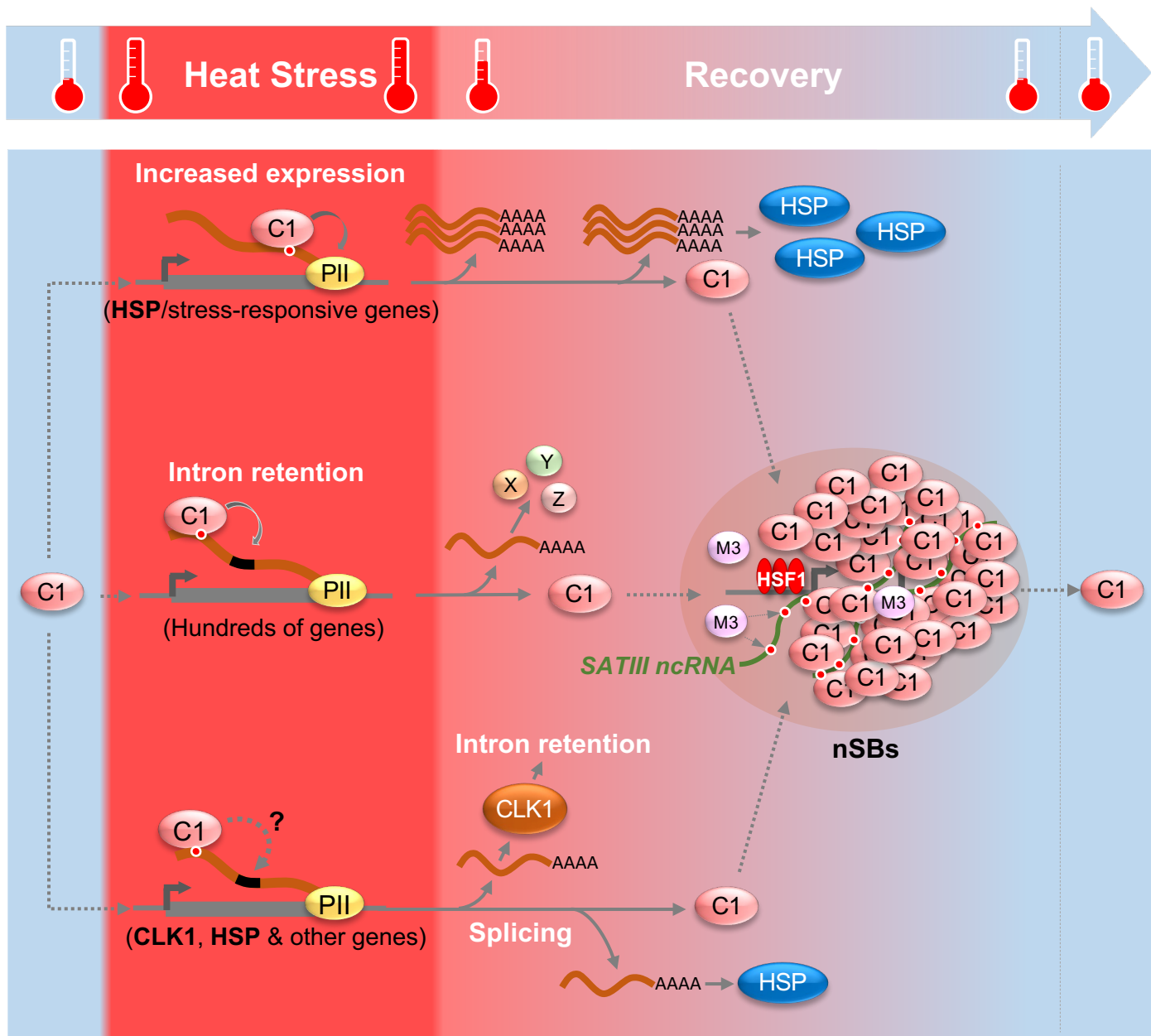
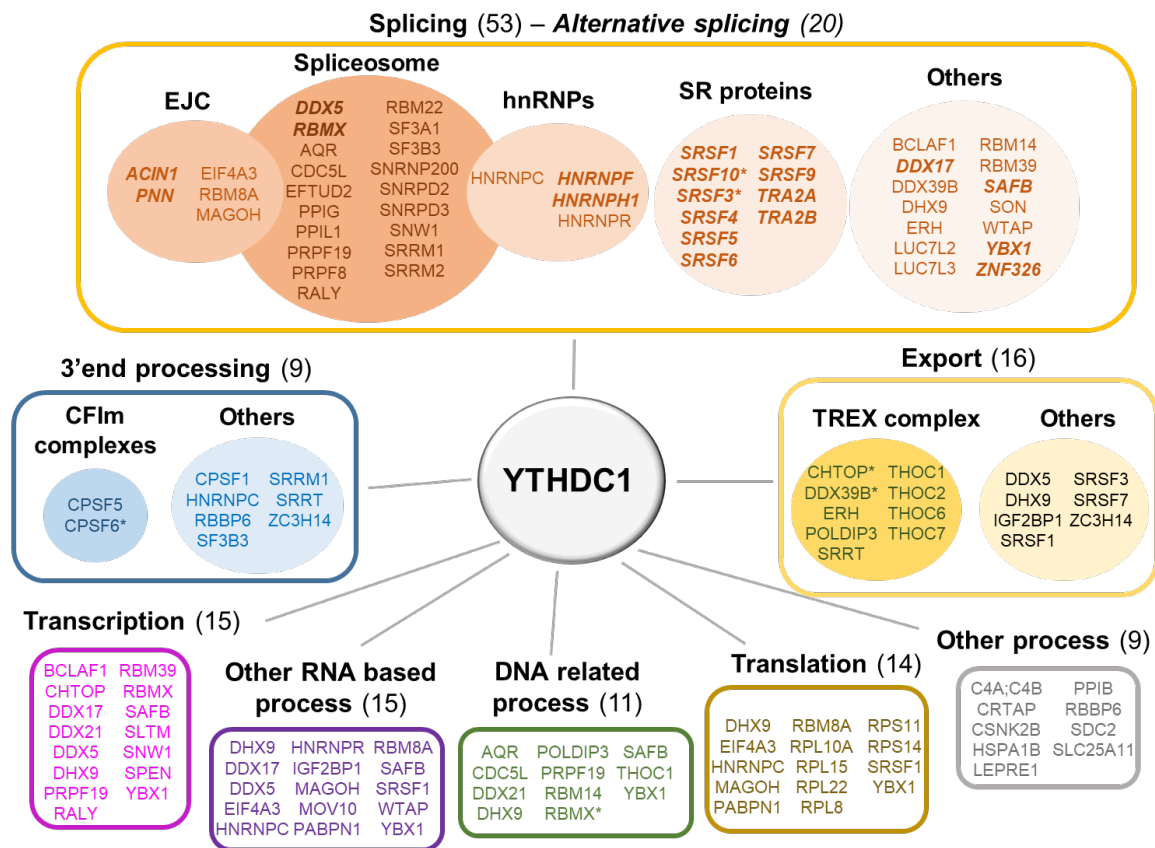


Figure 7.

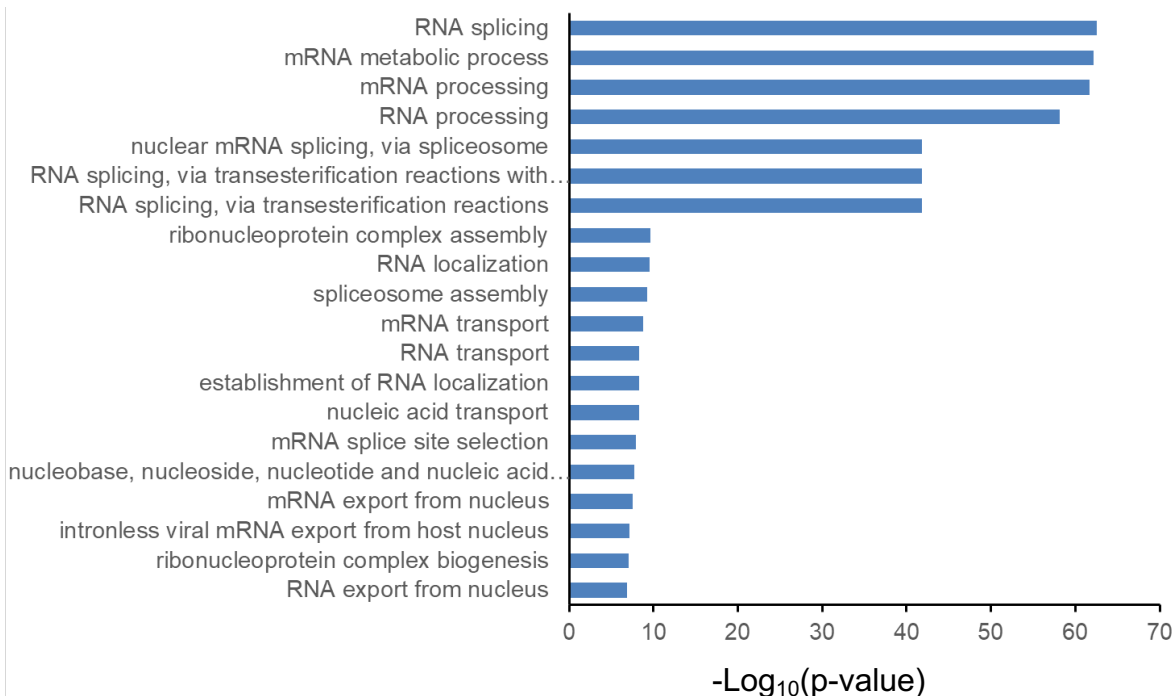


Sup Figure 1 (related to Figure 1).

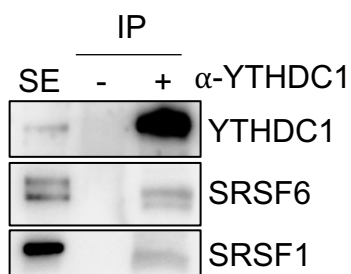
A



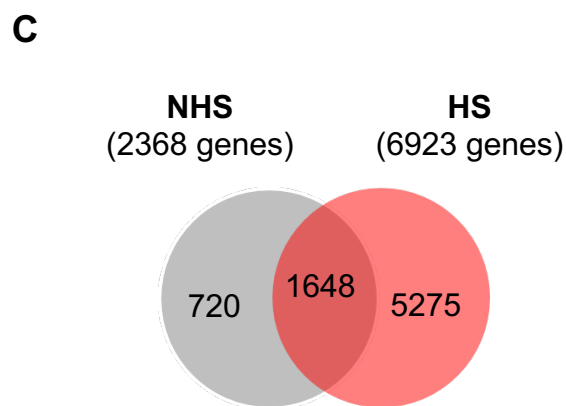
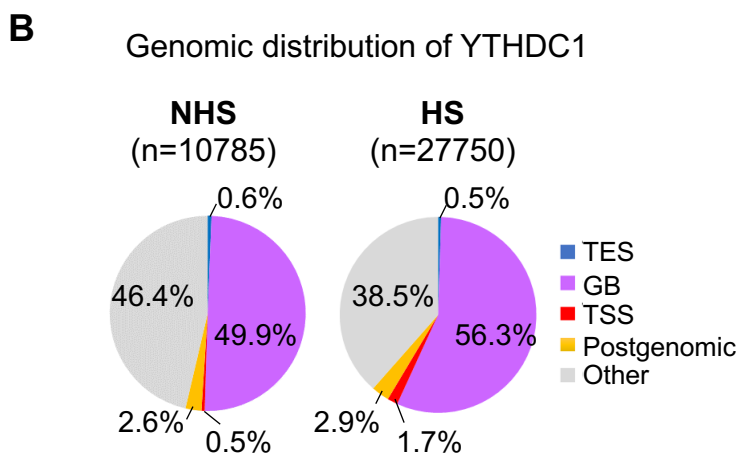
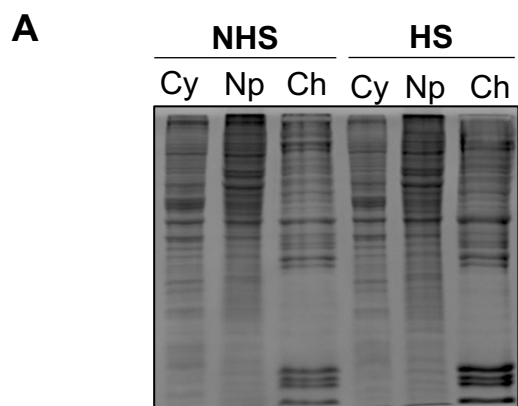
B



C

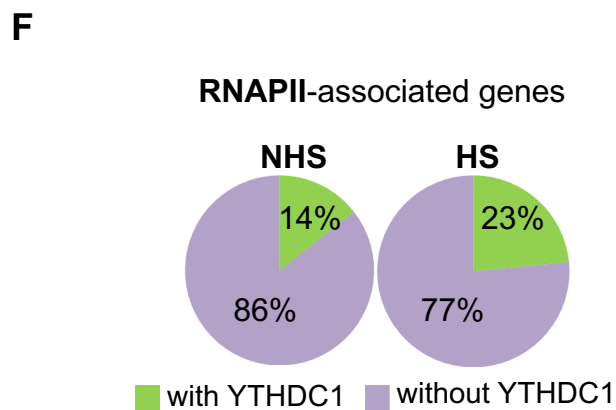
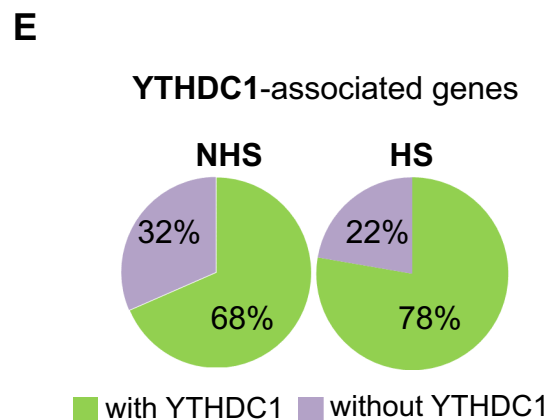


Sup Figure 2 (related to Figure 2).

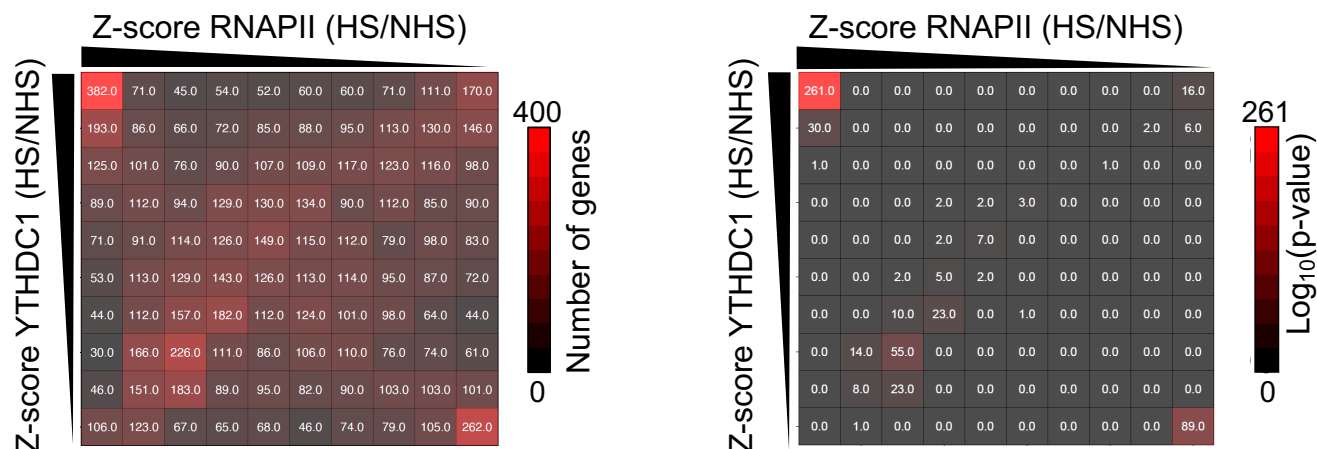


D

		-Log₁₀(p-value)
NHS	Translation	12-10
	Cell cycle	4
HS	Protein folding	13-9
	Translation	7
	Apoptosis	7
	Cell Cycle	6
	RNA processing	4
	Chromatin organization	4

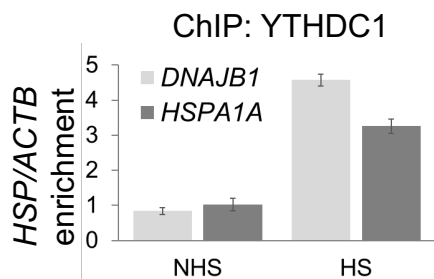


G Intersection between genes enriched in YTHDC1 and RNAPII

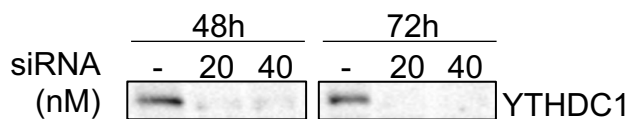


Sup Figure 3 (related to Figure 3).

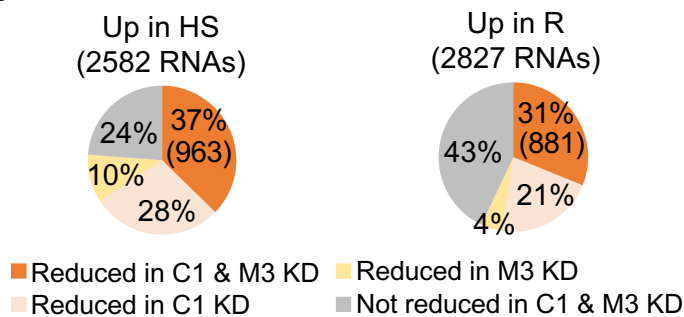
A



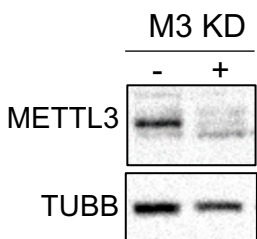
B



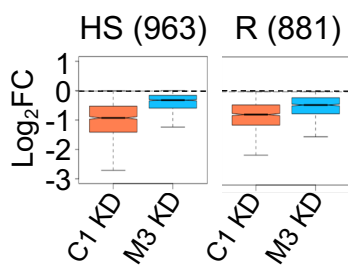
D



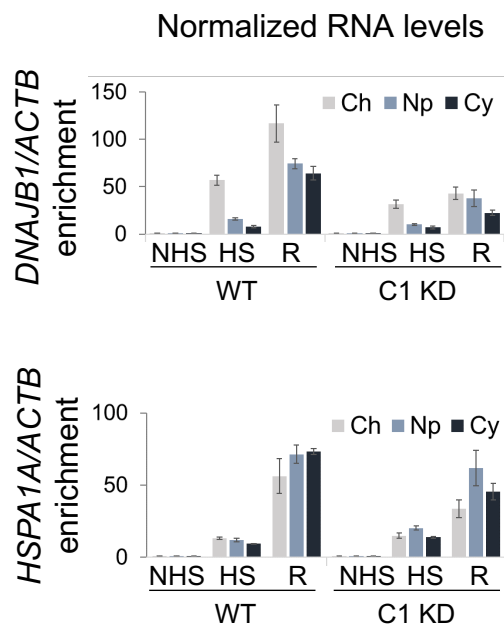
E



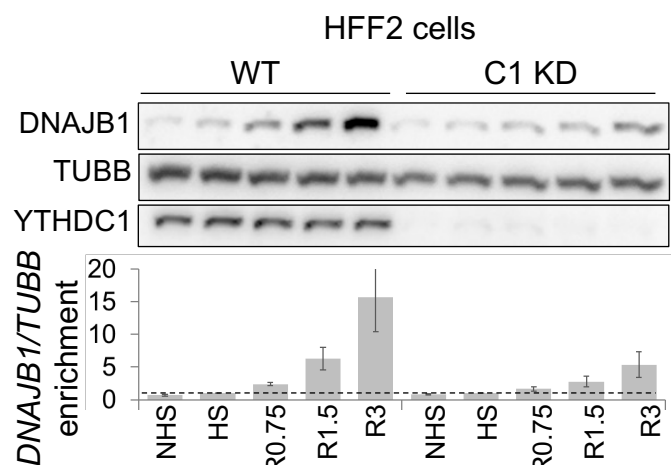
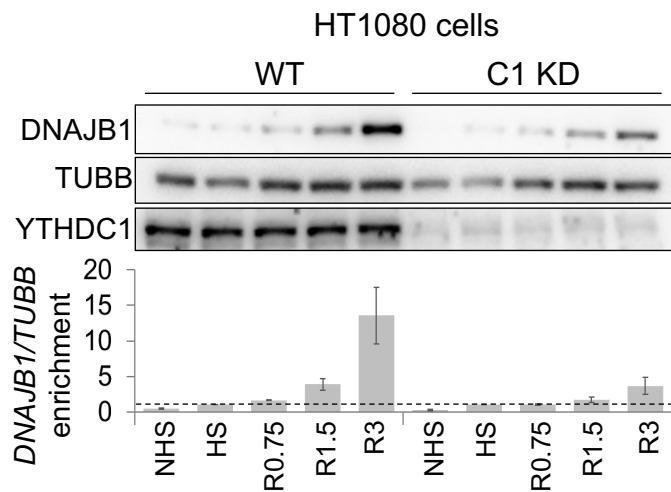
F



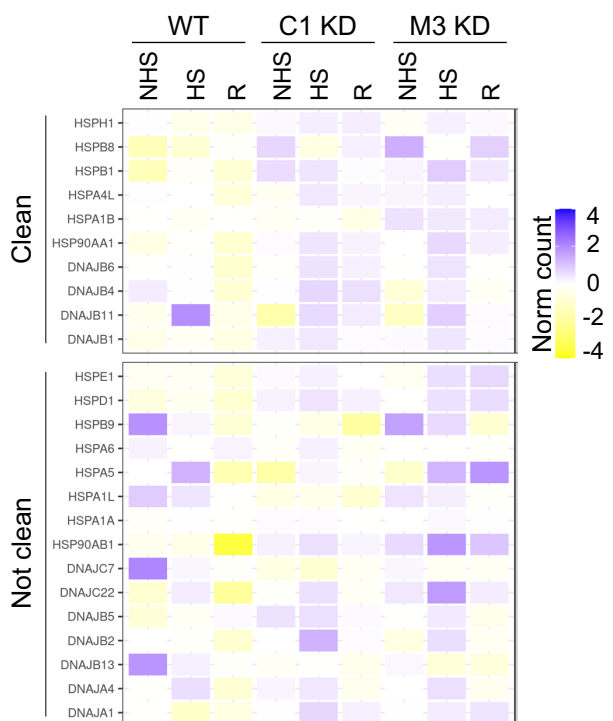
G



C



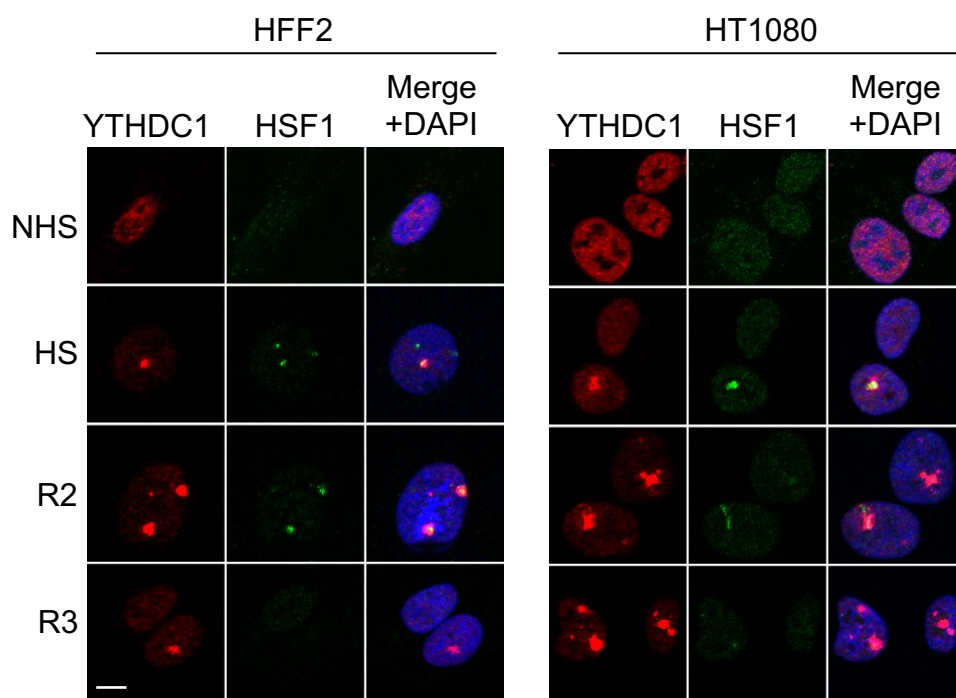
H



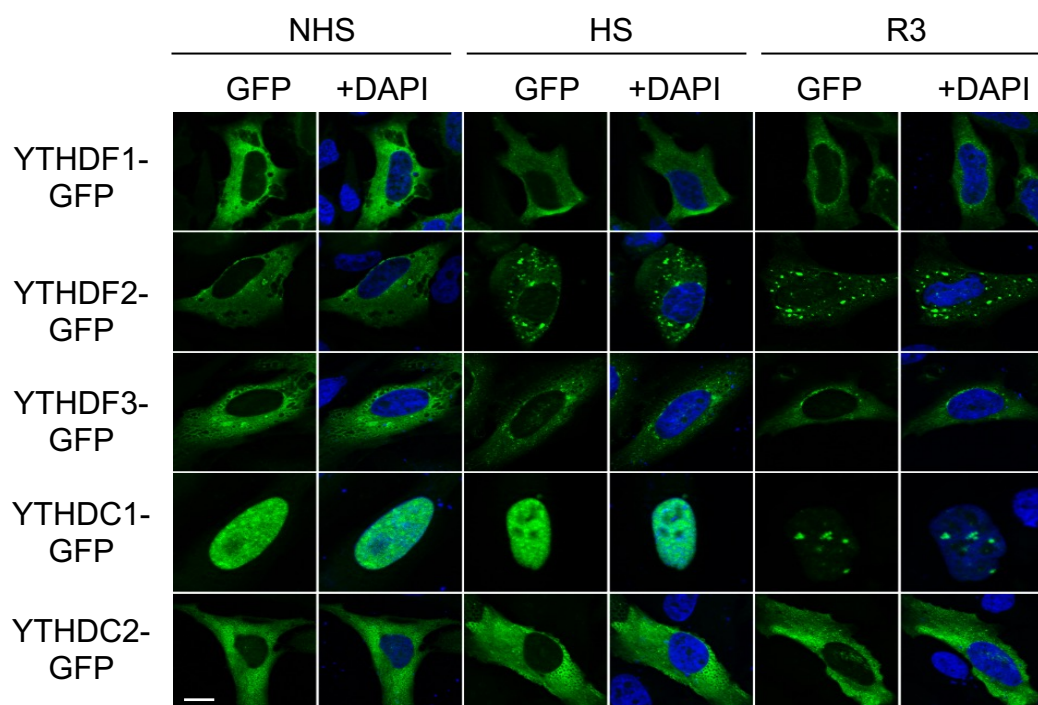
Norm count: Downstream Gene signal / GB signal

Sup Figure 4 (related to Figure 4).

A



B



Sup Figure 5 (related to Figure 4).

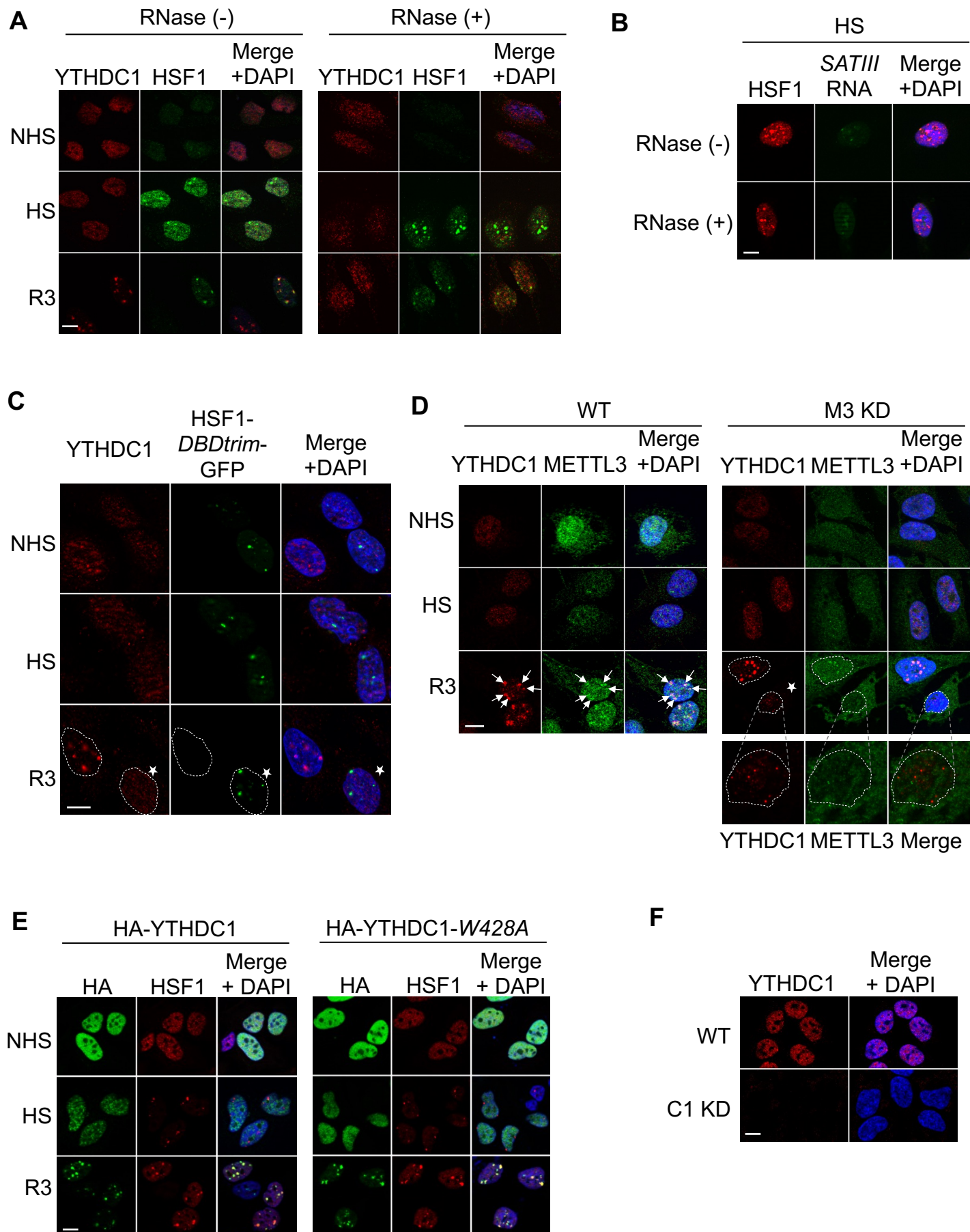
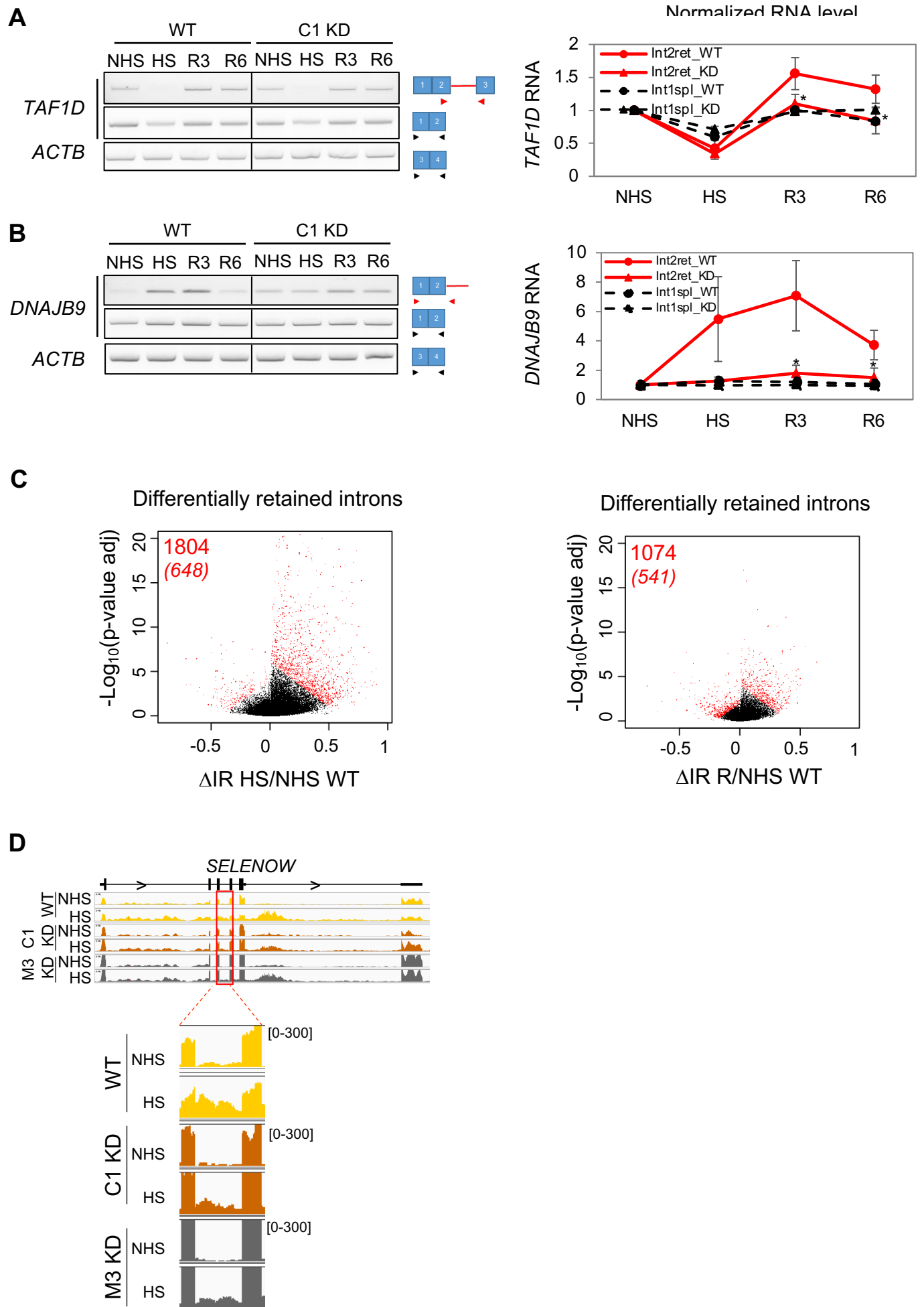
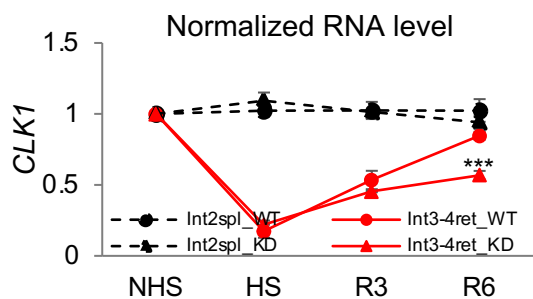
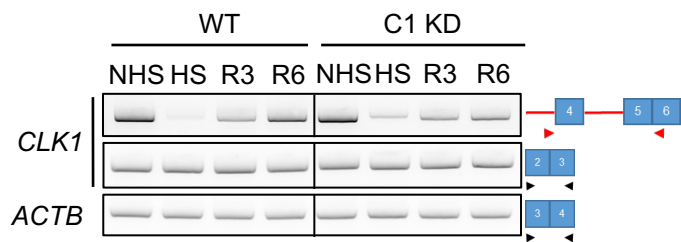


Figure S6 (related to Figure 5).

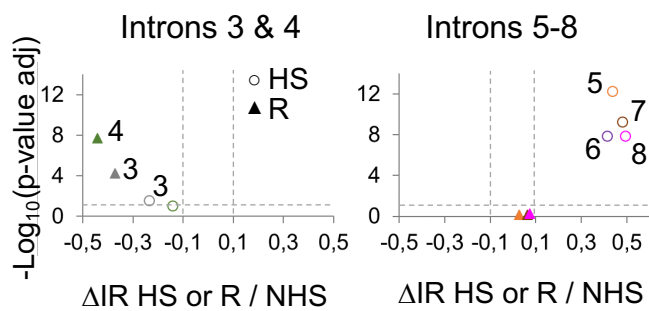


Sup Figure 7 (related to Figure 6).

A



B



1542 Trinklein, N.D., Murray, J.I., Hartman, S.J., Botstein, D., and Myers, R.M. (2004). The role of
1543 heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat
1544 shock response. *Mol Biol Cell* 15, 1254-1261.

1545 Uzor, S., Zorzou, P., Bowler, E., Porazinski, S., Wilson, I., and Lodomery, M. (2018).
1546 Autoregulation of the human splice factor kinase CLK1 through exon skipping and
1547 intron retention. *Gene* 670, 46-54.

1548 Vihervaara, A., Duarte, F.M., and Lis, J.T. (2018). Molecular mechanisms driving
1549 transcriptional stress responses. *Nat Rev Genet* 19, 385-397.

1550 Vihervaara, A., Mahat, D.B., Guertin, M.J., Chu, T., Danko, C.G., Lis, J.T., and Sistonen, L.
1551 (2017). Transcriptional response to stress is pre-wired by promoter and enhancer
1552 architecture. *Nat Commun* 8, 255.

1553 Vourc'h, C., Dufour, S., Timcheva, K., Seigneurin-Berny, D., and Verdel, A. (2022). HSF1-
1554 Activated Non-Coding Stress Response: Satellite lncRNAs and Beyond, an Emerging
1555 Story with a Complex Scenario. *Genes (Basel)* 13.

1556 Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.

1557 Wieczorek, S., Combes, F., Lazar, C., Giai Gianetto, Q., Gatto, L., Dorffer, A., Hesse, A.M.,
1558 Coute, Y., Ferro, M., Bruley, C., *et al.* (2017). DAPAR & ProStaR: software to perform
1559 statistical analyses in quantitative discovery proteomics. *Bioinformatics* 33, 135-136.

1560 Xiang, Y., Laurent, B., Hsu, C.H., Nachtergaele, S., Lu, Z., Sheng, W., Xu, C., Chen, H.,
1561 Ouyang, J., Wang, S., *et al.* (2017). RNA m(6)A methylation regulates the ultraviolet-
1562 induced DNA damage response. *Nature* 543, 573-576.

1563 Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y.S., Hao, Y.J., Sun, B.F., Sun, H.Y., Li, A., Ping,
1564 X.L., Lai, W.Y., *et al.* (2016). Nuclear m(6)A Reader YTHDC1 Regulates mRNA
1565 Splicing. *Mol Cell* 61, 507-519.

1566 Xu, C., Wang, X., Liu, K., Roundtree, I.A., Tempel, W., Li, Y., Lu, Z., He, C., and Min, J.
1567 (2014). Structural basis for selective binding of m6A RNA by the YTHDC1 YTH
1568 domain. *Nat Chem Biol* 10, 927-929.

1569 Yost, H.J., and Lindquist, S. (1991). Heat shock proteins affect RNA processing during the
1570 heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11, 1062-1068.

1571 Yu, J., Li, Y., Wang, T., and Zhong, X. (2018). Modification of N6-methyladenosine RNA
1572 methylation on heat shock protein expression. *PLoS One* 13, e0198604.

1573 Zaccara, S., Ries, R.J., and Jaffrey, S.R. (2019). Reading, writing and erasing mRNA
1574 methylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 608-624.

1575 Zander, G., Hackmann, A., Bender, L., Becker, D., Lingner, T., Salinas, G., and Krebber, H.
1576 (2016). mRNA quality control is bypassed for immediate export of stress-responsive
1577 transcripts. *Nature* 540, 593-596.

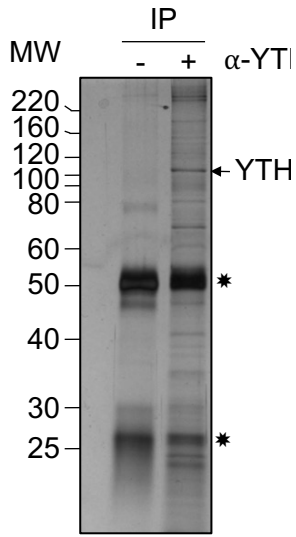
1578 Zhou, J., Wan, J., Gao, X., Zhang, X., Jaffrey, S.R., and Qian, S.B. (2015). Dynamic m(6)A
1579 mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature* 526,
1580 591-594.

1581 Zhou, J., Wan, J., Shu, X.E., Mao, Y., Liu, X.M., Yuan, X., Zhang, X., Hess, M.E., Bruning,
1582 J.C., and Qian, S.B. (2018). N(6)-Methyladenosine Guides mRNA Alternative
1583 Translation during Integrated Stress Response. *Mol Cell* 69, 636-647 e637.

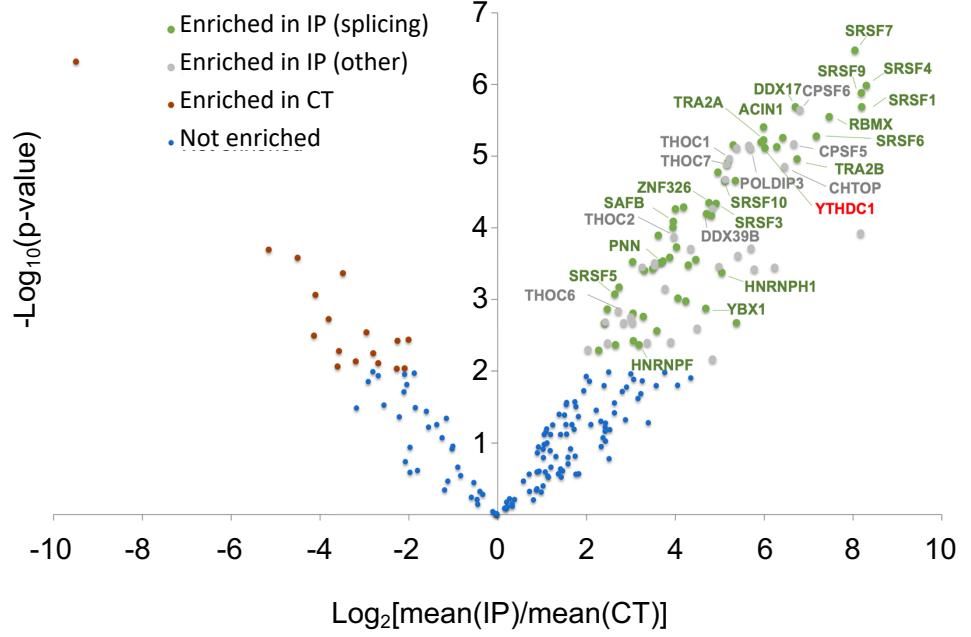
1584

Figure 1.

A



B



C

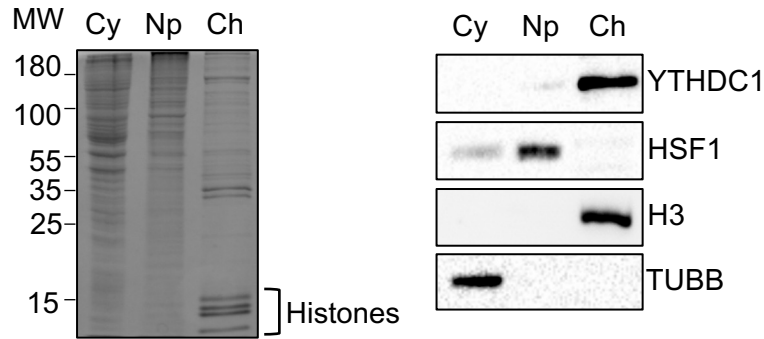


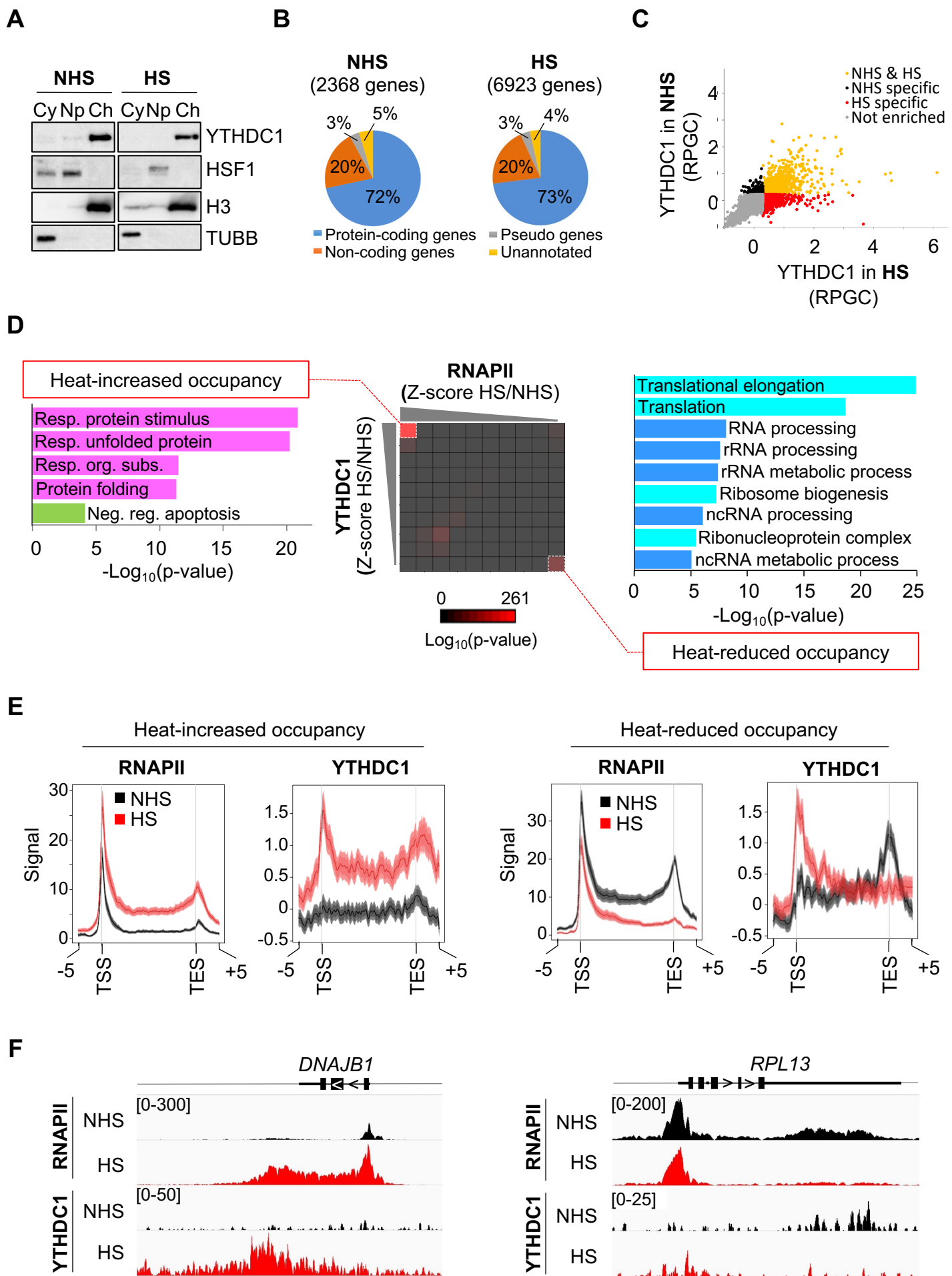
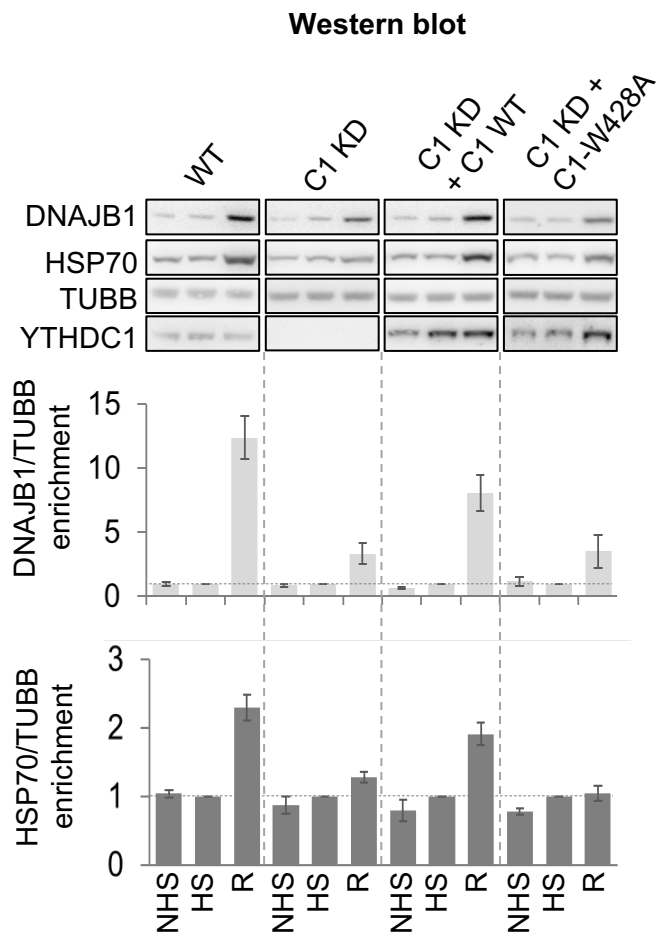
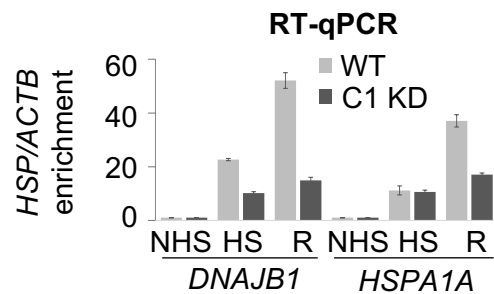
Figure 2.

Figure 3.

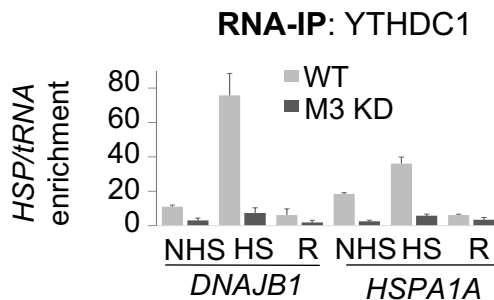
A



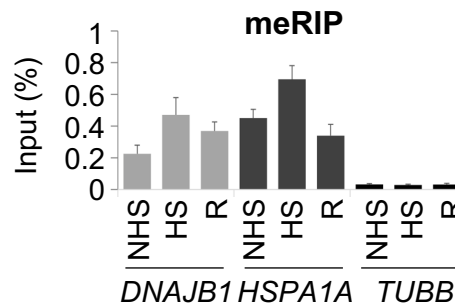
B



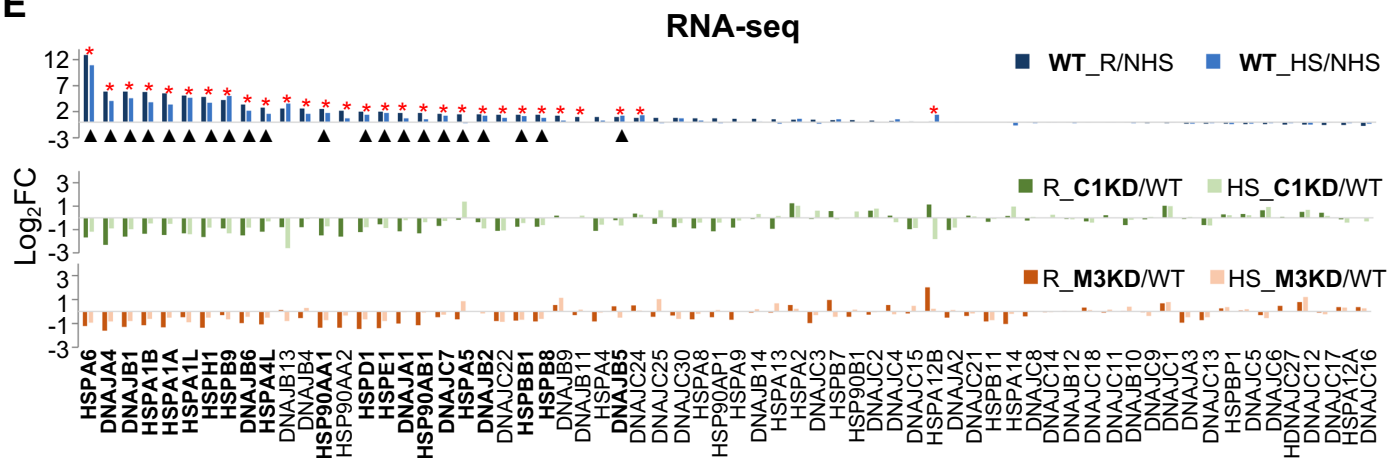
C



D



E



* HSP with heat-increased RNA level, ▲ targeted by YTHDC1 and deregulated in both C1 KD & M3 KD

F

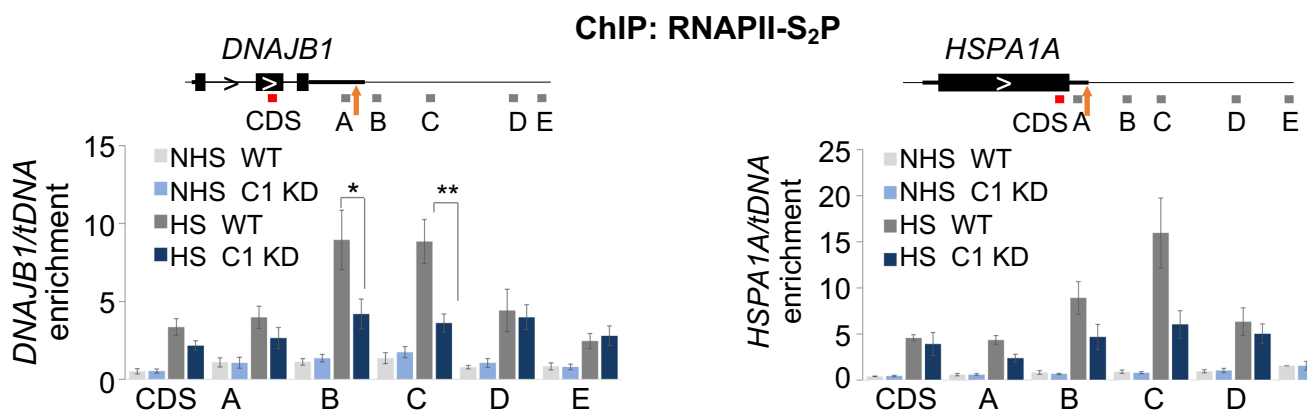


Figure 4.

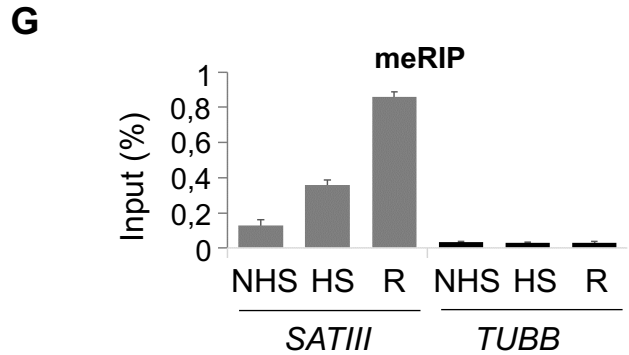
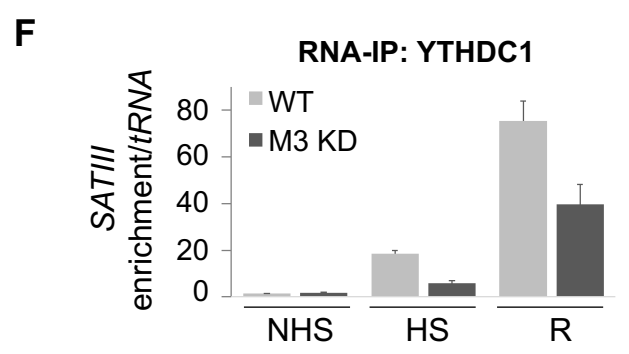
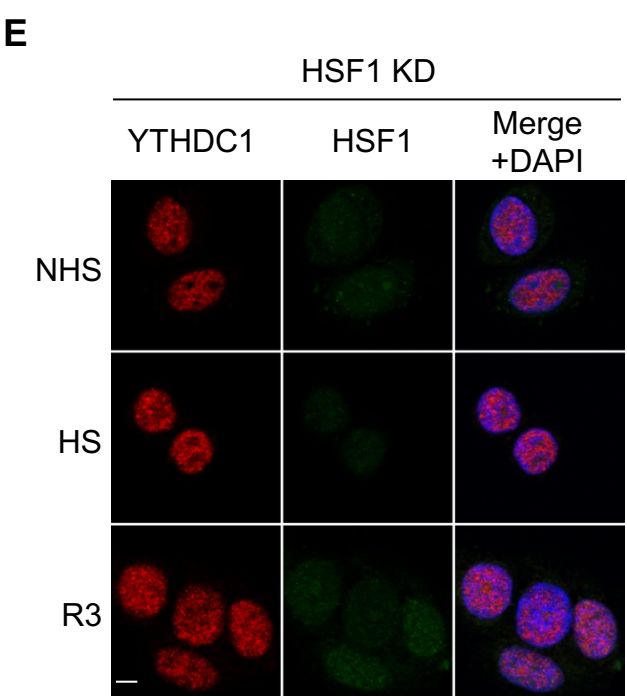
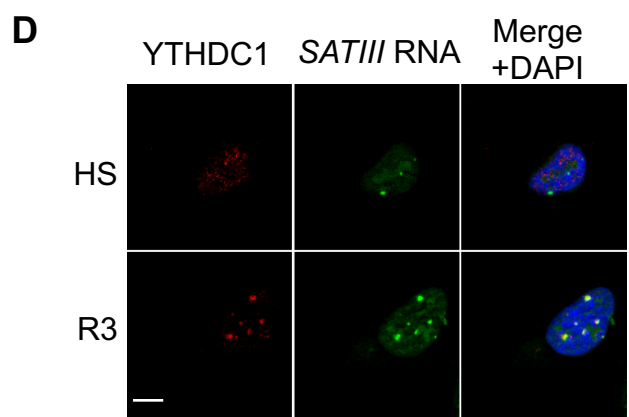
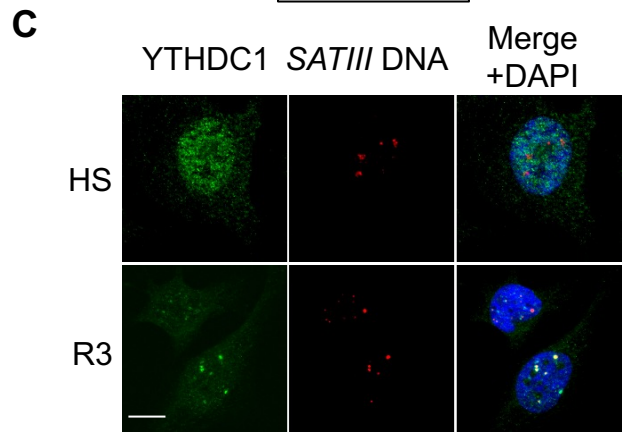
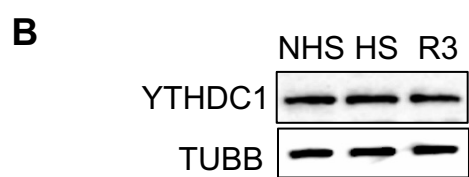
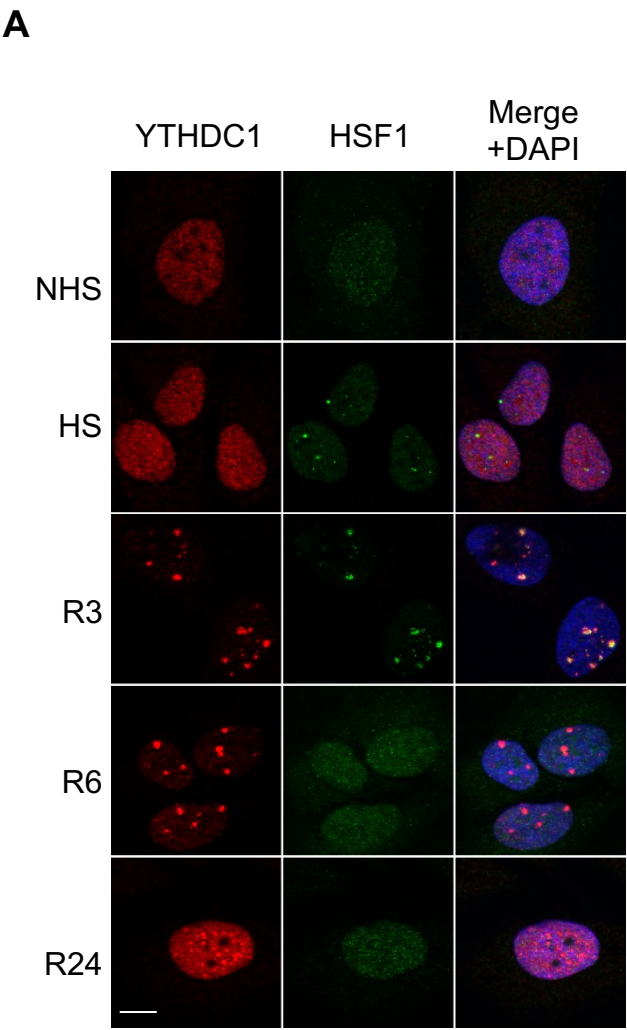
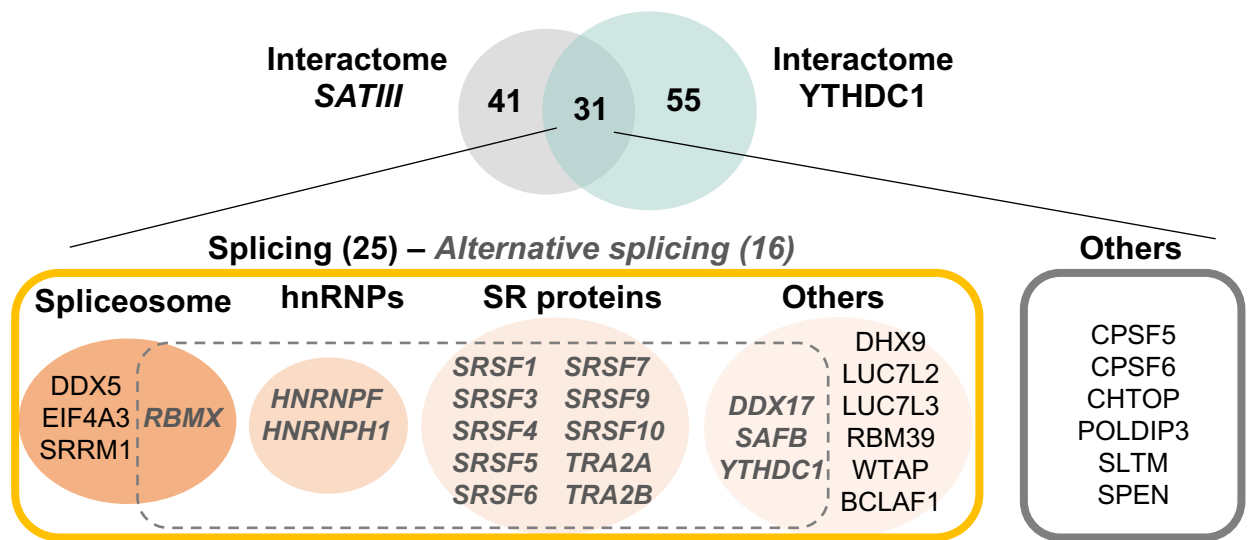
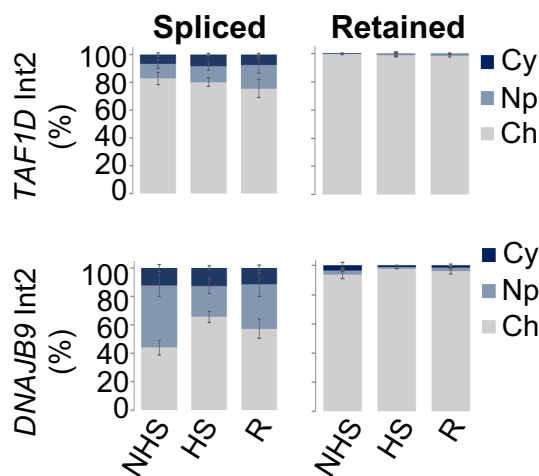


Figure 5.

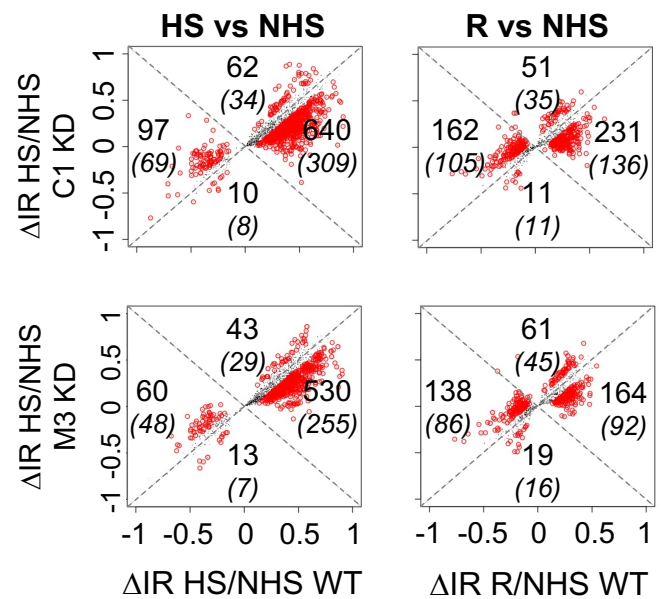
A



B

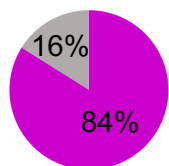


C



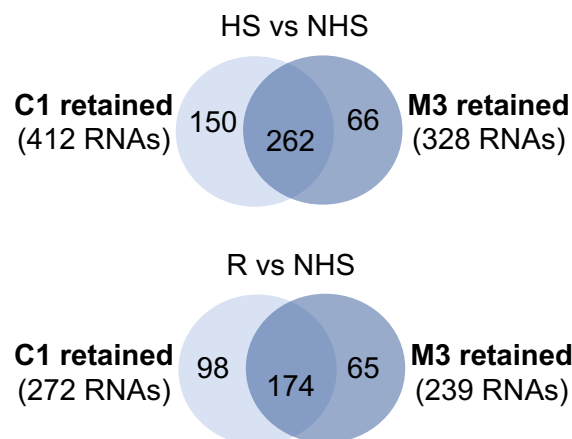
D

C1 retained introns



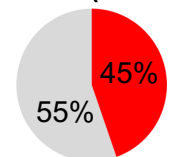
■ In HS
■ In HS & R

E

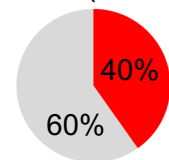


F

HS vs NHS (262 RNAs)



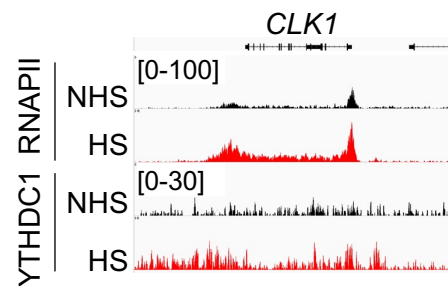
R vs NHS (174 RNAs)



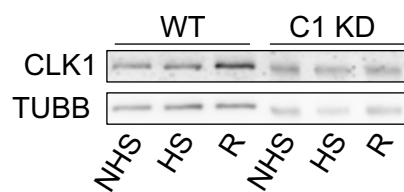
■ **C1 target genes in HS**
■ Not C1 target

Figure 6

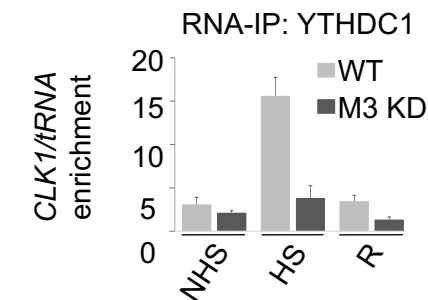
A



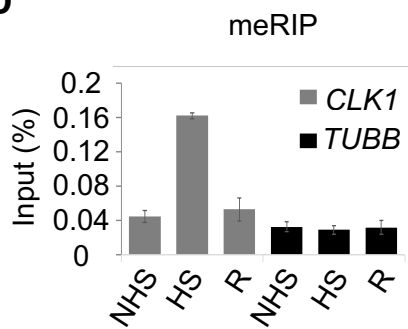
B



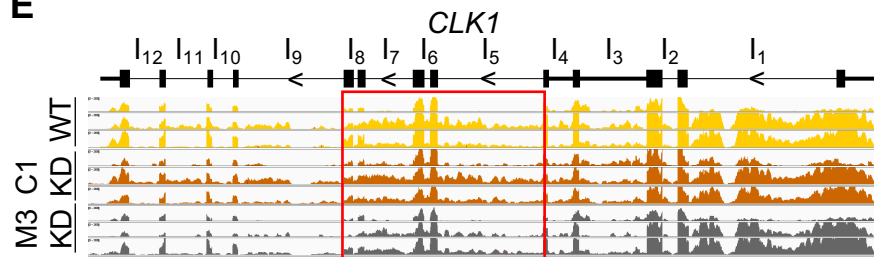
C



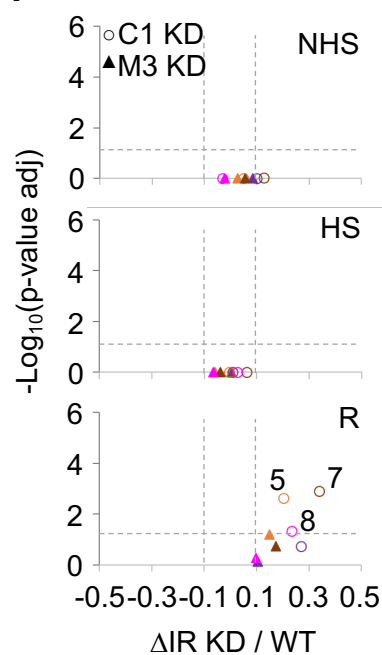
D



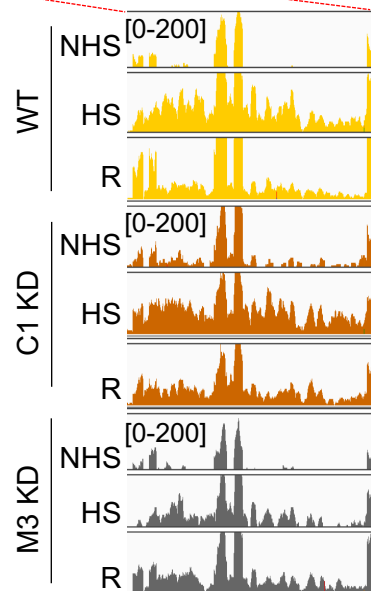
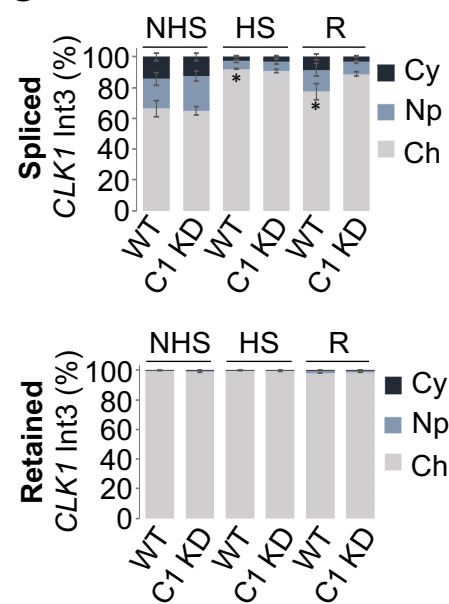
E



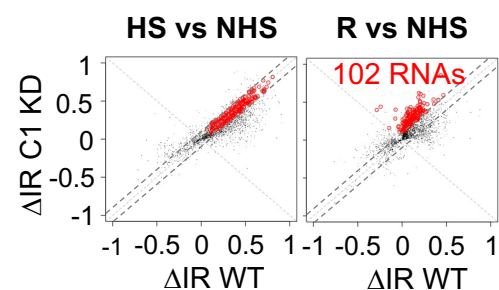
F



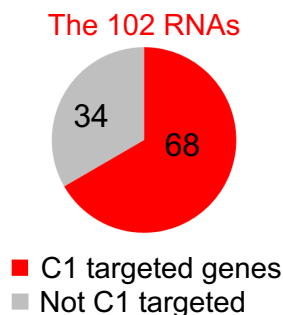
G



H



I



J

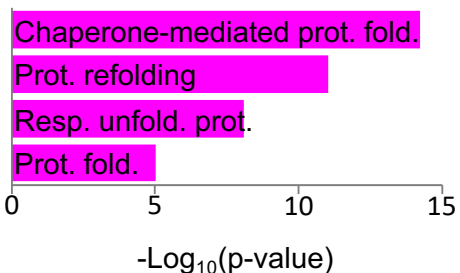
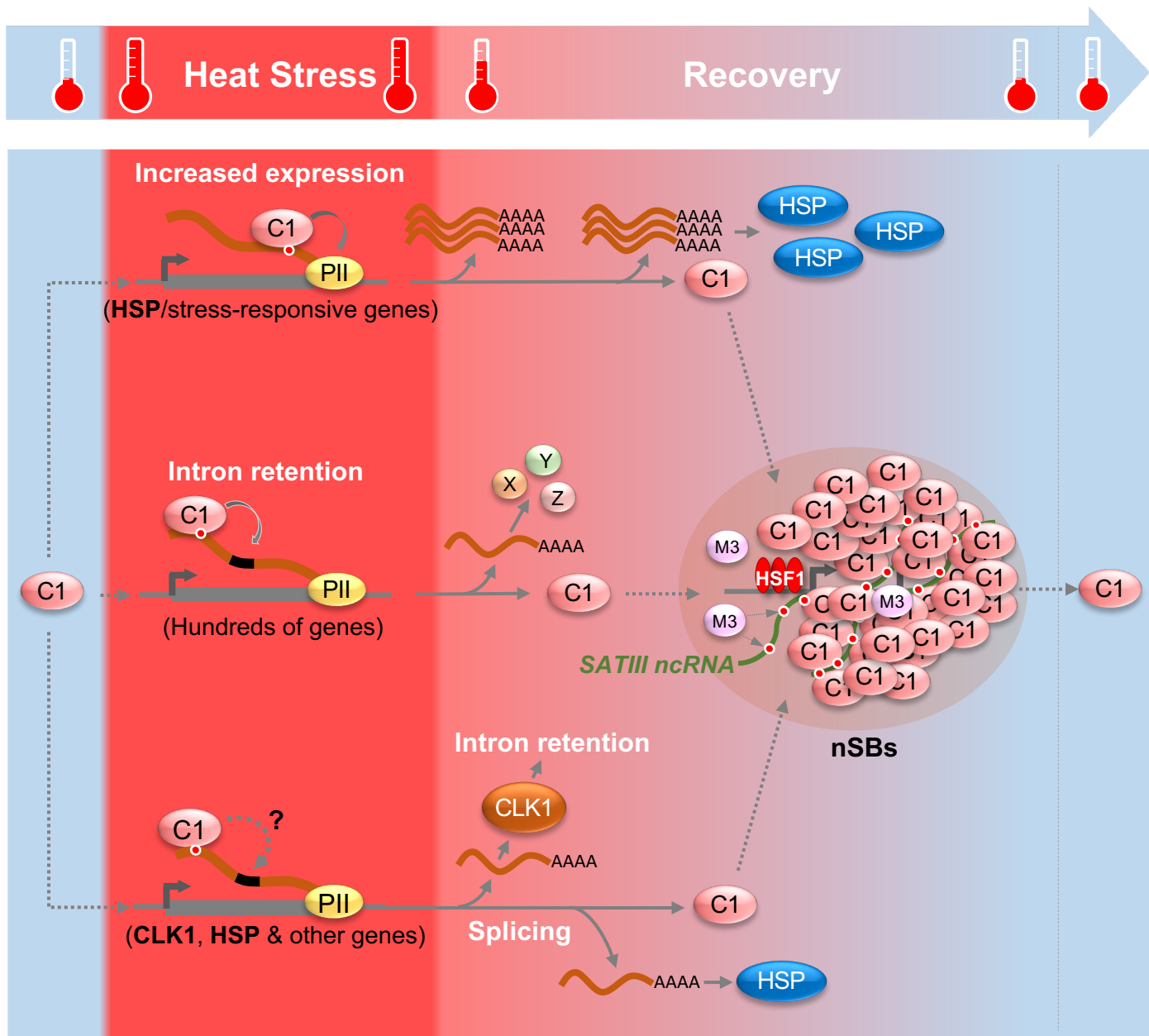
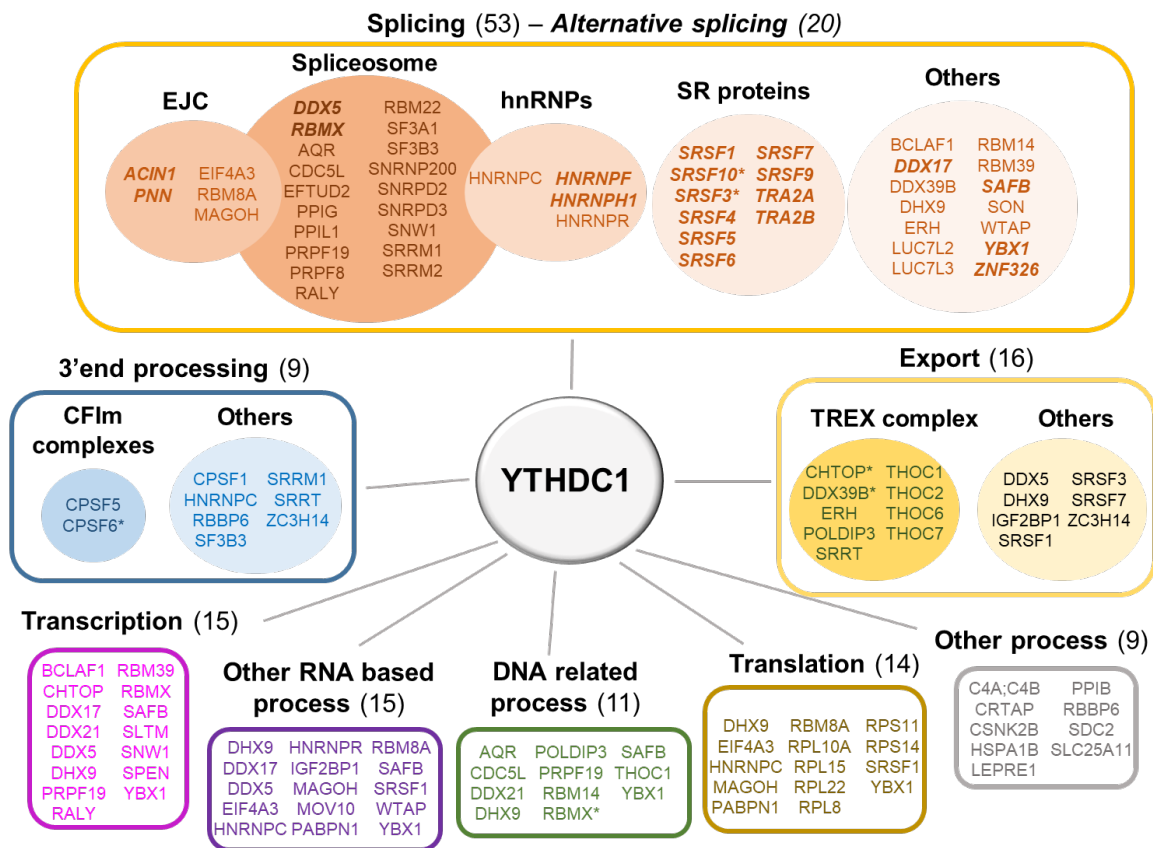


Figure 7.

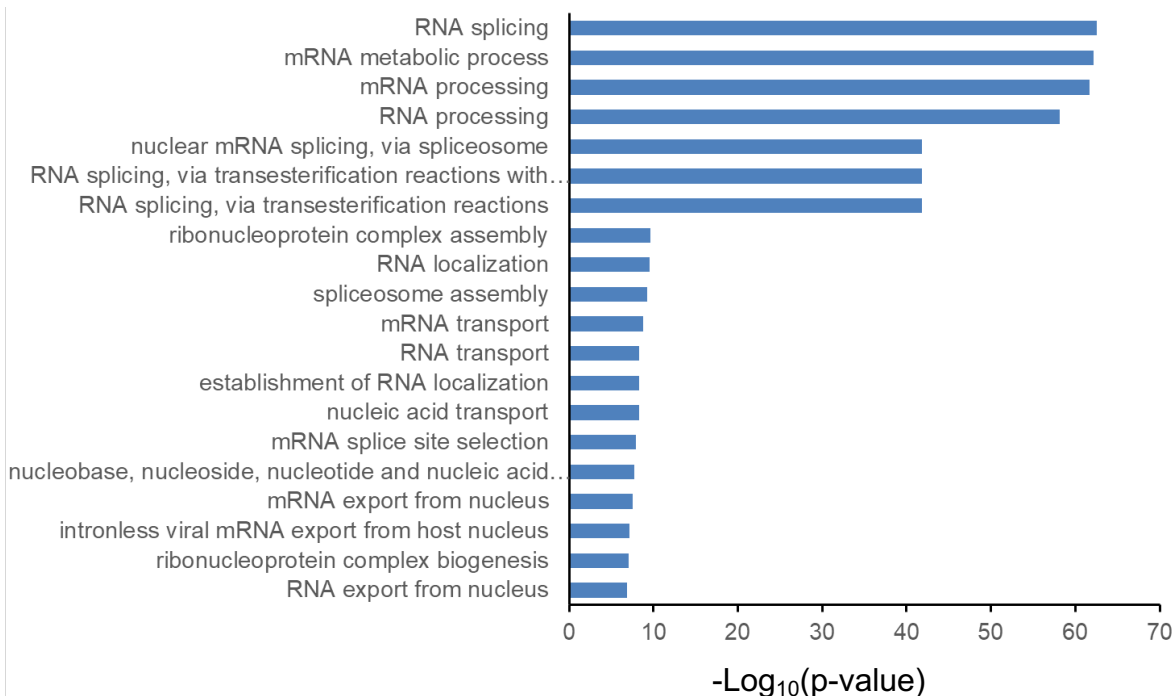


Sup Figure 1 (related to Figure 1).

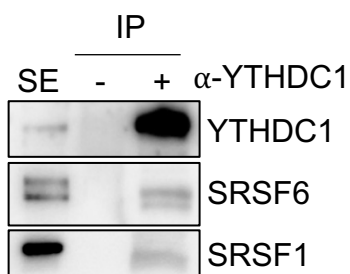
A



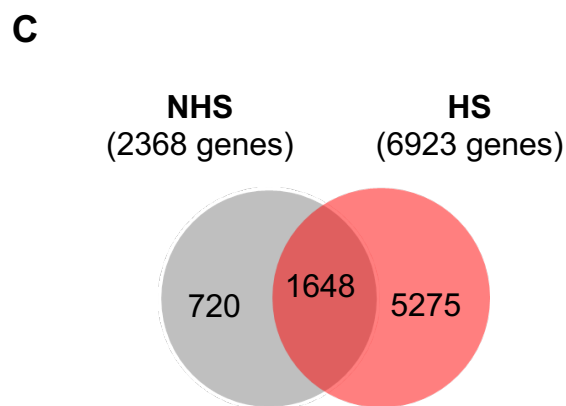
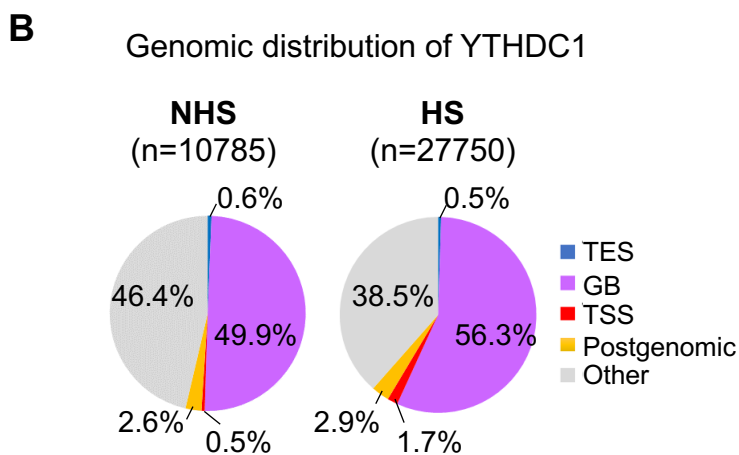
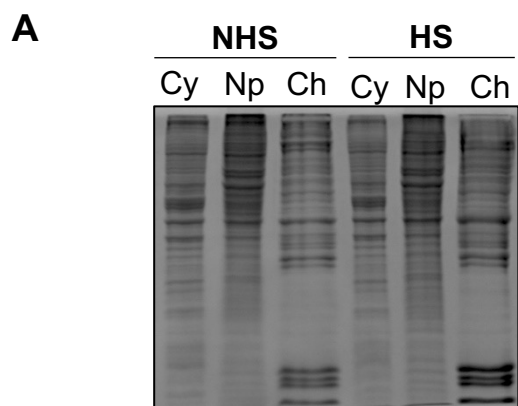
B



C

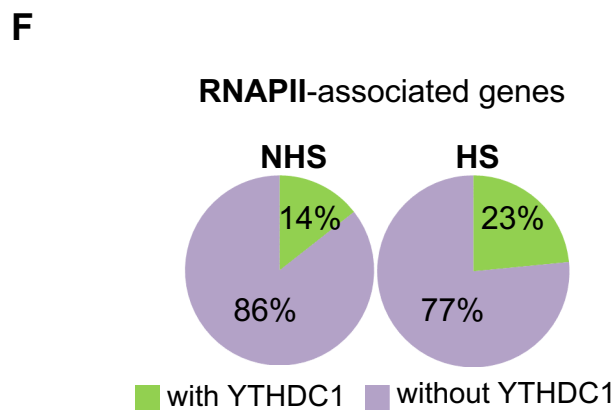
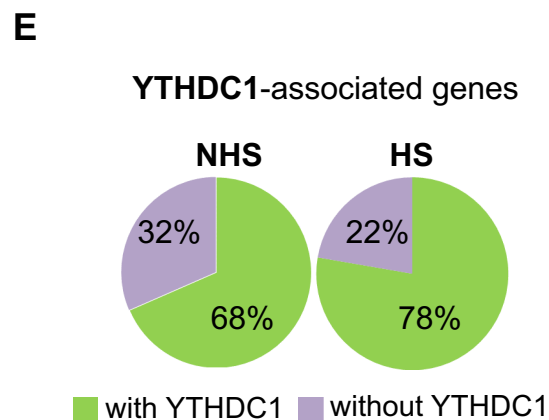


Sup Figure 2 (related to Figure 2).

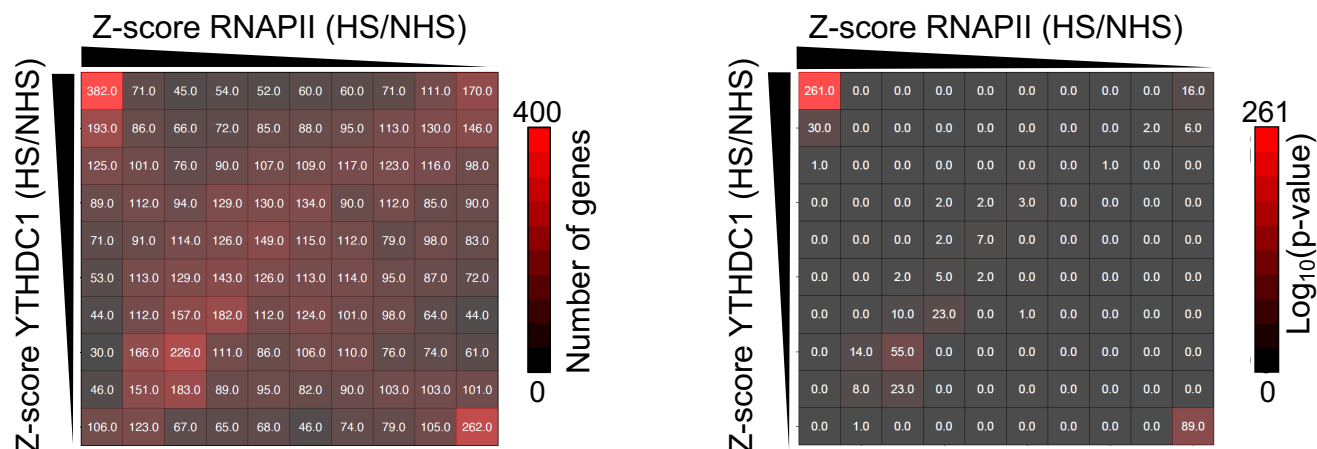


D

		-Log₁₀(p-value)
NHS	Translation	12-10
	Cell cycle	4
HS	Protein folding	13-9
	Translation	7
	Apoptosis	7
	Cell Cycle	6
	RNA processing	4
	Chromatin organization	4

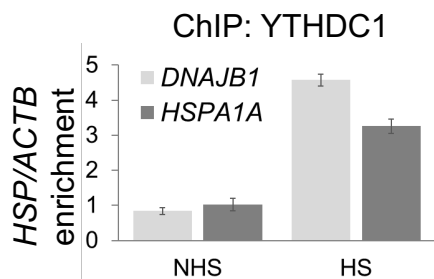


G Intersection between genes enriched in YTHDC1 and RNAPII

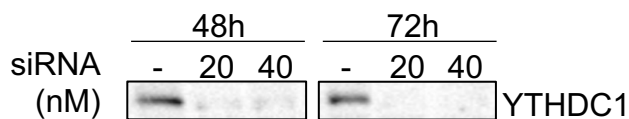


Sup Figure 3 (related to Figure 3).

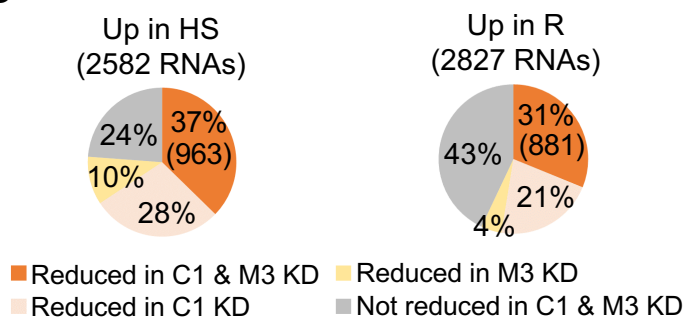
A



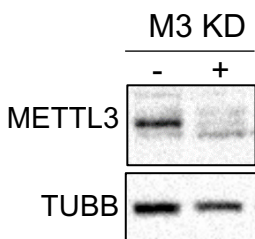
B



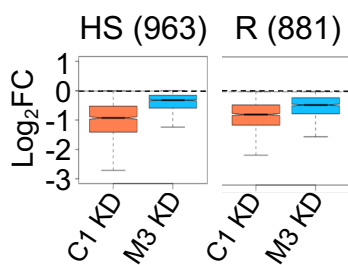
D



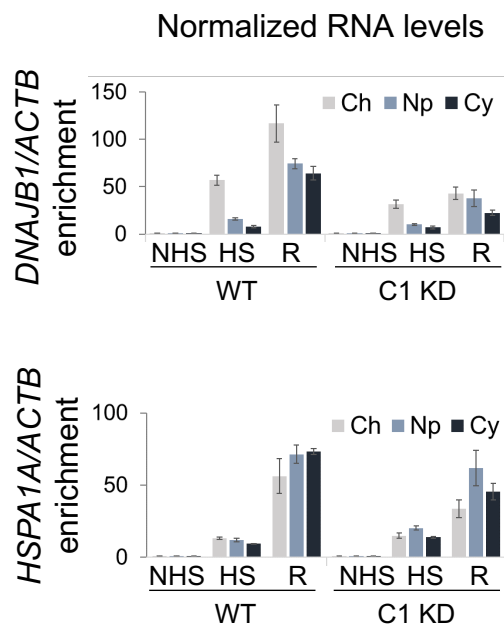
E



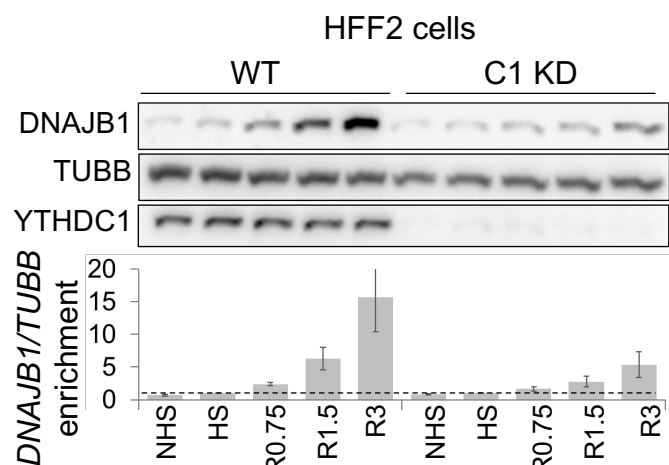
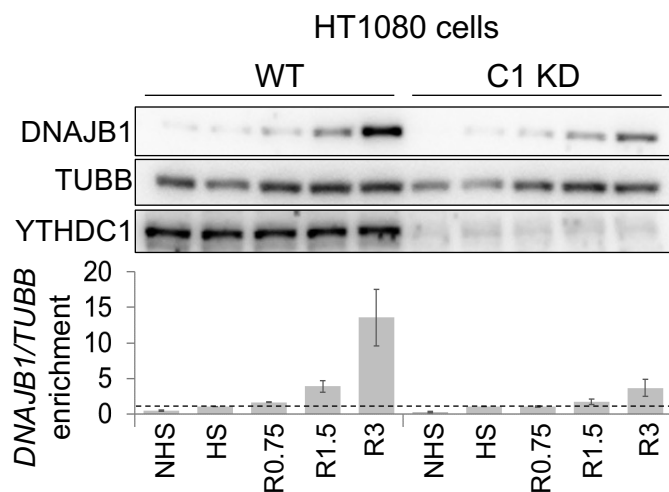
F



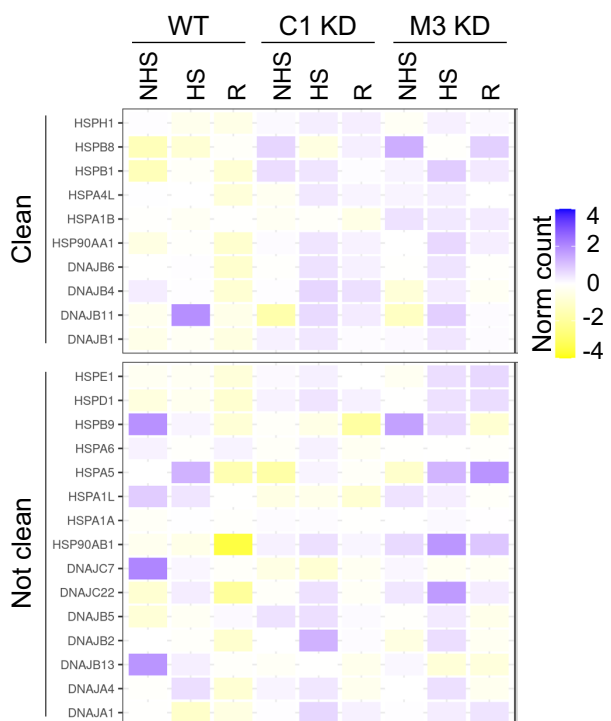
G



C



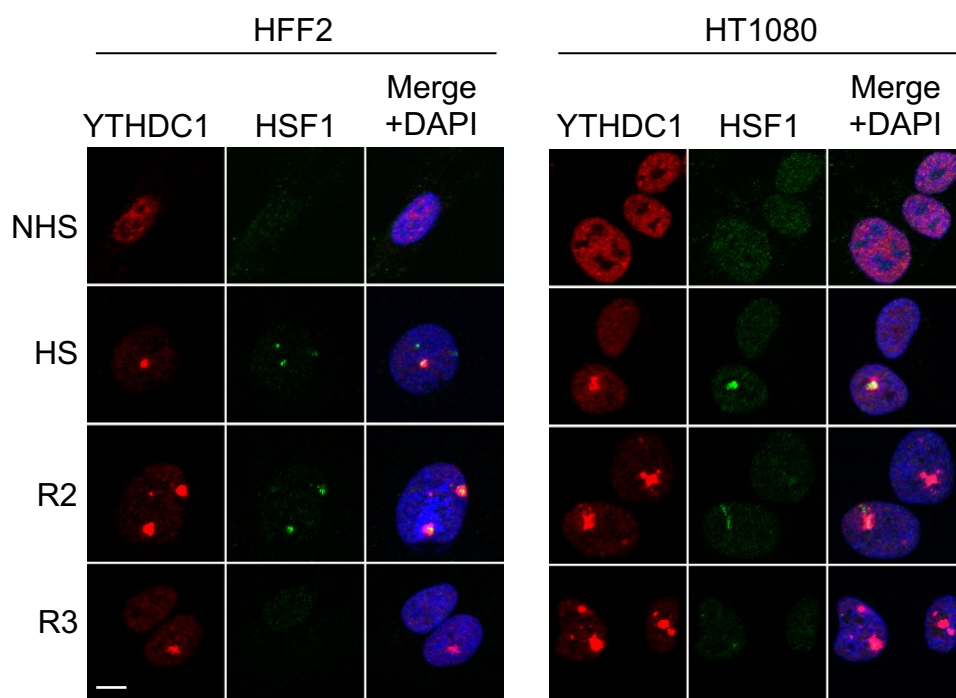
H



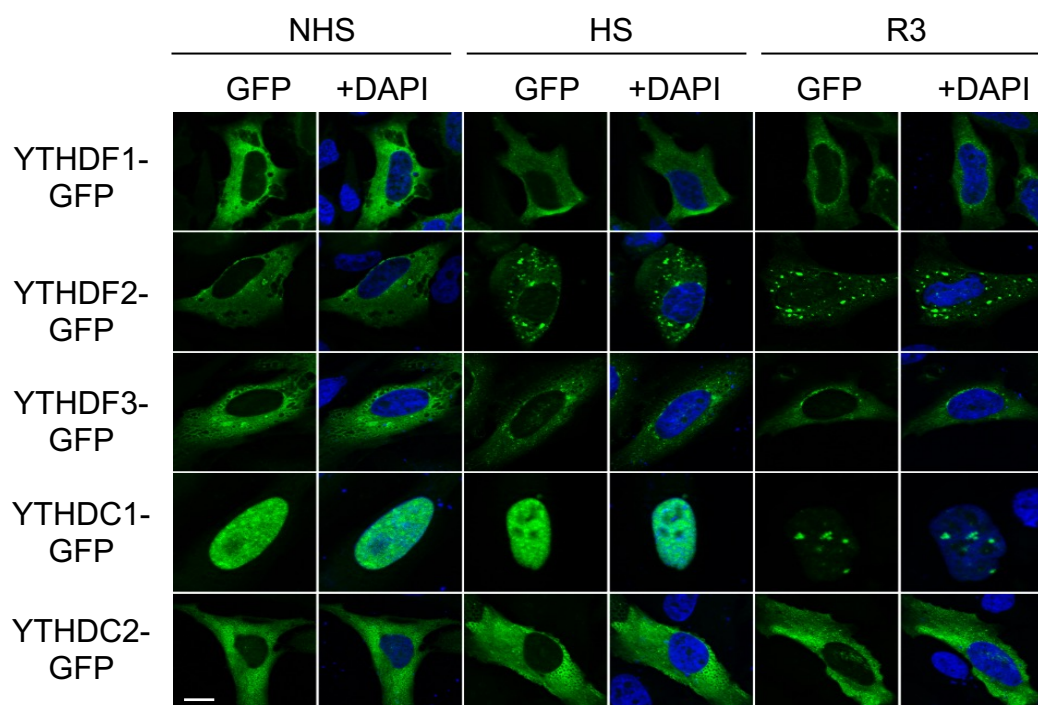
Norm count: Downstream Gene signal / GB signal

Sup Figure 4 (related to Figure 4).

A



B



Sup Figure 5 (related to Figure 4).

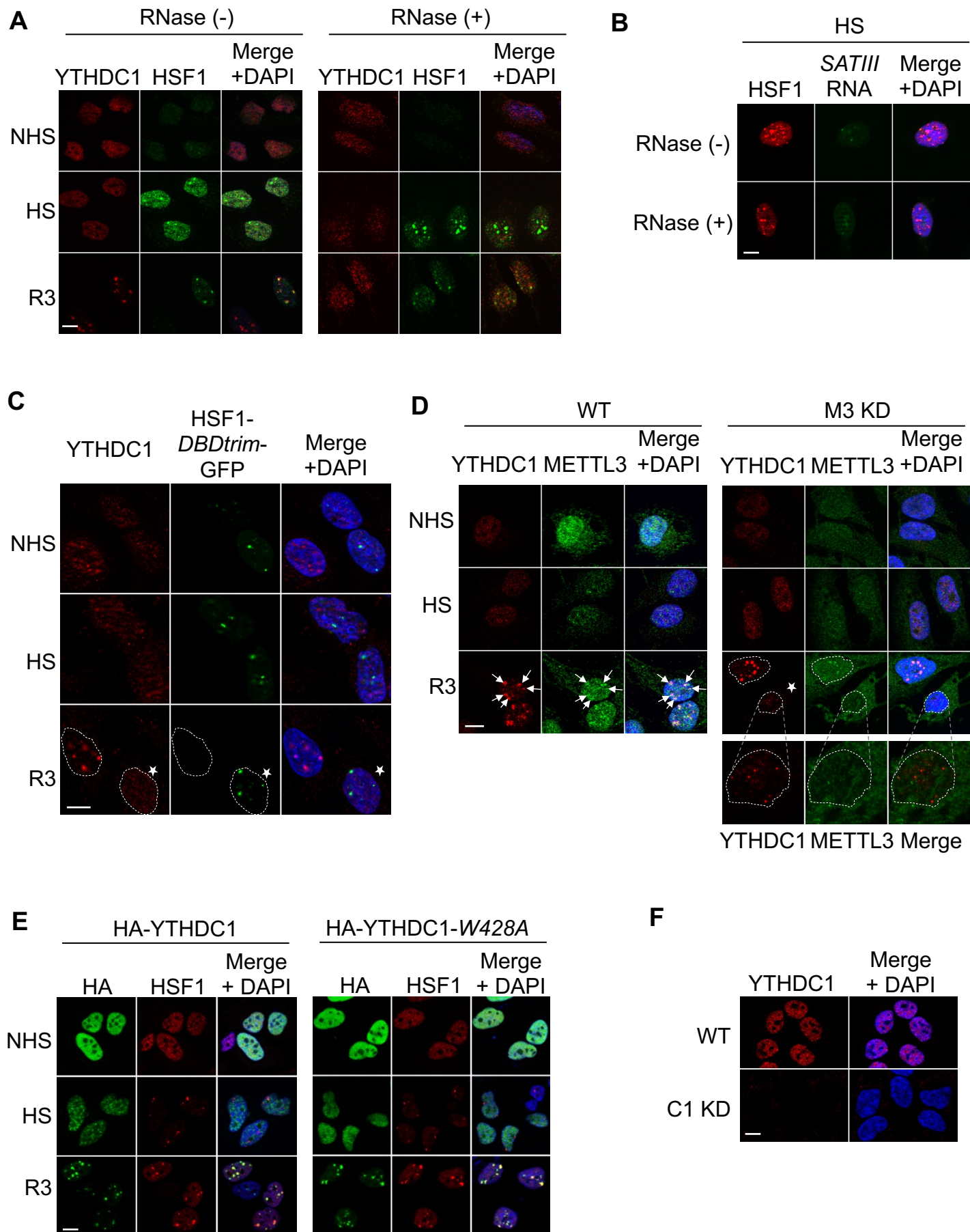
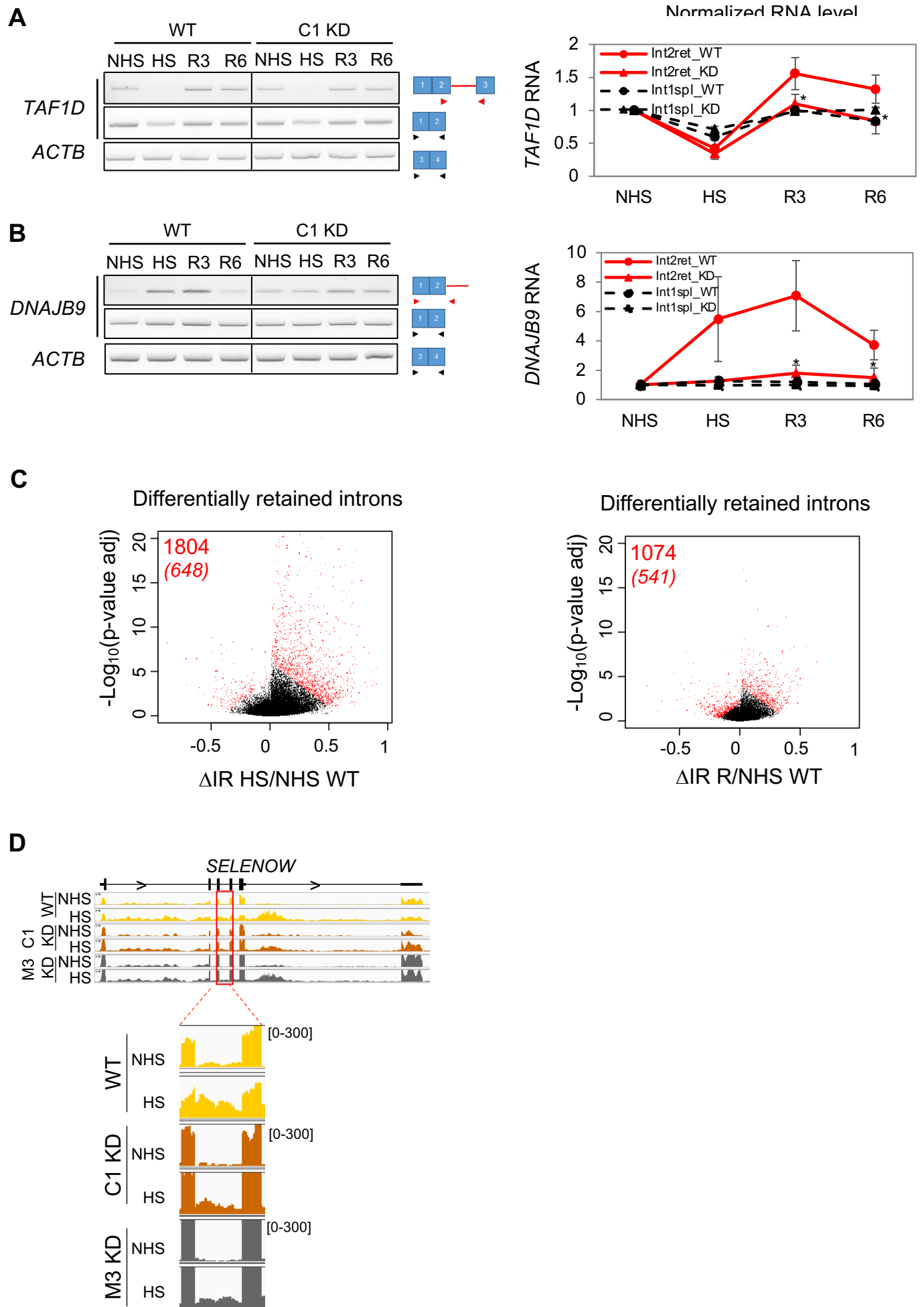
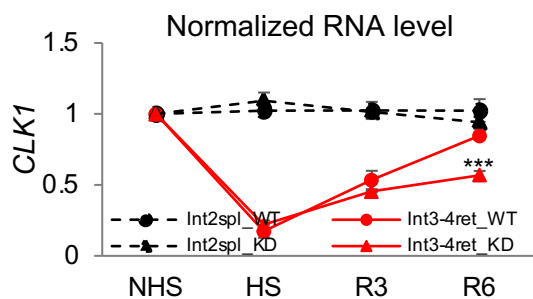
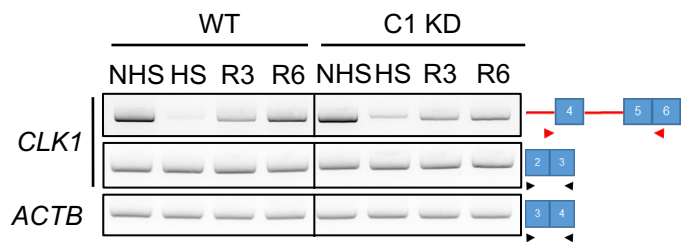


Figure S6 (related to Figure 5).

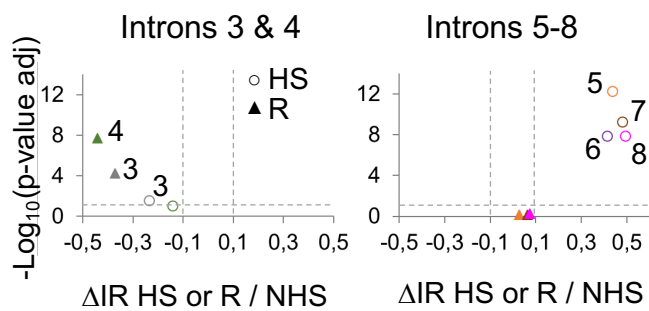


Sup Figure 7 (related to Figure 6).

A



B



SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Bromodomain factors of BET family are new essential actors of pericentric heterochromatin transcriptional activation in response to heat shock

Edwige Col¹, Neda Hoghoughi¹, Solenne Dufour¹, Jessica Penin¹, Sivan Koskas¹, Virginie Faure¹, Maria Ouzounova², Hector Hernandez-Vargash², Nicolas Reynoird¹, Sylvain Daujat⁴, Eric Folco¹, Marc Vigneron³, Robert Schneider^{4,5}, André Verdel¹, Saadi Khochbin¹, Zdenko Herceg², Cécile Caron¹ & Claire Vourc'h¹

The heat shock response is characterized by the transcriptional activation of both hsp genes and noncoding and repeated satellite III DNA sequences located at pericentric heterochromatin. Both events are under the control of Heat Shock Factor I (HSF1). Here we show that under heat shock, HSF1 recruits major cellular acetyltransferases, GCN5, TIP60 and p300 to pericentric heterochromatin leading to a targeted hyperacetylation of pericentric chromatin. Redistribution of histone acetylation toward pericentric region in turn directs the recruitment of Bromodomain and Extra-Terminal (BET) proteins BRD2, BRD3, BRD4, which are required for satellite III transcription by RNAP II. Altogether we uncover here a critical role for HSF1 in stressed cells relying on the restricted use of histone acetylation signaling over pericentric heterochromatin (HC).

In human cells, the heat shock response (HSR) is characterized by the transcriptional activation of both protein coding heat shock (hsp) genes¹ and pericentric heterochromatin (HC) formed of tandem repeats of sat III elements over several megabasis^{2,3}. Both events are under the control of Heat Shock Factor 1 (HSF1), a transcription factor present in the nucleus and cytoplasm of cell before heat shock⁴. Activation of pericentric HC is mainly observed at the 9q12 locus, and leads to the accumulation of long noncoding (lnc) satellite III (sat III) RNA. Sites of HSF1 accumulation at pericentric HC and of sat III sequences transcription form nuclear foci, also called nuclear stress bodies, (nSBs) in stressed cells. Transcriptional regulation of the heat shock response at hsp gene promoters, has been extensively studied as a model system of gene expression. Unlike hsp genes, sat III transcripts are transcribed from heterochromatic regions suggesting that different mechanisms may be involved in their transcriptional activation. In higher eukaryotes, RNA pol II (RNAP II) at hsp genes is transcriptionally engaged⁵ before heat shock, while no evidence exist that it is similarly engaged at sat III sequences.

Several actors have been identified for their role in HSF1-mediated hsp genes activation in higher eukaryotes. In *Drosophila*, proteins have been identified for their essential role in the initial, HSF1-mediated, transcription independent, nucleosome disruption. They include GAGA factor (GAF; Trithorax-like) and poly(ADP)-ribose polymerase (PARP)^{6,7}. TIP60 has also been identified for its role in the spreading of PARP and subsequent recruitment of elongation factors such as P-TEFb and Spt6 and for its role in the recruitment of histone-modifying enzymes such as Trithorax and CREB-binding protein (CBP)⁶⁻⁸. Based on *in vitro* interaction assays, a binding

¹Université Grenoble Alpes, CNRS UMR 5309, INSERM U1209, Institute for Advanced Biosciences (IAB), Site Santé - Allée des Alpes, 38700, La Tronche, France. ²International Agency for Research on Cancer (IARC), 69008, Lyon, France. ³UMR 7242, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg (ESBS), 300 boulevard Sebastien Brant, CS 10413, 67412, Illkirch, France. ⁴Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), Strasbourg, France. ⁵Institute of Functional Epigenetics, Helmholtz Zentrum Muenchen, Ingolstaedter Landstr 1, 85754, Neuherberg, Germany. Edwige Col and Neda Hoghoughi contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.V. (email: claire.vourc'h@univ-grenoble-alpes.fr)

between HSF1, the general transcription factors TATA-Binding Protein (TBP) and Transcription Factor IIB (TFIIB) has been reported in human cell extracts⁹. More recently a direct interaction between HSF1 and replication protein A (RPA), which is known to bind and stabilize single-strand DNA (ssDNA) has also been characterized¹⁰. The HSF1-RPA complex leads to preloading of RNAP II and opens the chromatin structure by recruiting a histone chaperone, FACT¹⁰.

Histone modifications, and especially acetylation, are known to play an essential role in the control of gene regulation¹¹. The role of Histone Acetyl Transferases (HATs) is to catalyze lysine acetylation which, depending on the lysine targeted, could be a way to loosen histone/DNA interactions¹². Acetylated residues also represent docking sites for bromodomain (Brd), a protein domain known to act as an acetyl-lysine binding domain. Brd-containing factors include proteins with multiple roles in transcriptional activation, like the HATs GCN5, PCAF (p300/CREB-binding protein-Associated Factor), p300 and like CBP (CREB Binding Protein), the BRG1 ATPase subunit of SWI/SNF nucleosome remodeling complex, or the TAF1 subunit of the general transcription factor TFIID (Transcription initiation factor TFIID subunit 1). They also include the “bromo- and extra terminal domains” (BET) family members, among which BRD2, BRD3, BRD4 and BRDT¹³. BRD4 and BRDT are key mediators for the assembly of the Positive Transcription Elongation Factor b complex (P-TEFb), an event required for the initiation of transcription elongation^{14,15}. An intrinsic histone chaperone activity has also been characterized for BRD2¹⁶. BET/histone interactions, which play important roles in physiological^{15,17} and in pathological settings¹⁸, can be selectively inhibited by the acetyl-lysine competitive inhibitor such as JQ1^{19,20}. As expected, histone acetylation plays an important role in the activation of hsp genes. Likewise, increased acetylation at histone H3 in the presence of HSF1 at the hsp70 gene is associated with increased recruitment of CBP and BRG1²¹, while an interaction between HSF1, p300/CBP and STRAP (Stress-responsive activator of p300) promotes HSF1 binding and augments histone acetylation within hsp genes²². Important changes in chromatin acetylation have also been shown within nSBs, revealed by the appearance of HSF1-dependent acetylated foci at nSBs, colocalizing with foci enriched for the HAT p300/CBP². However the role of the different actors described above, that set up and read acetylation marks, is currently unknown in the transcriptional activation of sat III sequences. The contrasting role of Trichostatin A (TSA), a potent inhibitor of Histone Deacetylases of Class I and II mammalian Histone Deacetylases (HDACs), on sat III and hsp70 transcriptional activation supports the existence of distinct specificities between sat III and hsp gene transcription. Indeed, while TSA promotes hsp 70 gene transcription even in the absence of stress, TSA inhibits sat III transcriptional up-regulation³.

In this context, investigating the mechanisms associated with HSF1-induced HC acetylation and sat III transcription represents an important goal in understanding the biology of HC. Here, we report that HSF1 directs several Histone Acetyl Transferases to pericentric HC in stressed cells. We also bring evidence that Bromodomain-containing proteins BRD2, BRD3 and BRD4 are specifically and massively recruited to pericentric HC in heat-shocked cells. Accordingly, we provide new evidence that unlike hsp70 gene, JQ1 specifically inhibits sat III transcription by RNA polymerase II (RNAP II), pointing to the existence of important differences in the mechanisms of activation of two major targets of the heat shock response.

Results

Characterization of heat-induced acetylation at pericentric HC. The transcriptional activation of pericentric HC is probably one of the most striking events occurring in response to stress. Unlike hsp genes, transcriptional activation at pericentric HC is thought to occur within compact chromatin, and the molecular mechanisms involved are still poorly characterized. Interestingly, the presence of a large number of transcribed units at the 9q12 locus, resulting in the formation of nSBs about 1 μm diameter, allows a characterization of the actors involved in the activation of these regions by *in situ* approaches²³.

As a step toward a better characterization of chromatin acetylation at the 9q12 locus, analysis of specific histone marks was performed in heat-shocked cells. Unstressed cells display a homogenous distribution of acetylated chromatin (see Supplementary Fig. S1), while foci enriched in acetylated chromatin are detected in heat-shocked cells^{2,3}. As shown in Fig. 1a–c, acetylated lysine residues of histone H3 (K4, K9, K18, K23, K27, K36, K56, K64, K122) and H4 (K5, K8, K12, K16, K20) were enriched at nSBs in stressed cells (acetylated foci present in >90% of all nSBs) (HeLa cells are tetraploid for chromosome 9 so that more than two foci were detected in these cells). Stress-induced acetylation of histone residues at histone H3 and H4 at nSBs appears as a broad phenomenon since a broad range of acetylated residues are enriched at nSBs.

The status of the repressive histone mark H3K9me3 was also analyzed by IF (Fig. 2a) and ChIP (Fig. 2b) in unstressed and stressed cells. In unstressed cells, the 9q12 locus can be detected with a plasmid expressing a HSF1 mutant containing the trimerization (TRIM) and DNA binding (DBD) domains but devoid of the transactivating domain. This DBD-TRIM HSF1 mutant displays a constitutive binding capacity and behaves as a dominant negative factor²⁴. This plasmid allows a direct identification of the 9q12 locus in unstressed cells, with no need to perform DNA FISH after acquisition of the IF image. As shown in Fig. 2a, H3K9me3 enrichment at the 9q12 locus is less pronounced in stressed cells. Of note, the absence of a global reduction of H3K9me3 was previously shown for the rest of the nucleus²⁵. In both unstressed and stressed cells, the percentage of foci in which total, partial and no overlap between HSF1 and H3K9me3 fluorescence profiles was observed is given as a plot. Decrease of H3K9me3 labeling at the 9q12 locus was also confirmed by ChIP experiments (Fig. 2b). Our data thus suggest that stress-induced acetylation we observe at H3K9 (Fig. 1a) occurs at regions initially enriched in H3K9me3 and that acetylation probably occurs at the expense of H3K9 methylation.

HSF1 triggers massive chromatin acetylation through interaction with Histone Acetyl Transferases. To better characterize the kinetics of histone acetylation with regard to the kinetics of HSF1 binding and sat III transcription by RNAP II, cells were submitted to a continuous heat shock exposure of 10 to 60 min. The evolution of HSF1 accumulation, of histone acetylation and of elongating RNAP II was analyzed by

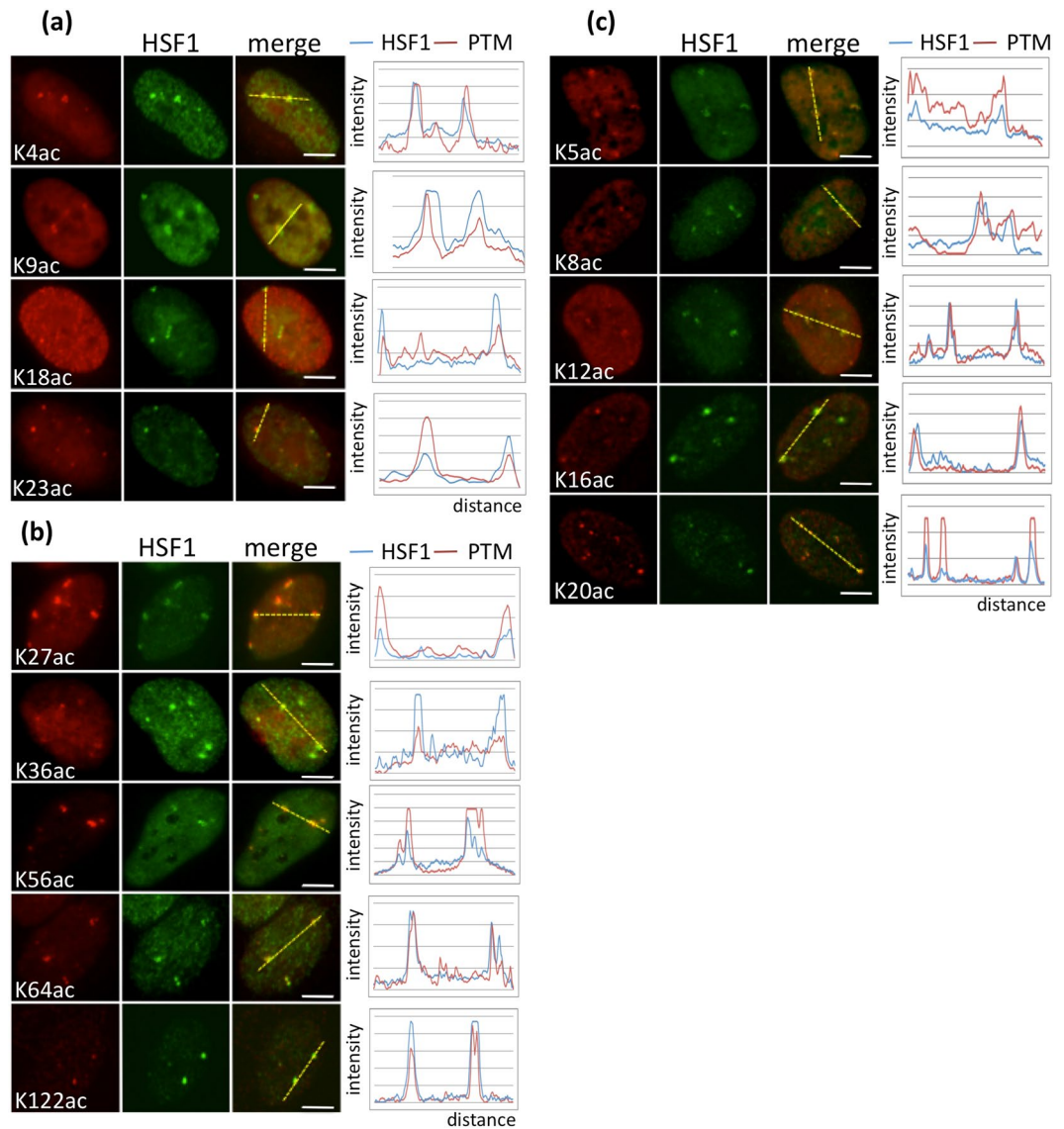


Figure 1. Status of active histones H3 and H4 marks at the 9q12 locus in HeLa stressed cells. **(a,b)** Active H3 and **(c)** H4 histone marks (red signals) and HSF1 (green signals) detected by immunofluorescence with fluorescence profiles (Scale bar = 5 μ m). PTM = Post Translational Modification.

immunofluorescence. SRSF1, a splicing factor binding to sat III RNA, was used as a marker of sat III RNA accumulation. Indeed, SF2/ASF enrichment is always detected at HSF1 foci enriched in Sat III RNA^{26–28}, allowing an indirect detection of Sat III transcript by immunofluorescence. As shown in Fig. 3A, the presence of HSF1 and of acetylated foci was observed earlier in time at nSBs (10 and 20 min HS) than the detection of elongating RNAP II and SRSF1 (30 min). Moreover, the evolution of the percentage of nuclei displaying HSF1 and acetylated foci in response to a continuous heat exposure (80% of nuclei displaying both HSF1 and acetylated foci after 30 min of heat shock), suggests that both events are tightly correlated in time.

Three HATs were tested for their presence at nSBs in HeLa stressed cells. Besides p300/CBP already identified at nSBs² and in HSF1 complexes in heat-shocked cells^{22,29}, two other HATs with pleiotropic roles, GCN5 and TIP60, were also detected at these bodies by IF (Fig. 3b). To further unravel the role played by active HSF1 in the recruitment of these three HATs, cells were further transfected with a plasmid expressing Flag-HSF1 and either Myc-GCN5, Myc-p300 or HA-TIP60. Immunoprecipitations of Flag-HSF1 were performed with extracts from Cos7 cells submitted or not to a 20 or 60 min heat shock. Immunoprecipitations of Flag-HSF1 were performed with extracts from Cos7 cells submitted or not to a 20 or 60 min heat shock. Indeed, Cos7 cells from green Monkeys do not display nSBs³⁰, making these cells as an appropriate biological system to test the capacity of HSF1 to interact with the considered HATs, independently of nSBs formation.

As shown in Fig. 3c, specific HSF1/p300/GCN5 or/TIP60 complexes were detected only in extracts from cells submitted to a 20 or 60 min heat shock while not detected in control cells. The lowered HSF1 mobility observed in the 42 °C sample is due to stress-induced post-translational modifications of the protein. Co-IP experiments

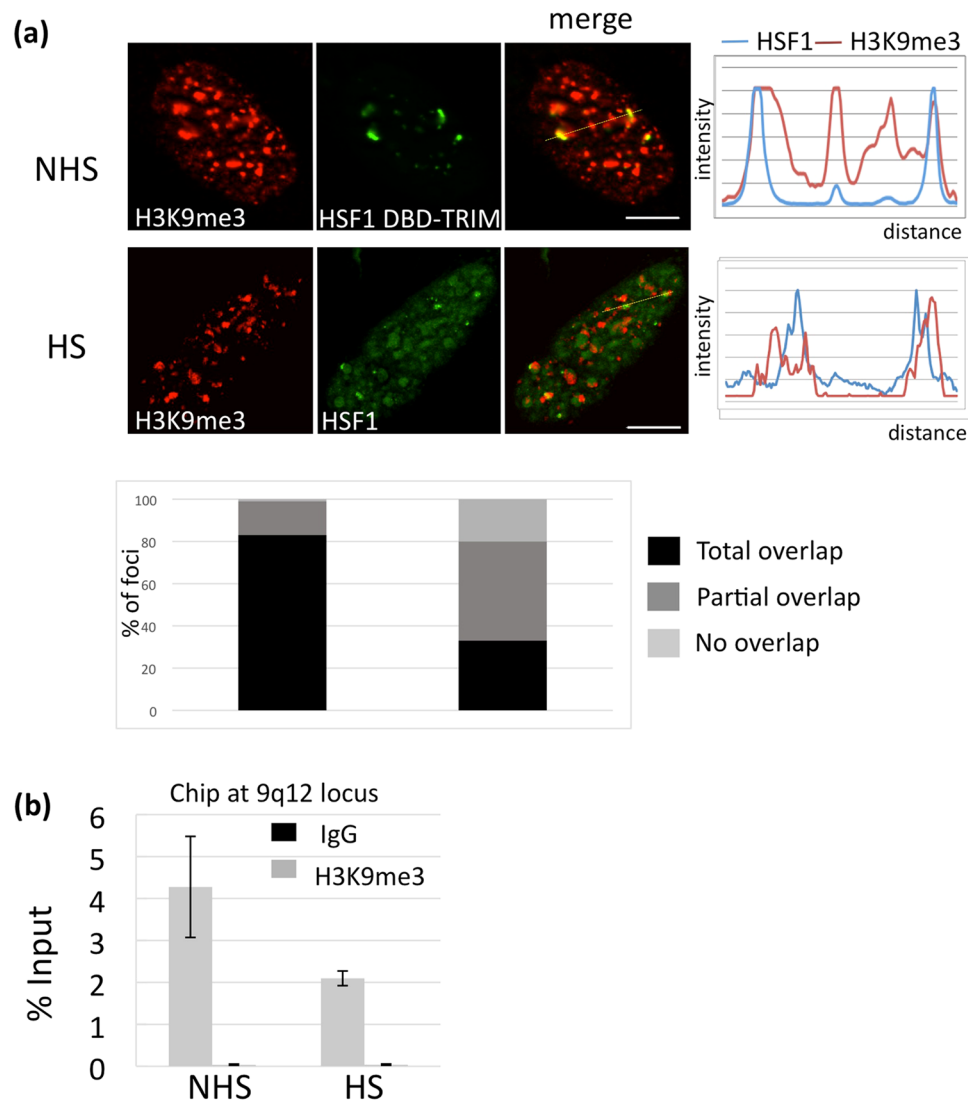


Figure 2. Loss of repressive H3K9me3 histone mark at the 9q12 locus in stressed HeLa cells. **(a)** H3K9me3 (red signals) was detected in unstressed cells with the DBD-TRIM-GFP HSF1 mutant and in stressed WT cells with endogenous HSF1 (green signals). In stressed cells, a higher percentage of foci displaying no overlap or a partial overlap of HSF1 (green signals) and H3K9me3 (red signals) fluorescence profiles is observed. Percentages were obtained from a total of 300 nSB profiles (Barr = 5 μ m). **(b)** Evolution of H3K9me3 at the 9q12 locus determined by ChIP in HeLa unstressed (NHS) and stressed (HS) cells.

indeed indicate that, in these cells, the interaction between HSF1 and HATs we observe in stressed cells is independent of the presence of nSBs.

HSF1 is negatively regulated by HSP70³¹ and, consequently, by a modification of the HSP70/HSF1 ratio in cells. Overexpressing HSF1 results in the constitutive HSF1 binding to its genomic targets, even in the absence of stress. To test whether HSF1 binding at the 9q12 locus was sufficient to promote an acetylation and transcription of the 9q12 locus in a heat-shock-independent manner, the transcriptional activation of the 9q12 locus, was tested in cells transfected with HSF1-GFP. As shown in Fig. 4, HSF1-GFP foci were present in a fraction of these cells. These foci were enriched in acetylated histones and in sat III transcripts, suggesting that overexpressed HSF1 is able to recruit HATs and to drive acetylation and transcription, when overexpressed, in a heat-independent manner. However, it is interesting to note that while acetylated foci, in HSF1 overexpressing cells, are present at the 9q12 locus, only interaction between GCN5 and HSF1 was detected in HSF1 immunoprecipitates from stressed cells. The reason could be that only a low percentage of transfected cells express HSF1 at a level sufficient to trigger HSF1 binding in the absence of stress and/or that the interaction between HATs and HSF1 is weaker in unstressed cells.

BET family members play an essential role in pericentric HC activation upon stress.

Bromodomain-containing proteins represent important actors in transcription initiation, and it has been shown that certain bromodomains target specific histone acetylation¹⁷. Because of the wide range of acetylated lysines

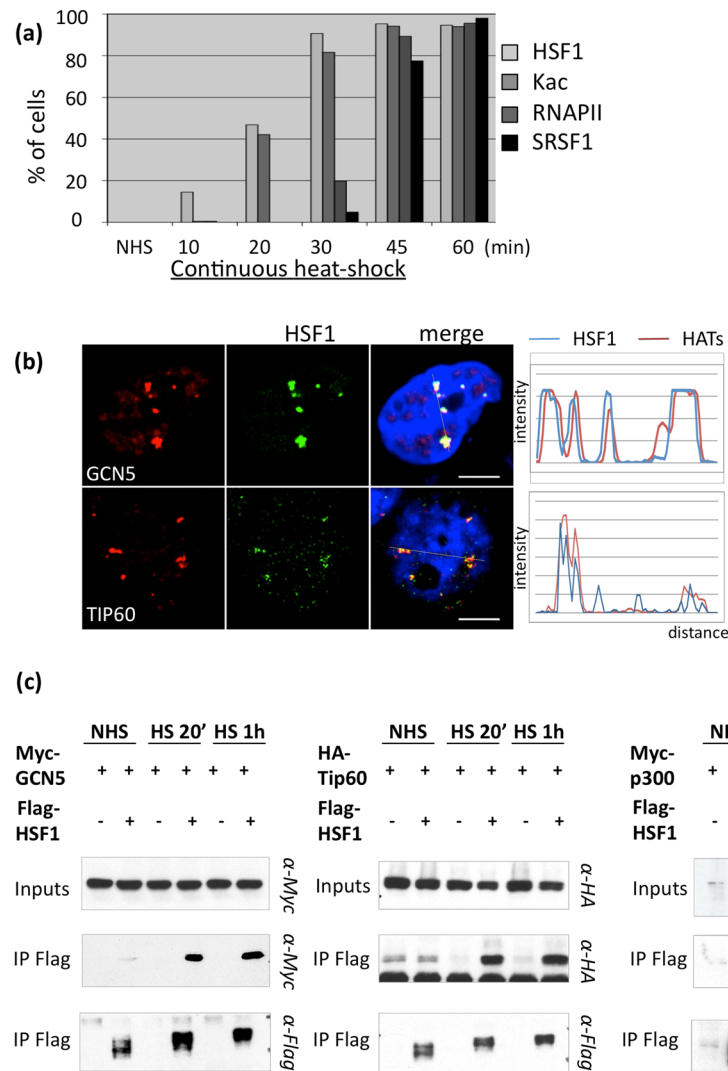


Figure 3. GCN5, TIP60 and p300 HATs are recruited to nSBs through their interaction with HSF1. **(a)** Percentage of cells displaying HSF1, acetylated histones, RNAP II and SRSF1 enrichment at nSBs over a kinetics of continuous heat shock exposure determined by immunofluorescence. Each percentage was calculated from a total of 300 cells. **(b)** Colocalization of endogenous HSF1 (green signals) and endogenous GCN5 or TIP60 (red signals) detected by immunofluorescence. Scale bar = 5 μ m. **(c)** co-immunoprecipitation of Flag-HSF1 with HA-TIP60, Myc-GCN5 or Myc-p300. All three HATs were detected in Flag-HSF1 immunoprecipitates from unstressed and stressed Cos7 cells (Original blots are presented in Supplementary Figure S2).

detected at nSBs, we wondered if BRD proteins could also be recruited on pericentric HC upon HS. The distribution of the BET family members BRD2, 3, 4, and of two other BRD containing proteins ATAD2 and TAF1/TAF250 was analyzed in stressed cells and their recruitment to nSBs examined. Endogenous BRD2, BRD3, BRD4 were clearly enriched at nSBs in stressed cells (colocalization with HSF1 foci >90%) while no recruitment of the TFIID subunit TAF250, and of the chromatin modulator ATAD2³², was observed, revealing the presence of certain, but not all, bromodomain proteins to nSBs (Fig. 5 and see Supplementary Fig. S3).

To determine the functional implication of BET proteins in HSF1-mediated sat III transcription, the impact of JQ1, a specific inhibitor of BET binding on acetylated histones, was tested on HSF1 foci formation, on chromatin acetylation at the 9q12 locus, and on hsp70 and sat III transcription. As expected, the recruitment of BRD4 (Fig. 6a), BRD2 and BRD3 proteins (see Supplementary Fig. S3) was lost on nSBs in the presence of JQ1, thus validating the efficacy of the JQ1 treatment in stressed cells. In contrast, HSF1 targeting to nSBs and the formation of acetylated foci was not affected by JQ1 (Fig. 6a). This clearly demonstrated that BET proteins do not play a major role, neither in HSF1 recruitment to and stabilization at the 9q12 locus in stressed cells, nor in HSF1-mediated HC acetylation. In contrast, a significant decrease in the amount of sat III RNA was observed in JQ1 treated cells, both by RNA FISH (Fig. 6b) and Northern blot experiments (Fig. 6c). This shows that, as expected, BET proteins act on HC after HSF1 binding and subsequent chromatin acetylation. This also shows that impairing the recruitment of BET proteins to acetylated chromatin by JQ1 affects sat III transcription. Surprisingly, while Triptolide, a potent inhibitor of RNA Pol II initiation both impaired the stress-induced accumulation of HSP70 and Sat III transcripts,

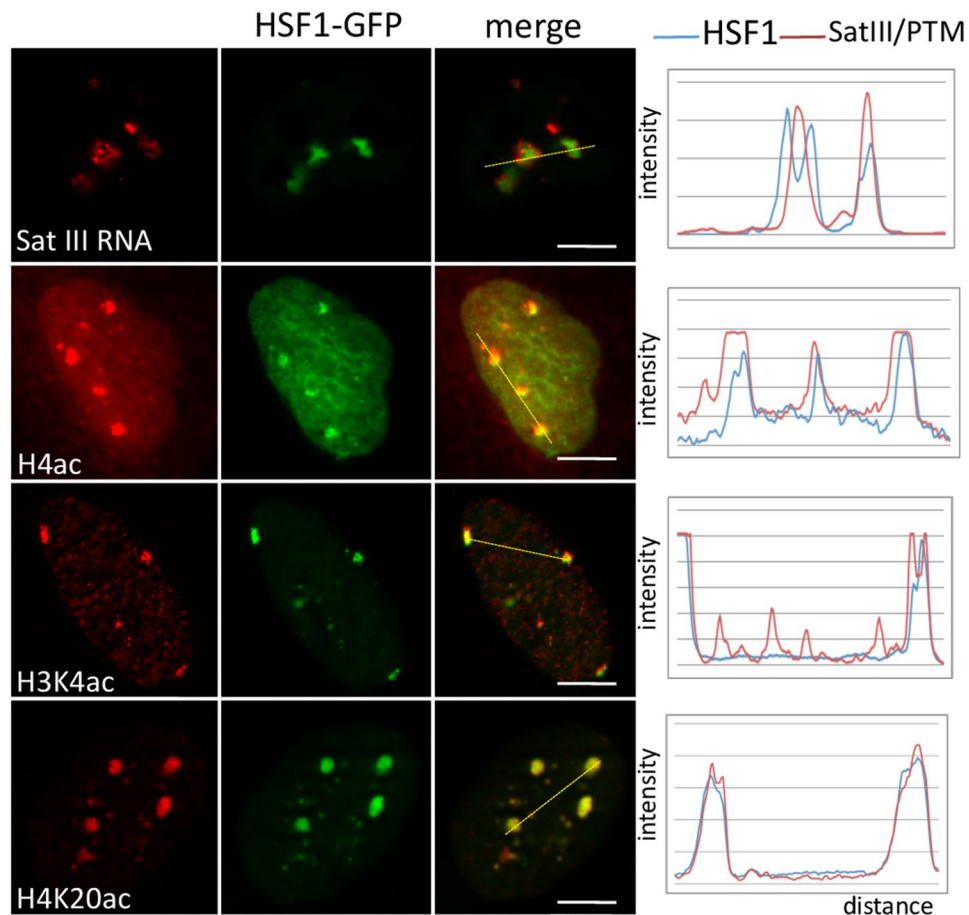


Figure 4. Overexpressed HSF1 directs chromatin acetylation at nSBs in unstressed HeLa cells. HSF1 foci were detected in cells transiently transfected with HSF1-GFP. HSF1-GFP foci correspond to regions of hyperacetylated chromatin and of sat III RNA accumulation, thus demonstrating that DNA-binding competent HSF1 directs chromatin acetylation at the 9q12 region in a stress-independent manner. Scale Bar = 5 μ m.

no impact of JQ1 on the stress-induced accumulation of HSP70 transcripts was observed (Fig. 6b and c), therefore identifying BET proteins as essential actors in sat III (and not hsp70) transcriptional activation, and JQ1 as a potent new decoupling agent of HSP70 and sat III transcription in heat-shocked cells. While no impact of JQ1 on histone acetylation at the 9q12 locus was observed, no accumulation of RNAP II (either phospho or not phosphorylated) at this locus was detected in JQ1 treated cells, revealing a new important role of BRD proteins in the recruitment of RNAP II at pericentric HC of stressed cells. (Fig. 7).

Discussion

One of the most dramatic examples of transcriptional activation of heterochromatic regions is the one occurring in response to cell stress. The heat shock response thus offers a unique model to explore the epigenetic mechanisms underlying pericentric HC activation that may also be involved in the different contexts where such activation occurs, including early development³³, senescence³⁴ or cancer³⁵.

The capacity of HSF1 to rapidly and efficiently activate the transcription of HC very likely relies on its capability, shown here, to interact with HATs, and to drive them to pericentric HC. Coimmunoprecipitation of p300/CBP with HSF1 has already been reported^{22,29} and the enrichment of CBP at nSBs² also described. We extend here these findings to two other essential transcriptional co-activators belonging to two additional HAT families: GCN5, and TIP60 and have also identified the domains possibly involved in their interaction with HSF1 (see Supplementary Fig. S4). As for p300, we have no evidence so far that TIP60 and GCN5 interaction with HSF1 is direct. The high number of acetylated histone marks found at nSBs however strengthens the idea that chromatin acetylation at nSBs results from the active targeting of HATs through a HSF1-driven process. It also reinforces the possibility that a massive recruitment of HATs at nSBs may deplete them from the rest of the nucleus and participate to the global down regulation of gene expression occurring in heat-shocked cells²³. The transcriptional activation of sat III by HSF1 could thus represent a powerful way to trigger a rapid remodeling of gene expression at a genome-wide scale in heat-shocked cells. Our observation also reveals that the enrichment of H3K9me3 at pericentric HC is not a barrier to HSF1 binding at these regions and to the HSF1-dependent transactivation of these loci. In the yeast *S. cerevisiae*, SIR-generated HC, although devoid of H3K9me3 histone marks, is permissive to the binding of HSF and components of the preinitiation complex (PIC), TBP and RNAPII, in a model where

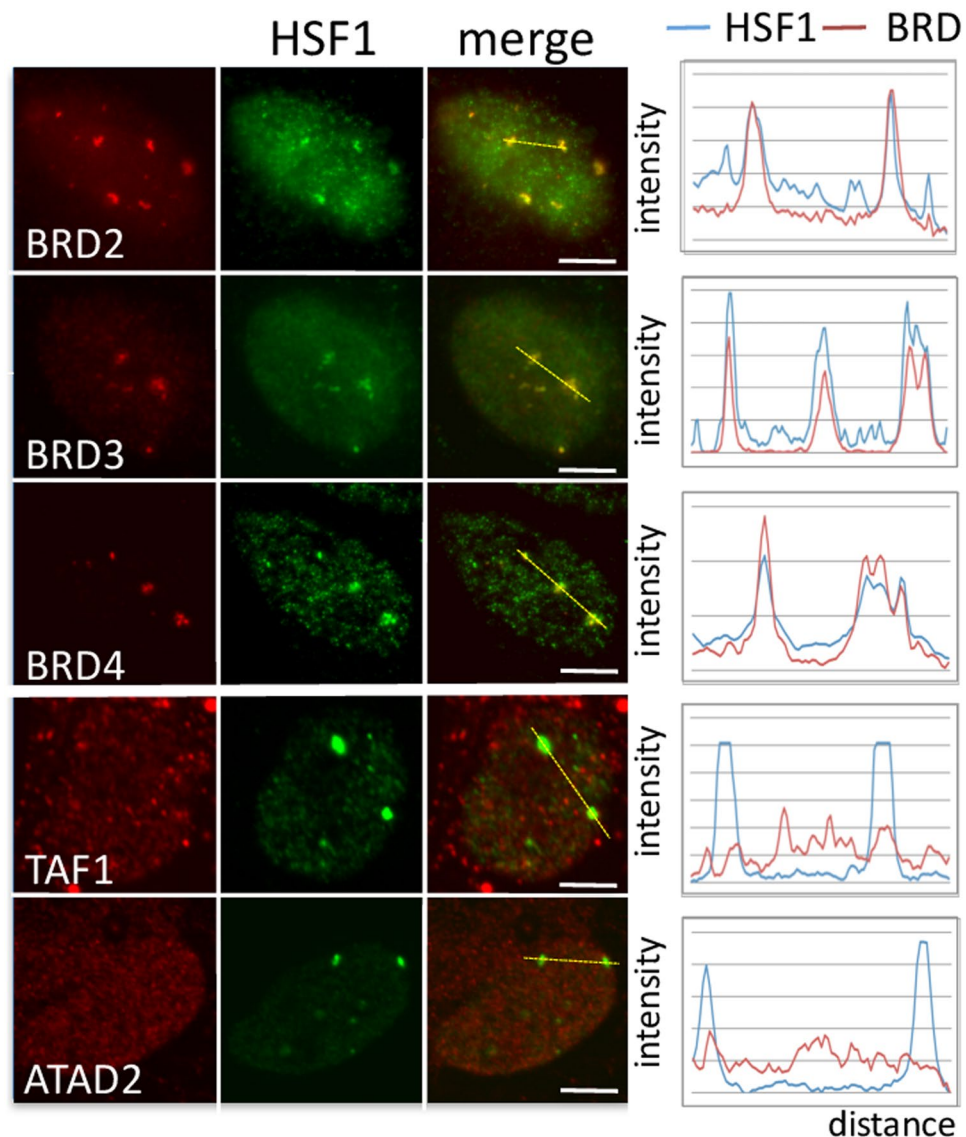


Figure 5. Specific Bromodomain-containing proteins are recruited to the 9q12 locus in stressed HeLa cells. Bromodomain containing proteins (green signals) are co-detected with HSF1 (red signals) by immunofluorescence on stressed cells. Endogenous BRD2, BRD3 and BRD4 are enriched at nSBs together with endogenous HSF1 (green signals) while TAF₂₅₀ and ATAD2 are not. Absence of TAF1 and ATAD2 enrichment at the 9q12 locus was confirmed by comparative analysis of TAF1 or ATAD2 and HSF1 fluorescence profiles. Scale bar = 5 μ m.

a heat shock gene was flanked by mating-type silencers³⁶. We now broaden these observations to an endogenous locus in human cells, and confirm the capacity of HSF1 to promote a rapid deposition of active epigenetic marks at regions enriched in H3K9me3, thus reinforcing the classification of HSF1 in the category of pioneer transcription factors, able to access target element in nucleosomal DNA when other factors cannot^{10,37}.

Acetylation of all four H2A, H2B, H3 and H4 histones at nSBs has already been reported, more specifically at H4K8 and K16^{2,3} and is consistent with the active transcriptional state of HC upon HS. We show that acetylation targets lysine residues at the N terminal histone tails but also, in the case of H3K56, H3K64, H3K122, at histone fold motifs. Among the different acetylation marks we detect at nSBs, three of them have been related to heterochromatin maintenance. H3K4ac has been proposed to regulate heterochromatin formation, and more specifically the switch between active and inactive HC formation at S phase in the yeast *S. pombe*, allowing the binding of Chp2 and Swi6, the yeast homologs of HP1, to H3K9me2/3³⁸. A very recent work now also points to the contrasting role of two other acetylation marks in mammals. Indeed, H3K18 deacetylation at pericentric HC has been found to stabilize pericentric HC and to prevent mitotic errors and cellular senescence³⁹ while, conversely, a new study points to the importance of TIP60-dependent H3K12 acetylation, through BRD2 interaction, to stabilize pericentric HC in Suv39H^{-/-} mouse cells⁴⁰.

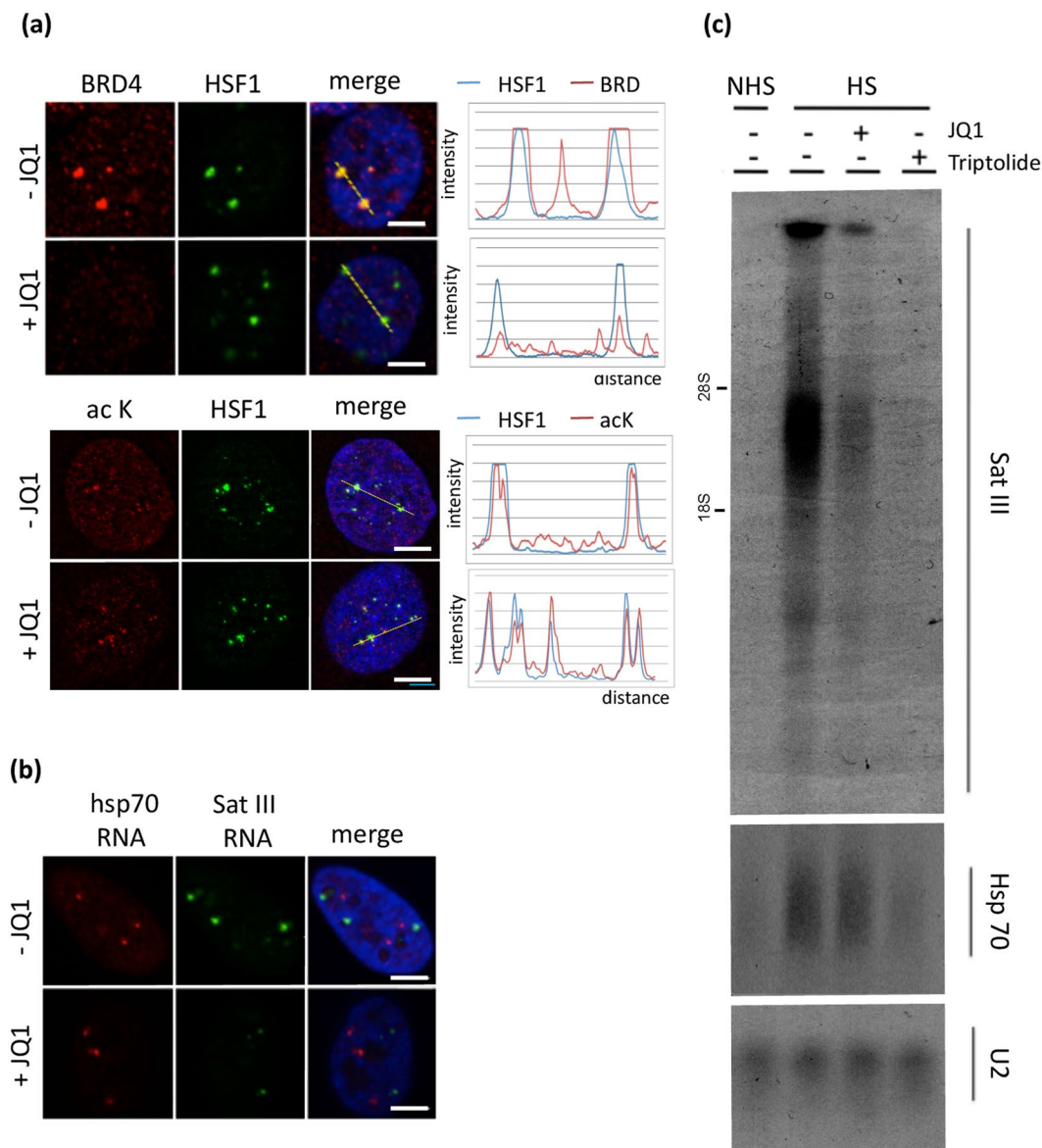


Figure 6. Inhibition of Brd proteins binding to acetylated chromatin by JQ1 impairs the transcriptional activation of sat III sequences by RNAP II in stressed cells. **(a)** HSF1 (green signals) was either co-detected with BRD4 by immunofluorescence (red signals) (upper image) or detected with acetylated Lysine (lower image) **(b)** hsp70 (red signals) and sat III (green signals) RNA were detected with RNA FISH (same exposure time were used in both conditions). **(c)** Impact of JQ1 on hsp70 and sat III RNA accumulation by Northern blot on RNA fractions prepared from unstressed (NHS) and stressed (HS) cells treated or not with JQ1 (original blots are displayed in Supplementary Figure S5).

The contrasting roles of histone acetylation in these different biological contexts, might reflect the dual roles of pericentric HC activation. Indeed, in stressed cells, pericentric HC transcriptional activation and sat III RNA accumulation may serve, through the transient recruitment of transcription factors and of RNA maturation factors at nSBs, as an efficient way to trigger global and rapid changes in gene expression. Conversely, transient accumulation of pericentric RNA also participates, as in the yeast *S. pombe*⁴¹ and mammals^{33,42} in HC maintenance and establishment through the recruitment of proteins, such as HP1 (Heterochromatin Protein 1)^{42,43}. Finally, based on the recent finding that deacetylation of H3K18 at pericentric HC seems to prevent mitotic errors and cellular senescence³⁹, histone acetylation at pericentric HC may promote a rapid activation of cell cycle checkpoints and be used as a sensor of stress.

Our observation that HSF1 overexpression is sufficient to trigger chromatin acetylation and sat III accumulation at nSBs suggests that active HSF1 is able to drive HATs to nSBs, even in the absence of stress, with possible impact in tumors where HSF1 overexpression and nuclear localization is associated with reduced cell survival⁴⁴.

Acetylated residues within the N terminal tails and histone fold motifs neutralize positive charges on histones and/or serve as platforms for the recruitment of essential transcription factors. Our data now point to the

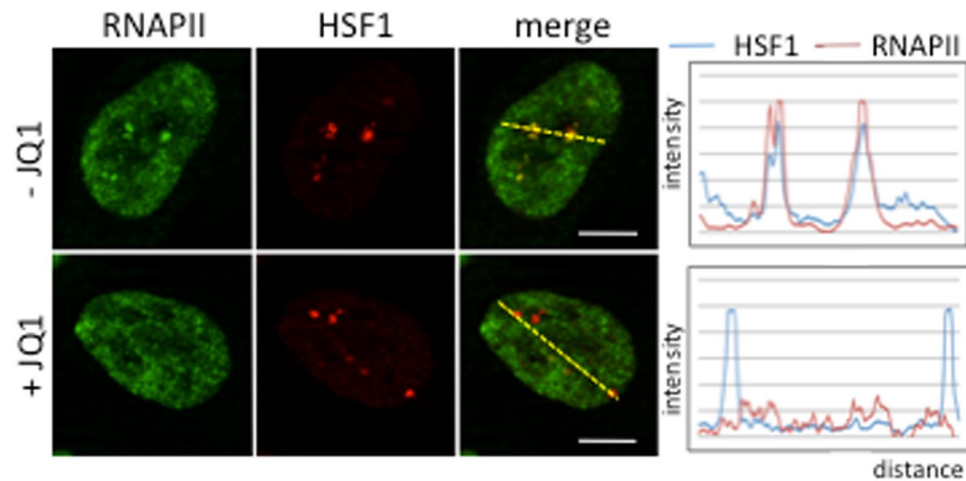


Figure 7. Detection of endogenous HSF1 and RNAP II by immunofluorescence in stressed cells treated or not with JQ1. Colocalization between RNAP II (green signals) and HSF1 (red signals) is >90% in the absence of JQ1 and <10% in cells treated with JQ1. Scale bar = 5 μ m.

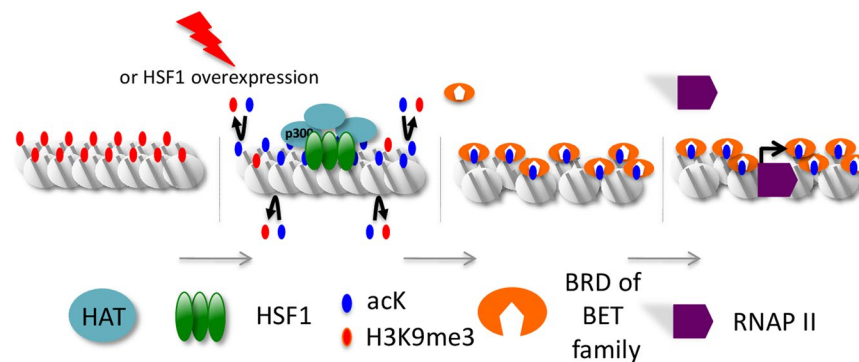


Figure 8. General scheme of sat III transcription at nSB. Heat shock allows a massive recruitment of several HATs to sat III sequences through their direct or indirect interaction with HSF1. Acetylated lysine residues of histones H3 and H4 then serve as docking sites for Bromodomain proteins of the BET family, triggering chromatin remodeling and RNAP II recruitment.

important role of acetylation in the selective recruitment of Bromodomain proteins BRD2, BRD3, and BRD4 on nSBs, with a role in sat III accumulation. Our finding that JQ1 selectively impairs the accumulation of sat III and not that of hsp70 transcripts reveals major differences in the mechanisms underlying sat III and hsp70 gene transcription. Differences of chromatin compaction between hsp70 gene and sat III sequences could set the basis for the differences of the JQ1 impact we observe. The BRD2 protein has been found to display an intrinsic histone chaperone activity, rendering nucleosomes marked by acetylation, permissive to the progression of elongating RNAPII¹⁶. Likewise, BRD4 activates transcriptional elongation through different ways. One, specifically found at enhancers, relies on the acetyl binding property of the BRD4 bromodomain and involves the histone chaperone activity of BET proteins⁴⁵. A second way, not impaired by JQ1, would rely on the capacity of BRD4 to recruit the P-TEFb complex allowing RNAP II phosphorylation and release from pausing at transcription start sites⁴⁶. The new observation we make that RNAP II accumulation at the 9q12 locus is impaired in JQ1 treated cells, reveals a new specific role for Brd proteins in RNAP II recruitment at pericentric HC in stressed cells and indicates that the histone chaperone function of BET proteins is preferentially required for HC transcription (Fig. 8). Indeed although pTEFb is known to play a role in the elongation of RNAP II at hsp70 gene^{47–49}, the role of BET proteins in pTEFb recruitment on Hsp70 promoter, if any, is not impaired by JQ1.

Additional and non-exclusive functions of BET proteins could also be envisioned. In *S. pombe*, Bdf2, the yeast homolog of BRD4 has been found to create a barrier between the bunch of active chromatin and adjacent regions. One cannot exclude that the recruitment of BET proteins to heterochromatic regions could favor the isolation of the active locus from its adjacent environment⁵⁰. Moreover, while our paper was under reviewing, a study reported that Brd4 recruitment to pericentric HC could protect genes from splicing inhibition upon heat shock. This study therefore also identifies pericentric HC as a new specific target of BRD proteins in heat-shocked cells⁵¹. The possibility to uncouple sat III and hsp70 gene transcription should help us to unravel the specific role of pericentric activation and sat III transcripts in heat-shocked cells and in the various different physiopathological contexts, such as cancer^{23, 52, 53}, for which an accumulation of sat III RNA has been detected.

Material and Methods

Cell culture, heat shock and drug treatments. *Cell lines.* Immunofluorescence and ChIP analysis were performed in HeLa cells, from cervix adenocarcinoma (American Type Culture Collection, VA, USA). Co-immunoprecipitations were performed in fibroblast-like Monkey Cos7 cells.

Heat-shock experiments were performed by immersion of the culture flasks in a warm water bath. Unless otherwise stated, heat-shock was performed for 1 h at 43 °C.

JQ1 treatment¹⁹ was achieved by treating the cells at a concentration of 500 nM, 5 min before heat shock.

Transient transfections were performed using lipofectamine[®]2000 solution (ThermoFisher Scientific).

Transcription inhibition was performed with adding Triptolide, an inhibitor of RNAP II initiation⁵⁴, at a final concentration of 5 mM in the culture medium 5 min before stress. Triptolide was then maintained during the heat-shock treatment.

Plasmids. Expression plasmids for human CBP-Ha, Ha-Gcn5 and p300 were provided by A. Harel-Bellan (Institut A. Lwoff, Villejuif, France), and H. Stunnenberg (Radboud University Nijmegen, The Nederland), respectively. Human pcDNA Ha-tagged TIP60 expression plasmids are described in^{55,56}. pH2.3 clone corresponding to human hsp70 sequence⁵⁷ was provided by R.I. Morimoto (Northwestern University, Evanston, IL, USA). The plasmids expressing the mouse HSF1-GFP, DBD-TRIM-GFP and FLAG-HSF1 were developed in our laboratory^{24,58}. Detection of hsp70 and sat III RNA was performed with plasmid pH2.3 and pHuR98^{57,59}.

Immunofluorescence, RNA FISH, DNA FISH, and microscopy. Immunofluorescence was performed on formaldehyde-fixed cells as previously described^{58,60}, with the following antibodies: rabbit anti-HSF1 (Enzo, SPA-950) (1:100), mouse anti-HSF1 (Santa Cruz sc 11757, 1:200), rabbit anti-H3K4ac (Millipore, 07-539, 1:100), rabbit anti-H3K9ac Abcam ab39917 (1:200), rabbit anti-H3K18ac Abcam ab1191 (1:50), rabbit anti-H3K27ac active motif 39133 (1:800), rabbit anti-H3K56ac Epitomics 2134-1 (1:250), rabbit anti-H3K64ac Active Motif 39546 (1:1000), rabbit anti-H3K122ac R. Schneider (1:100), rabbit anti-H4 K5ac Epitomics 1808-1 (1:500), rabbit anti-H4K8ac Epitomics 1796-1 (1:800), rabbit anti-H4K12ac (Millipore, 07-595, 1:500), rabbit anti-H4K16ac Millipore 07-329 (1:200), rabbit anti-H4K20ac Abcam ab19855 (1:200), anti-acetyl lysin Millipore, 06-933 (1:200), anti-Gcn5 Millipore 07-038 (1:50), anti-Tip60 Santa Cruz sc-20698 (1:100), anti-Brd2 (Abcam, 1:400), anti-Brd4 (Abcam, Ab75898) (1:300), and mouse anti-ATAD2 (Sigma, SAB1400512) (1:200). Anti-RNAP II Ser 2 (1:400) was obtained, from M. Vigneron (IGBMC, Strasbourg, France) (1:400). Anti-TAF1 was kindly provided by L. Tora (IGBMC, Strasbourg, France). Anti-Brd3 (1:100) was made by immunizing a rabbit with the peptides QLKKGKQASASYDSC and CQAAKSKEELAQEK, followed by immuno-purification of the serum on the immobilized peptides.

Secondary anti-rat or -rabbit antibodies conjugated to either Dylight 549 (KPL) or Alexa 488 (Molecular Probes) were used. DNA was counterstained with DAPI (250 ng/mL). RNA FISH alone and in combination with immunofluorescence or DNA FISH was performed as described previously⁶⁰. Cells were analyzed using an apotome microscopy system (Zeiss, Jena, Germany) or a confocal laser scanning microscope (CLSM) (LSM 510 META NLO, Zeiss) using a Plan-Apochromat 63x Oil objective (NA = 1.4). Confocal excitation wavelengths were 488 nm (FITC), 543 nm (Cy3), and 730 nm (DAPI- biphotonic excitation). The pinhole diameter was set to 1 Airy Unit for the confocal channels and fully opened for 2P excitation.

RNA extraction and Northern blot. Total RNAs were extracted with Tri-reagent[®] (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's instructions. For Northern blot analysis, 10 µg of RNA were loaded on a 1% agarose denaturing gel. Before transfer, the gel was treated with 75 mM NaOH for 10 min, and washed in 0.5 M Tris/1.5 M NaCl, pH 7.0. The RNAs were then transferred onto Hybond N membrane (Amersham Biosciences) and hybridized with pH2.3⁵⁷ or pHuR98⁵⁹ probe labeled with- α³²P dCTP.

Immunoprecipitation. Cos cells were plated in 10 cm dishes and transfected with 3 µg of a pcDNA-FLAG plasmid expressing a Human HSF1 (FLAG in Cter) or an empty vector as negative control, and a plasmid expressing either HA-p300 (5 µg), HA-GCN5 (4 µg) or HA-TIP60 (4 µg). Cells were lysed 24 h after transfection by incubation for 1 h on ice in LSDB500 (500 mM KCl, 20% glycerol, 3 mM MgCl₂ and 50 mM Hepes pH 7.9) containing 0.2% NP-40, 1 mM DTT, 200 µg/ml DNaseI, 100 µg/ml RNaseA, 50 ng/ml TSA and protease inhibitors cocktail (complete mini EDTA-free; Roche). After centrifugation, the lysate was incubated with 1 µg of anti-FLAG antibody (Sigma) for 1 h on ice. Protein G-Sepharose beads (Amersham) were then added and incubated at 4 °C on a rotoshake for 1 h. After three washes with LSDB250 (same as the lysis buffer with 250 mM KCl), complexes were recovered by adding Laemmli sample buffer and analyzed by Western blots. Western blot was performed with a rat anti-HA (3F10) antibody (Roche).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP). Cells were cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 10 min before the addition of 125 mM glycine (Sigma) at room temperature for 5 min. After washing, cell were resuspended into cytosol lysis buffer (10 mM Hepes pH 6.5, 0.25% Triton-X100, 0.5 mM EGTA, 10 mM EDTA) at 4 °C for 5 min. Nuclei were resuspended in nuclei lysis buffer (50 mM Tris pH 8, 120 mM NaCl, 5 mM EDTA and 0.5% NP- 40) and then sonicated at 4 °C for 19 min with a BioRuptor sonicator (Diagenode) to obtain fragments between 200 and 800 base pairs. Samples were incubated overnight with the anti-H3 (Abcam), anti-H3K9Me3 (Abcam), anti-IgG (Diagenode) antibodies and immunoprecipitated using the OneDay ChIP kit (Diagenode), following the manufacturer instructions. Immunoprecipitated DNA was analyzed by qPCR, using primers. IP-PHUR1 (Fwd): AATCAACCCGAGTGCAATCGAATGGAATCG and IP-PHUR2 (Rev) TCCATTCCATTCTGTACTCGG⁵².

Standard deviations were calculated from 3 independent experiments.

References

- Lindquist, S. & Craig, E. A. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* **22**, 631–677, doi:10.1146/annurev.ge.22.120188.003215 (1988).
- Jolly, C. *et al.* Stress-induced transcription of satellite III repeats. *J Cell Biol* **164**, 25–33, doi:10.1083/jcb.200306104 (2004).
- Rizzi, N. *et al.* Transcriptional activation of a constitutive heterochromatic domain of the human genome in response to heat shock. *Mol Biol Cell* **15**, 543–551, doi:10.1091/mbc.E03-07-0487 (2004).
- Akerfelt, M., Morimoto, R. I. & Sistonen, L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 545–555, doi:10.1038/nrm2938 (2010).
- de Nadal, E., Ammerer, G. & Posas, F. Controlling gene expression in response to stress. *Nat Rev Genet* **12**, 833–845, doi:10.1038/nrg3055 (2011).
- Petes, S. J. & Lis, J. T. Rapid, transcription-independent loss of nucleosomes over a large chromatin domain at Hsp70 loci. *Cell* **134**, 74–84, doi:10.1016/j.cell.2008.05.029 (2008).
- Zobeck, K. L., Buckley, M. S., Zipfel, W. R. & Lis, J. T. Recruitment timing and dynamics of transcription factors at the Hsp70 loci in living cells. *Mol Cell* **40**, 965–975, doi:10.1016/j.molcel.2010.11.022 (2010).
- Smith, S. T. *et al.* Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin-modifying complex. *Nat Cell Biol* **6**, 162–167, doi:10.1038/ncb1088 (2004).
- Yuan, C. X. & Gurley, W. B. Potential targets for HSF1 within the preinitiation complex. *Cell Stress Chaperones* **5**, 229–242 (2000).
- Fujimoto, M. *et al.* RPA assists HSF1 access to nucleosomal DNA by recruiting histone chaperone FACT. *Mol Cell* **48**, 182–194, doi:10.1016/j.molcel.2012.07.026 (2012).
- Lee, J. S., Smith, E. & Shilatifard, A. The language of histone crosstalk. *Cell* **142**, 682–685, doi:10.1016/j.cell.2010.08.011 (2010).
- Lawrence, M., Daujat, S. & Schneider, R. Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends Genet* **32**, 42–56, doi:10.1016/j.tig.2015.10.007 (2016).
- Muller, S., Filippakopoulos, P. & Knapp, S. Bromodomains as therapeutic targets. *Expert Rev Mol Med* **13**, e29, doi:10.1017/S1462399411001992 (2011).
- Bres, V., Yoh, S. M. & Jones, K. A. The multi-tasking P-TEFb complex. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 334–340, doi:10.1016/j.ceb.2008.04.008 (2008).
- Gaucher, J. *et al.* Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt. *EMBO J* **31**, 3809–3820, doi:10.1038/emboj.2012.233 (2012).
- LeRoy, G., Rickards, B. & Flint, S. J. The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription. *Mol Cell* **30**, 51–60, doi:10.1016/j.molcel.2008.01.018 (2008).
- Moriniere, J. *et al.* Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain. *Nature* **461**, 664–668, doi:10.1038/nature08397 (2009).
- Reynold, N. *et al.* Oncogenesis by sequestration of CBP/p300 in transcriptionally inactive hyperacetylated chromatin domains. *EMBO J* **29**, 2943–2952, doi:10.1038/emboj.2010.176 (2010).
- Filippakopoulos, P. *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* **468**, 1067–1073, doi:10.1038/nature09504 (2010).
- Wang, C. Y. & Filippakopoulos, P. Beating the odds: BETs in disease. *Trends Biochem Sci* **40**, 468–479, doi:10.1016/j.tibs.2015.06.002 (2015).
- Sullivan, E. K., Weirich, C. S., Guyon, J. R., Sif, S. & Kingston, R. E. Transcriptional activation domains of human heat shock factor 1 recruit human SWI/SNF. *Mol Cell Biol* **21**, 5826–5837 (2001).
- Xu, D., Zalmas, L. P. & La Thangue, N. B. A transcription cofactor required for the heat-shock response. *EMBO Rep* **9**, 662–669, doi:10.1038/emboj.2008.70 (2008).
- Biamonti, G. & Vourc'h, C. Nuclear stress bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000695, doi:10.1101/cshperspect.a000695 (2010).
- Jolly, C. *et al.* *In vivo* binding of active heat shock transcription factor 1 to human chromosome 9 heterochromatin during stress. *J Cell Biol* **156**, 775–781, doi:10.1083/jcb.200109018 (2002).
- Fritah, S. *et al.* Heat-shock factor 1 controls genome-wide acetylation in heat-shocked cells. *Mol Biol Cell* **20**, 4976–4984, doi:10.1091/mbc.E09-04-0295 (2009).
- Denegri, M. *et al.* Stress-induced nuclear bodies are sites of accumulation of pre-mRNA processing factors. *Mol Biol Cell* **12**, 3502–3514 (2001).
- Chiodi, I. *et al.* RNA recognition motif 2 directs the recruitment of SF2/ASF to nuclear stress bodies. *Nucleic Acids Res* **32**, 4127–4136, doi:10.1093/nar/gkh759 (2004).
- Metz, A., Soret, J., Vourc'h, C., Tazi, J. & Jolly, C. A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. *J Cell Sci* **117**, 4551–4558, doi:10.1242/jcs.01329 (2004).
- Takii, R. *et al.* ATF1 modulates the heat shock response by regulating the stress-inducible heat shock factor 1 transcription complex. *Mol Cell Biol* **35**, 11–25, doi:10.1128/MCB.00754-14 (2015).
- Denegri, M. *et al.* Human chromosomes 9, 12, and 15 contain the nucleation sites of stress-induced nuclear bodies. *Mol Biol Cell* **13**, 2069–2079, doi:10.1091/mbc.01-12-0569 (2002).
- Shi, Y., Mosser, D. D. & Morimoto, R. I. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev* **12**, 654–666 (1998).
- Morozumi, Y. *et al.* Atad2 is a generalist facilitator of chromatin dynamics in embryonic stem cells. *J Mol Cell Biol* **8**, 349–362, doi:10.1093/jmcb/mjv060 (2016).
- Probst, A. V. *et al.* A strand-specific burst in transcription of pericentric satellites is required for chromocenter formation and early mouse development. *Dev Cell* **19**, 625–638, doi:10.1016/j.devcel.2010.09.002 (2010).
- Enukashvily, N. I., Donev, R., Waisertreiger, I. S. & Podgornaya, O. I. Human chromosome 1 satellite 3 DNA is decondensed, demethylated and transcribed in senescent cells and in A431 epithelial carcinoma cells. *Cytogenet Genome Res* **118**, 42–54, doi:10.1159/000106440 (2007).
- Eymery, A., Callanan, M. & Vourc'h, C. The secret message of heterochromatin: new insights into the mechanisms and function of centromeric and pericentric repeat sequence transcription. *Int J Dev Biol* **53**, 259–268, doi:10.1387/ijdb.082673ae (2009).
- Sekinger, E. A. & Gross, D. S. Silenced chromatin is permissive to activator binding and PIC recruitment. *Cell* **105**, 403–414 (2001).
- Zaret, K. S. & Carroll, J. S. Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev* **25**, 2227–2241, doi:10.1101/gad.176826.111 (2011).
- Xhemalce, B. & Kouzarides, T. A chromodomain switch mediated by histone H3 Lys 4 acetylation regulates heterochromatin assembly. *Genes Dev* **24**, 647–652, doi:10.1101/gad.1881710 (2010).
- Tasselli, L. *et al.* SIRT6 deacetylates H3K18ac at pericentric chromatin to prevent mitotic errors and cellular senescence. *Nat Struct Mol Biol* **23**, 434–440, doi:10.1038/nsmb.3202 (2016).
- Grezy, A., Chevillard-Briet, M., Trouche, D. & Escaffit, F. Control of genetic stability by a new heterochromatin compaction pathway involving the Tip60 histone acetyltransferase. *Mol Biol Cell* **27**, 599–607, doi:10.1091/mbc.E15-05-0316 (2016).
- Verdel, A., Vavasseur, A., Le Gorrec, M. & Touat-Todeschini, L. Common themes in siRNA-mediated epigenetic silencing pathways. *Int J Dev Biol* **53**, 245–257, doi:10.1387/ijdb.082691av (2009).
- Muchardt, C. *et al.* Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1alpha. *EMBO Rep* **3**, 975–981, doi:10.1093/embo-reports/kvf194 (2002).

43. Maison, C. *et al.* Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* **30**, 329–334, doi:10.1038/ng843 (2002).
44. Santagata, S. *et al.* High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 18378–18383, doi:10.1073/pnas.1115031108 (2011).
45. Kanno, T. *et al.* BRD4 assists elongation of both coding and enhancer RNAs by interacting with acetylated histones. *Nat Struct Mol Biol* **21**, 1047–1057, doi:10.1038/nsmb.2912 (2014).
46. Peterlin, B. M. & Price, D. H. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* **23**, 297–305, doi:10.1016/j.molcel.2006.06.014 (2006).
47. Ni, Z., Schwartz, B. E., Werner, J., Suarez, J. R. & Lis, J. T. Coordination of transcription, RNA processing, and surveillance by P-TEFb kinase on heat shock genes. *Mol Cell* **13**, 55–65 (2004).
48. Ni, Z. *et al.* P-TEFb is critical for the maturation of RNA polymerase II into productive elongation *in vivo*. *Mol Cell Biol* **28**, 1161–1170, doi:10.1128/MCB.01859-07 (2008).
49. Yoon, Y. J. *et al.* KRIBB11 inhibits HSP70 synthesis through inhibition of heat shock factor 1 function by impairing the recruitment of positive transcription elongation factor b to the hsp70 promoter. *J Biol Chem* **286**, 1737–1747, doi:10.1074/jbc.M110.179440 (2011).
50. Wang, J. *et al.* Epe1 recruits BET family bromodomain protein Bdf2 to establish heterochromatin boundaries. *Genes Dev* **27**, 1886–1902, doi:10.1101/gad.221010.113 (2013).
51. Hussong, M. *et al.* The bromodomain protein BRD4 regulates splicing during heat shock. *Nucleic Acids Res* **45**, 382–394, doi:10.1093/nar/gkw729 (2017).
52. Eymery, A. *et al.* A transcriptomic analysis of human centromeric and pericentric sequences in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res* **37**, 6340–6354, doi:10.1093/nar/gkp639 (2009).
53. Vourc'h, C. & Biamonti, G. Transcription of Satellite DNAs in Mammals. *Prog Mol Subcell Biol* **51**, 95–118, doi:10.1007/978-3-642-16502-3_5 (2011).
54. Bensaude, O. Inhibiting eukaryotic transcription: Which compound to choose? How to evaluate its activity? *Transcription* **2**, 103–108, doi:10.4161/trns.2.3.16172 (2011).
55. Lemerrier, C. *et al.* Tip60 acetyltransferase activity is controlled by phosphorylation. *J Biol Chem* **278**, 4713–4718, doi:10.1074/jbc.M211811200 (2003).
56. Legube, G. *et al.* Tip60 is targeted to proteasome-mediated degradation by Mdm2 and accumulates after UV irradiation. *EMBO J* **21**, 1704–1712, doi:10.1093/emboj/21.7.1704 (2002).
57. Wu, B., Hunt, C. & Morimoto, R. Structure and expression of the human gene encoding major heat shock protein HSP70. *Mol Cell Biol* **5**, 330–341 (1985).
58. Jolly, C., Morimoto, R., Robert-Nicoud, M. & Vourc'h, C. HSF1 transcription factor concentrates in nuclear foci during heat shock: relationship with transcription sites. *J Cell Sci* **110**(Pt 23), 2935–2941 (1997).
59. Grady, D. L. *et al.* Highly conserved repetitive DNA sequences are present at human centromeres. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 1695–1699 (1992).
60. Jolly, C., Mongelard, F., Robert-Nicoud, M. & Vourc'h, C. Optimization of nuclear transcript detection by FISH and combination with fluorescence immunocytochemical detection of transcription factors. *J Histochem Cytochem* **45**, 1585–1592 (1997).

Acknowledgements

We thank C. Jolly and A. Desvignes for her initial input in this work. We thank J.M. Escudier (Plateforme de synthèse d'Oligonucléotides modifiés de l'Interface Chimie Biologie de l'ITAV-Toulouse, France) for the synthesis of oligonucleotide probes for *in situ* analysis. We are very grateful to J. Bradner and R. Oakley (Dana Farber Cancer Institute, Boston, USA) for kindly providing JQ1. We thank D. Seigneurin-Berny for her critical reading of the article. Association de la Recherche sur le Cancer (#3686 C.V.). ARECA framework program (C.V., S.K.). Institut national du Cancer (Epistress) (C.V., S.K., and Z.H.). ANR RNAGermSilence (A.V.). Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), 'analyse bio-informatique pour la recherche en biologie' program, ANR Episperm3 program, INCa libre program, Plan Cancer and Fondation ARC (S.K.).

Author Contributions

E.C., N.H., S.G., J.P., S.K., V.F., M.O., H.H.-V., N.R., S.D., E.F., M.V., R.S., A.V., S.K., Z.H., and C.C. performed the experiments or provided specific materials. C.V. wrote the manuscript. All authors, analyzed data, conceived experiments, contributed to discussion and reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-05343-8

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

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



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

CHAPITRE VI : BIBLIOGRAPHIE

- Abdouh, Mohamed, Roy Hanna, Jida El Hajjar, Anthony Flamier, et Gilbert Bernier. 2016. « The Polycomb Repressive Complex 1 Protein BMI1 Is Required for Constitutive Heterochromatin Formation and Silencing in Mammalian Somatic Cells * ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (1): 182-97. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.662403>.
- Agresti, A, R Meneveri, A.G Siccardi, A Marozzi, G Corneo, S Gaudi, et E Ginelli. 1989. « Linkage in Human Heterochromatin between Highly Divergent Sau3A Repeats and a New Family of Repeated DNA Sequences (HaeIII Family) ». *Journal of Molecular Biology* 205 (4): 625-31. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(89\)90308-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(89)90308-2).
- Agresti, Alessandra, G. Rainaldi, Andrea Lobbiani, Ivana Magnani, R. Di Lernia, Raffaella Meneveri, A. G. Siccardi, et E. Ginelli. 1987. « Chromosomal Location by in Situ Hybridization of the Human Sau3A Family of DNA Repeats ». *Human Genetics* 75 (4): 326-32. <https://doi.org/10.1007/BF00284102>.
- Åkerfelt, Malin, Richard I. Morimoto, et Lea Sistonen. 2010. « Heat Shock Factors: Integrators of Cell Stress, Development and Lifespan ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (8): 545-55. <https://doi.org/10.1038/nrm2938>.
- Allen, Tiffany A., Sandra Von Kaenel, James A. Goodrich, et Jennifer F. Kugel. 2004. « The SINE-Encoded Mouse B2 RNA Represses MRNA Transcription in Response to Heat Shock ». *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (9): 816-21. <https://doi.org/10.1038/nsmb813>.
- Allis, C. David, et Thomas Jenuwein. 2016a. « The Molecular Hallmarks of Epigenetic Control ». *Nature Reviews Genetics* 17 (8): 487-500. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59>.
- Allshire, Robin C., et Karl Ekwall. 2015. « Epigenetic Regulation of Chromatin States in *Schizosaccharomyces Pombe* ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (7): a018770. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018770>.
- Almouzni, Geneviève, et Aline V. Probst. 2011. « Heterochromatin maintenance and establishment: Lessons from the mouse pericentromere ». *Nucleus* 2 (5): 332-38. <https://doi.org/10.4161/nucl.2.5.17707>.
- Altemose, Nicolas, Karen H. Miga, Mauro Maggioni, et Huntington F. Willard. 2014. « Genomic Characterization of Large Heterochromatic Gaps in the Human Genome Assembly ». *PLOS Computational Biology* 10 (5): e1003628. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003628>.
- Anckar, Julius, et Lea Sistonen. 2011. « Regulation of HSF1 Function in the Heat Stress Response: Implications in Aging and Disease ». *Annual Review of Biochemistry* 80 (1): 1089-1115. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060809-095203>.
- Antequera, F, et A Bird. 1993. « Number of CpG islands and genes in human and mouse. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (24): 11995-99. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.24.11995>.
- Arnoult, Nausica, Amandine Van Beneden, et Anabelle Decottignies. 2012. « Telomere Length Regulates TERRA Levels through Increased Trimethylation of Telomeric H3K9 and HP1 α ». *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (9): 948-56. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2364>.
- Azzalin, Claus M., Patrick Reichenbach, Lela Khoriantou, Elena Giulotto, et Joachim Lingner. 2007. « Telomeric Repeat-Containing RNA and RNA Surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends ». *Science* 318 (5851): 798-801. <https://doi.org/10.1126/science.1147182>.
- Bannister, Andrew J., et Tony Kouzarides. 2011. « Regulation of Chromatin by Histone Modifications ». *Cell Research* 21 (3): 381-95. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
- BANNISTER, Andrew J, Philip ZEGEMAN, Janet F. PARTRIDGE, Eric A. MISKA, Jean O. THOMAS, Robin C. ALLSHIRE, et Tony KOUZARIDES. 2001. « Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain ». *Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain* 410 (6824): 120-24.

- Barna, János, Péter Csermely, et Tibor Vellai. 2018. « Roles of Heat Shock Factor 1 beyond the Heat Shock Response ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 75 (16): 2897-2916. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2836-6>.
- Becker, Justin S., Dario Nicetto, et Kenneth S. Zaret. 2016. « H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes ». *Trends in Genetics* 32 (1): 29-41. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.11.001>.
- Bensaude, Olivier. 2011. « Inhibiting Eukaryotic Transcription. Which Compound to Choose? How to Evaluate Its Activity ? : Which Compound to Choose? How to Evaluate Its Activity? » *Transcription* 2 (3): 103-8. <https://doi.org/10.4161/trns.2.3.16172>.
- Biamonti, Giuseppe, et Javier F. Caceres. 2009. « Cellular Stress and RNA Splicing ». *Trends in Biochemical Sciences* 34 (3): 146-53. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.11.004>.
- Bickmore, Wendy A., et Bas van Steensel. 2013. « Genome Architecture: Domain Organization of Interphase Chromosomes ». *Cell* 152 (6): 1270-84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.001>.
- Bloomfield, Victor A. 1996. « DNA condensation - ScienceDirect ». 1996. <https://www-sciencedirect-com.insb.bib.cnrs.fr/science/article/pii/S0959440X96800522>.
- Bolzer, Andreas, Gregor Kreth, Irina Solovei, Daniela Koehler, Kaan Saracoglu, Christine Fauth, Stefan Müller, et al. 2005. « Three-Dimensional Maps of All Chromosomes in Human Male Fibroblast Nuclei and Prometaphase Rosettes ». *PLoS Biology* 3 (5): e157. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030157>.
- Bouzinba-Segard, Haniaa, Adeline Guais, et Claire Francastel. 2006. « Accumulation of small murine minor satellite transcripts leads to impaired centromeric architecture and function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (23): 8709-14. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508006103>.
- Boyault, Cyril, Yu Zhang, Sabrina Fritah, Cécile Caron, Benoit Gilquin, So Hee Kwon, Carmen Garrido, et al. 2007. « HDAC6 Controls Major Cell Response Pathways to Cytotoxic Accumulation of Protein Aggregates ». *Genes & Development* 21 (17): 2172-81. <https://doi.org/10.1101/gad.436407>.
- Brun, Marie-Elisabeth, Erica Lana, Isabelle Rivals, Gérard Lefranc, Pierre Sarda, Mireille Claustres, André Mégarbané, et Albertina De Sario. 2011. « Heterochromatic Genes Undergo Epigenetic Changes and Escape Silencing in Immunodeficiency, Centromeric Instability, Facial Anomalies (ICF) Syndrome ». *PLOS ONE* 6 (4): e19464. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019464>.
- Bühler, Marc, André Verdel, et Danesh Moazed. 2006. « Tethering RITS to a Nascent Transcript Initiates RNAi- and Heterochromatin-Dependent Gene Silencing ». *Cell* 125 (5): 873-86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.025>.
- Canzio, Daniele, Adam Larson, et Geeta J. Narlikar. 2014. « Mechanisms of Functional Promiscuity by HP1 Proteins ». *Trends in Cell Biology* 24 (6): 377-86. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.01.002>.
- Carr, Antony M., et Sarah Lambert. 2013. « Replication Stress-Induced Genome Instability: The Dark Side of Replication Maintenance by Homologous Recombination ». *Journal of Molecular Biology*, Replicon Theory, Regulation of DNA Replication and Genomic Instability, 425 (23): 4733-44. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.04.023>.
- Carthew, Richard W., et Erik J. Sontheimer. 2009. « Origins and Mechanisms of MiRNAs and SiRNAs ». *Cell* 136 (4): 642-55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>.
- Chatterjee, Suman, et Timothy F. Burns. 2017. « Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (9): 1978. <https://doi.org/10.3390/ijms18091978>.
- Chen, Chun-Kan, Mario Blanco, Constanza Jackson, Erik Aznauryan, Noah Ollikainen, Christine Surka, Amy Chow, Andrea Cerase, Patrick McDonel, et Mitchell Guttman. 2016. « Xist recruits the X chromosome to the nuclear lamina to enable chromosome-wide silencing ». *Science* 354 (6311) : 468-72. <https://doi.org/10.1126/science.aae0047>.

- Christians, E., A. A. Davis, S. D. Thomas, et I. J. Benjamin. 2000. « Maternal Effect of Hsf1 on Reproductive Success ». *Nature* 407 (6805): 693-94. <https://doi.org/10.1038/35037669>.
- Col, Edwige, Neda Hoghoughi, Solenne Dufour, Jessica Penin, Sivan Koskas, Virginie Faure, Maria Ouzounova, et al. 2017. « Bromodomain Factors of BET Family Are New Essential Actors of Pericentric Heterochromatin Transcriptional Activation in Response to Heat Shock ». *Scientific Reports* 7 (1): 5418. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05343-8>.
- Cooper, Katrina F., Richard B. Fisher, et Chris Tyler-Smith. 1992. « Structure of the Pericentric Long Arm Region of the Human Y Chromosome ». *Journal of Molecular Biology* 228 (2): 421-32. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(92\)90831-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90831-4).
- Corneo, Gianmarco, Enrico Ginelli, et Elio Polli. 1967. « A Satellite DNA Isolated from Human Tissues ». *Journal of Molecular Biology* 23 (3): 619-22. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(67\)80130-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(67)80130-X).
- Corneo. 1968. « Isolation of the Complementary Strands of a Human Satellite DNA ». *Journal of Molecular Biology* 33 (1): 331-35. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(68\)90301-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(68)90301-X).
- corneo. 1970. « Repeated Sequences in Human DNA ». *Journal of Molecular Biology* 48 (2): 319-27. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90163-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90163-4).
- Cotto, J., S. Fox, et R. Morimoto. 1997. « HSF1 granules: a novel stress-induced nuclear compartment of human cells ». *Journal of Cell Science* 110 (23): 2925-34. <https://doi.org/10.1242/jcs.110.23.2925>.
- Cremer, Thomas, et Marion Cremer. 2010. « Chromosome Territories ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (3): a003889. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003889>.
- Creyghton, Menno P., Albert W. Cheng, G. Grant Welstead, Tristan Kooistra, Bryce W. Carey, Eveline J. Steine, Jacob Hanna, et al. 2010. « Histone H3K27ac Separates Active from Poised Enhancers and Predicts Developmental State ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (50): 21931-36. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016071107>.
- Dai, Chengkai, Luke Whitesell, Arlin B. Rogers, et Susan Lindquist. 2007. « Heat Shock Factor 1 Is a Powerful Multifaceted Modifier of Carcinogenesis ». *Cell* 130 (6): 1005-18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.020>.
- Dawson, Mark A., et Tony Kouzarides. 2012. « Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy ». *Cell* 150 (1): 12-27. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>.
- Deininger, Prescott. 2011. « Alu elements: know the SINEs ». *Genome Biology* 12 (12): 236. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-12-236>.
- Denegri, Marco, Daniela Moralli, Mariano Rocchi, Marco Biggiogera, Elena Raimondi, Fabio Cobianchi, Luigi De Carli, Silvano Riva, et Giuseppe Biamonti. 2002. « Human Chromosomes 9, 12, and 15 Contain the Nucleation Sites of Stress-Induced Nuclear Bodies ». Édité par Joseph Gall. *Molecular Biology of the Cell* 13 (6): 2069-79. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-12-0569>.
- Dixon, Jesse R., Siddarth Selvaraj, Feng Yue, Audrey Kim, Yan Li, Yin Shen, Ming Hu, Jun S. Liu, et Bing Ren. 2012. « Topological Domains in Mammalian Genomes Identified by Analysis of Chromatin Interactions ». *Nature* 485 (7398): 376-80. <https://doi.org/10.1038/nature11082>.
- Duarte, Fabiana M., Nicholas J. Fuda, Dig B. Mahat, Leighton J. Core, Michael J. Guertin, et John T. Lis. 2016. « Transcription Factors GAF and HSF Act at Distinct Regulatory Steps to Modulate Stress-Induced Gene Activation ». *Genes & Development* 30 (15): 1731-46. <https://doi.org/10.1101/gad.284430.116>.
- Eissenberg, Joel C, et Sarah CR Elgin. s. d. « The HP1 Protein Family: Getting a Grip on Chromatin », 7. Elgin, Sarah C. R., et Gunter Reuter. 2013. « Position-Effect Variegation, Heterochromatin Formation, and Gene Silencing in Drosophila ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5 (8): a017780. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017780>.
- Elimelech, Aviv, et Ramon Y. Birnbaum. 2020. « From 3D Organization of the Genome to Gene Expression ». *Current Opinion in Systems Biology*, juillet. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2020.07.006>.

- Enukashvily, N. I., R. Donev, I. S.-R. Waisertreiger, et O. I. Podgornaya. 2007. « Human Chromosome 1 Satellite 3 DNA Is Decondensed, Demethylated and Transcribed in Senescent Cells and in A431 Epithelial Carcinoma Cells ». *Cytogenetic and Genome Research* 118 (1): 42-54. <https://doi.org/10.1159/000106440>.
- Espinoza, Celso A., Tiffany A. Allen, Aaron R. Hieb, Jennifer F. Kugel, et James A. Goodrich. 2004. « B2 RNA Binds Directly to RNA Polymerase II to Repress Transcript Synthesis ». *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (9): 822-29. <https://doi.org/10.1038/nsmb812>.
- Eymery, Angéline, Béatrice Horard, Michèle El Atifi-Borel, Geneviève Fourel, François Berger, Anne-Laure Vitte, Arnaud van den Broeck, et al. 2009. « A Transcriptomic Analysis of Human Centromeric and Pericentric Sequences in Normal and Tumor Cells. » *Nucleic Acids Research* 37 (19): 6340-54. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp639>.
- Eymery, Angéline, Catherine Souchier, Claire Vourc'h, et Caroline Jolly. 2010. « Heat Shock Factor 1 Binds to and Transcribes Satellite II and III Sequences at Several Pericentromeric Regions in Heat-Shocked Cells ». *Experimental Cell Research* 316 (11): 1845-55. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.002>.
- Filippakopoulos, Panagis, Sarah Picaud, Oleg Fedorov, Marco Keller, Matthias Wrobel, Olaf Morgenstern, Franz Bracher, et Stefan Knapp. 2012. « Benzodiazepines and Benzotriazepines as Protein Interaction Inhibitors Targeting Bromodomains of the BET Family ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry, The Chemistry Biology Interface*, 20 (6): 1878-86. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.10.080>.
- Filippakopoulos, Panagis, Sarah Picaud, Maria Mangos, Tracy Keates, Jean-Philippe Lambert, Dalia Barsyte-Lovejoy, Ildiko Felletar, et al. 2012. « Histone Recognition and Large-Scale Structural Analysis of the Human Bromodomain Family ». *Cell* 149 (1): 214-31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.013>.
- Fox, Archa H., et Angus I. Lamond. 2010. « Paraspeckles ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (7): a000687. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000687>.
- Fuda, Nicholas J., M. Behfar Ardehali, et John T. Lis. 2009. « Defining Mechanisms That Regulate RNA Polymerase II Transcription in Vivo ». *Nature* 461 (7261): 186-92. <https://doi.org/10.1038/nature08449>.
- Fujimoto, Mitsuaki, Naoki Hayashida, Takuma Katoh, Kouji Oshima, Toyohide Shinkawa, Ramachandran Prakasam, Ke Tan, Sachiye Inouye, Ryosuke Takii, et Akira Nakai. 2010. « A Novel Mouse HSF3 Has the Potential to Activate Nonclassical Heat-Shock Genes during Heat Shock ». *Molecular Biology of the Cell* 21 (1): 106-16. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-07-0639>.
- Fujimoto, Mitsuaki, Eiichi Takaki, Ryosuke Takii, Ke Tan, Ramachandran Prakasam, Naoki Hayashida, Shun-ichiro Iemura, Tohru Natsume, et Akira Nakai. 2012. « RPA Assists HSF1 Access to Nucleosomal DNA by Recruiting Histone Chaperone FACT ». *Molecular Cell* 48 (2): 182-94. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.026>.
- Fukagawa, Tatsuo, Masahiro Nogami, Mitsuko Yoshikawa, Masashi Ikeno, Tuneko Okazaki, Yasunari Takami, Tatsuo Nakayama, et Mitsuo Oshimura. 2004. « Dicer Is Essential for Formation of the Heterochromatin Structure in Vertebrate Cells ». *Nature Cell Biology* 6 (8): 784-91. <https://doi.org/10.1038/ncb1155>.
- Gaglia, Giorgio, Rumana Rashid, Clarence Yapp, Gaurav N. Joshi, Carmen G. Li, Susan L. Lindquist, Kristopher A. Sarosiek, Luke Whitesell, Peter K. Sorger, et Sandro Santagata. 2020. « HSF1 Phase Transition Mediates Stress Adaptation and Cell Fate Decisions ». *Nature Cell Biology* 22 (2): 151-58. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0458-3>.
- Gaillard, Hélène, Tatiana García-Muse, et Andrés Aguilera. 2015. « Replication Stress and Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 15 (5): 276-89. <https://doi.org/10.1038/nrc3916>.
- Gallo, G J, H Prentice, et R E Kingston. 1993. « Heat shock factor is required for growth at normal temperatures in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. » *Molecular and Cellular Biology* 13 (2): 749-61.

- Garcia-Saez, Isabel, Hervé Menoni, Ramachandran Boopathi, Manu S. Shukla, Lama Soueidan, Marjolaine Noirclerc-Savoye, Aline Le Roy, et al. 2018. « Structure of an H1-Bound 6-Nucleosome Array Reveals an Untwisted Two-Start Chromatin Fiber Conformation ». *Molecular Cell* 72 (5): 902-915.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.027>.
- Gilbert, Nick, Inga Thomson, Shelagh Boyle, James Allan, Bernard Ramsahoye, et Wendy A. Bickmore. 2007. « DNA methylation affects nuclear organization, histone modifications, and linker histone binding but not chromatin compaction ». *Journal of Cell Biology* 177 (3): 401-11. <https://doi.org/10.1083/jcb.200607133>.
- Giordano, Manuela, Lucia Infantino, Marco Biggiogera, Alessandra Montecucco, et Giuseppe Biamonti. 2020. « Heat Shock Affects Mitotic Segregation of Human Chromosomes Bound to Stress-Induced Satellite III RNAs ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (8): 2812. <https://doi.org/10.3390/ijms21082812>.
- Gomes, Anita Quintal, Sofia Nolasco, et Helena Soares. 2013. « Non-Coding RNAs: Multi-Tasking Molecules in the Cell ». *International Journal of Molecular Sciences* 14 (8): 16010-39. <https://doi.org/10.3390/ijms140816010>.
- Gomez-Pastor, Rocio, Eileen T. Burchfiel, et Dennis J. Thiele. 2018. « Regulation of Heat Shock Transcription Factors and Their Roles in Physiology and Disease ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19 (1): 4-19. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.73>.
- Guelen, Lars, Ludo Pagie, Emilie Brasset, Wouter Meuleman, Marius B. Faza, Wendy Talhout, Bert H. Eussen, et al. 2008. « Domain Organization of Human Chromosomes Revealed by Mapping of Nuclear Lamina Interactions ». *Nature* 453 (7197): 948-51. <https://doi.org/10.1038/nature06947>.
- Guertin, M. J., S. J. Petesch, K. L. Zobeck, I. M. Min, et J. T. Lis. 2010. « Drosophila Heat Shock System as a General Model to Investigate Transcriptional Regulation ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 75 (janvier): 1-9. <https://doi.org/10.1101/sqb.2010.75.039>.
- Guertin, Michael J., et John T. Lis. 2010. « Chromatin Landscape Dictates HSF Binding to Target DNA Elements ». *PLOS Genetics* 6 (9): e1001114. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001114>.
- Guiducci, Giulia, et Lovorka Stojic. 2021. « Long Noncoding RNAs at the Crossroads of Cell Cycle and Genome Integrity ». *Trends in Genetics* 37 (6): 528-46. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.01.006>.
- Gutbrod, M. J., B. Roche, J. I. Steinberg, A. A. Lakhani, K. Chang, A. J. Schorn, et R. A. Martienssen. 2022. « Dicer Promotes Genome Stability via the Bromodomain Transcriptional Co-Activator BRD4 ». *Nature Communications* 13 (1): 1001. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28554-8>.
- Gutbrod, Michael J., et Robert A. Martienssen. 2020. « Conserved Chromosomal Functions of RNA Interference ». *Nature Reviews Genetics* 21 (5): 311-31. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0203-6>.
- Hagan, Christy R., Rebecca F. Sheffield, et Charles M. Rudin. 2003. « Human Alu Element Retrotransposition Induced by Genotoxic Stress ». *Nature Genetics* 35 (3): 219-20. <https://doi.org/10.1038/ng1259>.
- Hahn, Ji-Sook, et Dennis J. Thiele. 2004. « Activation of the Saccharomyces Cerevisiae Heat Shock Transcription Factor Under Glucose Starvation Conditions by Snf1 Protein Kinase ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (7): 5169-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311005200>.
- Hernandez-Verdun, Danièle. 2011. « Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle ». *Nucleus* 2 (3): 189-94. <https://doi.org/10.4161/nucl.2.3.16246>.
- Heun, Patrick, Sylvia Erhardt, Michael D. Blower, Samara Weiss, Andrew D. Skora, et Gary H. Karpen. 2006. « Mislocalization of the Drosophila Centromere-Specific Histone CID Promotes Formation of Functional Ectopic Kinetochores ». *Developmental Cell* 10 (3): 303-15. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.01.014>.
- Hietakangas, Ville, Johanna K. Ahlskog, Annika M. Jakobsson, Maria Hellesuo, Niko M. Sahlberg, Carina I. Holmberg, Andrey Mikhailov, Jorma J. Palvimo, Lila Pirkkala, et Lea Sistonen. 2003. « Phosphorylation of Serine 303 Is a Prerequisite for the Stress-Inducible SUMO Modification

- of Heat Shock Factor 1 ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (8): 2953-68.
<https://doi.org/10.1128/MCB.23.8.2953-2968.2003>.
- Horard, Béatrice, Angéline Eymery, Genevieve Fourel, Nikita Vassetzky, Jacques Puechberty, Gerard Roizes, Kevin Lebrigand, et al. 2009. « Global analysis of DNA methylation and transcription of human repetitive sequences. » *Epigenetics* 4 (5): 339-50.
<https://doi.org/10.4161/epi.4.5.9284>.
- Huang, Chuan, Xiaolin Wang, Xu Liu, Shuhuan Cao, et Ge Shan. 2015. « RNAi Pathway Participates in Chromosome Segregation in Mammalian Cells ». *Cell Discovery* 1 (1): 15029.
<https://doi.org/10.1038/celldisc.2015.29>.
- Hussong, Michelle, Christian Kaehler, Martin Kerick, Christina Grimm, Alexandra Franz, Bernd Timmermann, Franziska Welzel, et al. 2017. « The bromodomain protein BRD4 regulates splicing during heat shock ». *Nucleic Acids Research* 45 (1): 382-94.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkw729>.
- Inbar-Feigenberg, Michal, Sanaa Choufani, Darci T. Butcher, Maian Roifman, et Rosanna Weksberg. 2013. « Basic Concepts of Epigenetics ». *Fertility and Sterility* 99 (3): 607-15.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.117>.
- Jacobson, Raymond H., Andreas G. Ladurner, David S. King, et Robert Tjian. 2000. « Structure and Function of a Human TAFII250 Double Bromodomain Module ». *Science* 288 (5470): 1422-25.
<https://doi.org/10.1126/science.288.5470.1422>.
- Jaeger, Alex M, Charles W Pemble, Lea Sistonen, et Dennis J Thiele. 2016. « Structures of HSF2 Reveal Mechanisms for Differential Regulation of Human Heat-Shock Factors ». *Nature Structural & Molecular Biology* 23 (2): 147-54. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3150>.
- Janssen, Aniek, Serafin U. Colmenares, et Gary H. Karpen. 2018. « Heterochromatin: Guardian of the Genome. » *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 34 (1): 265-88.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062653>.
- Jedlicka, Mortin, et Wu. 1997. « Multiple functions of Drosophila heat shock transcription factor in vivo ». *The EMBO Journal* 16 (9): 2452-62. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2452>.
- Jenuwein, Thomas, et C. David Allis. 2001. « Translating the Histone Code ». *Science* 293 (5532): 1074-80. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>.
- Jolly, Caroline, Lara Konecny, Deborah L. Grady, Yulia A. Kutsikova, José J. Cotto, Richard I. Morimoto, et Claire Vourc'h. 2002. « In vivo Binding of Active Heat Shock Transcription Factor 1 to Human Chromosome 9 Heterochromatin during Stress ». *The Journal of Cell Biology* 156 (5): 775-81.
- Jolly, Caroline, Alexandra Metz, Jérôme Govin, Marc Vigneron, Bryan Turner, Saadi Khochbin, et Claire Vourc'h. 2004. « Stress-Induced Transcription of Satellite III Repeats. » *Journal of Cell Biology* 164 (1): 25-33. <https://doi.org/10.1083/jcb.200306104>.
- Jolly, Caroline, Alexandra Metz, Jérôme Govin, Marc Vigneron, Bryan M. Turner, Saadi Khochbin, et Claire Vourc'h. 2004. « Stress-Induced Transcription of Satellite III Repeats ». *Journal of Cell Biology* 164 (1): 25-33. <https://doi.org/10.1083/jcb.200306104>.
- Jolly, Caroline, et Richard I. Morimoto. 2000. « Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death ». *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 92 (19): 1564-72. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.19.1564>.
- Jolly, Caroline, Yves Usson, et Richard I. Morimoto. 1999. « Rapid and Reversible Relocalization of Heat Shock Factor 1 within Seconds to Nuclear Stress Granules ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (12): 6769-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6769>.
- Joutsen, Jenny, et Lea Sistonen. 2019. « Tailoring of Proteostasis Networks with Heat Shock Factors ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 11 (4): a034066.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034066>.
- Kanellopoulou, Chryssa, Stefan A. Muljo, Andrew L. Kung, Shridar Ganesan, Ronny Drapkin, Thomas Jenuwein, David M. Livingston, et Klaus Rajewsky. 2005. « Dicer-Deficient Mouse Embryonic Stem Cells Are Defective in Differentiation and Centromeric Silencing ». *Genes & Development* 19 (4): 489-501. <https://doi.org/10.1101/gad.1248505>.

- Khorasanizadeh, Sepideh. 2004. « The Nucleosome: From Genomic Organization to Genomic Regulation ». *Cell* 116 (2): 259-72. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00044-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00044-3).
- Knuckles, Philip, Sarah H. Carl, Michael Musheev, Christof Niehrs, Alice Wenger, et Marc Bühler. 2017. « RNA Fate Determination through Cotranscriptional Adenosine Methylation and Microprocessor Binding ». *Nature Structural & Molecular Biology* 24 (7): 561-69. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3419>.
- Koch, Birgit, Stephanie Kueng, Christine Ruckenbauer, Kerstin S. Wendt, et Jan-Michael Peters. 2008. « The Suv39h–HP1 Histone Methylation Pathway Is Dispensable for Enrichment and Protection of Cohesin at Centromeres in Mammalian Cells ». *Chromosoma* 117 (2): 199-210. <https://doi.org/10.1007/s00412-007-0139-z>.
- Koningsbruggen, Silvana van, Marek Gierliński, Pietá Schofield, David Martin, Geoffrey J. Barton, Yavuz Ariyurek, Johan T. den Dunnen, et Angus I. Lamond. 2010. « High-Resolution Whole-Genome Sequencing Reveals That Specific Chromatin Domains from Most Human Chromosomes Associate with Nucleoli ». *Molecular Biology of the Cell* 21 (21): 3735-48. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-06-0508>.
- Koskas, Sivan, Anabelle Decottignies, Solenne Dufour, Mylène Pezet, André Verdel, Claire Vourc'h, et Virginie Faure. 2017. « Heat shock factor 1 promotes TERRA transcription and telomere protection upon heat stress ». *Nucleic Acids Research* 45 (11): 6321-33. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx208>.
- Krietenstein, Nils, Sameer Abraham, Sergey V. Venev, Nezar Abdennur, Johan Gibcus, Tsung-Han S. Hsieh, Krishna Mohan Parsi, et al. 2020. « Ultrastructural Details of Mammalian Chromosome Architecture ». *Molecular Cell* 78 (3): 554-565.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.003>.
- Kulkarni, Meeta, Sevim Ozgur, et Georg Stoecklin. 2010. « On track with P-bodies ». *Biochemical Society Transactions* 38 (1): 242-51. <https://doi.org/10.1042/BST0380242>.
- Lachner, Monika, Dónal O'Carroll, Stephen Rea, Karl Mechtler, et Thomas Jenuwein. 2001. « Methylation of Histone H3 Lysine 9 Creates a Binding Site for HP1 Proteins ». *Nature* 410 (6824): 116-20. <https://doi.org/10.1038/35065132>.
- Larson, Adam G., Daniel Elnatan, Madeline M. Keenen, Michael J. Trnka, Jonathan B. Johnston, Alma L. Burlingame, David A. Agard, Sy Redding, et Geeta J. Narlikar. 2017. « Liquid Droplet Formation by HP1 α Suggests a Role for Phase Separation in Heterochromatin ». *Nature* 547 (7662): 236-40. <https://doi.org/10.1038/nature22822>.
- Lellahi, S. Mohammad, Ingrid Arctander Rosenlund, Annica Hedberg, Liv Torill Kiær, Ingvild Mikkola, Erik Knutsen, et Maria Perander. 2018. « The Long Noncoding RNA NEAT1 and Nuclear Paraspeckles Are Up-Regulated by the Transcription Factor HSF1 in the Heat Shock Response ». *Journal of Biological Chemistry* 293 (49): 18965-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004473>.
- Lieberman-Aiden, Erez, Nynke L. van Berkum, Louise Williams, Maxim Imakaev, Tobias Ragoczy, Agnes Telling, Ido Amit, et al. 2009. « Comprehensive Mapping of Long-Range Interactions Reveals Folding Principles of the Human Genome ». *Science* 326 (5950): 289-93. <https://doi.org/10.1126/science.1181369>.
- Liu, Wen-Man, Wen-Ming Chu, Prabhakara V. Choudary, et Carl W. Schmid. 1995. « Cell stress and translational inhibitors transiently increase the abundance of mammalian SINE transcripts ». *Nucleic Acids Research* 23 (10): 1758-65. <https://doi.org/10.1093/nar/23.10.1758>.
- Losada, Ana. 2014. « Cohesin in Cancer: Chromosome Segregation and Beyond ». *Nature Reviews Cancer* 14 (6): 389-93. <https://doi.org/10.1038/nrc3743>.
- Lu, Junjie, et David M. Gilbert. 2007. « Proliferation-dependent and cell cycle-regulated transcription of mouse pericentric heterochromatin ». *Journal of Cell Biology* 179 (3): 411-21. <https://doi.org/10.1083/jcb.200706176>.
- Luger, Karolin. 1997. « Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 Å Resolution » 389: 12.

- Luger, Karolin, Mekonnen L. Dechassa, et David J. Tremethick. 2012. « New Insights into Nucleosome and Chromatin Structure: An Ordered State or a Disordered Affair? » *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (7): 436-47. <https://doi.org/10.1038/nrm3382>.
- Mahat, Dig B., H. Hans Salamanca, Fabiana M. Duarte, Charles G. Danko, et John T. Lis. 2016a. « Mammalian Heat Shock Response and Mechanisms Underlying Its Genome-Wide Transcriptional Regulation ». *Molecular Cell* 62 (1): 63-78. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.025>.
- Maison, Christèle, Delphine Bailly, Antoine H.F.M. Peters, Jean-Pierre Quivy, Danièle Roche, Angela Taddei, Monika Lachner, Thomas Jenuwein, et Geneviève Almouzni. 2002. « Higher-Order Structure in Pericentric Heterochromatin Involves a Distinct Pattern of Histone Modification and an RNA Component ». *Nature Genetics* 30 (3): 329-34. <https://doi.org/10.1038/ng843>.
- Maison, Christèle, Delphine Bailly, Danièle Roche, Rocio Montes De Oca, Aline V Probst, Isabelle Vassias, Florent Dingli, et al. 2011. « SUMOylation promotes de novo targeting of HP1 α to pericentric heterochromatin. » *Nature Genetics* 43 (3): 220-27. <https://doi.org/10.1038/ng.765>.
- Marston, Adele L. 2015. « Shugoshins: Tension-Sensitive Pericentromeric Adaptors Safeguarding Chromosome Segregation ». *Molecular and Cellular Biology* 35 (4): 634-48. <https://doi.org/10.1128/MCB.01176-14>.
- Martens, Roderick J O'Sullivan, Ulrich Braunschweig, Susanne Opravil, Martin Radolf, Peter Steinlein, et Thomas Jenuwein. 2005. « The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome ». *The EMBO Journal* 24 (4): 800-812. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600545>.
- Masai, Hisao, Seiji Matsumoto, Zhiying You, Naoko Yoshizawa-Sugata, et Masako Oda. 2010. « Eukaryotic Chromosome DNA Replication: Where, When, and How? » *Annual Review of Biochemistry* 79 (1): 89-130. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.103205>.
- Mason, Karlla, Zichuan Liu, Tiphaine Aguirre-Lavin, et Nathalie Beaujean. 2012. « Chromatin and Epigenetic Modifications during Early Mammalian Development ». *Animal Reproduction Science*, Special issue: 3rd Embryo Genomics Meeting, 134 (1): 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.010>.
- Mateescu, Bogdan, Patrick England, Frederic Halgand, Moshe Yaniv, et Christian Muchardt. 2004. « Tethering of HP1 proteins to chromatin is relieved by phosphoacetylation of histone H3 ». *EMBO reports* 5 (5): 490-96. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400139>.
- Mehta, Gunjan D., Syed Meraj Azhar Rizvi, et Santanu Kumar Ghosh. 2012. « Cohesin: A Guardian of Genome Integrity ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823 (8): 1324-42. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.05.027>.
- Mendillo, Marc L., Sandro Santagata, Martina Koeva, George W. Bell, Rong Hu, Rulla M. Tamimi, Ernest Fraenkel, Tan A. Ince, Luke Whitesell, et Susan Lindquist. 2012. « HSF1 Drives a Transcriptional Program Distinct from Heat Shock to Support Highly Malignant Human Cancers ». *Cell* 150 (3): 549-62. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.031>.
- Meneveri, Raffaella, Alessandra Agresti, Anna Marozzi, Salvatore Saccone, Mariano Rocchi, Nicoletta Archidiacono, Gianmarco Corneo, Giuliano Delia Valle, et Enrico Ginelli. 1993. « Molecular Organization and Chromosomal Location of Human GC-Rich Heterochromatic Blocks ». *Gene* 123 (2): 227-34. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90128-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90128-P).
- Metz, Alexandra, Johann Soret, Claire Vourc'H, Jamal Tazi, et Caroline Jolly. 2004. « A Key Role for Stress-Induced Satellite III Transcripts in the Relocalization of Splicing Factors into Nuclear Stress Granules. » *Journal of Cell Science* 117 (Pt 19): 4551-58. <https://doi.org/10.1242/jcs.01329>.
- Min, J.-N., L. Huang, D. B. Zimonjic, D. Moskophidis, et N. F. Mivechi. 2007. « Selective Suppression of Lymphomas by Functional Loss of Hsf1 in a P53-Deficient Mouse Model for Spontaneous Tumors ». *Oncogene* 26 (35): 5086-97. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210317>.

- Miozzo, Federico, Délara Sabéran-Djoneidi, et Valérie Mezger. 2015. « HSFs, Stress Sensors and Sculptors of Transcription Compartments and Epigenetic Landscapes ». *Journal of Molecular Biology* 427 (24): 3793-3816. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.007>.
- Mishima, Yuichi, Makoto Watanabe, Toru Kawakami, Chanika D. Jayasinghe, Junji Otani, Yusuke Kikugawa, Masahiro Shirakawa, et al. 2013. « Hinge and Chromoshadow of HP1 α Participate in Recognition of K9 Methylated Histone H3 in Nucleosomes ». *Journal of Molecular Biology* 425 (1): 54-70. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.10.018>.
- Mohn, Fabio, Michael Weber, Michael Rebhan, Tim C. Roloff, Jens Richter, Michael B. Stadler, Miriam Bibel, et Dirk Schübeler. 2008. « Lineage-Specific Polycomb Targets and De Novo DNA Methylation Define Restriction and Potential of Neuronal Progenitors ». *Molecular Cell* 30 (6): 755-66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.007>.
- Morimoto, Richard I. 1998. « Regulation of the Heat Shock Transcriptional Response: Cross Talk between a Family of Heat Shock Factors, Molecular Chaperones, and Negative Regulators ». *Genes & Development* 12 (24): 3788-96. <https://doi.org/10.1101/gad.12.24.3788>.
- Morley, James F., et Richard I. Morimoto. 2004. « Regulation of Longevity in *Caenorhabditis elegans* by Heat Shock Factor and Molecular Chaperones ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (2): 657-64. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-07-0532>.
- Mosser, Dick D., et Richard I. Morimoto. 2004. « Molecular Chaperones and the Stress of Oncogenesis ». *Oncogene* 23 (16): 2907-18. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207529>.
- Moyzis, R K, J M Buckingham, L S Cram, M Dani, L L Deaven, M D Jones, J Meyne, R L Ratliff, et J R Wu. 1988. « A Highly Conserved Repetitive DNA Sequence, (TTAGGG) $_n$, Present at the Telomeres of Human Chromosomes. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (18): 6622-26. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.18.6622>.
- Muchardt, Christian, Marie Guillemé, Jacob-S Seeler, Didier Trouche, Anne Dejean, et Moshe Yaniv. 2002. « Coordinated methyl and RNA binding is required for heterochromatin localization of mammalian HP1 α ». *EMBO reports* 3 (10): 975-81. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf194>.
- Nakai, Akira, Misao Suzuki, et Masako Tanabe. 2000. « Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1 ». *The EMBO Journal* 19 (7): 1545-54. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1545>.
- Németh, Attila, Ana Conesa, Javier Santoyo-Lopez, Ignacio Medina, David Montaner, Bálint Péterfia, Irina Solovei, Thomas Cremer, Joaquin Dopazo, et Gernot Längst. 2010. « Initial Genomics of the Human Nucleolus ». *PLOS Genetics* 6 (3): e1000889. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000889>.
- Nielsen, Peter R., Daniel Nietlispach, Helen R. Mott, Juliana Callaghan, Andrew Bannister, Tony Kouzarides, Alexey G. Murzin, Natalia V. Murzina, et Ernest D. Laue. 2002. « Structure of the HP1 Chromodomain Bound to Histone H3 Methylated at Lysine 9 ». *Nature* 416 (6876): 103-7. <https://doi.org/10.1038/nature722>.
- Ninomiya, Kensuke, Shungo Adachi, Tohru Natsume, Junichi Iwakiri, Goro Terai, Kiyoshi Asai, et Tetsuro Hirose. 2020. « LncRNA-dependent nuclear stress bodies promote intron retention through SR protein phosphorylation ». *The EMBO Journal* 39 (3): e102729. <https://doi.org/10.15252/embj.2019102729>.
- Nurk, Sergey. s. d. « The complete sequence of a human genome | bioRxiv ». Consulté le 11 mars 2022. https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.05.26.445798v1.full?utm_source=Nature+Briefing&utm_campaign=daa292b748-briefing-dy-20210601&utm_medium=email&utm_term=0_c9dfd39373-daa292b748-44906129.
- Olins, Donald E., et Ada L. Olins. 2003. « Chromatin History: Our View from the Bridge ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (10): 809-14. <https://doi.org/10.1038/nrm1225>.
- Oliveira, Raquel A., Shaila Kotadia, Alexandra Tavares, Mihailo Mirkovic, Katherine Bowlin, Christian S. Eichinger, Kim Nasmyth, et William Sullivan. 2014. « Centromere-Independent Accumulation of Cohesin at Ectopic Heterochromatin Sites Induces Chromosome Stretching

- during Anaphase ». *PLOS Biology* 12 (10): e1001962.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001962>.
- Orlando, Valerio. 2003. « Polycomb, Epigenomes, and Control of Cell Identity ». *Cell* 112 (5): 599-606.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00157-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00157-0).
- Pandey, Rajesh, Amit K. Mandal, Vineet Jha, et Mitali Mukerji. 2011. « Heat shock factor binding in Alu repeats expands its involvement in stress through an antisense mechanism ». *Genome Biology* 12 (11): R117. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-11-r117>.
- Penin, Jessica, Solenne Dufour, Virginie Faure, Sabrina Fritah, Daphné Seigneurin-Berny, Edwige Col, André Verdel, et Claire Vourc'h. 2021. « Chromosome Y Pericentric Heterochromatin Is a Primary Target of HSF1 in Male Cells ». *Chromosoma* 130 (1): 53-60.
<https://doi.org/10.1007/s00412-021-00751-2>.
- Pernet, Lydia, Virginie Faure, Benoit Gilquin, Solenne Dufour-Guérin, Saadi Khochbin, et Claire Vourc'h. 2014. « HDAC6–ubiquitin interaction controls the duration of HSF1 activation after heat shock ». *Molecular Biology of the Cell* 25 (25): 4187-94.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e14-06-1032>.
- Peters, Antoine H. F. M., Stefan Kubicek, Karl Mechtler, Roderick J. O'Sullivan, Alwin A. H. A. Derijck, Laura Perez-Burgos, Alexander Kohlmaier, et al. 2003. « Partitioning and Plasticity of Repressive Histone Methylation States in Mammalian Chromatin ». *Molecular Cell* 12 (6): 1577-89. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00477-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00477-5).
- Peters, Jan-Michael, et Tomoko Nishiyama. 2012. « Sister Chromatid Cohesion ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (11): a011130. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011130>.
- Pezer, Željka, et Đurđica Ugarković. 2008. « Role of Non-Coding RNA and Heterochromatin in Aneuploidy and Cancer ». *Seminars in Cancer Biology* 18 (2): 123-30.
<https://doi.org/10.1016/j.semancer.2008.01.003>.
- Pinheiro, Inês, Raphaël Margueron, Nicholas Shukeir, Michael Eisold, Christoph Fritsch, Florian M. Richter, Gerhard Mittler, et al. 2012. « Prdm3 and Prdm16 Are H3K9me1 Methyltransferases Required for Mammalian Heterochromatin Integrity ». *Cell* 150 (5): 948-60.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.048>.
- Polo, Sophie E, et Geneviève Almouzni. 2006. « Chromatin Assembly: A Basic Recipe with Various Flavours ». *Current Opinion in Genetics & Development* 16 (2): 104-11.
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.02.011>.
- Probst, Aline V., et Geneviève Almouzni. 2008. « Pericentric Heterochromatin: Dynamic Organization during Early Development in Mammals ». *Differentiation* 76 (1): 15-23.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00220.x>.
- Probst, Aline V., Ikuhiro Okamoto, Miguel Casanova, Fatima El Marjou, Patricia Le Baccon, et Geneviève Almouzni. 2010. « A Strand-Specific Burst in Transcription of Pericentric Satellites Is Required for Chromocenter Formation and Early Mouse Development ». *Developmental Cell* 19 (4): 625-38. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.002>.
- Prodromou, Chrisostomos. 2016. « Mechanisms of Hsp90 regulation ». *Biochemical Journal* 473 (16): 2439-52. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160005>.
- Prosser, J., M. Frommer, C. Paul, et P.C. Vincent. 1986. « Sequence Relationships of Three Human Satellite DNAs ». *Journal of Molecular Biology* 187 (2): 145-55. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90224-X](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90224-X).
- Rabindran, Sridhar K., Raymond I. Haroun, Joachim Clos, Jan Wisniewski, et Carl Wu. 1993. « Regulation of Heat Shock Factor Trimer Formation: Role of a Conserved Leucine Zipper ». *Science* 259 (5092): 230-34. <https://doi.org/10.1126/science.8421783>.
- Rasmussen, E B, et J T Lis. 1993. « In vivo transcriptional pausing and cap formation on three Drosophila heat shock genes. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (17): 7923-27. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.7923>.
- REA, S, F. EISENHABER, T. JENUWEIN, D. O'CARROLL, B. D. STRAHL, Z.-W. SUN, M. SCHMID, et al. 2000. « Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases ».

- Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases* 406 (6796): 593-99.
- Richmond, Timothy J., et Curt A. Davey. 2003. « The Structure of DNA in the Nucleosome Core ». *Nature* 423 (6936): 145-50. <https://doi.org/10.1038/nature01595>.
- Richter, Klaus, Martin Haslbeck, et Johannes Buchner. 2010. « The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death ». *Molecular Cell* 40 (2): 253-66. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.006>.
- Ritossa, F. 1962. « A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in *Drosophila* ». *Experientia* 18 (12): 571-73. <https://doi.org/10.1007/BF02172188>.
- Ritossa, Ferruccio. 1996. « Discovery of the heat shock response ». *Cell Stress & Chaperones* 1 (2): 97-98.
- Rizzi, Nicoletta, Marco Denegri, Ilaria Chiodi, Margherita Corioni, Rut Valgardsdottir, Fabio Cobianchi, Silvano Riva, et Giuseppe Biamonti. 2004. « Transcriptional Activation of a Constitutive Heterochromatic Domain of the Human Genome in Response to Heat Shock ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (2): 543-51. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-07-0487>.
- Robinson, Philip JJ, et Daniela Rhodes. 2006. « Structure of the '30nm' Chromatin Fibre: A Key Role for the Linker Histone ». *Current Opinion in Structural Biology, Nucleic acids/Sequences and topology*, 16 (3): 336-43. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.05.007>.
- Rocha, Simão T. da, et Edith Heard. 2017. « Novel Players in X Inactivation: Insights into Xist-Mediated Gene Silencing and Chromosome Conformation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 24 (3): 197-204. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3370>.
- Romano, Gal Hagit, Yaniv Harari, Tal Yehuda, Ariel Podhorzer, Linda Rubinstein, Ron Shamir, Assaf Gottlieb, et al. 2013. « Environmental Stresses Disrupt Telomere Length Homeostasis ». Édité par Jin-Qiu Zhou. *PLoS Genetics* 9 (9): e1003721. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003721>.
- Rošić, Silvana, et Sylvia Erhardt. 2016. « No Longer a Nuisance: Long Non-Coding RNAs Join CENP-A in Epigenetic Centromere Regulation ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 73 (7): 1387-98. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2124-7>.
- Rošić, Silvana, Florian Köhler, et Sylvia Erhardt. 2014. « Repetitive centromeric satellite RNA is essential for kinetochore formation and cell division ». *Journal of Cell Biology* 207 (3): 335-49. <https://doi.org/10.1083/jcb.201404097>.
- Rougvie, Ann E., et John T. Lis. 1988. « The RNA Polymerase II Molecule at the 5' End of the Uninduced Hsp70 Gene of *D. Melanogaster* Is Transcriptionally Engaged ». *Cell* 54 (6): 795-804. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(88\)91087-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(88)91087-2).
- Salmand, Pierre A., Thomas Jungas, Marylise Fernandez, Annie Conter, et Elisabeth S. Christians. 2008. « Mouse Heat-Shock Factor 1 (HSF1) Is Involved in Testicular Response to Genotoxic Stress Induced by Doxorubicin1 ». *Biology of Reproduction* 79 (6): 1092-1101. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.070334>.
- Sandqvist, Anton, Johanna K. Björk, Malin Åkerfelt, Zhanna Chitikova, Alexei Grichine, Claire Vourc'h, Caroline Jolly, Tiina A. Salminen, Yvonne Nymalm, et Lea Sistonen. 2009. « Heterotrimerization of Heat-Shock Factors 1 and 2 Provides a Transcriptional Switch in Response to Distinct Stimuli ». Édité par M. Bishr Omary. *Molecular Biology of the Cell* 20 (5): 1340-47. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-08-0864>.
- Santagata, Sandro, Rong Hu, Nancy U. Lin, Marc L. Mendillo, Laura C. Collins, Susan E. Hankinson, Stuart J. Schnitt, et al. 2011. « High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (45): 18378-83.
- Santenard, Angèle, Céline Ziegler-Birling, Marc Koch, László Tora, Andrew J. Bannister, et Maria-Elena Torres-Padilla. 2010. « Heterochromatin Formation in the Mouse Embryo Requires Critical Residues of the Histone Variant H3.3 ». *Nature Cell Biology* 12 (9): 853-62. <https://doi.org/10.1038/ncb2089>.

- Sanulli, S., M. J. Trnka, V. Dharmarajan, R. W. Tibble, B. D. Pascal, A. L. Burlingame, P. R. Griffin, J. D. Gross, et G. J. Narlikar. 2019. « HP1 Reshapes Nucleosome Core to Promote Phase Separation of Heterochromatin ». *Nature* 575 (7782): 390-94. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1669-2>.
- Sarge, K. D., S. P. Murphy, et R. I. Morimoto. 1993. « Activation of Heat Shock Gene Transcription by Heat Shock Factor 1 Involves Oligomerization, Acquisition of DNA-Binding Activity, and Nuclear Localization and Can Occur in the Absence of Stress ». *Molecular and Cellular Biology*, mars. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.3.1392-1407.1993>.
- Sarma, Kavitha, et Danny Reinberg. 2005. « Histone Variants Meet Their Match ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (2): 139-49. <https://doi.org/10.1038/nrm1567>.
- Seigneurin-Berny, Daphné, André Verdel, Sandrine Curtet, Claudie Lemercier, Jérôme Garin, Sophie Rousseaux, et Saadi Khochbin. 2001. « Identification of Components of the Murine Histone Deacetylase 6 Complex: Link between Acetylation and Ubiquitination Signaling Pathways ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (23): 8035-44. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.23.8035-8044.2001>.
- Shumaker, Dale K., Thomas Dechat, Alexander Kohlmaier, Stephen A. Adam, Matthew R. Bozovsky, Michael R. Erdos, Maria Eriksson, et al. 2006. « Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (23): 8703-8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602569103>.
- Skibbens, Robert V. 2019. « Condensins and cohesins – one of these things is not like the other! » *Journal of Cell Science* 132 (3): jcs220491. <https://doi.org/10.1242/jcs.220491>.
- Slee, R. B., C. M. Steiner, B.-S. Herbert, G. H. Vance, R. J. Hickey, T. Schwarz, S. Christan, et al. 2012. « Cancer-Associated Alteration of Pericentromeric Heterochromatin May Contribute to Chromosome Instability ». *Oncogene* 31 (27): 3244-53. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.502>.
- Smith, Roger S., Seesha R. Takagishi, David R. Amici, Kyle Metz, Sitaram Gayatri, Milad J. Alasady, Yaqi Wu, et al. s. d. « HSF2 cooperates with HSF1 to drive a transcriptional program critical for the malignant state ». *Science Advances* 8 (11): eabj6526. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abj6526>.
- Smurova, Ksenia, et Peter De Wulf. 2018. « Centromere and Pericentromere Transcription: Roles and Regulation ... in Sickness and in Health ». *Frontiers in Genetics* 9. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2018.00674>.
- Snider, Natasha T., et M. Bishr Omary. 2014. « Post-Translational Modifications of Intermediate Filament Proteins: Mechanisms and Functions ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (3): 163-77. <https://doi.org/10.1038/nrm3753>.
- Sorger, Peter K., et Hugh R.B. Pelham. 1988. « Yeast Heat Shock Factor Is an Essential DNA-Binding Protein That Exhibits Temperature-Dependent Phosphorylation ». *Cell* 54 (6): 855-64. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(88\)91219-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(88)91219-6).
- Spector, David L. 2006. « SnapShot: Cellular Bodies ». *Cell* 127 (5): 1071.e1-1071.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.026>.
- Sullivan, E. Kelly, Christine S. Weirich, Jeffrey R. Guyon, Saïd Sif, et Robert E. Kingston. 2001. « Transcriptional Activation Domains of Human Heat Shock Factor 1 Recruit Human SWI/SNF ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (17): 5826-37. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.17.5826-5837.2001>.
- Syafuruddin, Saiful Effendi, Sheen Ling, Teck Yew Low, et M. Aiman Mohtar. 2021. « More Than Meets the Eye: Revisiting the Roles of Heat Shock Factor 4 in Health and Diseases ». *Biomolecules* 11 (4): 523. <https://doi.org/10.3390/biom11040523>.
- Szabo, Quentin, Frédéric Bantignies, et Giacomo Cavalli. 2019. « Principles of Genome Folding into Topologically Associating Domains ». *Science Advances*, avril. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw1668>.

- Tan, Minjia, Hao Luo, Sangkyu Lee, Fulai Jin, Jeong Soo Yang, Emilie Montellier, Thierry Buchou, et al. 2011. « Identification of 67 Histone Marks and Histone Lysine Crotonylation as a New Type of Histone Modification ». *Cell* 146 (6): 1016-28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.008>.
- Tardat, Mathieu, et Jérôme Déjardin. 2018. « Telomere Chromatin Establishment and Its Maintenance during Mammalian Development ». *Chromosoma* 127 (1): 3-18. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0656-3>.
- Taverna, Sean D, Haitao Li, Alexander J Ruthenburg, C David Allis, et Dinshaw J Patel. 2007. « How Chromatin-Binding Modules Interpret Histone Modifications: Lessons from Professional Pocket Pickers ». *Nature Structural & Molecular Biology* 14 (11): 1025-40. <https://doi.org/10.1038/nsmb1338>.
- Tessari, A., E. Salata, A. Ferlin, L. Bartoloni, M.L. Slongo, et C. Foresta. 2004. « Characterization of HSFY, a novel AZFb gene on the Y chromosome with a possible role in human spermatogenesis ». *Molecular Human Reproduction* 10 (4): 253-58. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah036>.
- Théry, Clotilde, Laurence Zitvogel, et Sebastian Amigorena. 2002. « Exosomes: Composition, Biogenesis and Function ». *Nature Reviews Immunology* 2 (8): 569-79. <https://doi.org/10.1038/nri855>.
- Thomson, Inga, Susan Gilchrist, Wendy A. Bickmore, et Jonathan R. Chubb. 2004. « The Radial Positioning of Chromatin Is Not Inherited through Mitosis but Is Established De Novo in Early G1 ». *Current Biology* 14 (2): 166-72. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.12.024>.
- Ting, David T., Doron Lipson, Suchismita Paul, Brian W. Brannigan, Sara Akhavanfard, Erik J. Coffman, Gianmarco Contino, et al. 2011. « Aberrant Overexpression of Satellite Repeats in Pancreatic and Other Epithelial Cancers ». *Science* 331 (6017): 593-96. <https://doi.org/10.1126/science.1200801>.
- Tippens, Nathaniel D., Anniina Vihervaara, et John T. Lis. 2018. « Enhancer Transcription: What, Where, When, and Why? ». *Genes & Development* 32 (1): 1-3. <https://doi.org/10.1101/gad.311605.118>.
- Torres, Idelisse Ortiz, et Danica Galonić Fujimori. 2015. « Functional Coupling between Writers, Erasers and Readers of Histone and DNA Methylation ». *Current Opinion in Structural Biology, Catalysis and regulation • Protein-protein interactions*, 35 (décembre): 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.09.007>.
- Trinklein, Nathan D., John I. Murray, Sara J. Hartman, David Botstein, et Richard M. Myers. 2004. « The Role of Heat Shock Transcription Factor 1 in the Genome-wide Regulation of the Mammalian Heat Shock Response ». *Molecular Biology of the Cell* 15 (3): 1254-61. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-10-0738>.
- Valgardsdottir, Rut, Ilaria Chiodi, Manuela Giordano, Fabio Cobianchi, Silvano Riva, et Giuseppe Biamonti. 2005. « Structural and Functional Characterization of Noncoding Repetitive RNAs Transcribed in Stressed Human Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 16 (6): 2597-2604. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-12-1078>.
- Valgardsdottir, Rut, Ilaria Chiodi, Manuela Giordano, Antonio Rossi, Silvia Bazzini, Claudia Ghigna, Silvano Riva, et Giuseppe Biamonti. 2008. « Transcription of Satellite III non-coding RNAs is a general stress response in human cells ». *Nucleic Acids Research* 36 (2): 423-34. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm1056>.
- Vihervaara, Anniina, Fabiana M. Duarte, et John T. Lis. 2018. « Molecular Mechanisms Driving Transcriptional Stress Responses ». *Nature Reviews Genetics* 19 (6): 385-97. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0001-6>.
- Vihervaara, Anniina, Dig Bijay Mahat, Michael J. Guertin, Tinyi Chu, Charles G. Danko, John T. Lis, et Lea Sistonen. 2017. « Transcriptional Response to Stress Is Pre-Wired by Promoter and Enhancer Architecture ». *Nature Communications* 8 (1): 255. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00151-0>.
- Vihervaara, Anniina, et Lea Sistonen. 2014. « HSF1 at a glance ». *Journal of Cell Science* 127 (2): 261-66. <https://doi.org/10.1242/jcs.132605>.

- Voellmy, Richard, et Frank Boellmann. 2007. « Chaperone Regulation of the Heat Shock Protein Response ». In *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks*, édité par Peter Csermely et László Vigh, 89-99. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-39975-1_9.
- Volpe, Thomas A., Catherine Kidner, Ira M. Hall, Grace Teng, Shiv I. S. Grewal, et Robert A. Martienssen. 2002. « Regulation of Heterochromatic Silencing and Histone H3 Lysine-9 Methylation by RNAi ». *Science* 297 (5588): 1833-37. <https://doi.org/10.1126/science.1074973>.
- Vourc'h, Claire, et Giuseppe Biamonti. 2011. « Transcription of Satellite DNAs in Mammals ». In *Long Non-Coding RNAs*, édité par Durdica Ugarkovic, 51:95-118. Progress in Molecular and Subcellular Biology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-16502-3_5.
- Vourc'h, Claire, Solenne Dufour, Kalina Timcheva, Daphné Seigneurin-Berny, et André Verdel. 2022. « HSF1-Activated Non-Coding Stress Response: Satellite LncRNAs and Beyond, an Emerging Story with a Complex Scenario ». *Genes* 13 (4): 597. <https://doi.org/10.3390/genes13040597>.
- Wang, Zhuo, Zhong Deng, Nadia Dahmane, Kevin Tsai, Pu Wang, Dewight R. Williams, Andrew V. Kossenkov, et al. 2015. « Telomeric repeat-containing RNA (TERRA) constitutes a nucleoprotein component of extracellular inflammatory exosomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (46): E6293-6300.
- Watt, F., et P. L. Molloy. 1988. « Cytosine Methylation Prevents Binding to DNA of a HeLa Cell Transcription Factor Required for Optimal Expression of the Adenovirus Major Late Promoter. ». *Genes & Development* 2 (9): 1136-43. <https://doi.org/10.1101/gad.2.9.1136>.
- Waye, J S, et H F Willard. 1989. « Human beta satellite DNA: genomic organization and sequence definition of a class of highly repetitive tandem DNA. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (16): 6250-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6250>.
- Weighardt, F., F. Cobianchi, L. Cartegni, I. Chiodi, A. Villa, S. Riva, et G. Biamonti. 1999. « A novel hnRNP protein (HAP/SAF-B) enters a subset of hnRNP complexes and relocates in nuclear granules in response to heat shock ». *Journal of Cell Science* 112 (10): 1465-76. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.10.1465>.
- Westerheide, Sandy D., Julius Anckar, Stanley M. Stevens, Lea Sistonen, et Richard I. Morimoto. 2009. « Stress-Inducible Regulation of Heat Shock Factor 1 by the Deacetylase SIRT1 ». *Science* 323 (5917): 1063-66. <https://doi.org/10.1126/science.1165946>.
- Westerheide, Sandy D., et Richard I. Morimoto. 2005. « Heat Shock Response Modulators as Therapeutic Tools for Diseases of Protein Conformation * ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (39): 33097-100. <https://doi.org/10.1074/jbc.R500010200>.
- Whitesell, Luke, et Susan L. Lindquist. 2005. « HSP90 and the Chaperoning of Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 5 (10): 761-72. <https://doi.org/10.1038/nrc1716>.
- Widagdo, Jocelyn, Victor Anggono, et Justin J.-L. Wong. 2022. « The Multifaceted Effects of YTHDC1-Mediated Nuclear M6A Recognition ». *Trends in Genetics: TIG* 38 (4): 325-32. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.11.005>.
- Williams, Kristine, Jesper Christensen, et Kristian Helin. 2012. « DNA methylation: TET proteins—guardians of CpG islands? ». *EMBO Reports* 13 (1): 28-35. <https://doi.org/10.1038/embo.2011.233>.
- Wong, Lee H., Kate H. Brettingham-Moore, Lyn Chan, Julie M. Quach, Melissa A. Anderson, Emma L. Northrop, Ross Hannan, et al. 2007. « Centromere RNA Is a Key Component for the Assembly of Nucleoproteins at the Nucleolus and Centromere ». *Genome Research* 17 (8): 1146-60. <https://doi.org/10.1101/gr.6022807>.
- Wu, Carl. s. d. « Heat Shock Transcription Factors: Structure and Regulation », 31.
- XianZhong Xiao. 1999. « HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice ». *The EMBO Journal* 18 (21): 5943-52. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.21.5943>.

- Yamagishi, Yuya, Takeshi Sakuno, Mari Shimura, et Yoshinori Watanabe. 2008. « Heterochromatin Links to Centromeric Protection by Recruiting Shugoshin ». *Nature* 455 (7210): 251-55. <https://doi.org/10.1038/nature07217>.
- Yao, Run-Wen, Yang Wang, et Ling-Ling Chen. 2019. « Cellular Functions of Long Noncoding RNAs ». *Nature Cell Biology* 21 (5): 542-51. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0311-8>.
- Yi, Qi, Qinfu Chen, Cai Liang, Haiyan Yan, Zhenlei Zhang, Xingfeng Xiang, Miao Zhang, Feifei Qi, Linli Zhou, et Fangwei Wang. 2018. « HP1 links centromeric heterochromatin to centromere cohesion in mammals ». *EMBO reports* 19 (4): e45484. <https://doi.org/10.15252/embr.201745484>.
- Young, Jason C., Nicholas J. Hoogenraad, et F. Ulrich Hartl. 2003. « Molecular Chaperones Hsp90 and Hsp70 Deliver Preproteins to the Mitochondrial Import Receptor Tom70 ». *Cell* 112 (1): 41-50. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01250-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01250-3).
- Zhao, Jing, Bryan K. Sun, Jennifer A. Erwin, Ji-Joon Song, et Jeannie T. Lee. 2008. « Polycomb Proteins Targeted by a Short Repeat RNA to the Mouse X Chromosome ». *Science* 322 (5902): 750-56. <https://doi.org/10.1126/science.1163045>.
- Zhao, Y. H., M. Zhou, H. Liu, Y. Ding, H. T. Khong, D. Yu, O. Fodstad, et M. Tan. 2009. « Upregulation of Lactate Dehydrogenase A by ErbB2 through Heat Shock Factor 1 Promotes Breast Cancer Cell Glycolysis and Growth ». *Oncogene* 28 (42): 3689-3701. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.229>.
- Zhao, Yan Mei, Xia Chen, Hui Sun, Zhi Gen Yuan, Guo Ling Ren, Xiao Xue Li, Jun Lu, et Bai Qu Huang. 2006. « Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on Transcriptional Regulation of the Hsp70 Gene in Drosophila ». *Cell Research* 16 (6): 566-76. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310074>.
- Zhou, Jun, Ji Wan, Xin Erica Shu, Yuanhui Mao, Xiao-Min Liu, Xin Yuan, Xingqian Zhang, Martin E. Hess, Jens C. Brüning, et Shu-Bing Qian. 2018. « N6-Methyladenosine Guides mRNA Alternative Translation during Integrated Stress Response ». *Molecular Cell* 69 (4): 636-647.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.01.019>.
- Zhu, Quan, Nien Hoong, Aaron Aslanian, Toshiro Hara, Christopher Benner, Sven Heinz, Karen H. Miga, et al. 2018. « Heterochromatin-Encoded Satellite RNAs Induce Breast Cancer ». *Molecular Cell* 70 (5): 842-853.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.04.023>.
- Zhu, Quan, Gerald M. Pao, Alexis M. Huynh, Hoonkyo Suh, Nina Tonnu, Petra M. Nederlof, Fred H. Gage, et Inder M. Verma. 2011. « BRCA1 Tumour Suppression Occurs via Heterochromatin-Mediated Silencing ». *Nature* 477 (7363): 179-84. <https://doi.org/10.1038/nature10371>.
- Zorn, Christian, Christoph Cremer, Thomas Cremer, et Jürgen Zimmer. 1979. « Unscheduled DNA Synthesis after Partial UV Irradiation of the Cell Nucleus ». *Experimental Cell Research* 124 (1): 111-19. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(79\)90261-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(79)90261-1).