Dynamique nucléaire de cGAS lors de la sénescence induite par des dommages à l'ADN

Florent Bressac

▶ **To cite this version:**

Florent Bressac. Dynamique nucléaire de cGAS lors de la sénescence induite par des dommages à l'ADN. Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2024. Français. ⟨NNT : 2024LYO10258⟩. ⟨tel-05212529⟩

HAL Id: tel-05212529

https://theses.hal.science/tel-05212529v1

Submitted on 18 Aug 2025

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.

HAL Authorization

Université Claude Bernard Lyon 1

THESE de DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

Ecole Doctorale N° 40
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

Discipline : Biologie cellulaire

Soutenue publiquement le 03/12/2024, par :
Florent Bressac

Dynamique nucléaire de cGAS lors de la sénescence induite par des dommages à l'ADN

Devant le jury composé de :

Kretz, Carole	Professeure des Universités Université Claude Bernard Lyon 1	Présidente
Boumendil, Charlène	Chargée de recherche CNRS Université de Montpellier	Rapporteure
Bidère, Nicolas	Directeur de recherche INSERM Université de Nantes	Rapporteur
Lomonte, Patrick	Directeur de recherche CNRS Université Claude Bernard Lyon 1	Directeur de Thèse
Corpet, Armelle	Maître de conférence Université Claude Bernard Lyon 1	Co-directrice de thèse

Université Claude Bernard – Lyon 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Philippe CHEVALIER
Vice-Président du Conseil des Études de la Vie Universitaire	M. Christophe VITON
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Philippe CASSAGNAU
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Laetitia BIGNON
Faculté d'Odontologie	Doyen : M. Jean-Christophe MAURIN
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Doyen : M. Philippe PAPAREL
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Jacques LUAUTE
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directeur : M. Bernard MASSOUBRE

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Électrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Sophie Cavassila
Département informatique	Directrice : Mme Saïda BOUAKAZ
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
École Supérieur de Chimie, Physique, Électronique (CPE Lyon)	Directeur : M. Gérard PIGNAULT
Institut de Sciences Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Christian ROBERT
Institut National du Professorat et de l'Éducation	Directeur : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Michel MASSENZIO
Observatoire de Lyon	Directeur : M. Bruno GUIDERNONI
Polytechnique Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Guillaume BODET
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

« La question n'est pas ' qu'est-ce que je peux avoir ? '

Mais ' qu'est-ce que je peux donner dans la vie ' »

Lord Robert Baden-Powell

« Je peux accepter l'échec, tout le monde échoue dans quelque chose.

Mais je ne peux pas accepter de ne pas essayer »

Michael Jordan

Remerciements

A la fin de cette aventure, il est temps de remercier toutes celles et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ces 4 années. L'encadrement, l'environnement et l'ambiance de ces années à Lyon ont joué un rôle primordial tout au long de cette thèse.

Armelle Corpet, pour m'avoir fait confiance afin de mener ce projet alors que tu ne me connaissais pas. Je voudrais te remercier pour ces quatre années passées sous ta direction et qui ont été une aventure incroyable. Je ne te remercierai jamais assez de ta gentillesse, de ton écoute, de ta patience et de ta bienveillance. Travailler avec toi a été très riche d'un point de vue scientifique, mais également humain et je te remercie pour toutes les discussions que nous avons eues et qui m'ont beaucoup aidé dans les moments difficiles. Merci également de m'avoir soutenu pour m'essayer à l'enseignement. Tu es une enseignante formidable et c'est en grande partie grâce à toi que je souhaite poursuivre dans ce domaine. Entre l'IUF, l'HDR, ta famille et tout le reste tu seras toujours une grande source d'inspiration pour moi.

Patrick Lomonte, pour m'avoir accueilli dans ton équipe et accepter d'être le garant de cette thèse. Je te remercie pour ton écoute et l'accompagnement tout au long de l'évolution de ce projet. Merci pour ta bienveillance, ta bonne humeur et cette capacité à créer du lien entre tous les sujets scientifiques que tu encadres. Grâce à toi ce lien se retrouve également entre les membres de l'équipe et travailler dans cette atmosphère a été une vraie chance.

Charlène Boumendil et Nicolas Bidère pour avoir accepté de lire et d'évaluer ce manuscrit et Carole Kretz pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse, ainsi que Thomas Clouaire qui a également accepté de faire partie de ce jury après m'avoir accompagné et conseillé en tant que membre de mon comité de suivi individuel. Je tiens aussi à remercier Marie Castets, second membre de mon jury du comité de suivi individuel, pour m'avoir suivi pendant cette thèse. Merci pour vos conseils et aide qui m'ont beaucoup apporté lors de l'évolution de ce projet.

Le Labex DevWeCan pour avoir financé mes trois premières années de thèse, la fondation ARC et l'Université Claude Bernard Lyon 1 pour cette année de prolongation et les formations proposées tout au long de la thèse. Un merci particulier à Frédéric et Marie pour m'avoir fait confiance en me donnant des heures d'enseignement, qui ont été pour moi une vraie chance et une formidable expérience.

L'équipe Lomonte, un groupe dont je n'aurais pu rêver mieux pour ces années. Un merci particulier à Constance qui m'a accueilli sur la fin de sa thèse et qui m'a transmis beaucoup de connaissances. Les anciens membres : Wilhelm, Simon, Pascale, Clément, Corentin, Solène, Coline, Mathilde et les actuels : Franceline, Rémi, Tristan E et Tristan B, Karine, Lucas, Clem, Delphine et Faouzi. Merci à tous pour ces bons moments au laboratoire, les paris sportifs, les bingos, les randonnées, la cuisine et surtout la bonne ambiance et l'entraide permanente. Je vous souhaite à tous de belles années à venir dans l'équipe ou dans vos nouveaux projets.

Tous les membres de l'INMG (PGNM et MeLis) pour les discussions et les temps informels que nous avons passé ensemble, Jianbo pour la dose quotidienne de sourire, l'équipe Durand et ses anciens membres, surtout Sébastien pour ton humour sans limite. Un merci particulier à l'association YRIN pour ses évènements, scientifiques ou non, qui permettent aux jeunes de passer de bons moments.

Mes anciens camarades de master qui ont pour la plupart fait leur thèse lors de la même période, pour nos retrouvailles et vos soutenances respectives, et tous les autres qui sont partis dans de beaux projets.

Mes amis de longue date : Suzy, Greg, Thomas, Arthur, Camille, Camolle, Thaïs et Capu qui ont réussi à me supporter et à me soutenir dans tous les moments plus ou moins sympathique de ces années. Un grand merci à Marin pour avoir été toujours disponible et si précieux pendant cette période. Votre soutien et tous ces moments passés ensemble m'ont beaucoup aidé au long de ces années.

Mes amis de Tours, Valou et Océane et mon équipe de basket des Buers.

Aux Scouts et Guides de France, aux groupes de Tours et Tassin et en particulier aux audacieux. A vos côtés j'ai beaucoup appris sur moi-même et vous avez été une bouffée d'oxygène incroyable.

Naïma, qui m'a accompagné pendant les 3 premières années de cette thèse et qui a été très courageuse et bienveillante. Je te remercie pour toutes les aventures et les défis qui ont accompagné ces années. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ton parcours et de ta vie que j'espère couronnés de succès et de joie.

Ma famille, à mes parents qui m'ont transmis leur intérêt pour la science, Jul qui a échappé à cette transmission, Alex qui va enfin voir se terminer ces années d'études et Marie qui risque de battre cette série. Un grand merci aux Cotelle pour leur accueil à Lyon, tous ces bons moments passés chez et avec eux.

Enfin Lucile, pour tous ces moments passés aux scouts qui m'ont fait tant de bien et pour désormais partager ma vie. Merci pour ton soutien, ton brin (gros brin) de folie, ta gentillesse, tout ce que nous avons déjà vécu et ce qu'il nous reste à vivre ensemble. Ton aide sur ces derniers mois a été très précieuse et j'ai beaucoup de chance de t'avoir à mes côtés.

Résumé

Les cellules des organismes eucaryotes sont continuellement soumises à différents types de stress pouvant endommager leur ADN et mener à l'accumulation de mutations. Afin d'éviter la transformation tumorale des cellules, ces dernières peuvent entrer en sénescence, un état qui permet l'arrêt irréversible du cycle cellulaire. Ce processus antitumoral est également impliqué dans le développement embryonnaire, la cicatrisation et l'apparition de maladies liées au vieillissement. La régulation de la mise en place de cet état fait intervenir de nombreux acteurs cellulaires, notamment la protéine cGAS. Cette enzyme, initialement décrite comme un senseur d'ADN cytoplasmique, participe à l'expression de cytokines pro-inflammatoires avec son partenaire STING dans les cellules sénescentes afin d'induire leur élimination par le système immunitaire. Plus récemment, il a été démontré que cGAS est également présente dans le compartiment nucléaire, et est maintenue inactive grâce à son interaction avec la chromatine. Lors de ma thèse, j'ai cherché à comprendre quel pouvait être le rôle de la protéine cGAS dans le noyau des cellules lors des phases précoces de l'induction de la sénescence suite à la génération de dommages à l'ADN.

Dans un premier temps, j'ai investigué la dynamique nucléaire de la protéine cGAS notamment vis-à-vis de la chromatine, dans un contexte d'induction de dommages à l'ADN conduisant à l'entrée en sénescence de cellules primaires. Mes travaux ont permis de montrer que, lorsque la structure de la chromatine est altérée, cGAS est décroché de la chromatine puis dégradé. De plus, nous avons identifié que ce décrochage et cette dégradation sont dépendants des protéines p97 et des corps nucléaires PML, des organelles sans membrane présents dans le noyau des cellules. Dans un second temps je me suis intéressé à l'importance de cette dynamique de cGAS pour le déclenchement de la sénescence dans des cellules primaires. J'ai pu montrer que l'absence de cGAS lors de la génération des dommages empêche l'apparition d'un marqueur précoce de la sénescence, l'accumulation du complexe chaperon d'histone HIRA dans les corps nucléaires PML et que cet effet est indépendant de la voie cGAS-STING. De façon surprenante, nous avons constaté que la dégradation de cGAS est également requise pour l'induction de la sénescence car l'inhibition de cette dégradation par le protéasome empêche l'apparition du marqueur précoce de sénescence. Je discuterai de ces résultats, à première vue antinomiques, dans le contexte des découvertes récentes sur le rôle de cGAS dans le noyau des cellules.

Abstract

Cells of eukaryotes organisms are continuously exposed to various types of stresses, which affect their genome integrity and increase the risk of accumulating genetic mutations. In order to avoid tumoral transformation, they can trigger the senescence program, a state which allows an irreversible arrest of the cell cycle. This antitumoral process is also involved in embryonic development, healing and in the appearance of age-related disorders. The regulation of the induction of this process involves many cellular elements, and among them, the protein cGAS. This enzyme, initially described as a cytoplasmic DNA sensor, is known to trigger the expression of pro-inflammatory cytokines with its partner STING in senescent cells in order to trigger their elimination by the immune system. Recently, cGAS was characterized as a nuclear protein, inactive when bound to chromatin and involved in different cellular processes. During my thesis, I sought to understand what is the implication of nuclear cGAS during the early steps of the senescence induction following DNA damage.

First, I investigated the nuclear dynamics of the protein cGAS, and its chromatin-binding property, in a context of DNA damage induced senescence in a primary cell line. My work has shown that cGAS is detached from the chromatin upon its alteration, and then degraded. Moreover, we identified that this dynamic of the protein in dependent on p97 and the PML nuclear bodies, membrane-less organelles present in the cell nucleus. Second, I was investigated the importance of this nuclear dynamic for the early senescence induction in a primary cell line. I have shown that the absence of cGAS during chromatin damages impairs the appearance of an early senescence marker which is the accumulation of the histone chaperone complex HIRA in the PML nuclear bodies and that this effect is independent of the cGAS-STING axis. Moreover, we noticed that cGAS degradation is required for senescence induction because the inhibition of its degradation by the proteasome also impairs the appearance of the early senescence hallmark. I will discuss these seemingly contradictory results in the context of recent discoveries on the role of cGAS in the nucleus of cells.

Table des matières

Remerciements *4*

Résumé *6*

Abstract *7*

Table des matières *8*

Table des figures et tableaux *12*

Liste des abréviations *14*

Introduction *18*

Préambule **19**

Chapitre 1 : La Sénescence, un processus antitumoral **20**

1. Définition de la sénescence 20
2. Les différents marqueurs cellulaires de la sénescence 21
   - 2.1. La détection de l'activité Bêta-Galactosidase associée à la sénescence 22
   - 2.2. L'augmentation de la perméabilité de l'enveloppe nucléaire 23
   - 2.3. La présence de dommages à l'ADN 23
   - 2.4. Le réarrangement de la chromatine avec la formation de foyers denses en hétérochromatine 24
   - 2.5. La sécrétion d'un cocktail de cytokines pro-inflammatoires 25
   - 2.6. La résistance à l'apoptose 27
   - 2.7. Un marqueur précoce : la relocalisation du complexe HIRA dans les PML NBs 29
3. Les différents modes d'induction de la sénescence cellulaire 29
   - 3.1. La sénescence réplicative 29
   - 3.2. La sénescence liée au stress 31
     - 3.2.A. Les cassures de la chromatine 31
     - 3.2.C. Le stress oncogénique 32
       - 3.3.C.i. L'activation des oncogènes 32
       - 3.3.C.ii. La perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs 32
4. Les voies de signalisation permettant la mise en place de la sénescence 33
   - 4 .1. La voie de réponse aux cassures de la chromatine 33
     - 4.1.1. La détection des télomères raccourcis 33
     - 4.1.2. Les dommages à l'ADN non réparés entraînant la sénescence 34
   - 4.2. Le rôle de la protéine du rétinoblastome (pRB) 34
   - 4.3. La stabilisation de p53 : le gardien du génome 34
     - 4.3.A. Le contexte d'un stress oncogénique 35
     - 4.3.B. Le contexte des dommages à l'ADN 35
   - 4.4. Les acteurs antitumoraux 36
     - 4.4.A. La protéine p21 36
     - 4.4.B. La protéine p16 36
5. Le rôle des PML NBs dans l'induction de la sénescence 37
   - 5.1. La protéine PML 37
   - 5.2. La SUMOylation, modification post-traductionnelle majeure de PML 38
   - 5.4. La composition et la formation des PML NBs 40
   - 5.5. L'implication des PML NBs dans la sénescence 42

5.4.A. Les PML NB dans la réponse aux dommages à l'ADN 42
5.4.B. L'accumulation de HIRA dans les PML NBs lors de l'induction de la sénescence 43
6. Les avantages et inconvénients de la sénescence dans les pathologies 43
6.1. L'élimination physiologique des cellules sénescentes 44
6.2. Les maladies liées au vieillissement 44
6.2.A. La mauvaise élimination des cellules sénescentes 45
6.2.B. L'immunosénescence 46
6.3. La sénescence et les cancers 47
6.3.A. Le rôle parfois néfaste de la sénescence dans un contexte cancéreux 47
6.3.B. Les thérapies induisant la sénescence 48

Chapitre 2 : La structure de la chromatine et la réparation de ses cassures 50
1. La structure de la chromatine 50
1.1. Le nucléosome, unité de base de la chromatine 51
1.1.A. Les protéines histones 51
1.1.B. La condensation de la chromatine 52
1.1.C. L'information épigénétique et les modifications post-traductionnelles des histones 52
1.2. L'euchromatine 55
1.3. L'hétérochromatine 56
1.3.A. L'hétérochromatine facultative 56
1.3.B L'hétérochromatine constitutive 57
2. La chromatine et les chaperons d'histones 58
2 .1 Les chaperons d'histones 58
2.2. Le chaperon ATRX-DAXX 59
2.3. Le complexe chaperon HIRA 60
3. Les différents types de cassures de la chromatine et leur réparation 62
3.1. Les senseurs de dommages à l'ADN 63
3.1.A. ATM 64
3.1.B. ATR 64
3.1.C. DNA-PK 65
3.2. Les mécanismes de réparation des cassures simple brin 65
3.2.A. La réparation par excision de base 66
3.2.B. La réparation par excision de nucléotide 67
3.2.C. La réparation des mésappariements 67
3.3. Les mécanismes de réparation des cassures double brins 68
3.3.A. Les cassures double brins 68
3.3.B. La jonction d'extrémités non homologues 69
3.3.B.i. Le rôle du complexe Ku 69
3.3.B.ii. Le rôle de XRCC4 69
3.3.B.iii. La recombinaison V(D)J 69
3.3.C La recombinaison homologue 70
3.3.C.i. Les conditions pour la mise en place de la HR et l'inhibition de la NHEJ 70
3.3.C.ii. La résection de l'ADN comme étape clé 70
3.3.C.iii. Le mécanisme d'invasion du brin homologue et la synthèse d'ADN 70
3.4. Les PML NBs dans la gestion des cassures et la dynamique des protéines de réparation 71

Chapitre 3 : la protéine cGAS 73
1. Découverte et origine de cGAS, un senseur d'ADN cytoplasmique 73
2. La structure de cGAS 74
2.1. Le domaine N-terminal 75

2.2. Le domaine C-terminal ... 75
2.3. Les sites de liaison de cGAS avec l'ADN ... 76
2.4. Les modifications post-traductionnelles de cGAS ... 77
3. Les localisations de cGAS dans le cytoplasme ... 79
3.1. cGAS ancré à la membrane plasmique ... 79
3.2. cGAS dans les granules de stress ... 80
3.3. cGAS dans les lysosomes ... 80
4. L'activité enzymatique de cGAS et l'axe cGAS-STING ... 81
4.1. La détection d'ADN de différentes origines ... 81
4 .1.A. La détection d'ADN d'origine microbienne ... 82
4.1.B. La détection d'ADN du soi extra-cellulaire ... 82
4.1.C. La détection d'ADN nucléaire ... 83
4.1.C.i. Les micronoyaux ... 83
4.1.C.ii. Les fragments de chromatine cytoplasmiques ... 83
4.1.D. La détection d'ADN mitochondrial ... 84
4.2. La synthèse de cGAMP, un second messager dans l'initiation de la réponse interféron ... 84
4.3. STING, le partenaire de cGAS ... 85
4.3.A. Structure et localisation de STING ... 85
4.3.B. L'activation de STING ... 85
4.3.C. L'activation de la réponse interféron par STING ... 86
4.4. Le rôle de l'axe cGAS-STING dans la sécrétion du SASP lors de la sénescence ... 87
5. La localisation nucléaire de cGAS et son interaction avec la chromatine ... 89
5.1. La découverte de cGAS dans le compartiment nucléaire ... 89
5.2. Le transport de cGAS entre le noyau et le cytoplasme ... 90
L'interaction de cGAS avec la chromatine ... 91
5.3.A. La liaison de cGAS au nucléosome ... 91
5.3.B. Les modifications post-traductionnelles de cGAS dans le noyau ... 92
5.3.C. Le cas particulier de la mitose ... 93
6. Les rôles de cGAS dans le noyau de la cellule ... 94
6.1. L'inhibition de la recombinaison homologue ... 94
6.2. La stabilisation des fourches de réplication ... 95
6.3. La protection de la fusion des chromosomes ... 95
6.4. La rupture de l'enveloppe nucléaire ... 96
6.5. L'angiogenèse ... 96
6.6. Déclenchement de l'immunité innée non cytoplasmique ... 97
7. La régulation de la quantité cellulaire de cGAS ... 98
7.1. Dégradation cytoplasmique ... 99
7.2. Dégradation nucléaire ... 100

Questions biologiques* ... *102
Modèles cellulaires utilisés ... 104

Résultats* ... *105

Rôle des PML NBs et de p97 dans la dégradation de cGAS au cours de la réponse aux dommages de l'ADN ... 106

Résultats supplémentaires ... 149

Discussion et Perspectives* ... *163

La dynamique nucléaire de cGAS suite à l'induction de dommages à l'ADN 164

La dynamique nucléaire de cGAS et sa dégradation dans le déclenchement de la sénescence 170

Annexes* *174

Annexe 1 : article de recherche 175

Annexe 2 : Contributions scientifiques et encadrements 211

Bibliographie* *213

Table des figures et tableaux

Figures :

FIGURE 1 : LES DIFFERENTS ROLES DE LA SENESCENCE. 21
FIGURE 2 : MARQUEURS CELLULAIRES DE LA SENESCENCE. 22
FIGURE 3 : LES DIFFERENTS ROLES DU SASP. 25
FIGURE 4 : L'INDUCTION DE LA SENESCENCE OU DE L'APOPTOSE EN FONCTION DE L'INTENSITE DU STRESS 28
FIGURE 5 : STRUCTURE DES TELOMERES, DE LA TELOMERASE ET ASSOCIATION AVEC LE COMPLEXE SHELTERIN. 30
FIGURE 6 : LES DIFFERENTS MODES D'INDUCTION DE LA SENESCENCE. 31
FIGURE 7: LA STABILISATION DE P53 EN FONCTION DU STRESS. 35
FIGURE 8 : LES ISOFORMES MAJEURS DE PML. 38
FIGURE 9 : PROPOSITION DE MODELE POUR LA FORMATION DES PML NBS. 41
FIGURE 10 : LA SENESCENCE PARTICIPE AU VIEILLISSEMENT. 46
FIGURE 11 : L'EFFET PRO-TUMORAL DES CELLULES SENESCENTES. 48
FIGURE 12 : TRAITEMENT "TWO-PUNCH" DES CELLULES CANCEREUSES. 49
FIGURE 13 : L'ORGANISATION DU GENOME EUCARYOTE (NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE 2024). 50
FIGURE 14 : REPRESENTATION DE LA STRUCTURE DU CHROMATOSOME AVEC LES DOMAINES GLOBULAIRES DES HISTONES 51
FIGURE 15 : LES DIFFERENTS VARIANTS D'HISTONES 53
FIGURE 16 : LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES 54
FIGURE 17 : MODIFICATION DE LA CONDENSATION DE LA CHROMATINE 56
FIGURE 18 : LES DOMAINES D'ACTION DES CHAPERONS D'HISTONES 59
FIGURE 19 : INCORPORATION DE H3.3 DANS LES DIFFERENTS TYPES DE CHROMATINE EN FONCTION DU CHAPERO. 60
FIGURE 20 : LA DYNAMIQUE DE HIRA, H3.3 ET PML LORS D'UNE REPONSE A L'INTERFERON 61
FIGURE 21 : DIFFERENTS STRESS INDUISANT DES CASSURES ET LES MECANISMES DE REPARATION 63
FIGURE 22 : DESCRIPTION ET PARTENAIRES DES PIKKS. 63
FIGURE 23 : MECANISMES DE REPARATION DES CASSURES SIMPLE BRIN :. 66
FIGURE 24 : REPARATION DES CASSURES DOUBLE BRINS 68
FIGURE 25 : LA STRUCTURE DE CGAS. 74
FIGURE 26 : REPRESENTATION CRISTALLOGRAPHIQUE DE CGAS 75
FIGURE 27 : LA LIAISON DE CGAS ET DE L'ADN PERMET L'OLIGOMERISATION DU COMPLEXE. 77
FIGURE 28 : LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES AFFECTANT L'ACTIVITE CATALYTIQUE DE CGAS. 78
FIGURE 29: : ACTIVATION DE LA VOIE CGAS-STING PAR DE L'ADN DE DIFFERENTES ORIGINES 81
FIGURE 30 : ACTIVATION DE STING 86
FIGURE 31 : CGAS-STING DANS LA SENESCENCE 88
FIGURE 32 : TRANSPORT DE CGAS ENTRE LE NOYAU ET LE CYTOPLASME 90
FIGURE 33 : INHIBITION DE CGAS PAR LE NUCLEOSOME 92
FIGURE 34 : : INHIBITION DE CGAS LORS DE LA MITOSE 93
FIGURE 35 : CGAS DANS LE NOYAU. 94
FIGURE 36 : DEGRADATION DE CGAS NUCLEAIRE LIE A LA CHROMATINE 101
FIGURE 37 : LA FORMATION DES FOYERS DE CGAS EST DEPENDANTE DE RNF111 153
FIGURE 38 : L'INHIBITION DE LA NEDDYLATION INDUIT LA FORMATION DE FOYERS DE CGAS 155
FIGURE 39 : LE ROLE DE P97 ET RNF111 EST ANTERIEUR A CELUI DE LA NEDDYLATION DANS LA FORMATION DES FOYERS DE CGAS 157

FIGURE 40 : L'INDUCTION DE LA SENESCENCE EST DEPENDANTE DE CGAS ET INDEPENDANTE DE LA VOIE CGAS-STING 159
FIGURE 41: LE LIEN ENTRE LA DYNAMIQUE NUCLEAIRE DE CGAS ET LA MISE EN PLACE DE LA SENESCENCE EST SIMILAIRE LORS D'UN STRESS ONCOGENIQUE. 161

Tableaux :

TABLEAU 1 : COMPOSANTS RECURRENTS DU SASP DANS LES DIFFERENTS MODES D'INDUCTION DE SENESCENCE.... **26**
TABLEAU 2 : PARTENAIRES DE CGAS DANS LE NOYAU..... **82**
TABLEAU 3 : MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES AFFECTANT LES DIFFERENTS ROLES DE CGAS CHEZ L'HOMME ET LA SOURIS.. ..... **98**
TABLEAU 4 : LISTE DES PLASMIDES UTILISES DANS LES RESULTATS SUPPLEMENTAIRES..... **149**
TABLEAU 5 : LISTE DES SIRNAS UTILISES DANS LES RESULTATS SUPPLEMENTAIRES **151**
TABLEAU 6 : LISTE DES ANTICORPS UTILISES DANS LES RESULTATS SUPPLEMENTAIRES **151**
TABLEAU 7 : LISTE DES DROGUES UTILISEES DANS LES RESULTATS SUPPLEMENTAIRES **152**
TABLEAU 8 : EFFET DES INHIBITEURS ET DEPLETIONS SUR LA FORMATION DES FOYERS DE CGAS NUCLEAIRES. **156**

Liste des abréviations

A

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNdb	ADN double brin
ADNh	ADN hétéroduplex
ADNsb	ADN simple brin
AKT	protein kinase B
ALT	Alternative lengthening telomeres
alt-EJ	alternative end-joining
ANP32E	acidic nuclear phosphoprotein 32 family member E
APB	ALT-associated PML NB
APL	Acute promyelocytic leukemia
ARN	Acide ribonucléique
ARNdb	ARN double brin
ARNsb	ARN simple brin
ARP	actin related protein
ASF1	Anti-silencing function protein 1
ATF7IP	activating transcription factor 7-interacting protein 1
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adénosine triphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related homolog
ATRIP	ATR-interacting protein
ATRX	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked

B

BAF	barrier to autointegration factor
BAK	Bcl2-antagonist killer 1
BAX	BCL2-associated X protein
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BER	Base excision repair
BLM	Bloom syndrome helicase
BRCA	Breast cancer susceptibility protein
BRD4	Bromodomain-containing protein 4

C

CABIN1	Calcineurin binding protein 1
CAF-1	Chromatin associated factor 1
CCF	Cytoplasmic chromatin fragments
Cdc	cell division cycle
CDK	Cyclin-dependent kinase
CENP	Centromer protein
cGAMP	Cyclic GMP-AMP
cGAS	Cyclic GMP-AMP synthase
cGMP	Cyclic GMP
CHD	Chromodomain helicase DNA-binding
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CHK	Checkpoint kinase
CRL5	cullin-RING E3 ubiquitin ligase 5
CTCF	CCCTC-binding factor
CTT	C-terminal tail
CUL5	cullin 5
CyPN	cytoplasmic assemblies of PML and nucleoporin
CYREN	cell cycle regulator of NHEJ

D

DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DAXX	Death domaine-associated protein 6
DDR	DNA damage response
DDX3X	DEAD-box helicase 3 X-linked
dHJ	Double Holliday junction
DNA2	DNA replication ATP-dependent helicase / nuclease 2
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase
DNA-SCARS	DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence
DNMT	DNA methyltransferase
DREAM complex	DP, RB-like, E2F, and MuvB complex
DSB	Double strand break

E

EBV	Epstein Barr virus
EGFR	Epidemic growth factor receptor
Elo	elongin
ER	endoplasmic reticulum
ES cell	Embryonic stem cell

ETAA1	Ewing's tumor-associated antigen 1
Eto	étoposide
ExoI	Exonuclease I

F

FACT	Facilitated chromatin transcription complex
FBF1	Fas-binding factor 1
FAS-L	Ligand de Fas
FISH	Fluorescent in situ hybridization

G

G3BP1	GTPase-activating protein-(SH3 domain)-binding protein 1
GADD45	Growth arrest and DNA damage-inducible protein
GGR	Global genome repair
gH2AX	Phosphorylation de la sérine 139 de H2AX
GTP	Guanosine triphosphate
GSK3b	glycogen synthase kinase b
GST	Gènes suppresseurs de tumeurs

H

H	Histone
H2A.BbD	Histone 2A Barr body deficient
H2AK119Ub1	Ubiquitinylation de la lysine 119 de l'histone H2A)
H3K27	Lysine 27 de l'histone H3
H3K27me3	triméthylation de H3K27
H3K36	Lysine 36 de l'histone H3
H3K36me3	triméthylation de H3K36
H3K9	Lysine 9 de l'histone H3
K3K9me3	triméthylation de H3K9
HAT	Histone acetyltransferase
HDAC	Histones deacetylase
HDM2	human double minute 2
HEK 293	Human embryonic kidney cells 293
HIRA	Histone regulator A
HIV	human immunodeficiency virus
HMGB	high mobility group box
HP1	heterochromatin protein 1
HR	Homologous recombination
HRD	Hpc2-related domain
HSV-1	Herpes simplex virus 1

I

ikB	inhibitor of kB
IDR	intrinsically disordered region
IFI16	interferon-g-inducible factor 16
IFN	Interferon
IKK	inhibitor of kB kinase
IL-(n)	Interleukin-(n)
IL-(n)R	Interleukin-(n) Receptor
IRF	Interferon regulatory factor
ISG	Interferon stimulated gene
ISRE	Type I IFN stimulated response element

J

JAK	Janus kinase

K

KAT	Lysine acetyltransferase
KPNB1	Karyopherin subunit Beta 1
KRAB	Kruppel-associated box
KSHV	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus

L

LAD	Lamina associated domain
LBD	ligand-binding domain
LC3	microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LINE-1	Long interspersed element 1
LLPS	Liquid-liquid phase separation
lncRNA	Long non-coding RNA
LTR	Long terminal repeat

M

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPP	mitotic accumulation of PML protein
MDC1	mediator of DNA damage checkpoint protein
MDM2	mouse double minute 2
MEF	Murine embryonic fibroblast
MG	MG132
MHC	Major histocompatibility complex
MMR	Mismatch repair
MPP8	M-phase phosphoprotein 8
MRE11	Meiotic recombination 11
MRN	Complexe MRE11, RAD50 et NSB1
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTTL3	methyltranferase like 3

N

NAP1	nucleosome assembly protein 1
NBS1	Nibrine
NE	Nuclear Envelope
NER	Nucleotide excision repair

NF-κB	Nuclear factor kappa B
NKG2D	NK group 2, member D
NHEJ	Non-homologous end-joining
NK	Natural killer
NLS	Nuclear localisation signal
NONO	non-POU domain-containing octamer binding protein
Ntase	nucleotidyltransferase

O

OIS	oncogene-induced senescence
ORF	open reading frame
OTUD3	OTU deubiquitinase 3

P

p14ARF	alternative reading frame
p62/SQSTM1	sequestosome 1
PAD	PML associated domain
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PARP	poly(ADP) ribose polymerase
PARG	poly-ADP ribose glycohydrolase'
PcG	Polycomb Group
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	pre-incision complex
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI(4,5)P2	phosphatidylinositol 4 ,5-biphosphate
PIAS	protein inhibitor of activated STAT
PICS	PTEN-loss induced cellular senescence
PIN1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1
PML	Promyelocytic leukemia
PML NB	PML nuclear body
POT1	protection of telomers protein 1
PP1	protein phosphatase 1
PRD II	positive regulatory domain II
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTM	post-translationnal modification
pRB	Retinoblastoma-associated protein
PRC	polycomb repressive complex
PRR	Pattern recognition receptor
PTM	Post-translational modification
PQBP1	polyglutamine-binding protein 1

R

RAG	recombination activating
RAP1	Ras-related protein 1
RARα	Retinoic acid receptor alpha
RBCC	Ring finger ; B-box ; coiled-coiled
RBX2	ring box protein 2
recA	recombinase A
RNF	RING finger protein
RNS	reactive nitrogen species'
ROS	Reactive oxygen species
RPA	Replication protein A

S

SA b-Gal	senescence associated b-galactosidase
SAE	SUMO-activating enzyme
SAHF	Senescence associated heterochromatin foci
SASP	Senescence associated secretory phenotype
SENP	sentrin-specific protease
SENP2	SUMO specific peptidase
SETDB1	SET domaine bifurcated histone lysine 1 methyltransferase 1
SIM	SUMO-interacting motif
SPSB3	SPRY domain-containing SOCS box protein 3
SSA	single strand annealing
STAT	Signal transducer and activator of transcription
STING	Stimulator of interferon genes
STUbL	SUMO-targeting ubiquitin ligase
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
SUV39H1	suppressor of variegation 3_9 homolog 1

T

TAD	Topologically associated domaine
TASOR	Transcription activation suupresor'
TBK1	TANK-binding kinase 1
TCR	transcription-coupled repair
TIS	treatment induced senescence'
TLR	told like receptor
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
TOP	DNA topoisomerase
TOPB1	DNA topoisomerase 2-binding protein 1
TP54BP1	tumor protein p53 binding protein 1
TRAF6	TNF receptor associated factor 6
TRIM	motif tripartite
TRIF	TIR domain-containing adaptor molecule1
TRF2	telomeric repeat binding factor 2
TSA	Trichostatine A

TTLL	Tubulin tyrosine ligase like
	U
UBC9	Ubiquitin carrier protein 9
UBE2	ubiquitin conjugating enzyme E2
UBN1	Ubinuclein 1
UHRF1	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domain 1
ULBP1	UL16 binding protein 1
UPS	Ubiquitin-proteasome system
USP8	universal stress protein
USP15	Ubiquitin specific peptidase 15
UV	Ultraviolet
	V
vDCP NB	Viral DNA-containing PML NB
VEGF-A	vascular endothelial growth factor A
	X
XLF	XRCC4-like factor
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4
	Z
ZCCHC3	zinc finger CCHC-type containing 3
ZNF	Zinc-finger protein

Introduction

Préambule

Les progrès de la médecine et de la recherche ont permis d'allonger l'espérance de vie des êtres humains, notamment dans les pays développés comme la France. Cependant, l'allongement de l'espérance de vie ne s'accompagne pas forcément de l'augmentation de la durée de vie en bonne santé. Le cancer figure parmi les principaux problèmes de santé en France. En 2023, d'après Santé Publique France, 433 000 nouveaux cancers ont été diagnostiqués en France, un nombre qui a doublé depuis 1990. Cette valeur témoigne des progrès accomplis dans le domaine du dépistage mais également que notre mode de vie est propice au développement de cette pathologie. Il est d'ailleurs plus juste de parler de « ces pathologies » car les progrès scientifiques ont permis de démontrer que chaque cancer est unique en fonction du patient, de son environnement et du type cellulaire concerné. Cela permet le développement de thérapies personnalisées, plus efficaces et entrainant moins d'effets secondaires sur les organismes. Notre mode de vie (alimentation, sédentarité, pollution, …) influence grandement le développement de cette pathologie.

En plus des cancers, le vieillissement s'accompagne de pathologies bien connues comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, ou l'arthrose, invalidantes pour les patients et leur entourage. Le point commun entre ces pathologies et les cancers est le phénomène de sénescence qui fait partie des pistes de traitements contre ces maladies. Ainsi, l'étude des mécanismes qui favorisent, ou au contraire inhibent la sénescence, pourrait permettre d'améliorer la qualité de vie des personnes touchées par ces maladies. Cette étude s'inscrit donc avec de nombreuses autres dans la recherche de la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la mise en place de la sénescence afin d'identifier des voies de signalisation qui pourront je l'espère, participer à l'amélioration des traitements dans un futur plus ou moins proche.

Chapitre 1 : La Sénescence, un processus antitumoral

La sénescence est un état cellulaire physiologique caractérisé par un arrêt du cycle cellulaire qui se met en place après un nombre important de divisions cellulaires ou en réponse à différents types de stress. Ce processus est associé à des changements morphologiques, métaboliques et sécrétoires qui peuvent varier en fonction du type cellulaire concerné et du mode d'induction de sénescence. Ce mécanisme est très étudié car il offre des perspectives très intéressantes dans la lutte contre les cancers et contre les maladies liées au vieillissement. Dans ce premier chapitre, après avoir introduit les caractéristiques des cellules sénescentes, je décrirai les différents modes d'inductions menant à cet état et les voies de signalisations impliquées dans sa mise en place. Je ferai ensuite une description détaillée du rôle des PML NBs (PML nuclear bodies) dans la sénescence car ces structures sont au cœur de mon projet de thèse. Pour finir, je parlerai de l'importance de la sénescence dans les pathologies et notamment ses implications dans le vieillissement et le traitement des cancers.

1. Définition de la sénescence

L'état de sénescence a été décrit pour la première fois dans les années 1960 par Leonard Hayflick. A l'époque, il a observé que des cellules somatiques humaines *in vitro* arrêtaient de proliférer après un certain nombre de divisions (Hayflick et Moorhead 1961). Cette observation a été faite sur des fibroblastes non cancéreux qui n'entraient plus en mitose malgré la présence de facteurs de croissance dans le milieu et l'absence d'inhibition de contact. Ce mécanisme « d'horloge biologique » est en fait causé par le raccourcissement progressif de l'extrémité des chromosomes, les télomères, à chaque division cellulaire. Au-delà d'un certain nombre de divisions, la taille des télomères atteint la limite de Hayflick, ce qui provoque l'entrée en sénescence de la cellule, afin d'éviter l'instabilité génomique et l'accumulation de dommages à l'ADN (Calcinotto et al. 2019). Cet état ne correspond pas à une mort cellulaire mais plutôt à une transition car l'activité métabolique des cellules continue (Hernandez-Segura, Nehme, et Demaria 2018). La sénescence est généralement caractérisée par un arrêt irréversible du cycle cellulaire, même si la prolifération peut reprendre dans des conditions particulières, notamment dans les cellules cancéreuses (Galanos et al. 2016; Milanovic et al. 2018; Patel et al. 2016; Saleh et al. 2019). Depuis la découverte de la limite de Hayflick, la recherche a permis de montrer que ce processus de sénescence peut également être déclenché prématurément en réponse à différents types de stress afin d'éviter que la cellule ne devienne cancéreuse (Gorgoulis et al. 2019).

Ce mécanisme a plus récemment été observé lors des étapes les plus précoces de la vie lors de l'embryogenèse. Des cellules avec des marqueurs de sénescence sont présentes dans différentes régions de l'embryon comme les crêtes ectodermiques apicales (futurs membres), le mésonéphros (futur appareil rénal), la crête neurale et le sac endolymphatique dans les oreilles. Ces cellules

participent à l'activation de la voie Wnt et Hedgehog et permettent le remodelage des membres en développement (Storer et al. 2013; Muñoz-Espín et al. 2013).

Les cellules sénescentes sont également retrouvées dans le processus de cicatrisation, ce qui a été observé pour la première fois chez des souris. L'étude de Demaria et al montre que suite à une blessure cutanée, des fibroblastes sénescents s'accumulent transitoirement au niveau de la plaie et que la suppression de ces cellules retarde la cicatrisation et augmente le risque de fibrose (Demaria et al. 2014). Les multiples rôles de la sénescence sont illustrés dans la Figure 1.

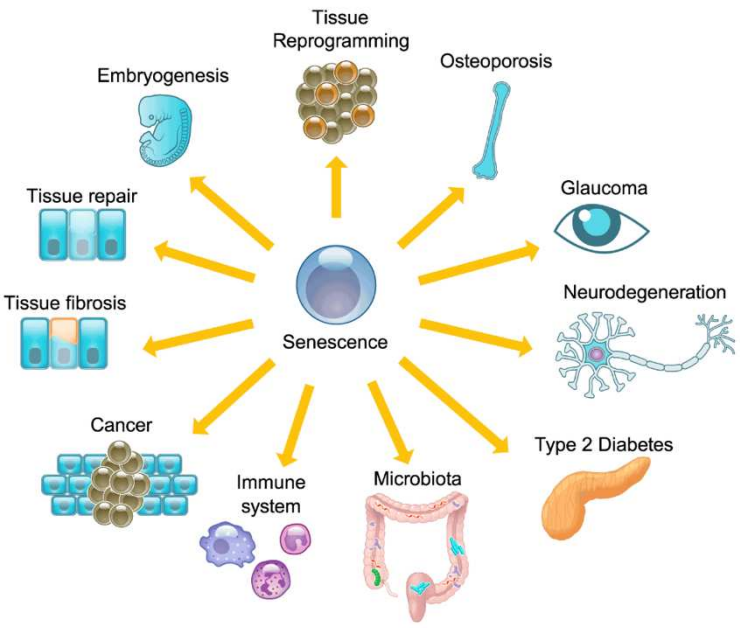


Figure 1 : Les différents rôles de la sénescence. *(Calcinotto 2019)* La sénescence est bien connue comme mécanisme anti-tumoral. Elle est également impliquée dans de nombreux processus comme le développement embryonnaire, la cicatrisation des tissus et des maladies liées au vieillissement.

La sénescence est donc un mécanisme qui joue des rôles variés à différentes étapes de la vie. Son implication dans le vieillissement et dans les cancers sera détaillée en partie 6. Dans la prochaine partie je détaillerai les différents marqueurs qui permettent d'identifier une cellule en sénescence. Bien qu'il en existe un certain nombre, leur présence peut varier en fonction du type cellulaire et du mode d'induction de sénescence.

2. Les différents marqueurs cellulaires de la sénescence

Comme mentionné précédemment, la sénescence entraine un arrêt du cycle cellulaire mais cette seule caractéristique ne permet pas d'identifier les cellules en sénescence. Cet arrêt diffère de celui observable en quiescence, un arrêt réversible du cycle, car la présence de facteurs mitogènes ne permet pas à une cellule sénescente de reprendre sa prolifération alors que cela le permet chez une cellule quiescente (Dimri et Campisi 1994; Dimri et al. 1996). Cet arrêt du cycle corrèle avec une augmentation de facteurs inhibiteurs du cycle cellulaire tels que p16 et p21 dont je parlerai en partie 4.4, ainsi que p53 en partie 4.3. Une caractéristique de beaucoup de types cellulaires est un changement de la morphologie des cellules avec une augmentation du volume cytoplasmique et

nucléaire en sénescence (González-Gualda et al. 2021). Dans les sous-parties suivantes je décrirai les marqueurs majoritairement détectés chez les cellules en sénescence, qui sont également illustrés en Figure 2.

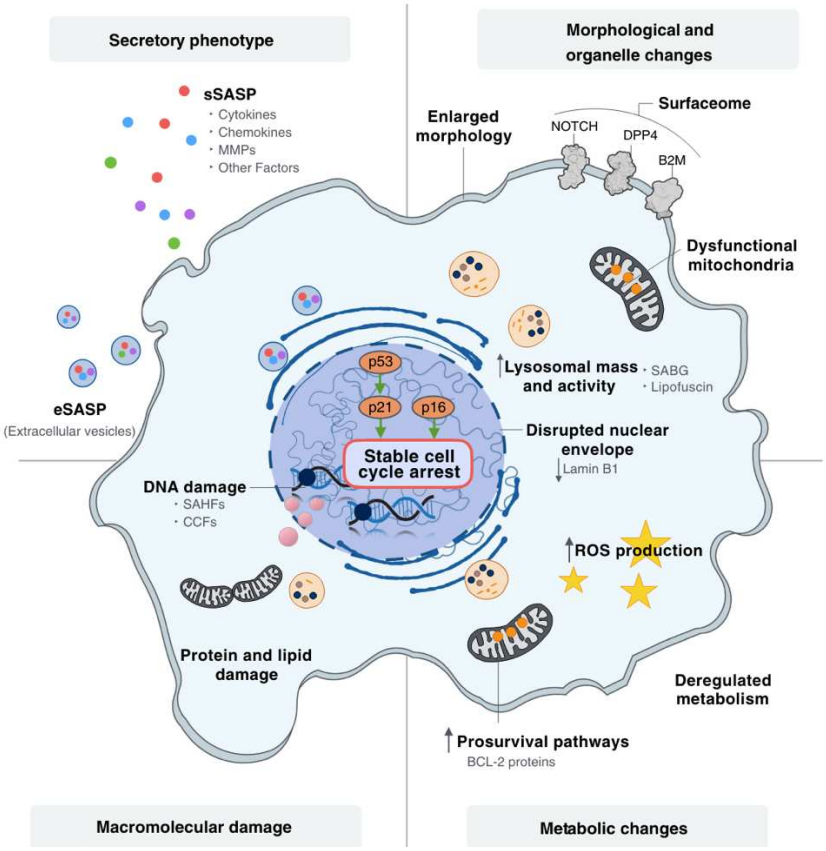


Figure 2 : Marqueurs cellulaires de la sénescence. *(Ou 2020) La sénescence peut être causée par une grande variété de stimuli. Elle s'accompagne d'un phénotype particulier avec des changements morphologiques importants dans le cytoplasme et le noyau. B2M, β2 microglobulin; BCL-2, B-cell lymphoma 2; CCF, cytoplasmic chromatin fragment; DPP4, dipeptidyl-peptidase 4; MMPs, matrix metalloproteinases; ROS, reactive oxygen species; SAβG, senescence-associated β-galactosidase; SAHF, senescence-associated heterochromatin foci; SASP, senescence-associated secretory phenotype.*

2.1. La détection de l'activité Bêta-Galactosidase associée à la sénescence

Le premier marqueur de la sénescence fût proposé par les travaux de Dimri et al en 1995 ; ils ont démontré l'existence d'une enzyme qui permet l'hydrolyse de β-galactosides en monosaccharides dans les cellules en sénescence à un pH de 6. Cette enzyme a été nommée β-galactosidase associée à la sénescence ou plus couramment SA β-Gal (pour senescence associated β-galactosidase). Dans leurs travaux ils ont observé que cette enzyme est active dans des fibroblastes et kératinocytes en sénescence, et indétectable chez ces mêmes lignées en quiescence ou prolifération (Dimri et al. 1995). La détection de ce marqueur est possible avec l'ajout d'un substrat X-Gal sur les cellules, qui est clivé si l'enzyme est active et ce clivage entraine l'apparition d'un précipité bleu dans les cellules facilement observable en microscopie. Cette activité enzymatique correspond à la surexpression de la galactosidase chez les cellules en sénescence et son accumulation dans les lysosomes, bien que

cette enzyme ne soit pas indispensable pour la mise en place de la sénescence (B. Y. Lee et al. 2006). Ce marqueur reste depuis sa découverte le plus utilisé car il est fiable et facile à détecter.

2.2. L'augmentation de la perméabilité de l'enveloppe nucléaire

A l'interface de la membrane interne de l'enveloppe nucléaire, notée NE (pour 'nuclear envelope'), se trouve un réseau nommé lamina nucléaire composé de filaments intermédiaires permettant de maintenir la structure du noyau et des pores nucléaires ainsi que l'intégrité du noyau (Wong, Melendez-Perez, et Reddy 2022). Ce réseau forme une couche de 10 à 20nm d'épaisseur et est composé de polypeptides de 3 types différents : lamine A, lamine B, lamine C. Cette structure joue également un rôle important dans l'organisation de la chromatine, la réplication et la transcription que je n'aborderai pas (pour revue voir Dechat et al. 2008). La mise en place de la sénescence s'accompagne d'une diminution d'expression de la lamine B1, ce qui provoque une instabilité et la rupture de l'enveloppe nucléaire. Ce phénomène s'accompagne de la fuite de portions de chromatines dans le cytoplasme nommés CCF (pour 'Cytoplasmic Chromatin Fragments') (Ivanov et al. 2013). Ces portions de chromatine portent une marque spécifique de dommages à l'ADN nommé γH2A.X et qui correspond à la phosphorylation de la sérine 139 de l'histone H2A.X (Rogakou et al. 1998). La présence de ces fragments d'ADN dans le cytoplasme entraine leur détection par des senseurs d'ADN cytoplasmiques tel que cGAS (pour cGAMP synthase), ce qui permet l'induction d'une réponse interféron et dans un contexte de sénescence l'expression d'un cocktail de cytokines pro-inflammatoires nommé SASP via l'axe cGAS-STING (pour senescence-associated secretory phenotype) (X.-D. Li et al. 2013; L. Sun et al. 2013; J. Wu et al. 2013; Glück et al. 2017; H. Yang et al. 2017; Ishikawa, Ma, et Barber 2009). L'instabilité nucléaire entraine également la formation de micronoyaux, des structures formées d'un bourgeonnement de l'enveloppe nucléaire et contenant une portion de chromosome (Hatch et al. 2013). Dans le cytoplasme, l'intégrité des micronoyaux est rapidement compromise et la libération de la chromatine entraine également l'activation de la voie cGAS-STING (Mackenzie et al. 2017). Je détaillerai le fonctionnement de l'axe cGAS-STING dans le chapitre 3 et la composition du SASP dans la partie 2.5.

2.3. La présence de dommages à l'ADN

Les dommages à l'ADN sont également un des stress pouvant mener à l'induction de sénescence. Si des dommages trop importants ou irréparables se forment, cela engendre des dommages persistants et une réponse aux dommage nommée DDR (pour 'DNA-damaged response') constitutive avec une activation chronique de p53, un acteur majeur de l'entrée en sénescence dont je discuterai dans la partie 4.3. La réponse aux dommages à l'ADN est un mécanisme essentiel dans l'établissement et le maintien de l'induction de sénescence, qu'il s'agisse d'un stress oncogénique, d'un raccourcissement des télomères ou de dégâts trop importants de la chromatine (Bartkova et al. 2006; Beauséjour et al. 2003; Di Micco et al. 2006; Gire et al. 2004; Herbig et al. 2004). Ces cassures persistantes impliquent une majorité de protéines en commun avec les cassures transitoires mais quelques différences

importantes sont à noter. Premièrement, ces cassures sont positives pour le marqueur γH2AX mais sont dépourvues de RPA (pour 'Replication protein A') et Rad51 et n'ont donc pas les éléments nécessaires pour induire leur réparation. Les cassures persistantes permettent l'activation constitutive de p53 et de CHK2 (serine/threonine checkpoint kinase 2), 2 acteurs majeurs de l'arrêt du cycle cellulaire et de la mise en place de la sénescence (Rodier et al. 2011). Ces dommages persistants sont nommés DNA-SCARS pour 'DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence'. Leur but n'est donc pas de signaler les dommages afin d'engendrer une réparation mais bien de maintenir l'activation des acteurs majeurs de l'induction de sénescence pour un arrêt définitif du cycle cellulaire (Rodier et al. 2011).

2.4. Le réarrangement de la chromatine avec la formation de foyers denses en hétérochromatine

Les changements dans l'architecture du noyau et l'apparition des dommages persistants s'accompagnent d'un important réarrangement de la chromatine. Si le niveau global d'hétérochromatine dans les cellules diminue (Villeponteau 1997), des structures particulières de chromatine condensée apparaissent et sont nommées SAHF pour 'Senescence-associated heterochromatin foci'. Ces structures sont observées majoritairement dans un contexte de stress oncogénique (OIS pour 'oncogene-induced senescence') et ne sont pas indispensables pour la mise en place de la sénescence (Kosar et al. 2011). Les SAHFs sont organisés en plusieurs couches, avec en leur centre un enrichissement de la marque H3K9me3 (triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3) et de sa protéine associée HP1 (heterochromatin protein 1) (Narita et al. 2003; R. Zhang et al. 2005), des marqueurs spécifiques de l'hétérochromatine constitutive. Les couches périphériques sont constituées d'hétérochromatine facultative enrichie en marque H3K27me3 (Chandra et al. 2012; Rai et Adams 2012). Les notions d'hétérochromatine facultative et constitutive seront détaillées dans le chapitre 2. Les travaux de Nielsen et al ont montré que lors d'un stress OIS, la protéine du rétinoblastome pRB permet d'induire la déposition de méthylation sur l'histone H3 via SUV39H1 (Histone-lysine N-methyltransferase) et le recrutement de HP1 sur les promoteurs de gènes impliqués dans la prolifération comme la cycline E (Nielsen et al. 2001). Les travaux de Di Micco et al ont montré que ce remodelage de la chromatine est plus efficace lorsque la DDR est active (Di Micco et al. 2011). En plus de l'hétérochromatinisation de gènes de la prolifération, la nouvelle architecture de la chromatine permet de nouvelles interactions entre des régions du génome, ce qui participe également à sa régulation (Sati et al. 2020). Ces structures sont observables en microscopie notamment avec un marquage au DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) où la chromatine forme une structure cotonneuse avec des foyers denses en hétérochromatine. Cependant, au niveau nucléaire, il y a une perte globale du niveau d'hétérochromatine, ce qui permet l'expression de gènes associés à la sénescence, dont des facteurs de l'inflammation (Olan, Handa, et Narita 2023).

2.5. La sécrétion d'un cocktail de cytokines pro-inflammatoires

Les cellules sénescentes expriment et sécrètent des cytokines inflammatoires, des chimiokines, des facteurs de croissance et des remodeleurs de la matrice extra-cellulaire. L'ensemble de ces facteurs est appelé SASP. Le SASP contribue à la modification de l'environnement et peut être responsable d'inflammation chronique dans des pathologies liées au vieillissement et dans les cancers (Naoko Ohtani 2022). Les différents effets du SASP sont illustrés dans la Figure 3 et ses effets néfastes seront détaillés dans la partie 6.2.

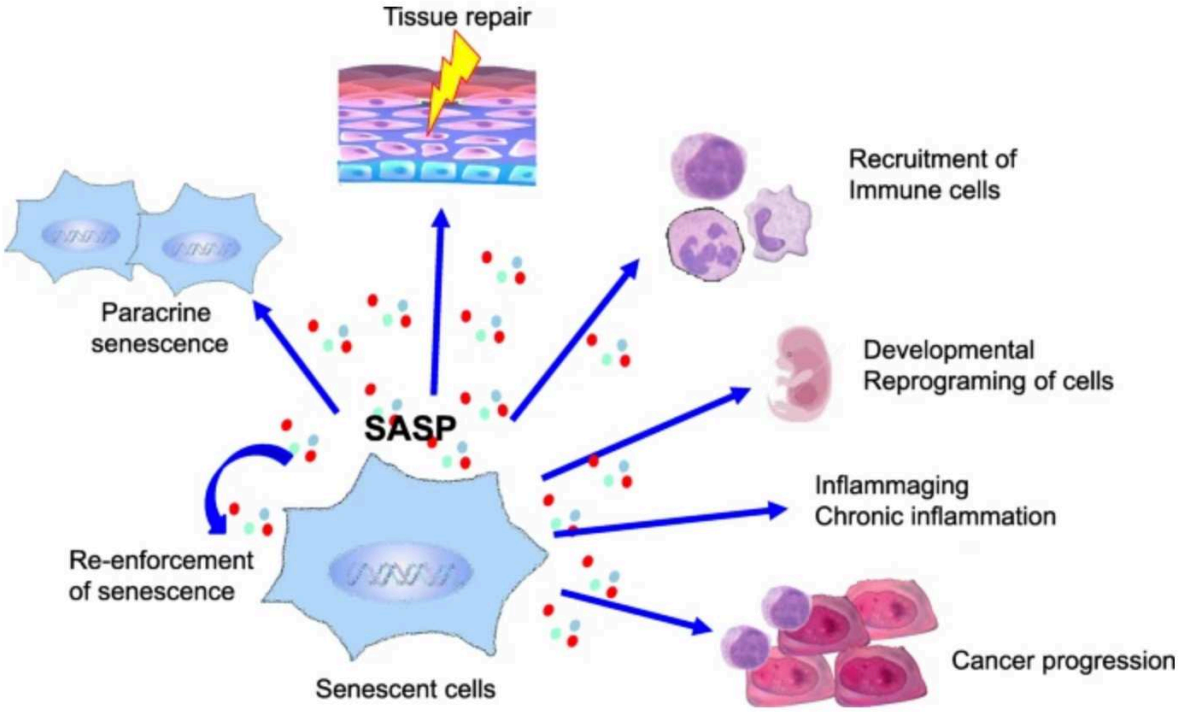


***Figure 3 : Les différents rôles du SASP**. (Ohtani 2022) Le SASP permet de renforcer la sénescence de façon autocrine et de l'induire de manière paracrine sur les cellules voisines. Sa capacité à recruter des cellules immunitaires permet l'élimination de la cellule et le remodelage des tissus. Dans le contexte du développement embryonnaire, cela permet également la différenciation des tissus. Le SASP est également impliqué dans les inflammations chroniques et dans certains cas peut même avoir un effet pro-tumoral.*

L'expression des gènes du SASP serait la conséquence des dégâts de la chromatine et de la perméabilisation du noyau. En effet, ces évènements menant à la présence de CCFs entrainent la détection de l'ADN cytoplasmique par des senseurs tels que cGAS, activant la voie cGAS-STING, provoquant l'expression de ces composants pro-inflammatoires (Takahashi et al. 2018; Harding et al. 2017; Mackenzie et al. 2017; Dou et al. 2017; Glück et al. 2017). Le rôle de cGAS et de l'axe cGAS-STING dans la détection d'ADN cytoplasmique sera détaillé dans le chapitre 3 partie 4. La voie cGAS-STING est également activée par des séquences répétées appelées LINE-1 pour 'Long interspersed element 1'. Ces séquences capables de rétrotransposer sont normalement inhibées, mais cette inhibition est levée dans les cellules en sénescence. Leur activation engendre leur transcription et leur rétrotransposition menant à une accumulation d'ADN complémentaires (noté ADNc) des LINE-1

qui se retrouvent également dans le cytoplasme et sont détectés par cGAS (De Cecco et al. 2019). La composition du SASP varie selon le type cellulaire et peut contenir des centaines d'éléments protéiques, non protéiques et même des microvésicules contenant des éléments cytoplasmiques (Basisty et al. 2020; Takasugi 2018). Les éléments les plus souvent retrouvés dans sa composition sont listés dans le tableau 1 ci-dessous. Avant d'être amplifiés par la voie cGAS-STING, les éléments du SASP sont exprimés grâce aux cassures persistantes de l'ADN et la DDR via l'accumulation de ATM (pour 'Ataxia-telangiectasia mutated'), MRE11 (pour 'Meiotic recombination 11') au site de cassure et l'activation du facteur de transcription NF-κB (pour 'Nuclear factor kappa B') (Rodier et al. 2009).

***Tableau 1** : composants récurrents du SASP dans les différents modes d'induction de sénescence (inspiré de Giroud 2023)*

Elément du SASP	Inducteur	Effet	Référence
Interleukine-6	Sénescence par irradiation ou UV Sénescence réplicative OIS	Recrutement et différenciation des cellules immunitaires Adhésion des lymphocytes via le récepteur de l'IL-6 Induit la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires par les cellules voisines	(Coppé et al. 2008; Rodier et al. 2009; Bauwens et al. 2023)
Interleukine-1	Sénescence par irradiation OIS Sénescence réplicative	Induction d'un état pro-sénescent sur les cellules voisines Angiogenèse Recrutement des cellules immunitaires	(Coppé et al. 2008; Rodier et al. 2009)
CXCL1-2-3	Sénescence par irradiation Sénescence réplicative	Recrutement des cellules immunitaires	(Rodier et al. 2009; Coppé et al. 2008)
Interleukine-8	Sénescence par irradiation ou UV Sénescence réplicative Stress oxydant	Recrutement et différenciation des cellules immunitaires Adhésion des lymphocytes via le récepteur de l'IL-6 Induit la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires par les cellules voisines	(Coppé et al. 2008; Rodier et al. 2009; Halkoum et al. 2022; Basisty et al. 2020; Bauwens et al. 2023)
IGFBP-2 (insulin-like growth factor-binding protein 2)	Sénescence par irradiation	Altère la liaison de facteurs de croissance à leur récepteurs	(Rodier et al. 2009; Basisty et al. 2020)
Interleukine-7	Sénescence par irradiation	Recrutement des cellules immunitaires Renforce la survie les lymphocytes T et B	(Coppé et al. 2008)
GDF15 (growth differenciation factor 15)	Sénescence par irradiation Sénescence réplicative	Hormone communiquant le stress au système nerveux Variation du métabolisme cellulaire	(Basisty et al. 2020)

MIF (Macrophage migration inhibitory factor)	Sénescence par irradiation ou UV OIS Stress oxydant	Activation des lymphocytes T Bloque la migration des macrophages	(Coppé et al. 2008; Basisty et al. 2020; Özcan et al. 2016; Valerio et al. 2021)
Filamine B	Sénescence par irradiation ou UV OIS Stress oxydant	Induction de changements morphologiques du cytosquelette	2008; Basisty et al. 2020; Özcan et al. 2016; Valerio et al. 2021)
Cathepsine D	Sénescence par irradiation Sénescence réplicative Stress oxydant	Protéase intracellulaire nécessaire pour l'augmentation de l'activité lysosomale Joue souvent un rôle pro-tumoral dans les cancers	(Özcan et al. 2016)

Les rôles du SASP varient en fonction de sa composition. Son rôle principal est de maintenir et de renforcer l'état sénescent de la cellule (Acosta et al. 2008). Parmi les autres rôles, on retrouve le remodelage de la matrice extra-cellulaire avec une forte dégradation du collagène et de l'élastine, permettant notamment de faciliter la cicatrisation suite à une blessure (Giroud et al. 2023). Le remodelage de l'environnement par le SASP permet également de ralentir la prolifération des cellules voisines dans le tissu de manière paracrine (Ruscetti et al. 2020; Faget, Ren, et Stewart 2019; Gorgoulis et al. 2019). Le SASP permet surtout de recruter des cellules immunitaires afin d'éliminer les cellules sénescentes et d'empêcher leur accumulation. Parmi ces cellules immunitaires impliquées on retrouve les macrophages, des cellules NK (natural killer) et des lymphocytes T (Burton et Krizhanovsky 2014; Kang et al. 2011).

Le SASP a donc un rôle anti-tumoral important mais peut également jouer un rôle pro-tumoral, que je détaillerai dans la partie 6.3.A.

2.6. La résistance à l'apoptose

L'arrêt de la prolifération des cellules en sénescence diffère de l'apoptose car la cellule ne meurt pas, et maintient une activité métabolique. Lorsque les cellules subissent un stress, l'une de ces voies est mis en place. Le phénomène d'apoptose est même inhibé chez les cellules en sénescence, ce qui participe au phénomène d'accumulation dans les pathologies liées au vieillissement et à la suite de chimiothérapies car si le système immunitaire ne les détruit pas, elles persistent dans les tissus (Calcinotto et al. 2019). Parmi les gènes surexprimés lors de la sénescence on retrouve les gènes de la famille de *Bcl-2* (pour 'B-cell lymphoma 2'), des régulateurs de l'apoptose. La perméabilisation de la membrane mitochondriale et le relargage du cytochrome c permettent l'induction de l'apoptose. Les protéines de la famille BCL-2 permettent de maintenir l'intégrité de la membrane mitochondriale, ce qui empêche l'activation de l'apoptose par le relargage du cytochrome c (Mas-Bargues, Borrás, et Viña 2021). Les protéines transmembranaires FasL (ligand de Fas) et FasR sont responsables de l'induction d'apoptose via l'interaction avec des cellules voisines. Ces protéines sont sous-exprimées dans les cellules en sénescence alors qu'on les retrouve en abondance chez les cellules déclenchant

l'apoptose (Rochette et Brash 2008). De même, si l'apoptose est déclenchée, des mécanismes d'inhibition de l'entrée en sénescence se mettent en place avec par exemple l'expression de DNMT3A (DNA methyltransferase 3a) qui bloque l'activité de p21 (Y. Zhang et al. 2011). Le choix de l'induction de la sénescence ou de l'apoptose reste encore flou, mais il semblerait que le seuil de stress pour déclencher l'apoptose, un mécanisme entrainant une inflammation importante, soit supérieur à celui déclenchant la sénescence, un mécanisme plus progressif et moins éprouvant pour l'organisme (Childs et al. 2014). Cette notion de seuil et d'exclusivité entre apoptose et sénescence sont illustrés en Figure 4.

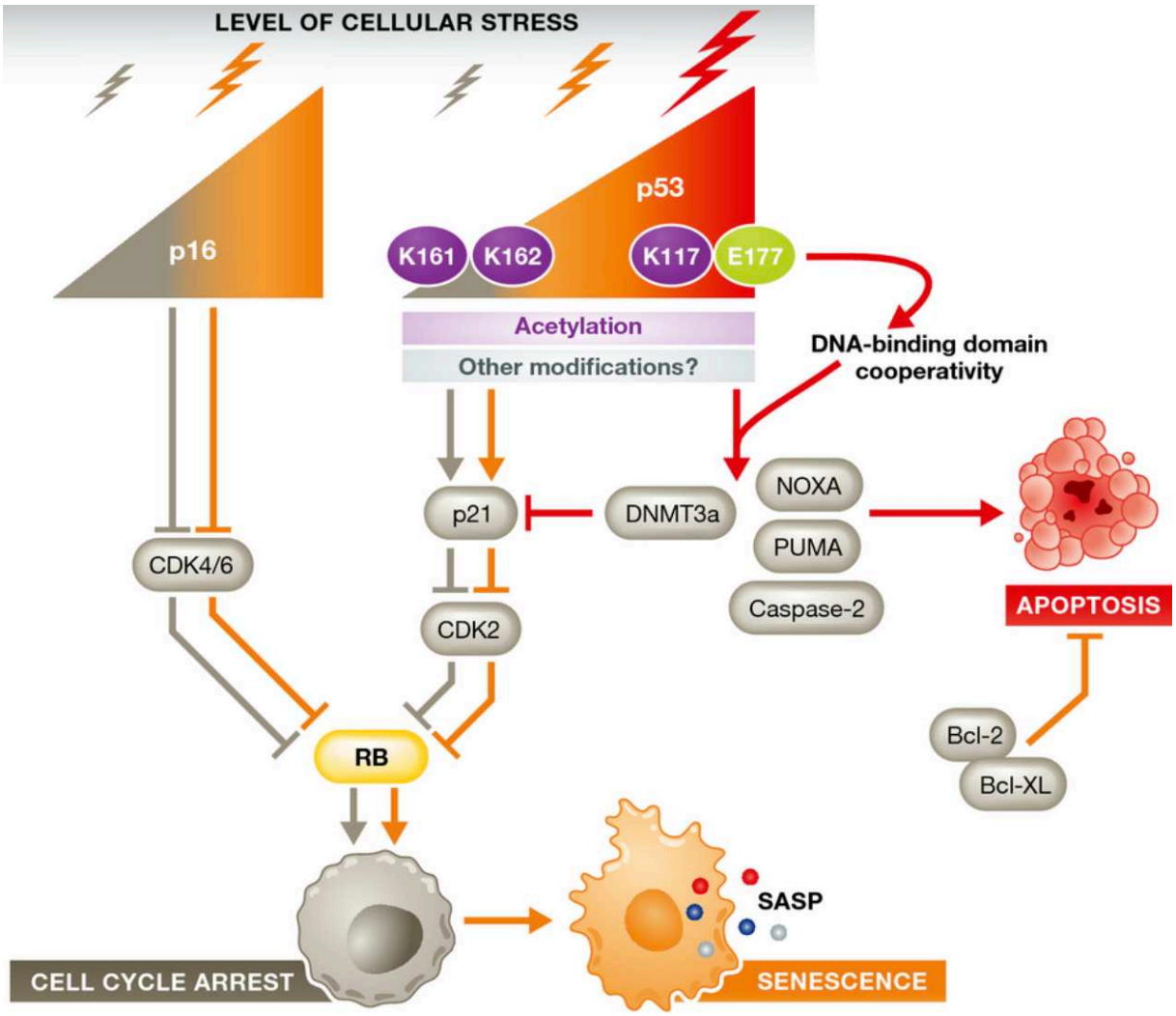


Figure 4 : L'induction de la sénescence ou de l'apoptose en fonction de l'intensité du stress*. (Childs 2014) Les signaux menant à l'arrêt du cycle cellulaire sont représentés en gris, ceux menant à la sénescence en orange et ceux menant à l'apoptose en rouge. Un stress activant légèrement p16 mène à un arrêt du cycle alors qu'une activation plus forte mène à la sénescence. L'intensité d'un stress activant p53 entraine son acétylation sur de résidus différents, ce qui a pour effet de déclencher la sénescence ou l'apoptose. Ces 2 mécanismes sont exclusifs et la mise en place de l'un inhibe celle de l'autre.*

2.7. Un marqueur précoce : la relocalisation du complexe HIRA dans les PML NBs

La sénescence est un processus long à se mettre en place et les marqueurs décrits jusqu'à maintenant ne sont détectables que plusieurs jours après l'induction de sénescence. La dynamique du complexe HIRA, chaperon du variant d'histone H3.3 composé des sous-unités HIRA (Histone regulator A), CABIN1 (Calcineurin binding protein 1) et UBN1 (Ubinuclein 1), par rapport aux corps nucléaires PML (ou PML NBs pour PML nuclear bodies) est un marqueur précoce de l'induction de sénescence dans le noyau des cellules (Corpet et al. 2020). Je détaillerai le rôle et la structure des PML NBs dans la partie 5, et le rôle de HIRA dans le chapitre 2, partie 2.3. En effet, le complexe HIRA, soluble dans le nucléoplasme des cellules en prolifération se retrouve accumulé dans les PML NBs dès les premières étapes de la sénescence. Ce phénomène est important pour la formation des SAHFs (Banumathy et al. 2009; R. Zhang et al. 2005; Ye, Zerlanko, Zhang, et al. 2007) et pour la sécrétion du SASP (Dasgupta et al. 2024) et sera détaillé dans la partie 5.2.A.

3. Les différents modes d'induction de la sénescence cellulaire

La sénescence est un mécanisme physiologique qui permet d'arrêter la prolifération cellulaire lorsque la cellule a atteint un nombre important de divisions ou lorsqu'elle subit des dommages trop importants pour maintenir son intégrité. Dans cette partie je décrirai les mécanismes qui permettent de déclencher le processus de sénescence, dans un premier temps chez les cellules ayant atteint leur seuil maximal de division et dans un deuxième temps chez les cellules subissant un stress, ce qui entraine une sénescence dite « prématurée ».

3.1. La sénescence réplicative

Pour bien comprendre le phénomène de la sénescence réplicative, il est important de bien introduire les télomères. Ces derniers sont des séquences répétées non codantes TTAGGG (Rk et al. 1988; J, Rl, et Rk 1989) que l'on retrouve à l'extrémité des chromosomes, associées à un complexe protéique nommé Shelterin et représenté sur la Figure 5 (Palm et de Lange 2008). Ces séquences sont répétées sur plusieurs kilobases sur chaque extrémité et leur association avec le complexe protéique permet de protéger les chromosomes afin qu'ils ne s'effilochent pas et que les extrémités ne soient pas reconnues comme des dommages à l'ADN, ce qui engendrerait une DDR et la fusion des chromosomes par leurs extrémités (pour revue sur le complexe Shelterin et les télomères : Lin et Epel 2022). Cela est possible notamment grâce à TRF2 (telomeric repeat binding factor 2) et RAP1 qui inhibent la réponse aux cassures NHEJ (Non-homologous end joining) (Bombarde et al. 2010; Palm et de Lange 2008; Sarthy et al. 2009). Une autre particularité de cette séquence télomérique est la présence d'une extrémité simple brin pouvant faire jusqu'à 200 nucléotides et qui s'invagine après repliement dans la structure double brin pour former une D-loop. Ce repliement de l'extrémité et la fixation du complexe Shelterin forment une structure en T-loop, illustrée en Figure 5 (Hockemeyer et Collins 2015). La T-loop permet d'éviter la fixation des complexes MRN ou Ku dont je parlerai dans le chapitre 2, et empêcher respectivement l'activation de ATM et DNA-PK (protéine kinase dépendante de l'ADN). De plus, la partie simple brin de l'extrémité télomérique est recouverte de POT1 (protection of

telomers protein 1), ce qui empêche la fixation de RPA, une protéine de liaison à l'ADN simple brin, et l'activation de ATR (Ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related homolog) (Blackford et Jackson 2017). Lors de chaque division cellulaire, ce complexe se décompose et les télomères perdent entre 50 et 200 paires de bases, une perte compensée par une enzyme nommée télomérase qui permet de synthétiser à nouveau ces séquences (Levy et al. 1992). Cependant, l'activité de la télomérase est presque absente dans les cellules somatiques, ce qui n'est pas suffisant pour maintenir la longueur des télomères au fur et à mesure des divisions (Shawi et Autexier 2008).

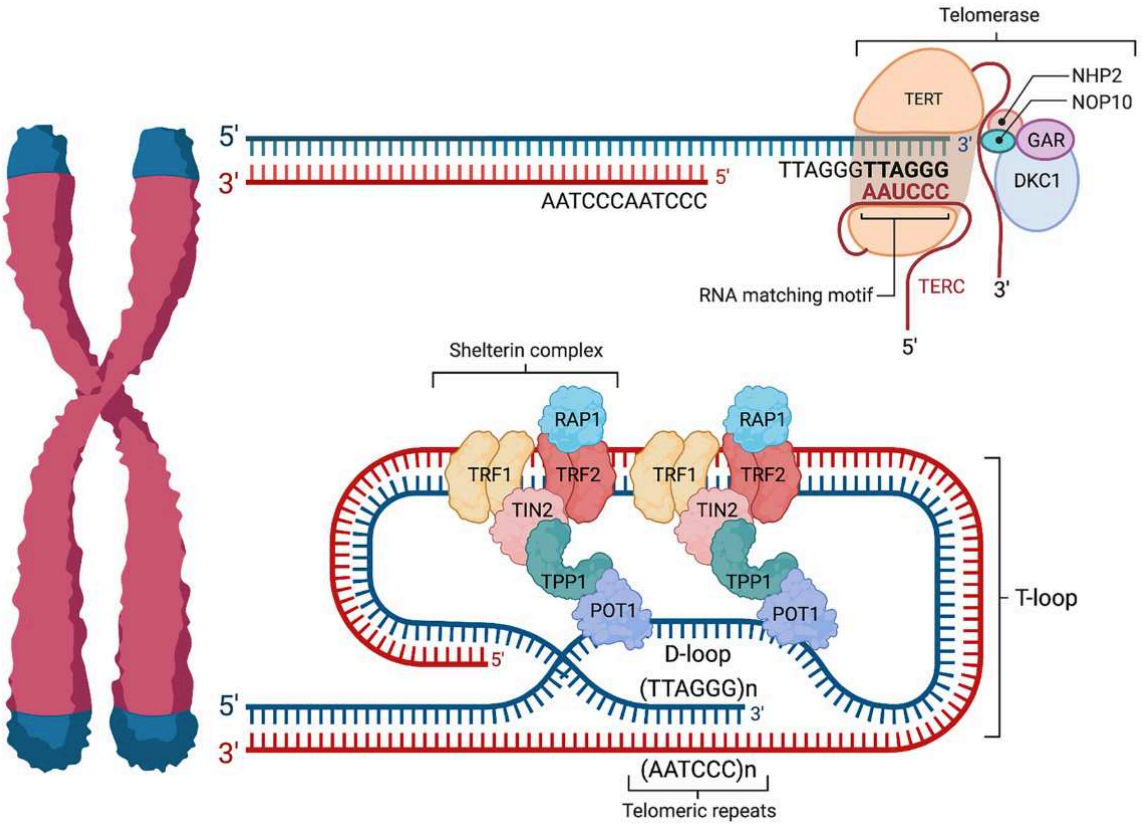


Figure 5 : Structure des télomères, de la télomérase et association avec le complexe Shelterin. *(Muoio 2022) La répétition de la séquence télomérique peut aller jusqu'à 15kb, avec une extrémité 3' plus longue de 50 à 200 bases qui forme une t-loop afin de protéger l'extrémité. La télomérase est composée d'une transcriptase inverse de télomères (hTERT) et d'un ARN (TERC) qui sert de matrice pour l'élongation des télomères. Les protéines TRF1 (telomeric repeat-binding factor 1) et TRF2 lient spécifiquement les séquences télomériques ((TTAGGG/CCCTAA) et sont liées entre elles par TIN2 (TRF1 interacting nuclear factor 2). La sous-unité TPP1 permet de faire la liaison avec POT1 (protection of telomere 1) qui se lie au brin 3' pour maintenir la structure de la T-loop.*

Comme évoqué précédemment, le raccourcissement des télomères abouti à une taille seuil nommée « limite de Hayflick » (Hayflick et Moorhead 1961; Hayflick 1965). Lorsque cette limite est atteinte, le complexe Shelterin ne peut plus se mettre en place et le repliement de l'extrémité télomérique n'est plus possible. A ce stade les télomères sont perçus comme des dommages à l'ADN double brin par les senseurs des cassures dont je parlerai dans le chapitre 2 en partie 3.1. L'activation de la DDR au niveau des télomères et la présence de ces cassures persistantes entrainent alors l'induction de la sénescence (Zglinicki, Petrie, et Kirkwood 2003). Malheureusement, certaines cellules arrivent à

contourner l'entrée en sénescence à cause d'une réactivation de la télomérase, ce qui participe à la transformation tumorale (Blackburn 1992).

3.2. La sénescence liée au stress

Comme expliqué précédemment, la sénescence est également un moyen de prévenir la transformation des cellules en cellules tumorales suite à des stress trop importants. Ce processus peut être déclenché suite à différents types de stress, même lorsque la cellule n'a pas atteint la limite de Hayflick.

3.2.A. Les cassures de la chromatine

Les cellules eucaryotes subissent régulièrement des cassures de la chromatine, physiologiques ou à cause de facteurs environnementaux. Elles possèdent également des mécanismes de réparation très efficace, en cas de cassures simple et double brin. Ces mécanismes seront détaillés dans le chapitre 2. Toutefois, si les cellules subissent trop de dommages et que l'intégrité du génome est compromise, les cassures persistent et comme expliqué précédemment, cela induit l'entrée en sénescence de la cellule (M. Yousefzadeh et al. 2021). La détection des cassures de la chromatine se fait via le complexe MRN (pour MRE11-RAD50-NBS1) qui active les kinases PI3Ks (pour 'phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases') ATM, ATR ou DNA-PK (Thompson 2012). Cela entraine l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 afin d'empêcher la réplication de l'ADN (Campisi et d'Adda di Fagagna 2007; d'Adda di Fagagna 2008) ou même en phase G2 pour bloquer la mitose (Gire et Dulic 2015). Lors de la sénescence réplicative, les mêmes acteurs sont activés par les extrémités télomériques raccourcies (Roger, Tomas, et Gire 2021). La réparation des cassures permet normalement au cycle cellulaire de reprendre en moins de 24h, mais dans le cas de la sénescence réplicative ou de cassures trop importantes, celle-ci deviennent des cassures persistantes qui engendrent la sénescence de la cellule. La machinerie de détection des cassures avec le complexe MRN et les PI3Ks sont des acteurs majeurs dans l'initiation de la sénescence et interviennent dans les modes d'induction prématurés qui vont suivre et illustrés en figure 6 (Roger, Tomas, et Gire 2021).

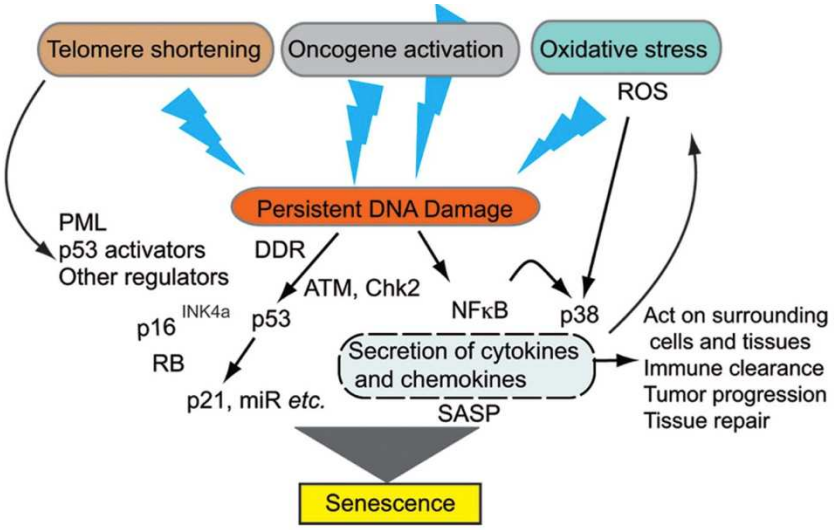


Figure 6 : Les différents modes d'induction de la sénescence. *(Kojima 2013) Tous les modes d'induction de sénescence mènent à la mise en place de dommages persistants de l'ADN, ce qui permet une activation constante de la voie de DDR, p53, pRB et l'arrêt prolongé du cycle cellulaire. La sécrétion du SASP permet de renforcer ce mécanisme.*

3.2.B. Le stress oxydant

Ce type d'agression cellulaire est le résultat de l'accumulation de radicaux libre dans les cellules. Ces petites molécules appelées ROS (pour 'Reactive oxygen species') peuvent venir de l'environnement ou sont le résultat d'un dysfonctionnement des mitochondries (Harman 1956; Muller et al. 2007; Lans et Hoeijmakers 2006). Ces molécules sont très cytotoxiques car elles possèdent un électron libre, les rendant très instables. Elles oxydent les autres éléments de la cellule en leur piquant un électron, les rendant à leur tour instables (Sies 2015). L'accumulation de ROS dans la cellule entraîne également des dommages à l'ADN, ce qui participe la sénescence comme expliqué dans le paragraphe au-dessus. De plus, les ROS entraînent l'activation de la voie AKT (protein kinase B), une autre kinase capable d'induire la sénescence cellulaire (X. Xu et al. 2018). Un dernier effet des ROS est celui de la perturbation de l'expression de la Lamine B1, ce qui engendre une déformation du noyau des cellules et amplifie le mécanisme de sénescence (D. A. McCarthy et al. 2013).

3.2.C. Le stress oncogénique

La sénescence est un processus antitumoral important qui permet l'arrêt de la prolifération lorsque les cellules présentent un risque de transformation en cellules cancéreuses. Le génome humain contient de nombreux gènes régulant l'homéostasie cellulaire qui sont soumis à une importante régulation. Dans un premier je parlerai du stress correspondant à l'activation aberrante de gènes pro-tumoraux et dans un deuxième de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, 2 formes de stress oncogéniques.

3.3.C.i. L'activation des oncogènes

Les gènes responsables de la prolifération, de la différenciation et de la croissance cellulaires sont appelés des proto-oncogènes. Ces gènes sont soumis à une régulation stricte pour empêcher tout emballement de la prolifération. Si toutefois un de ces gènes ou un de leur régulateur est muté, leur activation n'est plus contrôlée, ils deviennent alors des oncogènes et cela participe à la tumorigenèse (Chandeck et Mooi 2010). Les travaux de Serrano et al ont mis en évidence pour la première fois que l'activation de l'oncogène *Ras* entraîne l'induction prématurée de la sénescence dans les cellules. Le gène *Ras* code pour une petite protéine du même nom qui permet l'activation de la prolifération cellulaire. Cette protéine est normalement sous la dépendance et le contrôle du récepteur aux facteurs de croissance épidermique (nommé EGFR pour 'epidermic growth factor receptor'). Lorsque le gène *Ras* est muté, son activation devient constante, ce qui entraîne une prolifération aberrante de la cellule. Cette prolifération active les facteurs antitumoraux p16 et p21 dont je parlerai en partie 4.4 (Serrano et al. 1997). Leur activation entraîne la sénescence cellulaire prématurée nommée OIS. Ce type de stress engendre également une instabilité chromosomique qui permet d'activer la DDR afin de renforcer l'induction de la sénescence (Roger, Tomas, et Gire 2021).

3.3.C.ii. La perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs

Dans le paragraphe précédent nous avons vu que le gain de fonction d'un proto-oncogène induit un stress OIS. Ce stress est également déclenché lorsque qu'une catégorie de gènes nommés GST (pour gènes suppresseurs de tumeurs) ou les facteurs qui les régulent subissent une mutation qui leur fait perdre leur fonction (Zhu et al. 2020). Un cas bien décrit est celui de la mutation de *Pten* (Phosphatase

and tensin homolog), une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. La perte de fonction de ce gène entraîne un stress nommé PICS (pour 'PTEN-loss induced cellular senescence'). Contrairement à l'activation des oncogènes, ce stress n'engendre pas de dommages à l'ADN et de DDR mais permet quand même l'activation de p53 (S. H. Jung et al. 2019).

Une mutation conduisant à l'activation d'un oncogène ou l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeur ne conduit pas directement à l'apparition d'un cancer. En effet les cellules humaines possèdent plusieurs niveaux de contrôle de leur cycle, et dans les cellules cancéreuses on retrouve souvent plusieurs gènes mutés. Les gènes majoritairement impliqués dans les cancers comme p53 et pRB seront détaillés dans la partie suivante. Cependant, la mutation d'éléments supplémentaires nécessaires pour mettre en place l'OIS peut permettre aux cellules d'échapper à l'induction de sénescence et de devenir cancéreuses (Calcinotto et al. 2019).

4. Les voies de signalisation permettant la mise en place de la sénescence

Dans la partie précédente nous avons vu qu'il existe plusieurs mécanismes très variés pouvant mener à l'induction de la sénescence dans les cellules afin d'empêcher la transformation des cellules en cellules cancéreuses. Ces différents stress sont détectés par des acteurs particuliers qui déclenchent différentes voies de signalisation. Malgré la diversité des stress menant à la sénescence, toutes ces voies de signalisations dépendent d'acteurs communs que je vais décrire dans cette partie.

4 .1. La voie de réponse aux cassures de la chromatine

Comme évoqué précédemment, l'induction de la sénescence peut être déclenchée suite à des évènements de cassures de la chromatine. De plus, les autres stress conduisant à la sénescence engendrent des cassures afin de renforcer le mécanisme de sénescence grâce à l'instabilité chromosomique. Dans cette sous partie je détaillerai les mécanismes permettant d'induire la sénescence suite à la détection de télomères raccourcis ou dans un contexte de cassures persistantes.

4.1.1. La détection des télomères raccourcis

Comme expliqué dans la partie 3.1, les télomères sont associés au complexe Shelterin qui protège les extrémités afin d'éviter leur détection par des senseurs de cassures et / ou la fusion entre les extrémités télomériques. Lorsque les télomères atteignent la limite de Hayflick, leur association avec le complexe Shelterin diminue, ce qui les expose aux senseurs de cassures de la chromatine comme MRN ou Ku (McHugh et Gil 2017). Cela engendre alors le recrutement des PIKKs qui s'activent et engendrent la DDR. Comme ces cassures ne sont pas réparables, celle-ci sont considérées comme des cassures persistantes et cela aboutit à l'induction de la sénescence (d'Adda di Fagagna et al. 2003).

4.1.2. Les dommages à l'ADN non réparés entraînant la sénescence

Les télomères raccourcis sont considérés comme des cassures persistantes car leur réparation n'est pas possible (Rossiello et al. 2014). Lorsque des cassures apparaissent dans la chromatine, le cycle cellulaire est stoppé et ne peut reprendre qu'après réparation de ces dommages. Si les cassures sont trop importantes, la cellule doit arrêter ton cycle de manière définitive afin que des mutations ou de l'instabilité chromosomique ne soit transmises aux cellules filles (Rossiello et al. 2014). C'est également pour cette raison que tous les stress pouvant induire la sénescence mènent à l'activation de la DDR afin de bloquer le cycle cellulaire. En effet, cela permet l'activation des PIKKs, nécessaires à la signalisation pour arrêter le cycle cellulaire (Roger, Tomas, et Gire 2021). Les sites de dommages à l'ADN persistants sont accumulés en foyers importants, qui permettent l'activation constante des acteurs de l'induction et du maintien de la sénescence comme la protéine du rétinoblastome (pRB) et p53 dont je parlerai dans les parties suivantes (Ou et Schumacher 2018).

4.2. Le rôle de la protéine du rétinoblastome (pRB)

Cette protéine de séquestration jour un rôle de régulation négative du cycle cellulaire et a été le premier gène suppresseur de tumeur identifié (Friend et al. 1986; Knudson 1971). Son nom est associé à un cancer ophtalmologique pédiatrique appelé rétinoblastome dans lequel le gène *Rb1* est muté (Sachdeva et O'Brien 2012). Sous sa forme hypophosphorylée, pRB a une forte affinité pour le facteur de transcription E2F associé à la progression dans le cycle cellulaire. Cette liaison empêche son activité et permet de bloquer le cycle cellulaire avant le passage en phase S (Y. Zhou et al. 2023). Lorsque la cellule doit avancer dans son cycle et que tous les éléments permettent le passage en phase S, les kinases dépendantes des cyclines nommées CDK (cyclin-dependent kinase), notamment CDK2, CDK4 et CDK6 phosphorylent pRB qui perd son affinité pour E2F. La libération de E2F permet alors le passage en phase S (C. J. Sherr 1996; Weinberg 1995). Le complexe pRB-E2F est également retrouvé aux sites de cassures et peut interagir avec MRE11, RPA et Rad51 pour faciliter la réparation par recombinaison homologue (Vélez-Cruz et al. 2016 ; Chen et al. 2011). Le complexe E2F-pRB est très important pour empêcher une prolifération excessive des cellules, et des mutations de pRB sont souvent retrouvées dans les cancers. La perte de pRB entraîne heureusement l'activation d'un élément de la réponse anti-tumorale qui est p14ARF (alternative reading frame). Le rôle de ARF est de permettre l'activation de p53, un autre acteur de la réponse anti-tumorale (Bates et al. 1998).

4.3. La stabilisation de p53 : le gardien du génome

La protéine p53 est un facteur de transcription codé par le gène *tp53* et a une activité très limitée dans les cellules saines et proliférantes (Mijit et al. 2020). L'expression du gène est constitutive, et la régulation de p53 se fait au niveau protéique avec sa séquestration par MDM2 (ou HDM2 pour human double minute 2). Cette ubiquitine ligase empêche l'interaction de p53 avec ses gènes cibles et induit sa dégradation par le protéasome grâce à l'ajout d'une modification post-traductionnelle d'ubiquitine (Momand et al. 1992; Oliner et al. 1993; Midgley et Lane 1997). MDM4 peut également bloquer la liaison de p53 avec les gènes cibles mais ne possède pas d'activité d'ubiquitine ligase (J. Yang et al. 2021). La libération de p53 peut se faire par 2 mécanismes différents en fonction du type de stress, illustrés en Figure 7.

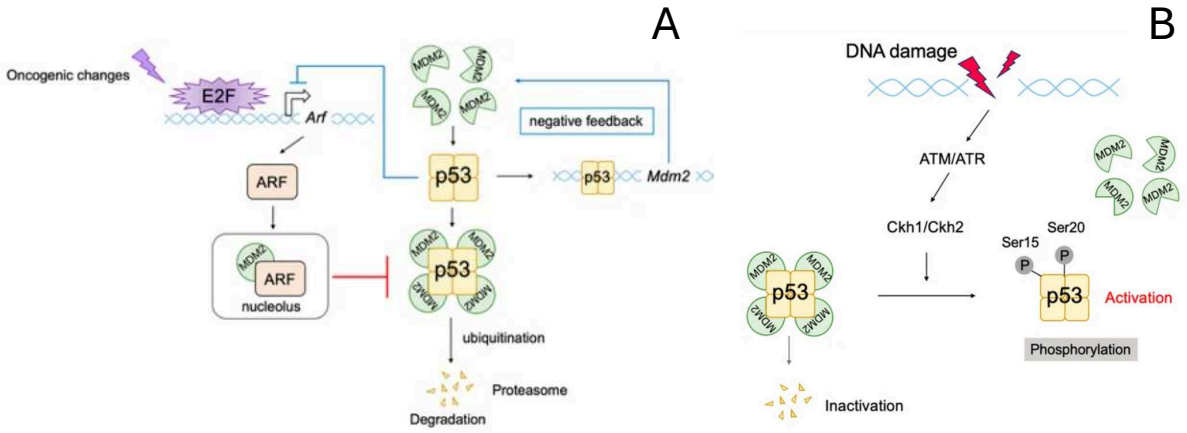


Figure 7: La stabilisation de p53 en fonction du stress. *(Zhou 2023) A : lors d'un stress oncogénique et d'une prolifération aberrante, l'expression de Arf permet de lever l'inhibition de p53 en induisant la dégradation de MDM2 et/ou sa séquestration dans les nucléoles. Si la quantité de p53 est trop importante, un rétrocontrôle négatif se met en place avec p53 qui inhibe l'expression du gènes Arf. B : Dans le cas de dommages à l'ADN, p53 est phosphorylé sur les sérines 15 et 20, ce qui permet sa libération de MDM2. Ces deux mécanismes ne sont pas exclusifs, les 2 peuvent co-exister dans une même cellule.*

4.3.A. Le contexte d'un stress oncogénique

Dans le cas d'un stress provoqué par une hyperprolifération, la protéine ARF, exprimée quand le cycle cellulaire n'est plus contrôlé, permet de stabiliser p53. ARF est capable de se lier à MDM2 et exerce un double effet. Le premier est de bloquer son activité d'ubiquitine ligase et le second de le séquestrer dans les nucléoles. Ainsi p53 se retrouve libre et actif dans le nucléoplasme et peut activer ses gènes cibles (Llanos et al. 2001; Midgley et al. 2000). La stabilisation de la cellule engendre l'arrêt prolongé de son cycle cellulaire et peut mener vers la sénescence ou l'apoptose en fonction du type cellulaire et de son environnement (Charles J. Sherr et McCormick 2002).Parmi les gènes concernés on trouve *Pten*, un gène suppresseur de tumeur évoqué précédemment, et qui permet de bloquer la voie mTor, impliquée dans la prolifération cellulaire (Stambolic et al. 2001). Des modifications post-traductionnelles peuvent être déposées sur p53 comme la NEDDylation par MDM2 qui a un rôle similaire à celui de l'ubiquitine, ou la SUMOylation par ARF qui, au contraire, permet son activation (Xirodimas et al. 2004).

4.3.B. Le contexte des dommages à l'ADN

Lors de la réponse aux dommages, ARF n'est pas exprimé dans les cellules. Les cassures sont détectées par le complexe MRN et / ou la protéine Ku, ce qui entraîne le recrutement et l'activation des PIKKs. Ces cascades de signalisation seront détaillées dans le chapitre 2 partie 3.1. Rapidement après leur activation, elles activent les kinases de checkpoint CHK1 et CHK2, qui phosphorylent à leur tour p53 sur les sérines 15 et 20 (Shieh et al. 1997; Tibbetts et al. 1999). Cette phosphorylation permet à PIN1 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1) de changer la conformation de p53, ce qui a pour conséquence de lever son inhibition par MDM2 (Zheng et al. 2002). La levée de son inhibition permet à p53 d'activer ses gènes cibles afin d'arrêter le cycle cellulaire. Dans certains contextes, si les

cassures ne sont pas réparables, une autre phosphorylation de p53 sur la sérine 46 permet de changer ses gènes cibles afin d'activer *Bax* (pour 'BCL2-associated X protein), un régulateur pro-apoptotique (Miyashita et Reed 1995; Smeenk et al. 2011). P53 active également des gènes liés à la mise en place de la sénescence comme p21 dont je discuterai dans la partie suivant et GADD45 **(**Growth arrest and DNA damage-inducible protein) (Vousden et Prives 2009; Harper et al. 1993; X. W. Wang et al. 1999). Les modifications d'activation de p53 sont nombreuses et comprennent également des acétylations représentées en Figure 4.

Lors d'un stress oncogénique, la voie des dommages est activée grâce à la génération de cassures mais des études ont montré que dans ce contexte OIS, l'activation de p53 par les dommages à l'ADN est bien moins efficace que la voie passant par ARF (Efeyan et al. 2006; Hinkal, Parikh, et Donehower 2009; Christophorou et al. 2006).

4.4. Les acteurs antitumoraux

Parmi les cibles directes de p53 impliqués dans la mise en place de la sénescence, on trouve les gènes *p21Cip1/Waf1* et *p16Ink4A*, codant respectivement pour p21 et p16, et des protéines essentielles pour l'arrêt du cycle cellulaire.

4.4.A. La protéine p21

Le gène *p21Cip1/Waf1* code pour une protéine inhibitrice de kinase 1 dépendante des cyclines. Comme son nom l'indique, elle permet de bloquer l'activité de certaines kinases impliquées dans la progression du cycle cellulaire. Ce gène est régulé au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et post-traductionnel (Y.-S. Jung, Qian, et Chen 2010). On trouve une activation de p21 suite à la stabilisation de p53 dans des contextes de dommages à l'ADN ou de stress oxydant afin de déclencher la sénescence (Abbas et Dutta 2009). Lors du développement embryonnaire, les cellules sénescentes sont positives pour p21 mais négatives pour p16, suggérant une activation également indépendante de p53 (Macleod et al. 1995). Les kinases inhibées par p21 servent normalement à empêcher la formation d'un complexe nommé DREAM (DP, RB-like, E2F, and MuvB complex). Ce complexe permet la répression des gènes du cycle cellulaire en empêchant l'entrée en phase S (pour revue : Sadasivam et DeCaprio 2013). Grâce à p21, le complexe DREAM est stabilisé et permet l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, en inhibant la formation des complexes cycline-CDK2 et cycline-CDK4, p21 empêche la phosphorylation de pRB afin d'accentuer l'arrêt du cycle cellulaire (Karimian, Ahmadi, et Yousefi 2016).

On retrouve une diminution de l'expression de p21 dans les cancers positifs pour c-Myc, un facteur de transcription activant les gènes de la prolifération (Seoane, Le, et Massagué 2002; Dang 2012). P21 a également été décrit comme un inhibiteur de la génération de cassures de l'ADN, ce qui peut être un désavantage lors de traitement anti-cancéreux (Viale et al. 2009). Il a même été observé que dans certains cancers sa déplétion est bénéfique pour la guérison (Jain, Raina, et Agarwal 2013).

4.4.B. La protéine p16

Tout comme p21, cette protéine est un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines, plus particulièrement de CKD4 et CDK6. Elle est codée par le gène *p16^{INK4a},* situé sur le même locus

cdkn2a permettant également l'expression de la protéine ARF grâce à l'épissage alternatif (Safwan-Zaiter, Wagner, et Wagner 2022). Contrairement à p21 qui est surtout surexprimé lors de la sénescence induite par les dommages à l'ADN, p16 est surexprimé dans le contexte de l'OIS (Rayess, Wang, et Srivatsan 2012). Son activité permet également la stabilisation de pRB afin de bloquer E2F et le cycle cellulaire (Petrova et al. 2016). Le locus *cdkn2a* est soumis à un rétro-contrôle afin de limiter l'expression de *p16* et *Arf*. En présence d'un niveau important de pRB hypophosphorylé, les complexes PRC1 et PRC2 ('polycomb repressive complex'), des remodeleurs de la chromatine, permettent l'hétérochromatinisation du locus (Safwan-Zaiter, Wagner, et Wagner 2022). Lors de l'activation d'un oncogène, p16 peut également être activé indépendamment de p53 par les facteurs de transcription Ets1 et Ets2 (N. Ohtani et al. 2001).

Cette protéine est aussi impliquée dans la sénescence dans des contextes de cicatrisation, avec une augmentation des cellules positives pour p16 dans la zone lésée (Demaria et al. 2014), et pour le renouvellement des cellules souches. En effet, son absence favorise le vieillissement (D'Arcangelo, Tinaburri, et Dellambra 2017).

Beaucoup d'autre gènes sont des cibles de p53 et participent à la mise en place de la sénescence en fonction du contexte d'induction (pour revue Mijit et al. 2020). Parmi ces cibles on trouve une protéine nommée PML (promyelocytic leukemia), très importante dans mes travaux de thèse et dont je vais parler dans la partie suivante.

5. Le rôle des PML NBs dans l'induction de la sénescence

Parmi les nombreux éléments impliqués dans la mise en place et le maintien de la sénescence on trouve des structures particulières appelée corps nucléaires ou PML nuclear bodies (PML NBs). Ces corps nucléaires sont des organelles sans membrane présents dans presque tous les noyaux des cellules mammifères sous la forme de sphères de 0,1 à 2µm (Silonov et al. 2023). Leur taille et nombre varie selon le type cellulaire et l'état physiologique de la cellule (Bernardi et Pandolfi 2007). Ces corps nucléaires peuvent héberger plus d'une centaine de protéines différentes qui transitent à l'intérieur et permettent de concentrer des réactions biochimiques dans le noyau en fonction des besoins de la cellule (Corpet et al. 2020).

5.1. La protéine PML

Cette protéine a été décrite à l'origine dans le contexte de la leucémie aiguë promyélocytaire (APL) où elle est retrouvée fusionnée au récepteur de l'acide rétinoïque α (RARα) suite à une translocation (H. de Thé et al. 1990; Hugues de Thé, Le Bras, et Lallemand-Breitenbach 2012; Valérie Lallemand-Breitenbach et al. 2008). Le gène codant cette protéine possède 9 exons, dont l'épissage alternatif des exons 4-9 permet l'existence d'une quinzaine d'isoformes de la protéine (Bernardi et Pandolfi 2007). En Figure 8 on trouve les 7 isoformes principales, notées de PML-I à PML-VII. La protéine PML est composée en N-terminal d'un motif tripartite (TRIM). Elle

fait donc partie de la famille des protéines TRIM. Ce motif est également appelé domaine RBCC composé d'un domaine RING finger (R), deux domaines B-box (B1 et B2) et un domaine coiled-coiled (CC) (Borden 1998; K. Jensen, Shiels, et Freemont 2001; Saurin et al. 1996). L'exon 6 du gène code pour un signal de localisation nucléaire (NLS), ainsi, mis à part l'isoforme VII, toutes les isoformes de PML sont majoritairement nucléaires. L'isoforme PML-I possède également un signal d'export nucléaire, ce qui permet sa localisation nucléaire ou cytoplasmique en fonction du contexte cellulaire (Silonov et al. 2023). L'expression du gène *Pml* est accentuée par la présence d'interféron (IFN), faisant de lui un ISG (pour 'IFN stimulated gene') car son promoteur possède un élément de réponse aux interférons de type I (ISRE pour 'Type I IFN stimulated response element') et un domaine d'activation par l'IFNγ, nommé GAS pour 'IFN-gamma activated site'. En présence d'IFN, les facteurs de transcriptions STAT1 et 2 (signal-transducer and activator of transcription) induisent plus fortement l'expression du gène *Pml* (Stadler et al. 1995; Chelbi-Alix et al. 1995; Lavau et al. 1995). D'autres éléments pro-inflammatoires peuvent accentuer l'expression de PML, comme le facteur de nécrose tumorale TNFα (Cheng et al. 2012; C. Gao et al. 2008), l'interleukine 6 (IL-6) (Hubackova et al. 2012) et l'interleukine 1 (IL-1) (Heuser et al. 1998). Lors d'un stress oncogénique et le déclenchement de la sénescence, l'expression de *Pml* est également renforcée par la liaison de p53 sur son promoteur (Ferbeyre et al. 2000; de Stanchina et al. 2004).

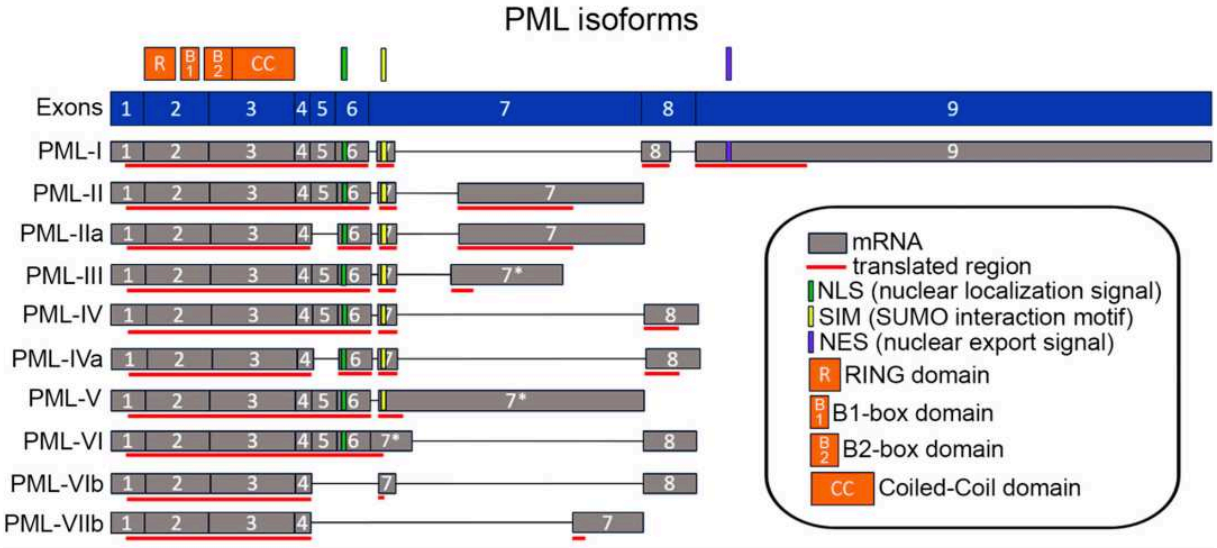


***Figure 8 : Les isoformes majeurs de PML**. (Silonov 2023) Les exons sont représentés en bleu avec une taille proportionnelle à la longueur de la séquence en nucléotides. Les lignes rouges représentent les séquences qui seront traduites.*

5.2. La SUMOylation, modification post-traductionnelle majeure de PML

Parmi les modifications de PML, la plus importante est la SUMOylation, qui correspond à la liaison covalente d'une protéine SUMO pour 'small ubiquitin-like modifier', de environ 11kDa, sur des résidus lysine (pour revue (H.-M. Chang et Yeh 2020). Cette modification peut faciliter la formation des corps nucléaires ou mener la protéine PML à la dégradation. Comme son nom l'indique, cette petite protéine a une structure très similaire à celle de l'ubiquitine (Kamitani et

al. 1998; Boddy et al. 1996; Matunis, Coutavas, et Blobel 1996; Okura et al. 1996; Shen et al. 1996). Chez les vertébrés il existe 5 paralogues de SUMO, et les plus étudiés sont SUMO-1, SUMO-2 et SUMO-3. SUMO-1 est majoritairement retrouvée sous forme monomérique sur les protéines cibles alors que SUMO-2 et 3 forment souvent des chaînes poly-SUMO, de la même manière que l'ubiquitine (Tatham et al. 2001). Dans la littérature, les formes SUMO-2 et 3 sont rarement différenciées car elles sont indissociables en western blot et sont donc nommées SUMO-2/3 (Saitoh et Hinchey 2000). La conjugaison de ces protéines SUMO sur des cibles se fait en plusieurs étapes. La protéine SUMO mature est prise en charge par un hétérodimère d'activation E1 composé de SAE1 et SAE2 (SUMO-activating enzymes 1 and 2). SUMO est ensuite transférée à une enzyme de conjugaison E2 nommé UBC9 (ubiquitin carrier protein 9), qui est la seule SUMO conjugase identifiée à ce jour. UBC9, avec l'aide d'enzymes ligases E3 comme les PIAS (protein inhibitor of activated STAT) conjugue la protéine SUMO sur la lysine d'une cible (Wilson 2017; Wilkinson et Henley 2010; H.-M. Chang et Yeh 2020). Cette SUMOylation peut être retirée par des protéases SENPs (sentrin-specific protease) (Mukhopadhyay et Dasso 2007).

Un des effets de la SUMOylation est de faciliter les interactions entre les protéines. En effet, des domaines protéiques spécifiques nommés SIM pour 'SUMO-interacting motif' peuvent interagir avec les motifs SUMO et donc, leur protéine associée (Yau et al. 2021). La SUMOylation peut également permettre le recrutement de protéines impliquées dans la dégradation des protéines cibles. Ces enzymes nommées STUBL pour 'SUMO targeted ubiquitin ligase' comme RNF4 et RNF111 chez l'Homme sont capables de reconnaître les protéines modifiées par SUMOylation pour lier un motif d'ubiquitine et ainsi induire leur dégradation, comme c'est le cas avec PML (Erker et al. 2013).

5.3. Le rôle des PML NBs dans la modification et la dégradation des protéines nucléaires

L'architecture des PML NBs permettant la concentration de réactions dont la modification post traductionnelle des protéines, fait de ces organelles des sites importants pour la stabilité et la dégradation des protéines nucléaires. Grâce à la séparation de phase, les enzymes et leurs substrats sont isolés du reste du nucléoplasme, ce qui facilite les interactions et réactions biochimiques (Abou-Ghali et Lallemand-Breitenbach 2024; Tessier et al. 2022). Impliquée dans la maturation des PML NBs, l'enzyme UBC9 permet également de SUMOyler des protéines clientes (Abou-Ghali et Lallemand-Breitenbach 2024). Cette modification permet à une autre catégorie d'enzymes de lier des motifs ubiquitines sur ces protéines SUMOylées. Ces enzymes nommées STUbls permettent donc d'induire la dégradation des protéines associées aux PML NBs via le protéasome (Y.-C. Chang, Oram, et Bielinsky 2021). Parmi ces STUbls se trouvent notamment RNF4 et RNF111, retrouvées accumulées dans les PML NBs en condition de stress et permettant la dégradation de protéines nucléaires telles que PIAS1 (Kumar et al. 2017) ou BLM (pour 'Bloom syndrome helicase') (S. Liu et al. 2023), deux protéines impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN.

De plus, les PML NBs sont en interaction avec des composants de la voie UPS (pour 'Ubiquitin-proteasome system') et de la machinerie d'autophagie. Les travaux de Lallemand-Breitenbach et al

ont montré que le traitement de cellules à l'arsenic permettant une forte SUMOylation des PML était accompagné d'une augmentation de la quantité de protéines ubiquitinées et de la relocalisation de sous-unités du protéasomes aux PML NBs (Valérie Lallemand-Breitenbach et al. 2008). En ce qui concerne l'autophagie, le récepteur p62/SQSTM1 (pour 'sequestosome 1') s'accumule dans les PML NBs avec des protéine poly-ubiquitinées en cas d'inhibition de l'export nucléaire, afin de faciliter leur dégradation par le protéasome (Pankiv et al. 2010). P97, un autre acteur de la dégradation par le protéasome est retrouvé dans les PML NBs d'après une étude plus récente de 2023 (Jaffray et al. 2023). p97 (ou VCP/p97) est une ségrégase ATP-dépendante qui permet l'extraction des protéines ubiquitinylées afin de faciliter leur dégradation par le protéasome (van den Boom et Meyer 2018). Toutes ces interactions démontrent que les PML NBs jouent un rôle dans l'homéostasie des protéines nucléaires, un point qui sera largement abordé au cours de mes travaux.

5.4. La composition et la formation des PML NBs

La formation des corps nucléaires PML (PML NBs) est un processus en plusieurs étapes dont la compréhension n'est pas encore complète et dont plusieurs modèles ont été proposés. Le modèle le plus récent est celui proposé par l'étude de Silonov et al. et montré en Figure 9. Ils proposent que la première étape soit la dimérisation de 2 protéines PML via la liaison de leurs domaines RING. Cette interaction est ensuite renforcée par l'interaction des B-Box. La multimérisation des domaines RBCC permet de recruter UBC9 afin de SUMOyler les protéines PML (P. Wang et al. 2018). La SUMOylation de la protéine PML permet d'augmenter les interactions, notamment grâce à la présence d'un domaine SIM sur PML. Les interactions SIM-SUMO et celles entre les domaines coiled-coiled permettent la mise en place d'un phénomène permettant de concentrer les protéines nommé séparation de phase liquide-liquide (LLPS pour 'liquid-liquid phase separation'). La LLPS qui permet la maturation des PML NBs est définie par le fait qu'au-dessus d'une certaine concentration, certaines protéines peuvent former des gouttelettes avec une composition distincte de l'environnement immédiat, sur le même principe que des gouttes d'huiles dans un verre d'eau (Banani et al. 2017; McSwiggen et al. 2019; A et Weber 2019)(pour revues sur la formation des PML NBs et de la LLPS voir (Corpet et al. 2020; Silonov et al. 2023). La forme des PML NBs est peut-être plus complexe et différente de celle admise jusqu'à présent (sphère creuse) car des observations en microscopie de super résolution réalisés dans notre équipe suggèrent une structure toroïdale. De plus, les oligomères seraient agencés sous forme d'hexamères (Chuang Li et al. 2017). Cette proposition de modèle sur l'architecture des PML NBs est compatible avec leurs propriétés, à savoir des échanges rapides et importantes entre les milieux internes et externes et des modifications post-traductionnelles faciles des protéines PML (Silonov et al. 2023).

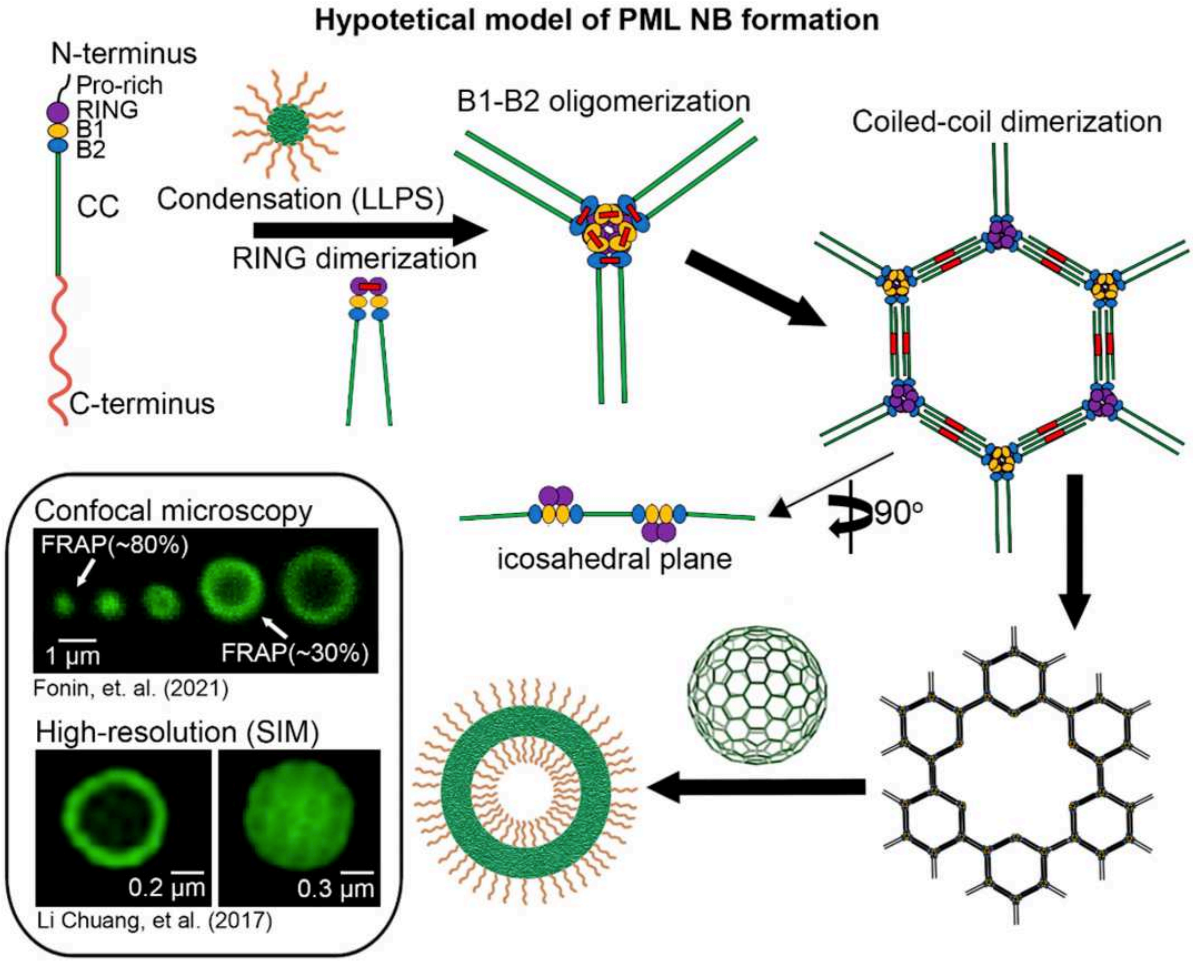


Figure 9 : Proposition de modèle pour la formation des PML NBs. *(Silonov 2023) La séparation de phase liquide-liquide permet d'accentuer les liaisons entre les protéines PML avec l'association des domaines RBCC. Les images de microscopie montrent que les échanges avec le nucléoplasme sont plus efficaces lorsque les PML NBs sont de petite taille.*

Les PML NBs sont composés de plusieurs isoformes (Condemine et al. 2006) et ne représentent que 10% des protéines PML nucléaire, quand les 90% restant sont diffus dans le nucléoplasme (V. Lallemand-Breitenbach et al. 2001; Valérie Lallemand-Breitenbach et de Thé 2010). Lors de la mitose, la protéine PML forme de gros agrégats nommés MAPPs pour 'mitotic accumulation of PML protein' qui sont soumis à une forte dé-SUMOylation, empêchant leur interaction avec d'autres protéines (Everett et al. 1999). Après la mitose et avant la formation de l'enveloppe nucléaire, la protéine PML se retrouve dans le cytoplasme, dans un complexe appelé CyPNs pour 'cytoplasmic assemblies of PML and nucleoporins'. L'importine KPNB1 permet ensuite la relocalisation de PML dans le noyau (Y.-C. M. Chen et al. 2008).

Les PML NBs ont de très nombreuses fonctions. Plus de 170 protéines ont été décrites comme des protéines clientes, c'est à dire pouvant résider de façon transitoire ou constitutive dans les PML NBs. On peut distinguer 3 grands rôles biochimiques des PML NBs avec leur capacité à (i) servir de lieux de modifications post-traductionnelles pour moduler l'activité des protéines clientes ou entraîner leur dégradation, (ii) séquestrer des protéines nucléaires pour moduler

leurs actions et (iii) organiser des domaines chromatiniens. Dans cette introduction je me concentrerai uniquement sur le rôle des PML NBs lors du processus de sénescence. Les rôles des PML NBs sont décrits dans une revue de l'équipe parue en 2020 (Corpet et al. 2020).

5.5. L'implication des PML NBs dans la sénescence

Depuis le début des années 2000 il est admis que l'expression de PML augmente lors de la sénescence cellulaire. De plus sa surexpression induit l'entrée en sénescence des cellules et son absence l'empêche lors d'un stress oncogénique (Pearson et al. 2000; Oliver Bischof et al. 2002; Ferbeyre et al. 2000). La protéine PML fait partie de la catégorie des gènes suppresseurs de tumeurs, notamment en permettant l'induction de l'apoptose et de la sénescence. Dans la plupart des cancers, la diminution de la présence de PML est associée à une progression tumorale, même si dans certains cas particuliers, PML peut avoir un rôle pro-tumoral comme dans le cancer du sein triple négatif où on le retrouve surexprimé (Silonov et al. 2023). Le gène *Pml* possède des sites de liaison pour p53 qui permet son activation (de Stanchina et al. 2004). Cette interaction entre PML et p53 permet une boucle de régulation positive car la protéine PML facilite l'acétylation de p53, nécessaire pour sa stabilisation et sa capacité à se lier à l'ADN lors des étapes précoces de la sénescence (Pearson et al. 2000). Des études récentes suggèrent que l'isoforme IV de PML serait la plus adaptée pour l'activation par p53 en raison d'une interaction privilégiée avec p14ARF (Chuang Li et al. 2017; Ivanschitz et al. 2015). Une étude récente montre également que la relocalisation de FBF1 ('Fas-binding factor 1'), une protéine normalement présente à la base du cil primaire est relocalisée dans les PML NBs, un évènement essentiel pour l'induction de la sénescence (X. Ma et al. 2023). De plus, les PML NBs permettent la séquestration de E2F afin de maintenir l'arrêt du cycle cellulaire, en plus de participer au dépôt de la marque répressive H3K9me3 sur les gènes cibles de E2F (Talluri et Dick 2014). Comme mentionné précédemment, la mise en place de la sénescence est fortement dépendante de la réponse aux dommages à l'ADN, et je vais maintenant m'intéresser au rôle des PML NBs dans la gestion des cassures.

5.4.A. Les PML NB dans la réponse aux dommages à l'ADN

Plusieurs éléments dans la littérature permettent d'affirmer que les PML NBs sont impliqués dans la gestion des cassures. Plusieurs études ont montré que de nombreuses protéines de réparation de l'ADN comme BLM, RAD51, RPA et ATR se retrouvent dans les PML NBs suite à l'induction de dommages (Dellaire et Bazett-Jones 2004). MRE11 et NBS1, 2 membres du complexe MRN de détection des cassures double-brin sont localisés dans les PML NBs en absence de cassures, et en sortent suite à l'apparition de dommages (Mirzoeva et Petrini 2001; Carbone et al. 2002). D'autres acteurs précoces de la signalisation des dommages comme ATM et BRCA1 ont été observés dans les PML NBs 8h après induction de cassures double-brins (Z.-X. Xu et al. 2003). Lors de l'apparition de dommages à l'ADN, les PML NBs sont soumis à une fission afin d'augmenter leur nombre et permettre à des PML NBs plus petits d'être mobilisés aux sites de cassure, et ce sous la dépendance de SUMO-1, NBS1, ATM, Chk2 et ATR (Eskiw et al. 2003; Dellaire et al. 2006; Carbone et al. 2002). Le rôle des PML NBs dans la réparation des

DSBs est supportée par l'observation d'un défaut de réparation des cassures dans les cellules des patients de la leucémie promyélocytaire où la protéine PML, fusionnée à RARα ('retinoic acid receptor alpha') est non fonctionnelle (di Masi et al. 2016).

Une étude plus récente de 2022 montre un lien entre les PML NBs, et leur juxtaposition aux sites de cassures sous la dépendance du réseau d'actine dans le noyau. Cette étude de Cobb et al montre qu'en l'absence de la polymérisation de l'actine filamenteuse (actine-F), la fission des PML NBs et leur motilité sont impactées et que la juxtaposition avec le marqueur de cassures double brins γH2AX est diminuée (Cobb et al. 2022).

En plus de cette implication dans la gestion des cassures et son interaction avec p53, les PML NBs participent également d'une façon bien différente à l'établissement de la sénescence. Un complexe protéique nommé HIRA s'accumule dans les PML NBs lors des étapes précoces de l'induction de sénescence et sera le sujet de la partie suivante.

5.4.B. L'accumulation de HIRA dans les PML NBs lors de l'induction de la sénescence

Comme mentionné précédemment, la mise en place de la sénescence s'accompagne de l'apparition de plusieurs marqueurs comme la formation des SAHFs. Plusieurs études ont montré que l'accumulation du complexe HIRA dans les PML NBs est importante pour la mise en place de ces foyers d'hétérochromatine (Banumathy et al. 2009; Rai et al. 2011; R. Zhang et al. 2005; Ye, Zerlanko, Zhang, et al. 2007). Le complexe HIRA étant le chaperon du variant d'histone H3.3, il est naturel de penser que ce variant est incorporé dans la chromatine pour la formation des SAHFs. Cependant, une étude épigénétique portant sur ces SAHFs montre qu'ils ne sont pas enrichis en H3.3 (Corpet et al. 2014). Le lien entre cette accumulation de HIRA dans les PML NBs et la mise en place des SAHFs semble donc indirect. De plus, cette accumulation n'est pas dépendante des voies p21/p53 et p16/pRB alors qu'elles sont elles-même requises pour la formation des SAHFs (Ye, Zerlanko, Zhang, et al. 2007). Lors de l'induction de sénescence, la voie Wnt est réprimée, ce qui permet l'activation de la kinase GSK3β ('glycogen synthase kinase β'), qui phosphoryle HIRA sur la sérine 697, permettant son recrutement dans les PML NBs (Ye, Zerlanko, Kennedy, et al. 2007). Bien que ce marqueur précoce de la sénescence soit admis dans la communauté scientifique, il reste beaucoup de mystère sur les causes et conséquences de cette relocalisation. Une étude très récente de 2024 a d'ailleurs montré que l'accumulation de HIRA dans les PML NBs était requise pour l'expression du SASP du fait de la séquestration de p62 par HIRA. Cet inhibiteur d'autophagie permet la dégradation de cGAS, et se trouve lié aux CCF. Cela impliquerait que cGAS soit dégradé par p62 lorsqu'il se lie aux CCFs sans pouvoir déclencher la voie menant à l'expression du SASP. Grâce à la séquestration par HIRA de p62, cGAS s'active en liant les CCFs sans être dégradé (Dasgupta et al. 2024).

6. Les avantages et inconvénients de la sénescence dans les pathologies

Il est bien admis que la sénescence est un puissant processus antitumoral permettant d'éviter le développement de beaucoup de pathologies, majoritairement des cancers.

Malheureusement, il arrive que la sénescence ait un rôle pro-tumoral dans certaines conditions. De plus, la présence prolongée de cellules sénescentes dans les tissus est responsable de nombreuses pathologies liées au vieillissement. Dans cette dernière partie du premier chapitre je parlerai de l'élimination des cellules sénescentes, du vieillissement et de la sénescence dans les cancers.

6.1. L'élimination physiologique des cellules sénescentes

Il a bien été défini que les cellules sénescentes ne sont pas mortes et qu'elles continuent d'avoir une activité métabolique. Leur principale activité est d'ailleurs la sécrétion du SASP, qui permet de recruter des cellules immunitaires afin de les éliminer (Liang et al. 2022). Le phénomène d'élimination des cellules sénescentes est nommé sénolyse et est étudié dans plusieurs types de traitements. Plusieurs types cellulaires sont impliqués dans cette élimination. Dans la catégorie du système immunitaire inné on trouve les cellules NK (natural killer) et les macrophages M1-like. La détection par les cellules NK se fait grâce à des récepteurs comme MICA et ULBP1 ('UL16 binding protein 1'), des ligands de NKG2D ('NK group 2, member D'), et permet l'élimination des cellules sénescentes suite à l'exocytose des granules des cellules NK (Adi Sagiv et al. 2016; A. Sagiv et al. 2013). L'activation de p53 dans les cellules sénescentes permet l'expression de facteurs qui induisent la différenciation des macrophages en macrophages M1 antitumoraux, permettant leur élimination (Lujambio et al. 2013). L'élimination par les cellules de l'immunité adaptative est également possible via les lymphocytes T. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques peuvent détecter et provoquer l'élimination des cellules sénescentes alors que les lymphocytes T CD4+ permettent d'accentuer le recrutement de cellules NK et de macrophages (Adi Sagiv et Krizhanovsky 2013). La reconnaissance des cellules sénescentes par l'immunité adaptative est également une piste pour développer des vaccins contre certains types de cancers où l'injection de cellules sénescentes permet de renforcer l'élimination des tumeurs (Meng et al. 2012).

L'élimination des cellules sénescentes est primordiale car si la présence transitoire de ces cellules est bénéfique, leur présence permanente engendre de nombreux problèmes. Nous verrons dans la partie suivante pourquoi leur mauvaise élimination est néfaste pour l'organisme.

6.2. Les maladies liées au vieillissement

La définition de la sénescence réplicative montre qu'après un certain nombre de divisions, les cellules arrêtent de proliférer. De ce fait, chez les personnes âgées, on trouve une augmentation du nombre de cellules en sénescence. La présence de ces cellules semble être directement liée à des pathologies liées au vieillissement (Y. Wang et al. 2022). De plus, chez ces personnes, le système immunitaire moins performant ne permet pas une élimination efficace de ces cellules. Dans cette partie je détaillerai ce phénomène de vieillissement et comment la sénescence, un processus pourtant censé protéger les individus, peut devenir responsable de pathologies.

6.2.A. La mauvaise élimination des cellules sénescentes

Le vieillissement s'accompagne d'une augmentation de molécules pro-inflammatoires en circulation et porte même un nom dans la littérature : inflammaging (Franceschi et al. 2000). Ce phénomène est un facteur de risque dans le développement de pathologies associées au vieillissement telles que des maladies cardiovasculaires, neurodégénératives ou encore des cancers et peut être associé à des décès prématurés (Di Micco et al. 2021). Des études ont mis en avant un lien entre la présence de ces molécules de l'inflammation dans la circulation, les pathologies liées à l'âge et l'expression de gènes clés de l'induction de sénescence comme le locus codant pour *Arf* et *p16* (Jeck, Siebold, et Sharpless 2012; Melzer 2008; Melzer et al. 2007; Johnson et al. 2015). D'autres études ont fait un lien entre le raccourcissement des télomères, responsable de la sénescence réplicative et des pathologies cardiaques (Benetos et al. 2013; D'Mello et al. 2015). Le principal responsable de ce phénomène est la sécrétion du SASP par les cellules sénescentes qui s'accumulent chez les personnes âgées (Fabbri et al. 2015). Une étude sur des souris montre que la transplantation de cellules sénescentes provoque un dysfonctionnement des tissus et réduit l'espérance de vie (M. Xu et al. 2018). En plus de l'effet néfaste de l'inflammation causée par le SASP, la présence de cellules sénescentes dans les tissus empêche leur bonne régénération en limitant la prolifération des cellules souches (Sousa-Victor et al. 2015). Un modèle de souris déficientes pour BubR1 (mitotic checkpoint serine/threonine kinase) montre un vieillissement accéléré et a permis de faire le lien entre sénescence et la mort suite à un vieillissement prématuré (Baker et al. 2004). Dans deux de leurs études, Baker et al montrent que la suppression des cellules sénescentes positives pour p16 dans les tissus vieillissants retarde leur dysfonctionnement et permet d'étendre la durée de vie des organismes (Baker et al. 2011; 2016).

On trouve des marqueurs de sénescence chez les patients atteints de maladies liées au vieillissement illustrées dans la Figure 10, comme dans l'athérosclérose, une pathologie dans laquelle des plaques lipidiques obstruent les artères, entraînant une activation des muscles lisses vasculaires. Les cellules musculaires sont positives pour la SA-βGal, p16 et p21 (J. Wang et al. 2015; Gardner et al. 2015). L'élimination des cellules sénescentes dans cette pathologie a même un effet positif (Childs et al. 2016). Dans le cas de l'arthrose, le vieillissement provoque l'entrée en sénescence des chondrocytes qui arrêtent de sécréter la matrice composant le cartilage et provoquent une inflammation chronique (K. McCulloch, Litherland, et Rai 2017; Price et al. 2002; Billinghurst et al. 1997). Chez les souris, la transplantation de cartilage sénescent dans le genou entraîne l'apparition des symptômes de l'arthrose (Farr et al. 2017). Dans des pathologies comme Alzheimer et Parkinson, on trouve des astrocytes positifs pour p16 et γH2AX en plus grande proportions que chez des sujets sains (J. Cohen et Torres 2019). De plus, un modèle de souris Parkinson a permis de montrer que l'élimination de ces cellules permet de ralentir la progression de la pathologie (Chinta et al. 2018).

Il existe de nombreux autres exemples de pathologies liées au vieillissement en lien avec l'accumulation de cellules sénescentes dans les tissus (pour revue voir (Calcinotto et al. 2019; Di Micco et al. 2021). Les traitements sénolytiques permettent de ralentir la progression de ces pathologies. Ce sujet très intéressant montre la dualité de la sénescence qui permet à la fois de prévenir

l'apparition de pathologies, mais qui est également une cible pour espérer allonger l'espérance de vie des individus vieillissants, ou du moins améliorer leur qualité de vie.

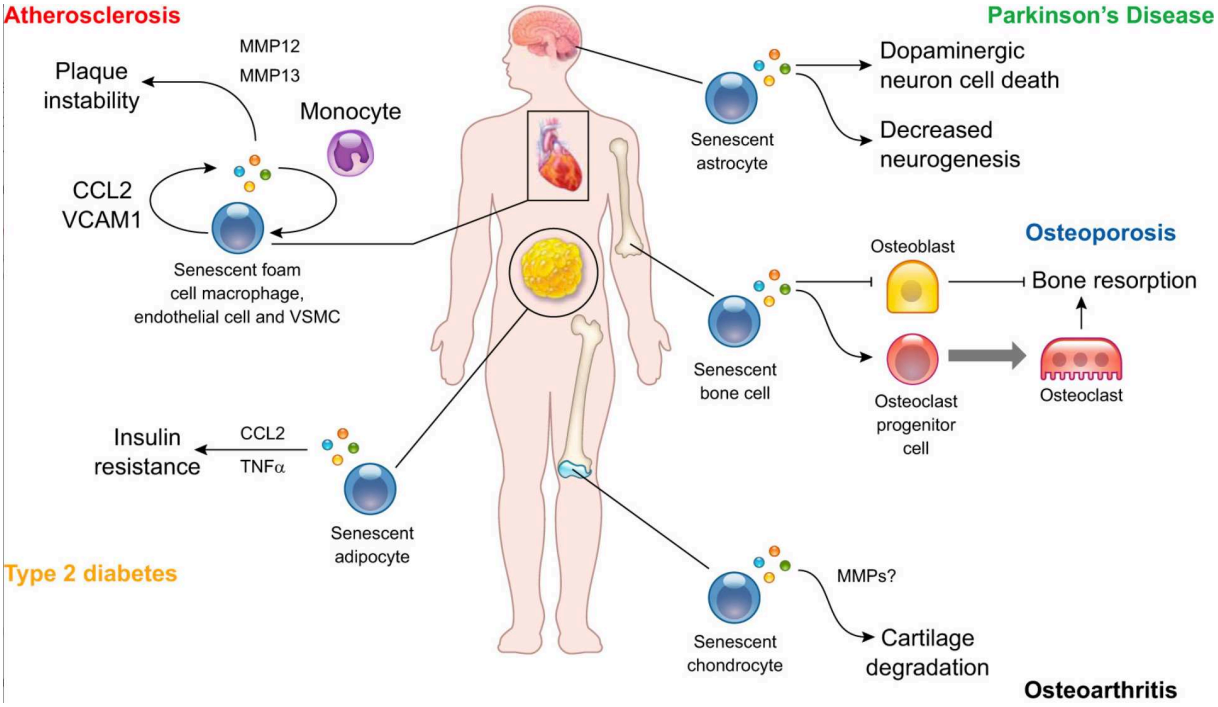


Figure 10 : La sénescence participe au vieillissement. *(Calcinotto 2019) Dans l'athérosclérose, les cellules sénescentes recrutent des monocytes, ce qui provoque l'instabilité des tissus. Dans l'osthéoarthrose les chondrocytes sénescents résident dans les cartilages et empêchent son renouvellement. Dans l'ostéoporose le SASP déséquilibre la balance de synthèse / dégradation des tissus osseux menant à la fragilisation des os. On retrouve également un rôle néfaste des adipocytes sénescents dans la résistance à l'insuline ce qui aggrave le diabète de type 2, et dans la neurodégénérescence avec les astrocytes sénescents.*

6.2.B. L'immunosénescence

L'augmentation de l'espérance de vie est également associée à une plus mauvaise réponse contre les thérapies et une augmentation des risques de rechutes de pathologies (Fane et Weeraratna 2020; Desdín-Micó et al. 2020). Ce phénomène est directement lié à l'immunosénescence, décrit par Roy Walford (Walford 1964). Un bon exemple est celui de la sénescence des lymphocytes T. Leur diminution rend les organismes plus sensibles aux pathogènes et diminue la stimulation par les vaccins (M. J. Yousefzadeh et al. 2021; Ovadya et al. 2018).

La diminution de la quantité de cellules souches hématopoiétiques avec l'âge est responsable de la baisse de production de lymphocytes B et T naïfs (Snoeck 2013), accentué pour les lymphocytes T par la dégénérescence du thymus, organe clé dans leur sélection et différenciation (Andrew et Aspinall 2002). A l'inverse, la proportion de cellules NK augmente (Kyoizumi et al. 2013), même si elles finissent également par entrer en sénescence réplicative avec le raccourcissement de leurs télomères (Gayoso et al. 2011). Concernant les macrophages, le vieillissement s'accompagne d'une diminution de leur capacité à sécréter des cytokines pro-inflammatoires, même si la présence de macrophages sénescents dans l'organisme fait encore débat dans la communauté scientifique (C. Q. Wang et al. 1995; Fuentes et al. 2011). Tous ces éléments font que les cellules sénescentes persistent dans l'organisme, et que la sécrétion du SASP empêche les tissus de fonctionner correctement, de se

régénérer et conduit à une inflammation chronique. De plus, la baisse d'efficacité du système immunitaire avec l'âge réduit l'action de l'immunité innée et provoque la baisse du répertoire des BCR et TCR en circulation dans l'organisme et la diminution de la présentation des antigènes (pour revue voir (Y. Wang et al. 2022). Cette immunosénescence a donc un impact direct sur le phénomène d'immunosurveillance, qui permet normalement à l'organisme de rester en alerte pour l'élimination de ces cellules (Calcinotto et al. 2019).

Le système immunitaire est pourtant un des acteurs clé avec la sénescence dans le combat contre un groupe de pathologie bien connu que sont les cancers. Dans la partie suivante je parlerai du rôle et de l'utilisation de la sénescence dans le cas des cancers.

6.3. La sénescence et les cancers

Dans la partie précédente nous avons vu que la présence transitoire de cellules sénescentes est bénéfique et nécessaire pour la régénération des tissus et la prévention d'apparition de cancers mais que leur présence constitutive est néfaste pour les tissus. Dans cette dernière partie je décrirai dans un premier temps qu'encore une fois les cellules sénescentes peuvent avoir un effet néfaste dans le combat contre les cancers et dans un deuxième temps comment ce processus est devenu une importante cible thérapeutique pour le traitement des patients.

6.3.A. Le rôle parfois néfaste de la sénescence dans un contexte cancéreux

Lors de l'apparition d'un tumeur, les cellules sénescentes ont un rôle très important via la sécrétion du SASP pour recruter des cellules immunitaires infiltrantes comme des cellules NK, des lymphocytes T et des macrophages afin de détruire les cellules tumorales (Di Mitri et Alimonti 2016). Le SASP permet également l'induction de la sénescence sur les cellules voisines, ce qui permet de freiner la croissance tumorale (Calcinotto et al. 2019; Vicente et al. 2016). Mais le SASP est de plus en plus décrit comme une épée à double tranchant. En effet, il existe des cas décrits comme de la sénescence inadaptée, au cours de laquelle le SASP permet la progression tumorale en induisant la prolifération cellulaire et la vascularisation des tumeurs (Coppé et al. 2006; Kuilman et al. 2008; Laberge et al. 2015; Rodier et al. 2009). Dans certains types de cancers, le SASP peut également contenir des facteurs immunosuppressifs, permettant le recrutement de cellules myéloïdes suppressives dans les tumeurs. Cela entraîne une inhibition de la réponse médiée par les lymphocytes T (Jackson et al. 2012). Encore une fois, l'effet du SASP est ici une question de temporalité. Lors des étapes précoces de la tumorigenèse, ce cocktail de cytokines pro-inflammatoires a un rôle bénéfique en induisant la suppression de la tumeur. A l'inverse, la présence de cellules sénescentes dans les stades avancés de la tumeur permet son échappement immunitaire et sa progression comme représenté en Figure 11 (Eggert et al. 2016). Dans le traitement des cancers, les cellules sénescentes et la composition du SASP sont devenus des cibles très importantes afin de permettre une bonne sénolyse (Soto-Gamez et Demaria 2017).

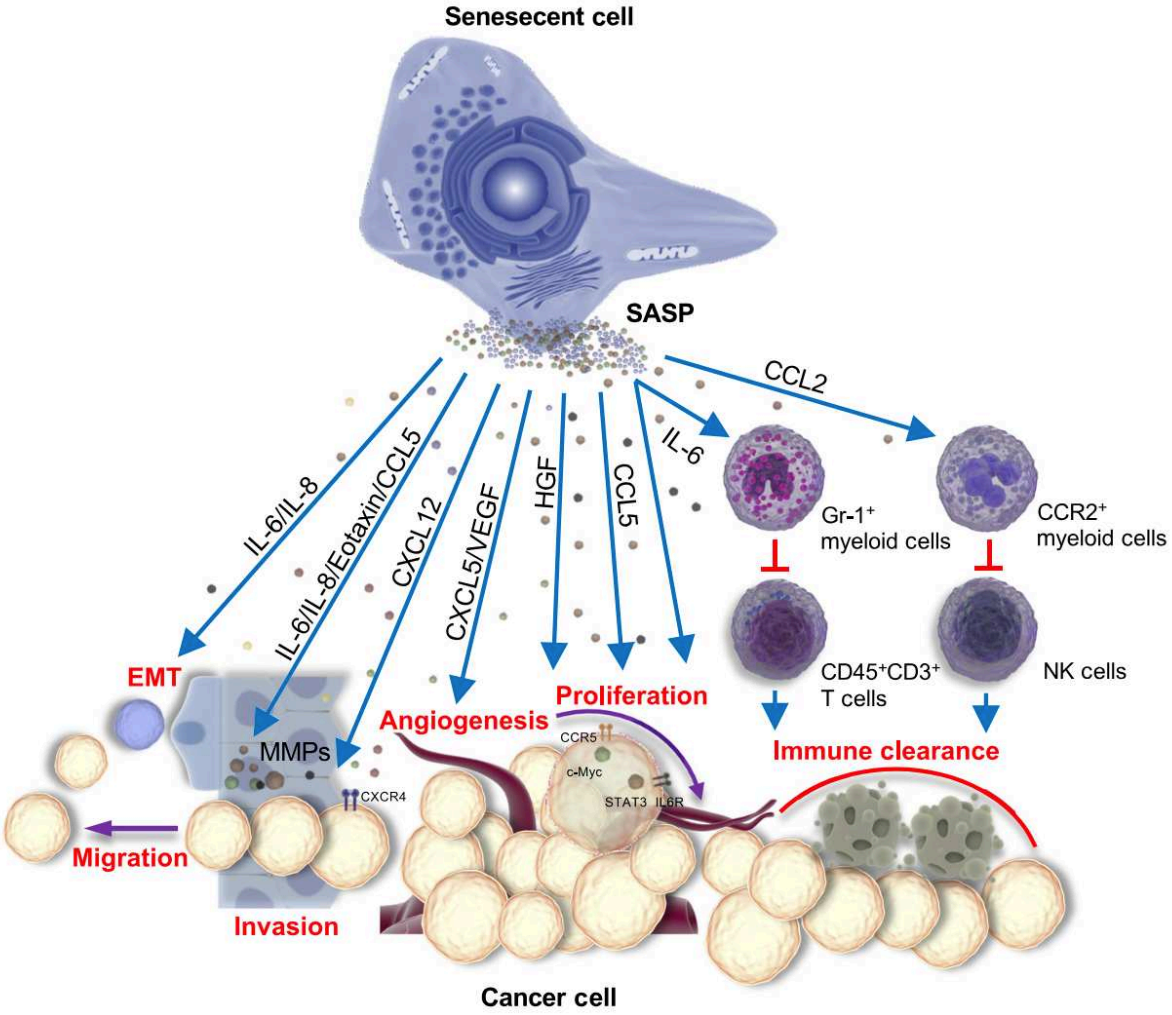


Figure 11 : L'effet pro-tumoral des cellules sénescentes. *(Wang 2020) Le SASP peut permettre aux cellules cancéreuses d'échapper à l'immunité en recrutant des cellules myéloïdes suppressives et en induisant l'angiogenèse dans l'environnement de la tumeur. Le SASP permet également de remodeler la matrice extra-cellulaire, ce qui permet aux cellules cancéreuses de migrer et d'envahir de nouveaux tissus.*

6.3.B. Les thérapies induisant la sénescence

Ce type de traitement nommé TIS ('treatment induced senescence') peut être médié par des molécules pharmacologiques ou des irradiations (Ewald et al. 2010; Poliseno et al. 2010; Alimonti et al. 2010; Fine et al. 2009). Dans ce type de traitement, les cellules cancéreuses sont donc « forcées » à entrer en sénescence suite à l'induction de cassures de l'ADN, ce qui est dépendant de la présence des éléments nécessaires à la réponse aux dommages (d'Adda di Fagagna et al. 2003). D'autres types de TIS ciblent l'inhibition de facteurs du cycle cellulaire comme les CDKs, MDM2, la voie NOTCH, CK2 ou JAK2 qui permettent l'arrêt de la prolifération et l'induction de la sénescence dans des cancers de différents backgrounds génétiques (Revandkar et al. 2016). Un des traitements les plus efficaces dans la catégorie des TIS consiste à bloquer les CDK4 et 6 (pour revue (Calcinotto et al. 2019). Le problème de ces thérapies est leur non-spécificité, ce qui a un impact sur les autres cellules de l'organisme et

provoque d'importants effets secondaires dont le vieillissement prématuré des tissus (Nardella et al. 2011).

Un autre type de traitement appelé thérapie pro-sénescente présentée en Figure 12 permet d'induire la sénescence uniquement chez les cellules cancéreuses, et de le coupler à des mécanismes permettant l'élimination des cellules sénescentes (Nardella et al. 2011). Ces traitements peuvent avoir différentes cibles : (a) inactivation de la télomérase des cellules cancéreuses ; (b) l'utilisation d'inhibiteurs des CDKs pour bloquer leur cycle ; (c) l'activation de p53 ; (d) supprimer les cellules myéloïdes suppressives circulantes ; (e) remodeler le SASP pour supprimer ses effets protumoraux (pour revue (Calcinotto et al. 2019). Suite à l'induction de sénescence ciblée pour les cellules cancéreuses, la suite du traitement consiste à les éliminer. Comme mentionné précédemment, les cellules sénescentes sont résistantes à l'apoptose et à l'autophagie. L'utilisation d'inhibiteurs de la famille des Bcl-2 permet donc d'améliorer l'élimination de ces cellules (Yosef et al. 2016; Timucin, Basaga, et Kutuk 2019).

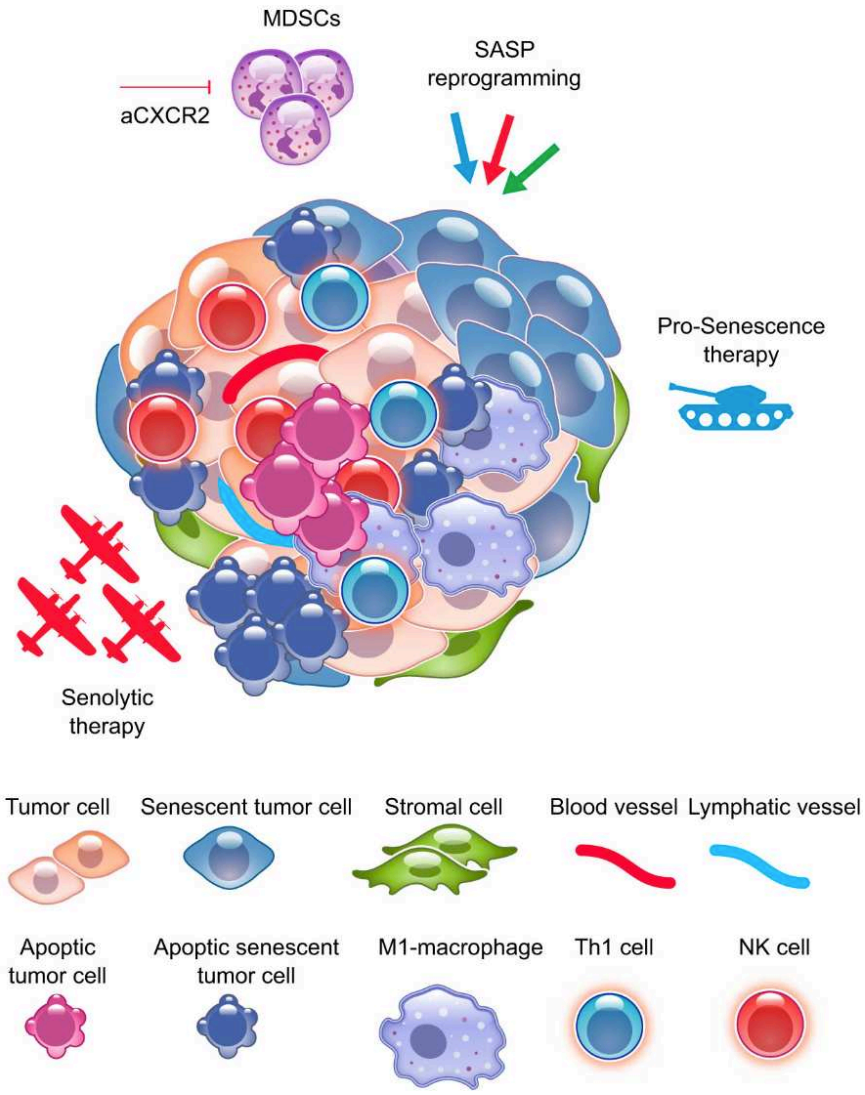


Figure 12 : Traitement "two-punch" des cellules cancéreuses. (Calcinotto 2019) La première étape consiste à induire la sénescence des cellules cancéreuses et remodeler le SASP pour éviter ses effets indésirables et le recrutement de cellules immunosuppressives. Le traitement sénolytique permet ensuite d'éliminer rapidement les cellules tumorales

Chapitre 2 : La structure de la chromatine et la réparation de ses cassures

Au sein du noyau de chaque cellule du corps humain se trouvent 2 mètres d'ADN, correspondant aux 3 milliards de paires de bases du génome humain (International Human Genome Sequencing Consortium 2004). Les molécules d'ADN chargées négativement s'associent avec des protéines chargées positivement, les histones, qui assurent la compaction de l'ADN au sein de l'espace restreint du noyau. Cette organisation en une structure nommée chromatine permet également de réguler l'accessibilité et l'expression des gènes. Dans ce chapitre je détaillerai la structure et la dynamique de la chromatine et les phénomènes de détection des cassures et de réparation touchant la chromatine.

1. La structure de la chromatine

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, un complexe d'ADN et de protéines histones, qui fait l'objet du paragraphe suivant et est représenté en figure 13 (Kornberg 1974). Nous verrons dans cette partie que l'octamère d'histones peut être constitué de différents variants d'histones en fonction des besoins de la cellule et de la phase du cycle cellulaire (Maze et al. 2014). L'incorporation de variants spécifiques et/ou la modification post-traductionnelle des histones sont 2 des mécanismes majeurs permettant de réguler la structure de la chromatine et l'expression génique (Karolin Luger, Dechassa, et Tremethick 2012).

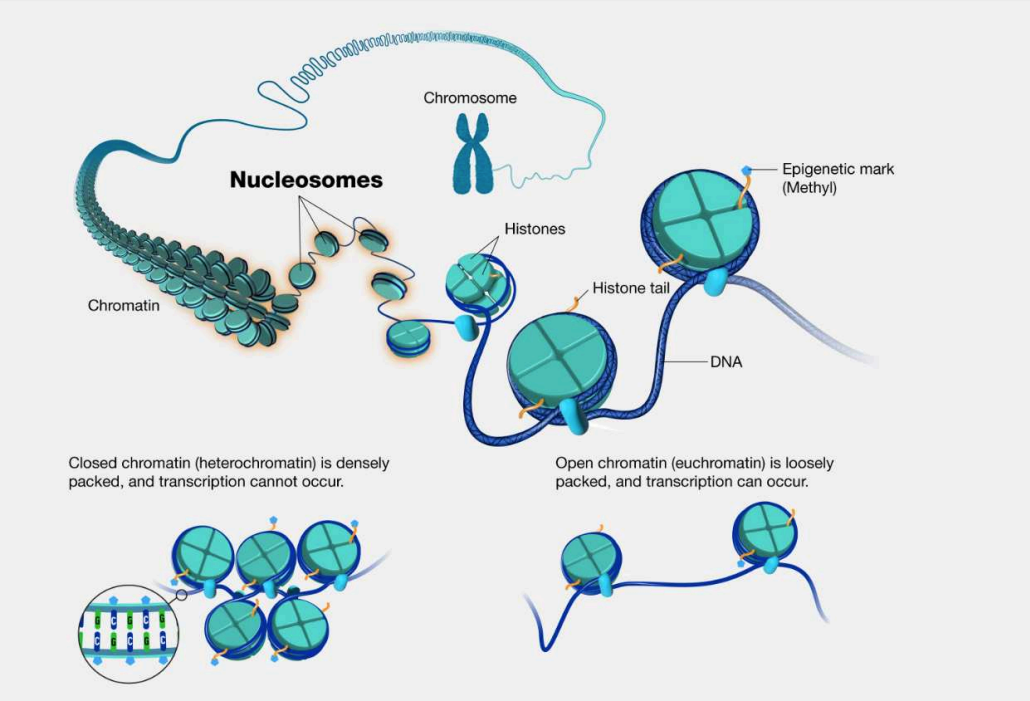


***Figure 13 : L'organisation du génome eucaryote (National Human Genome Research Institute 2024)**. La double hélice d'ADN est enroulée autour d'octamères d'histones pour former un noyau nucléosomique. Ce noyau et les séquences d'ADN internucléosomales*

forment l'unité de base de la chromatine, le nucléosome. La répétition de ces nucléosomes forme la fibre de chromatine qui après d'autres niveaux de compaction forme le chromosome. Cette chromatine, en fonction des marques épigénétiques des histones et d'autres protéines est plus ou moins condensée.

1.1. Le nucléosome, unité de base de la chromatine

Le nucléosome contient une particule cœur, correspondant à l'octamère d'histones et l'ADN enroulé autour, et les séquences d'ADN internucléosomales de part et d'autre de cette particule cœur. Alors que la longueur d'ADN enroulé autour des histones est toujours de 147 paires de bases, la longueur des segments internucléosomaux varie en fonction des espèces, du type cellulaire et de la compaction de la chromatine (Kornberg 1974). L'octamère d'histones se compose d'un tétramère $(H3\text{-}H4)_2$ central assemblé avec deux dimères H2A-H2B. L'ajout d'histones de liaison, H1 ou H5, permet d'obtenir des niveaux d'organisation supérieurs de la chromatine. Le complexe formé par l'histone H1 et le noyau nucléosomique est appelé chromatosome (Simpson 1978).

1.1.A. Les protéines histones

Les histones de cœur, c'est-à-dire incorporées dans le noyau nucléosomique, sont de petites protéines d'environ 15kDa chargées positivement, ce qui leur permet d'interagir avec la double hélice d'ADN chargée négativement. Celles de liaison, non intégrées dans la particule cœur sont un peu plus grosses, aux environs de 25-30 kDa. Les histones sont classées en 5 classes : l'histone de liaison H1 et les 4 histones cœurs H2A, H2B, H3, H4 qui sont très conservés au sein des eucaryotes (Schalch et Steiner 2017). Ces histones cœur sont composées de 3 domaines principaux : un domaine central globulaire composée de trois hélices alpha permettant la formation de dimères, et des extrémités N- et C-terminales désorganisées (aussi appelées "queues des histones") riches en arginines et lysines (K. Luger et al. 1997). Leur incorporation dans la chromatine se fait sous forme de dimères, H3-H4 ou H2A-H2B et est médiée par des protéines appelées chaperons d'histones (Berger 2023). Les domaines globulaires contiennent les acides aminés chargés positivement qui permettent la liaison de ce domaine à la molécule d'ADN (K. Luger et Richmond 1998a). Lors de la formation du nucléosome, le tétramère (H3-H4)2 est incorporé en premier, suivi du recrutement de 2 dimères H21-H2B. Après formation du cœur nucléosomique, l'histone de liaison H1 assure la formation du chromatosome comme représenté en figure 14 (K. Luger et al. 1997; Ramakrishnan 1997).

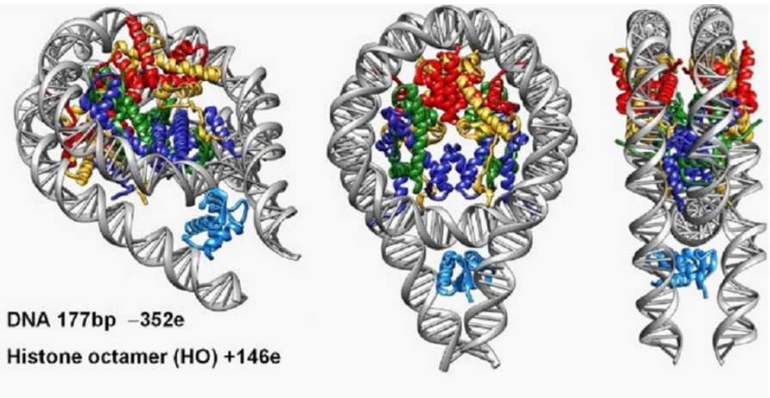


Figure 14 : Représentation de la structure du chromatosome avec les domaines globulaires des histones (Wang 2001). *La double hélice d'ADN est représentée en gris, l'histone de liaison H1 en bleu ciel et l'octamère d'histones en couleurs avec*

H2A=jaune ; H2B=rouge ; H3=bleu ; H4=vert. La structure comprend 177 paires de bases d'ADN ayant au total une charge élémentaire négative de -352e. Cette charge négative permet son interaction avec l'octamère d'histones chargé positivement.

A l'inverse, les queues d'histones sont libres à l'extérieur du noyau nucléosomique et sont accessibles à différentes enzymes, ce qui permet leur modification post-traductionnelle (K. Luger et Richmond 1998b). Ces queues d'histones sont majoritairement localisées en N-terminal de la protéine, même si des petites peuvent également se trouver en C-terminal comme montré en figure 15. Bien que son nom porte à confusion, l'histone H1 a une structure très différente que je n'aborderai pas (pour revue voir Brockers et Schneider 2019). Son rôle consiste à stabiliser les nucléosomes et permet l'organisation de la chromatine en structures d'ordre supérieur en formant des chromatosomes, représentés en figure 14. Elle contient toutefois également un domaine globulaire qui permet sa liaison avec l'ADN (Cutter et Hayes 2017).

1.1.B. La condensation de la chromatine

La fibre nucléosomale correspond à la succession de nucléosomes et forme le premier niveau de compaction en « collier de perles » dont le diamètre est de 11nm (Kornberg 1974). Les nucléosomes sont des structures très dynamiques et les histones qui les composent sont échangées/évincées pour permettre leur remodelage . J'aborderai le rôle des remodeleurs de la chromatine et des chaperons d'histones dans ce processus dans la partie 2. Cette structure en collier de perles subit des niveaux de compaction supérieurs, ce qui aboutit à l'obtention de la forme la plus compacte qu'est le chromosome et que l'on retrouve au moment de la mitose (Tyagi et al. 2016). La fibre nucléosomale se condense grâce à des interactions désordonnées entre les nucléosomes (Ghosh et Meyer 2021; Banigan et Mirny 2020). Des protéines nommées cohésines permettent également la formation de boucles de chromatine (Hoencamp et Rowland 2023). Malgré la taille très petite du noyau des cellules en comparaison de la taille d'ADN qui s'y trouve, la chromatine est organisée en compartiments, dont certains sont associés avec la lamine nucléaire (pour revue Wong, Melendez-Perez, et Reddy 2022). En fonction du type cellulaire et de son environnement, cette organisation varie fortement et est très dynamique. On distingue alors des compartiments correspondant à des domaines lâches et actifs pour la transcription nommés euchromatine et d'autres compactés et silencieux nommés hétérochromatine (Lieberman-Aiden et al. 2009). Ces deux types de structures seront détaillées dans les parties suivantes. Lors de la mitose, l'organisation de la chromatine est bouleversée et des condensines / topoisomérases permettent d'obtenir une compaction très importante afin d'assurer la bonne séparation du matériel génétique dans les cellules filles (Gibcus et al. 2018).

1.1.C. L'information épigénétique et les modifications post-traductionnelles des histones

Les organismes complexes possèdent des types cellulaires très variés, ayant une grande diversité de morphologies et de fonctions. Pourtant l'ADN de chacune d'entre elles est identique et contient les mêmes gènes. Cette diversité s'explique par une expression différentielle des gènes d'un type cellulaire à un autre. L'étude des molécules et mécanismes qui peuvent perpétuer des états alternatifs de l'expression des gènes dans le contexte d'une même séquence d'ADN constitue le domaine de l'épigénétique (Cavalli et Heard 2019). Ainsi, la chromatine est le support d'une

information épigénétique dont un ensemble de modifications permet la régulation de l'expression des gènes comme montré en figure 16, parmi lesquels on trouve : (a) la méthylation de l'ADN, (b) les modifications post-traductionnelles des histones, (c) la nature des variants d'histones qui composent les nucléosomes, (d) l'interaction d'ARN non codants avec la chromatine et (e) la localisation de la chromatine dans le noyau. En ce qui concerne les variants d'histones il est important de différencier les variants dits canoniques, dont l'incorporation est dépendante de la synthèse d'ADN, et les variants de remplacement qui peuvent être incorporés de façon indépendante de la synthèse d'ADN (Biterge et Schneider 2014). Dans le cas de l'histones H3, les variants canoniques H3.1 et H3.2 sont exprimés fortement lors de la phase S du cycle cellulaire. Les variants de remplacement (H3.3, H3.3, H3.5, CENP-A, H3.Y1 et H3.Y2) sont exprimés tout au long du cycle cellulaire afin d'être disponibles pour leur incorporation dans n'importe quelle phase du cycle (Ray-Gallet et al. 2011; Ding et al. 2021). Je n'entrerai pas dans les détails des variants de chaque famille d'histones, pour revue sur les histones des primates et hominidés voir (Ding et al. 2021). Ces variants sont essentiels car la chromatine étant une structure très dynamique, son intégrité doit être préservée dans des cellules non cyclantes ou ayant leur cycle interrompu à cause de différents types de stress (Berger 2023). Les différences de séquences, parfois très minimes entre les variants d'histones sont représentées en figure 15.

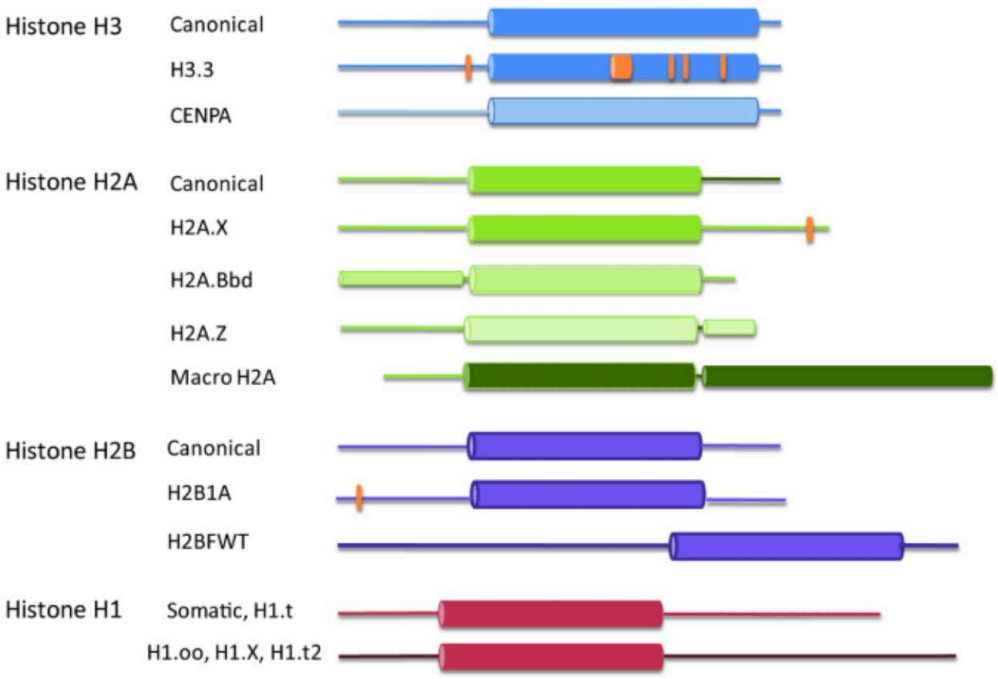


Figure 15 : Les différents variants d'histones (Arnaudo 2011). *Toutes les histones ont un domaine conservé représenté par les cylindres. Au sein d'une même famille, les variants peuvent n'avoir que quelques acides aminés de différence avec l'histone canonique. Les parties C-Terminales et N-terminales sont plus variables, et codent notamment pour les queues d'histones. Les traits oranges montrent les variations de séquence au sein d'une même famille.*

Je ne détaillerai pas l'implication des ARNs non-codants et de l'organisation en 3D de la chromatine sur la régulation de l'expression des gènes, pour revue voir (Probst, Dunleavy, et Almouzni 2009; Allis et Jenuwein 2016). Les marques épigénétiques sont très dynamiques et peuvent changer dans une

même cellule en fonction du cycle de celle-ci (Klemm, Shipony, et Greenleaf 2019). Il est donc très important que la cellule puisse réguler le dépôt et la conservation des marques épigénétiques. Cela est possible car lors de la synthèse d'ADN ou de la réparation de dommages, une partie des histones évincées est réincorporée avec leur PTMs ('post-translationnal modifications') dans la chromatine après synthèse / réparation. Le recyclage des histones parentales permet la conservation des marques épigénétiques et sert de modèle pour le dépôt des marques sur les histones néosynthétisées incorporées lors de la synthèse de l'ADN (Alabert et al. 2015). De même, si les histones parentales et leurs PTMs ne sont pas recyclées lors de dommages à l'ADN, le profil épigénétique de la zone concernée change et cela altère l'expression des gènes (Dabin, Fortuny, et Polo 2016).

L'établissement de ces marques permet d'activer ou de réprimer l'expression des gènes en fonction des besoins de la cellule. De plus, elles ont un rôle de « mémoire » dans l'expression de certains gènes. Cette notion de mémoire est par exemple visible lors de l'activation d'une réponse interféron, une cellule exprime des gènes cibles de cette molécule afin de répondre au stress d'origine comme une infection microbienne et permet de garder une forme de mémoire épigénétique sur ces gènes (Kamada et al. 2018). En effet il a été montré dans plusieurs études que le dépôt de marques épigénétiques permet d'induire une réponse plus efficace en cas de restimulation (pour revue voir Barrat, Crow, et Ivashkiv 2019; Ivashkiv 2018; K. Chen, Liu, et Cao 2017)

Au niveau de la structure, cela a pour incidence de décondenser la chromatine pour la rendre accessible ou au contraire de condenser les zones contenant des gènes ne devant pas être exprimés. Ce sont ces 2 formes de chromatine qui seront détaillées dans les parties suivantes.

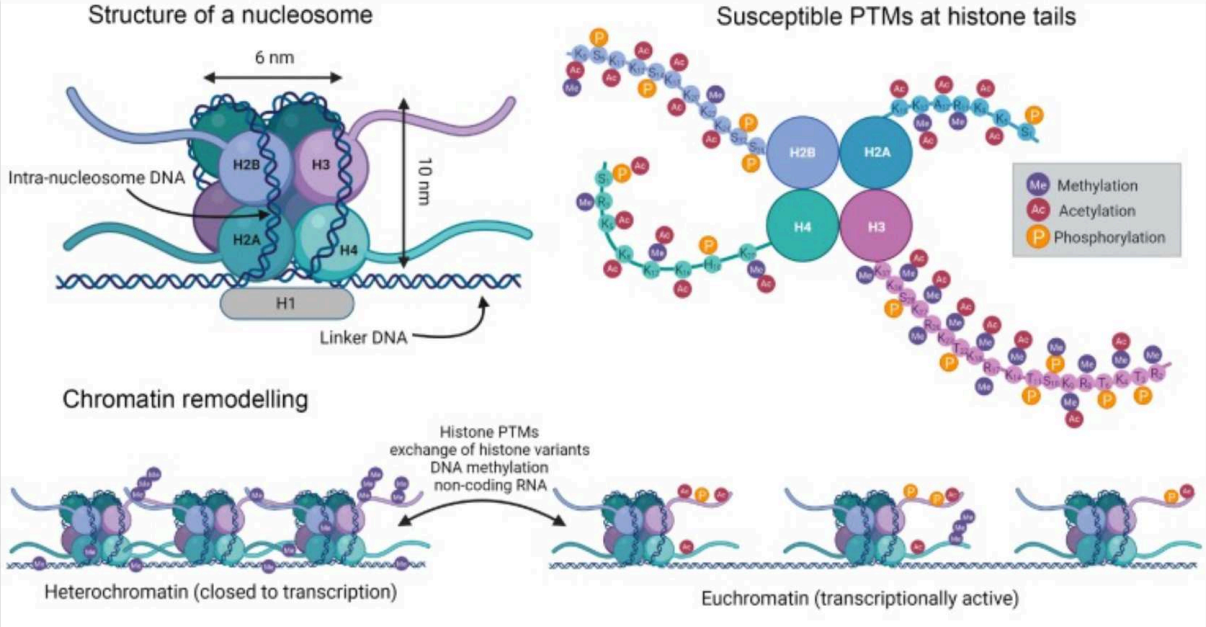


***Figure 16 : Les modifications post-traductionnelles des histones (Torres-Perez 2021)**. En plus de la nature des histones incorporées, ces dernières sont la cible de modifications jouant le rôle de marques épigénétiques. Ces marques influent sur la stabilité des histones et donc sur la condensation de la chromatine. Ces marques attirent des remodeleurs de la chromatine, induisant la compaction ou décompaction de la fibre, en fonction des besoins de la cellule.*

1.2. L'euchromatine

Cette forme dite « ouverte » de la chromatine permet la transcription des gènes qui s'y trouvent. Cette forme est localisée dans l'interphase du noyau contrairement à l'hétérochromatine que l'on trouve au niveau de la périphérie et du centre du noyau (Morrison et Thakur 2021). Au niveau de sa structure, les nucléosomes sont espacés, et positionnés avec précision pour que les séquences régulatrices et d'initiation de transcription soient bien accessibles (Radman-Livaja et Rando 2010; Shivaswamy et al. 2008). Parmi les éléments présents dans l'euchromatine on trouve des promoteurs de gènes qui peuvent contenir une zone dite dépourvue de nucléosomes. Cette zone est en fait composée de nucléosomes très dynamiques qui sont rapidement évincés et réassemblés (Tserel et al. 2010; Jin et al. 2009). Dans l'euchromatine on trouve également des 'enhancers', des séquences non codantes qui permettent d'activer les promoteurs des gènes. Ces enhancers parfois distants des séquences cibles, ou avec une orientation différente (Birnbaum et al. 2012) peuvent coder pour de longs ARN non codants (Lai et al. 2013) ou être mis en contact avec les promoteurs via la formation de boucles dans la fibre de chromatine (Wijgerde, Grosveld, et Fraser 1995).

Au niveau épigénétique, l'euchromatine est généralement hyperacétylée grâce aux HATs (pour 'histone acetyltransferase'), ce qui permet sa décondensation (Armstrong et Emerson 1998). Elle contient également des variants d'histones particuliers. Parmi eux on trouve H2A.Z, une histone incorporée indépendamment de la synthèse d'ADN (M. Adam et al. 2001; Mizuguchi et al. 2004), et H2A.Bbd (pour 'Barr body deficient'). Ce dernier tire son nom du fait qu'il est absent du chromosome X inactivé chez les femmes, formant le corpuscule de Barr. Un autre variant retrouvé dans les zones actives pour la transcription est l'histone de remplacement H3.3 (P. Chen et al. 2013), qui en fonction de ses modifications post-traductionnelles et du chaperon qui la prend en charge peut également être associé à l'hétérochromatine (C.-M. Chow et al. 2005; Ray-Gallet et al. 2002; Lewis et al. 2010). Je détaillerai le rôle des chaperons d'histones, des protéines chargées de transporter et déposer les histones dans la chromatine dans la partie 2 de ce chapitre. Les modifications post-traductionnelles des histones sont localisées majoritairement sur leur domaine N-terminal non structuré (queue d'histone), principalement sur des acides aminés lysines, mais également sur des sérines ou des arginines (Morrison et Thakur 2021). L'acétylation des lysines est associée à la transcription comme par exemple l'acétylation de la lysine 27 de l'histone H3 notée H3K27ac et médié par les HATs (K. K. Lee et Workman 2007). Une autre modification majeure, la méthylation, a un rôle plus compliqué car en fonction de la position de la lysine concernée par cette marque, cela peut avoir des effets pro ou anti-transcriptionnels (Y. Li, Chen, et Lu 2021). En ce qui concerne les marques de méthylation corrélées à la transcription on trouve deux tri-méthylations déposées par des enzymes nommées méthyltransférases : H3K4me3 au niveau des promoteurs et H3K36me3 dans le corps des gènes actifs (Sugeedha, Gautam, et Tyagi 2021). Ces différentes marques sur la chromatine permettent le recrutement entre autre des ARN polymérases afin d'initier la transcription des gènes (Berger 2023).

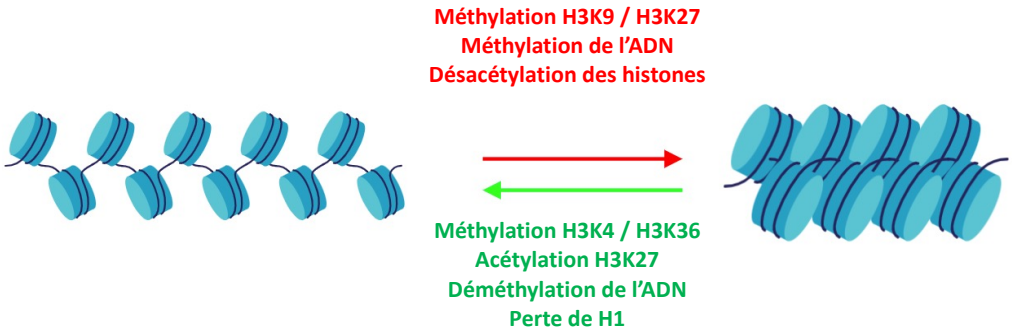


Figure 17 : Modification de la condensation de la chromatine (adapté de Biterge 2016). *En plus de l'incorporation de variants spécifiques, la chromatine subit des modifications post-traductionnelles qui influent sa compaction ou décompaction.*

1.3. L'hétérochromatine

Les gènes exprimés dans une cellule représentent une minorité de son génome total. La majeure partie de la chromatine d'une cellule est donc plus condensée et forme de l'hétérochromatine, ce qui a été observé pour la première fois par Emil Heitz en 1928 (Passarge 1979). Contrairement à l'euchromatine, cette forme condensée tout au long du cycle cellulaire est localisée autour des nucléoles ou en périphérie du noyau, associée à la lamine et formant les LADs (pour 'lamin associated domain') (Morrison et Thakur 2021). L'autre grande différence avec l'euchromatine est l'organisation des nucléosomes. Comme expliqué ci-dessus, les nucléosomes de l'euchromatine ont des positions spécifiques permettant la liaison de la machinerie de transcription. En ce qui concerne l'hétérochromatine, le positionnement des nucléosomes est beaucoup plus aléatoire (Mermoud, Rowbotham, et Varga-Weisz 2011). La condensation de la chromatine est un phénomène réversible et qui s'adapte aux besoins de la cellule (représenté en figure 17). On distingue donc 2 types d'hétérochromatine que je vais détailler ci-dessous.

1.3.A. L'hétérochromatine facultative

Ce premier type d'hétérochromatine n'est pas figé et concerne des régions dont l'expression doit être réprimée à certains stades de la vie de la cellule. En fonction du développement ou de la différenciation, ces zones peuvent redevenir actives (Trojer et Reinberg 2007). De ce fait, chaque cellule d'un individu à un profil d'hétérochromatine constitutive très différent. Ce type de chromatine est cependant présent chez toutes les femmes car c'est le devenir du chromosome X inactivé, qui est en grande partie hétérochromatinisé (J. C. Chow et Brown 2003).

Comme pour l'euchromatine, ces régions comportent des marques épigénétiques spécifiques comme le variant d'histone MacroH2A et les modifications d'histones H3K27me3, H3K9me2 ainsi qu'une absence d'acétylation (Grewal 2023). Ces marques répressives pour la transcription sont principalement déposées par des complexes protéiques du groupe polycomb (PcG) (R. L. McCarthy, Zhang, et Zaret 2023). Cette famille contient entre autres PRC1 qui apporte la modification H2AK119Ub1 (de Napoles et al. 2004; H. Wang et al. 2004) et PRC2 (pour 'polycomb reppressive

complex') qui dépose H3K27me3 (Margueron et Reinberg 2011). D'autres acteurs permettent le silencing de ces régions comme des ARNs non codants ou la formation de boucles via les répresseurs transcriptionnels CTCF ('CCCTC-binding factor') qui s'assemblent en homodimères après liaison au génome (pour revue respectivement (Grimaud et al. 2006; Ong et Corces 2014). L'ensemble de ces mécanismes répresseurs permet toutefois la réversion de cette répression contrairement à l'autre type d'hétérochromatine, dit constitutif (Grewal 2023).

1.3.B L'hétérochromatine constitutive

Les zones concernées par ce type de chromatine sont majoritairement dépourvues de gènes. Ce sont des séquences répétées, les régions péri-centromériques, péri-télomériques et des éléments transposables (Marsano et Dimitri 2022). Les séquences répétées représentant environ 50% du génome, cette forme permet donc d'empêcher la rétrotransposition des éléments transposables (Haws et al. 2022) et joue également un rôle structural car cette condensation des régions péri-centromériques permet d'éviter des accidents lors de la séparation des chromatides (Bernard et al. 2001). A l'inverse de l'hétérochromatine facultative, les cellules ont toutes un profil d'hétérochromatine constitutive similaire, qui persiste durant toute la vie de l'individu (Morrison et Thakur 2021).

La formation de l'hétérochromatine constitutive est donc couplée à la répression des séquences répétées, ce qui fait intervenir plusieurs mécanismes. Parmi eux, les protéines contenant un domaine KRAB avec doigts de zinc, appelées KRAB-containing zinc finger (KRAB pour 'Kruppel-associated box'). Les protéines comportant ce domaine agissent comme des facteurs de répression au niveau des séquences similaires aux LTRs (Long terminal repeat') en recrutant des déacétylases et des méthylases de l'ADN, les histones méthyltransférases SETDB1 ('SET domaine bifurcated histone lysine 1 methyltransferase 1') et HP1 (Stamidis et Żylicz 2023). Des ARN non codants permettent également le recrutement, par complémentarité avec les transcrits des rétroéléments, d'ADN méthyltransférases (Castillo-Aguilera et al. 2017). La répression et formation d'hétérochromatine peut également se faire grâce aux transcrits des éléments transposables. Les ARNm en formation sont marqués par une modification particulière nommée m6A. Cette modification permet la dégradation de l'ARN et sert également à recruter le complexe de méthyltransférase SETDB1-TRIM28 afin de déposer la marque H3K9me3 sur les nucléosomes. Ce recrutement est dépendant de METTL3 (pour 'methyltranferase like 3'), une des responsables de la méthylation m6A de l'ARN (Stamidis et Żylicz 2023). Chez l'Homme, un complexe protéique nommé HUSH (pour 'human silencing complex') permet également la mise en place de l'hétérochromatine. Les sous-unités TASOR ('Transcription activation supresor') et périphiline du complexe HUSH possèdent un domaine de à l'ARN, ce qui leur permet de se fixer à un ARN de LINE1 en cours de synthèse (Castello et al. 2012; Prigozhin et al. 2020). Cette fixation permet le recrutement de SETDB1-ATF7IP (pour 'activating transcription factor 7-interacting protein 1'), et la triméthylation de H3K9 (Stamidis et Żylicz 2023). La sous-unité MPP8 (pour 'M-phase phosphoprotein 8') de HUSH étant capable de se lier à la marque H3K9me3, cela permet la coopération HUSH-SETDB1 pour hétérochromatiniser la zone concernée (Douse et al. 2020; Tchasovnikarova et al. 2015; Timms

et al. 2016). Dans les régions centromériques et péricentromériques, c'est la méthyltransférase SUV39H1 qui est majoritairement recrutée, possiblement via ZNF512 et ZNF512B (Ma et al. 2024) et permet le dépôt de la marque H3K9me3 ainsi que le recrutement de HP1 (Padeken, Methot, et Gasser 2022).

Ces différentes formes de chromatines sont donc nécessaires au bon fonctionnement de la cellule. En plus des modifications post-traductionnelles, la composition des nucléosomes joue un rôle clé dans cette architecture. La prochaine partie décrit plus précisément le rôle et la variété des chaperons d'histones, essentiels pour assurer l'incorporation d'histones spécifiques dans des régions particulières de la chromatine.

2. La chromatine et les chaperons d'histones

Une fois incorporées dans la chromatine, les histones jouent un rôle essentiel pour moduler la structure de la chromatine et l'expression des gènes. L'incorporation des histones est dépendante de nombreux complexes appelés chaperons d'histones. Il existe de nombreux complexes différents, spécifiques ou non de certains variants et des zones d'incorporations concernées. Dans cette partie j'introduirai la notion de chaperons d'histones et je détaillerai le rôle de DAXX-ATRX (pour 'death domain-associated protein' et 'alpha thalassemia/mental retardation X-linked') et HIRA, deux complexes chaperons d'histones ayant un lien très étroit avec les PML NBs.

2 .1 Les chaperons d'histones

La synthèse des histones, comme toute protéine, se fait dans le cytoplasme des cellules, et nécessite donc leur acheminement dans le noyau puis leur incorporation dans la chromatine. Cela est possible grâce à des complexes protéiques nommés chaperons qui sont participent au stockage, transport, modifications post-traductionnelles et recyclage des histones (Hammond et al. 2017). Leur variété fait que leur seul point commun est la capacité à lier les histones car ces complexes partagent très peu d'homologie de séquence et de fonctions (Martire et Banaszynski 2020). Leur rôle est essentiel car ils doivent assurer l'incorporation et le recyclage des différents variants d'histones de façon coordonnée avec le cycle cellulaire, la dynamique de la chromatine et la gestion des stress comme représenté en figure 18 (Venkatesh et Workman 2015; Alabert et Groth 2012; S. Adam, Dabin, et Polo 2015; Annunziato 2013; Gurard-Levin, Quivy, et Almouzni 2014). Des manquements dans l'incorporation des histones peuvent être à l'origine de problèmes de réplication de l'ADN (Mejlvang et al. 2014), de structure des régions télomériques (O'Sullivan et al. 2014) et centromériques (Müller et Almouzni 2014; Heun et al. 2006; Lacoste et al. 2014) et d'instabilité génomique (Meeks-Wagner et Hartwell 1986)

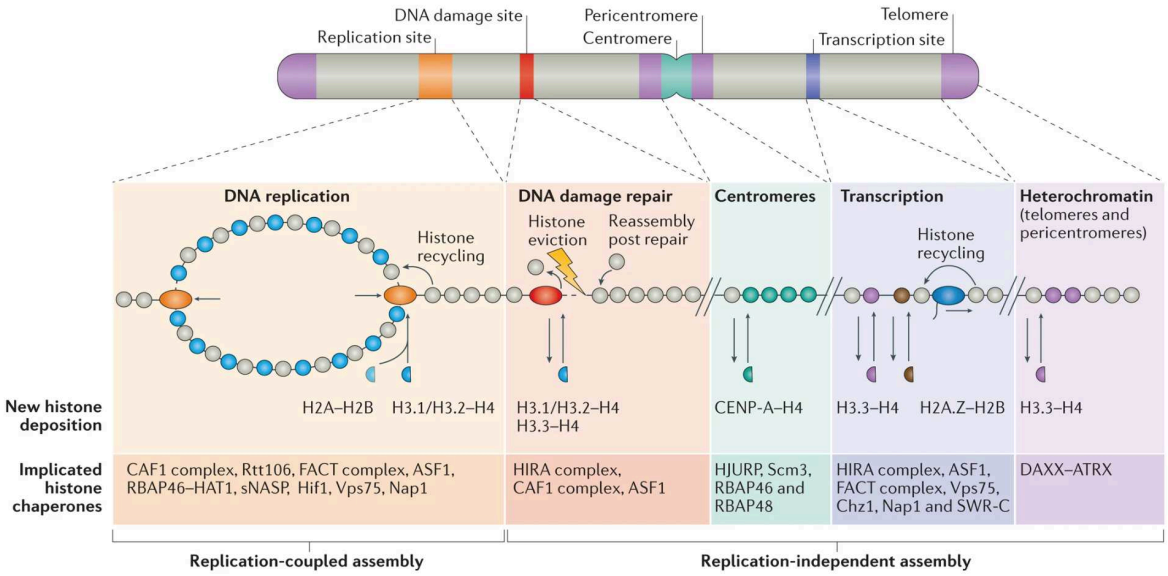


Figure 18 : Les domaines d'action des chaperons d'histones (Hammond 2017)*. Selon la zone de chromatine et le mécanisme concerné, un variant d'histone peut être apporté par plusieurs chaperons différents. Certains chaperons, en plus de l'incorporation d'histones nouvellement synthétisées, peuvent également réincorporer des histones parentales, ce qui est appelé recyclage d'histones.*

Les histones H2A et H2B sont pris en charge et incorporées dans la chromatine grâce aux chaperons NAP1 (pour 'nucleosome assembly protein 1') (Mosammaparast, Ewart, et Pemberton 2002), FACT (pour 'facilitates chromatin transcription') (Orphanides et al. 1998) et ANP32E (pour 'acidic nuclear phosphoprotein 32 family member E') (Obri et al. 2014). Les histones H3-H4 sont quant à elles prises en charge par ASF1 (pour 'anti-silencing function1A histone chaperone) (Mousson et al. 2005), CAF-1 (pour 'chromatin assembly factor 1') (Smith et Stillman 1989), DAXX-ATRX et HIRA. Je ne détaillerai pas le rôle de tous ces chaperons et leurs mécanismes d'action, pour revue voir (Hammond et al. 2017; Martire et Banaszynski 2020). Les PML NBs ayant un rôle central dans mes travaux, je détaillerai dans les parties suivantes les rôles de DAXX-ATRX et HIRA, des protéines clientes de ces corps nucléaires (Corpet et al. 2020). Ces 2 chaperons prennent en charge le même variant d'histone H3.3 comme représenté en figure 19, une histone de remplacement incorporée de façon indépendante de la synthèse d'ADN (Ahmad et Henikoff 2002).

2.2. Le chaperon ATRX-DAXX

Avant d'être associé à ce chaperon, l'histone H3.3 est pris en charge par le chaperon d'histones ASF1, qui l'amène au complexe de dépôt (Alvarez et al. 2011). ATRX-DAXX permet ensuite l'incorporation d'H3.3 dans les régions d'hétérochromatine, surtout au niveau des télomères et des régions péri-centromériques même s'il semblerait qu'en absence de ATRX-DAXX, le chaperon HIRA puisse compenser en incorporant H3.3 dans les régions télomériques (Clatterbuck Soper et Meltzer 2023). L'étude de Law et al montre qu'ATRX interagit avec les G-quadruplexes et la marque H3K9me3, ce qui permet au complexe de cibler ces zones d'hétérochromatine (Law et al. 2010; Iwase et al. 2011). De plus, des expériences de ChIP ont mis en évidence la localisation de ATRX-DAXX sur les séquences TTAGGG des télomères (Goldberg et al. 2010). Ce chaperon est donc relié à des problématiques de

cancer puisque la perte de ATRX ou de DAXX est fortement corrélée avec un dérèglement de la gestion des télomères et donc le syndrome ALT (Heaphy et al. 2011; Lovejoy et al. 2012; Bower et al. 2012). L''interaction entre les 2 protéines se fait grâce au domaine 4HB de DAXX et un petit motif au centre de ATRX (Hoelper et al. 2017; Tang et al. 2004).

Ce complexe chaperon d'histones est enrichi dans les PML NBs (Ishov et al. 1999; Xue et al. 2003). Le recrutement de ce complexe dans les corps nucléaires est possible grâce aux motifs SIM de DAXX, qui interagissent avec les groupements SUMO sur les protéines PML (Santiago et al. 2009; D.-Y. Lin et al. 2006). ATRX ne possède pas de domaine d'interaction avec PML et son recrutement est permis uniquement grâce à son association avec DAXX (Tang et al. 2004). Comme décrit dans le chapitre 1, les PML NBs sont un réservoir de dimères H3.3-H4, ce qui permet aux chaperons de s'y lier dans les corps nucléaires (Delbarre et al. 2013). Je ne donnerai pas plus de détails sur ce chaperon, car celui qui m'intéresse dans mes travaux est l'autre chaperon de H3.3, le complexe chaperon HIRA. Pour en savoir plus sur ATRX-DAXX, voir la revue (Clatterbuck Soper et Meltzer 2023).

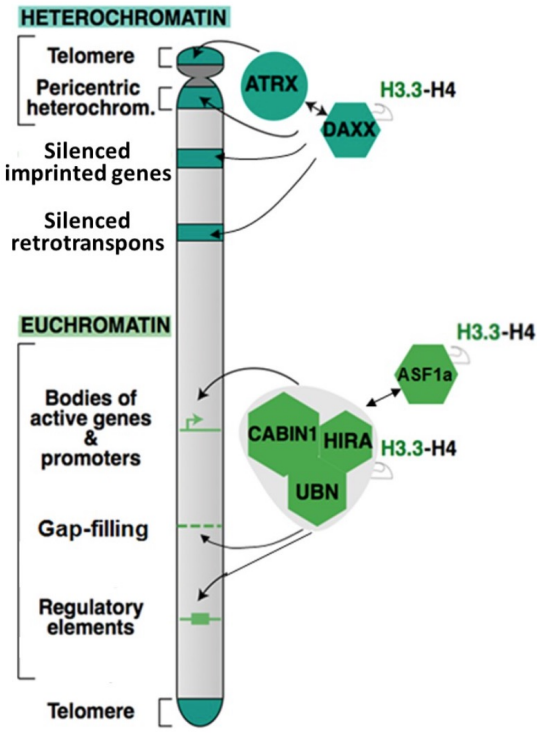


Figure 19 : Incorporation de H3.3 dans les différents types de chromatine en fonction du chaperon (Szenker 2011). *ATRX-DAXX permet l'incorporation de H3.3 dans les régions d'hétérochromatine alors que HIRA permet sa déposition dans les zones actives pour la transcription.*

2.3. Le complexe chaperon HIRA

Cet autre complexe chaperon de H3.3 est composé de 3 protéines, la protéine HIRA, UBN1 et CABIN1 (Banumathy et al. 2009; Rai et al. 2011; Tagami et al. 2004; Ray-Gallet et al. 2007; Ricketts et Marmorstein 2017; Bonnefoy et al. 2007). A la différence de DAXX-ATRX, ce chaperon a été décrit comme incorporant H3.3 dans les régions actives pour la transcription telles que les promoteurs et 'enhancers' (Szenker, Ray-Gallet, et Almouzni 2011). Au centre de ce complexe, la protéine HIRA joue un rôle d'échafaudage pour l'ensemble du complexe, grâce à son interaction avec UBN1 (Banumathy

et al. 2009) et CABIN1 (Rai et al. 2011). Dans ce complexe, c'est la protéine UBN1 qui joue le rôle d'unité fonctionnelle avec la capacité de lier le dimère H3.3-H4 via un domaine nommé HRD (pour 'Hpc2-related domain'), ainsi que l'ADN (Ricketts et al. 2015; 2019). Le dernier membre CABIN1 aurait surtout un rôle de stabilisation du complexe (Rai et al. 2011; Ray-Gallet et al. 2011). Le complexe comprend également le chaperon ASF1 de façon transitoire. En effet, les dimères H3.3-H4 nouvellement synthétisés entrent dans le noyau grâce à ASF1, puis se lient à UBN1 grâce à une interaction entre la protéine HIRA et ASF1 (Alvarez et al. 2011; Jasencakova et Groth 2010). Des études plus récentes ont montré que les histones incorporées peuvent également être issus d'histones évincées. En effet, les histones sont retirées de la chromatine pour permettre le passage de l'ARN polymérase II (Torné et al. 2020). Ces histones recyclées sont également pris en charge par HIRA, mais leur incorporation semble différente puisqu'indépendante de UBN1 d'après l'étude de Torné et al (Torné et al. 2020).

Comme expliqué précédemment, les histones H3.3-H4 nouvellement synthétisées se retrouvent stockées transitoirement dans les PML NBs suite à leur entrée dans le noyau, et ce grâce à ATRX-DAXX (Corpet et al. 2014; Delbarre et al. 2013; Drané et al. 2010). Lors de conditions de stress, il a été observé que le complexe chaperon HIRA relocalise dans les PML NBs alors que sa localisation dans des conditions normales est pan-nucléaire (R. Zhang et al. 2005; McFarlane et al. 2019; C. Cohen et al. 2018). Comme expliqué dans le chapitre 1, cette relocalisation de HIRA dans les PML NBs est observable lors des phases précoces de l'induction de la sénescence, et est nécessaire à la formation des SAHFs (Banumathy et al. 2009; Rai et al. 2011; R. Zhang et al. 2005) et à l'induction du SASP (Dasgupta et al. 2024). L'accumulation de HIRA dans les PML NBs est également observable dans un contexte différent qui est celui d'une réponse à l'IFN. Dans ce contexte, les PML NBs pourraient servir de lieu de stockage de HIRA, afin de réguler la quantité du complexe chaperon HIRA dans le noyau. Une publication de notre équipe à laquelle j'ai participé montre l'implication de HIRA et des PML NBs dans le dépôt de H3.3 au niveau des ISGs comme montré en figure 20 (Kleijwegt et al. 2023).

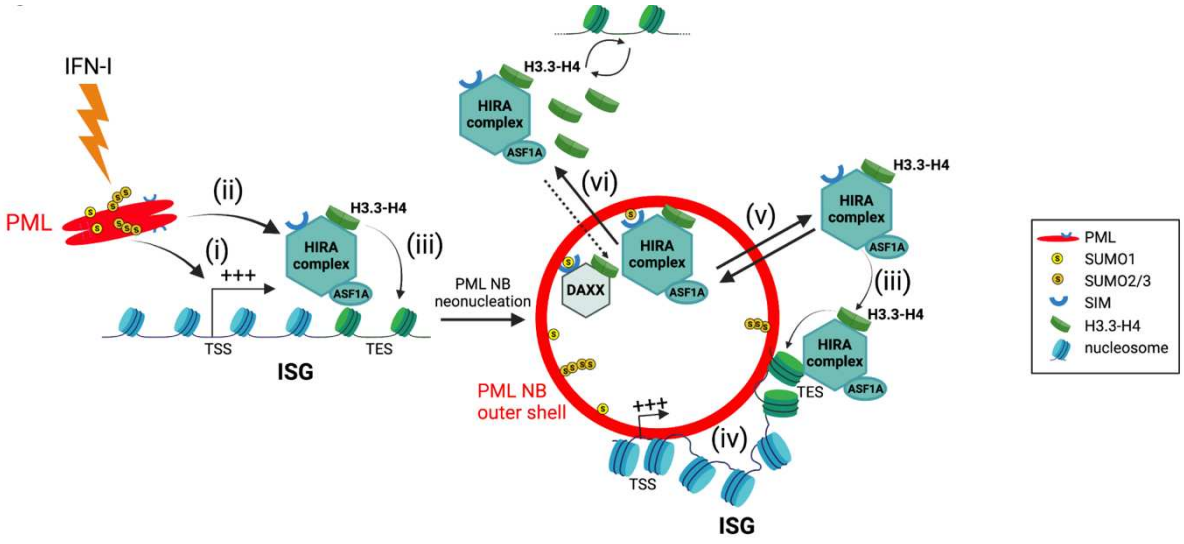


Figure 20 : La dynamique de HIRA, H3.3 et PML lors d'une réponse à l'interféron (Kleijwegt 2023). (i) *Lors de la stimulation par l'interféron, la protéine PML est requise pour l'expression des ISGs, ce qui peut indirectement (ii) recruter HIRA sur les ISG afin de déposer H3.3 sur ces gènes. (iii) Le dépôt de H3.3 par HIRA n'est pas nécessaire pour l'expression des ISGs et ne requiert pas son*

passage dans les PML NBs. (iv) Au stade tardif de la réponse interféron, la nucléation de PML permet la juxtaposition des ISGs avec des PML NBs, ce qui peut participer à une forme de mémoire de l'expression de ces gènes en cas de nouvelle stimulation. (v) Les PML NBs permettent également de réguler la quantité du complexe chaperon HIRA dans le nucléoplasme en le stockant. (vi) La quantité de HIRA dans les PML NBs est influencée par 2 paramètres : la présence de DAXX dans les PML NBs, qui est en compétition pour les sites de liaison dans les corps nucléaires et la quantité de H3.3 soluble dans le nucléoplasme, qui en cas de surexpression induit la sortie de HIRA des PML NBs.

Tous ces acteurs englobant les histones et leurs chaperons montrent la diversité de dynamique de la chromatine en fonction des besoins d'activation et de répression de la transcription. Dans la partie suivante je détaillerai une autre forme de dynamique de la chromatine, la gestion des cassures, qui a une place très importante dans mes travaux de thèse.

3. Les différents types de cassures de la chromatine et leur réparation

Le grand rôle de la chromatine est d'assurer la compaction du génome. Cette compaction est associée à une dynamique importante afin de permettre la transcription et la réplication de l'ADN. Malgré le fait que la structure de la chromatine lui permette une bonne protection contre les stress causant des dégâts, ce sont chaque jour des milliers de lésions qui l'endommagent (Ciccia et Elledge 2010), et certaines sont même physiologiques afin d'assurer la diversité des anticorps via recombinaison (Khan et Ali 2017) ou encore la résolution de problèmes de structure de la molécule d'ADN (J. C. Wang 2002). Les origines de ces dégâts sont très variées comme l'hydrolyse spontanée des bases (Lindahl 1993) les ROS, des petites molécules instables qui capturent les électrons d'autres éléments les rendant instables à leur tour, et les RNS (pour 'reactive nitrogen species') (Cadet et al. 1997; Murphy 2009). Une autre source peut être des erreurs lors de la synthèse d'ADN, ce qui rend impossible le bon appariement des bases engendrant des insertions ou délétions dans la séquence (S. D. McCulloch et Kunkel 2008). Les cassures sont également la conséquence de stress provenant de l'environnement comme des expositions aux UV, aux radiations ionisantes comme lors de radiothérapie ou à des molécules chimiques (Chatterjee et Walker 2017). D'autres éléments peuvent malheureusement être à l'origine de cassures de la chromatine, ce qui est au long terme peut provoquer des soucis de santé comme une alimentation trop transformée ou encore une consommation de tabac (Barnes et al. 2018).

Afin de préserver l'intégrité du génome, l'évolution a permis aux mammifères d'acquérir plusieurs mécanismes permettant de résoudre les dommages de la chromatine et qui sont représentés sur la figure 21. Dans cette partie je détaillerai les acteurs et les modes d'actions impliqués dans la détection, la signalisation et la réparation des dommages.

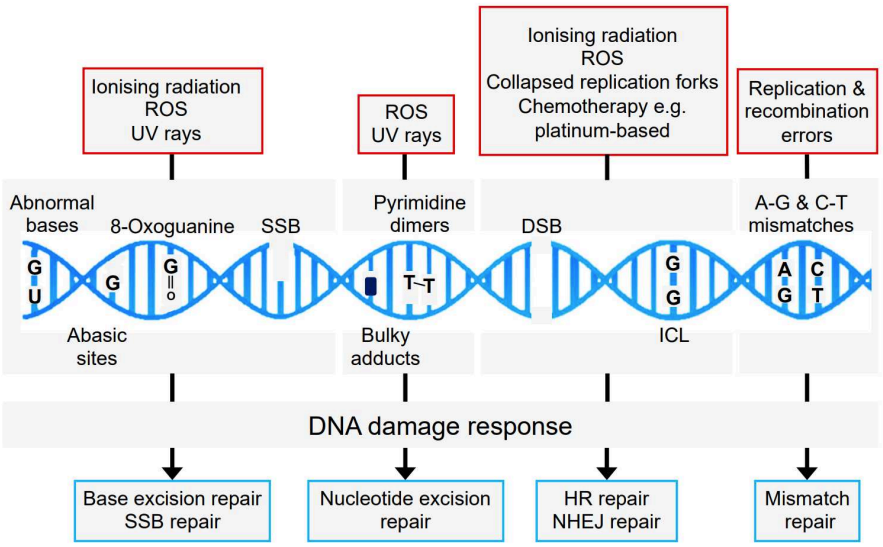


Figure 21 : Différents stress induisant des cassures et les mécanismes de réparation (Gillepsie 2023). *Les évènements pouvant mener à des dommages à l'ADN sont nombreux et d'origine cellulaire ou environnementale. Chaque type de dommage est associé à des mécanismes de réparation spécifiques.*

3.1. Les senseurs de dommages à l'ADN

Lorsqu'une cassure apparaît dans la chromatine, une signalisation importante se met en place afin d'éviter que le cycle cellulaire ne se poursuive, ce qui aurait pour conséquence de compromettre l'intégrité du génome. Parmi les premiers acteurs impliqués on trouve la famille des PIKKs représentée en figure 22. Les différents membres de cette famille s'activent pour un type de cassure, ce qui permet à la cellule de déclencher le mécanisme de réparation adapté (Bekker-Jensen et al. 2006).

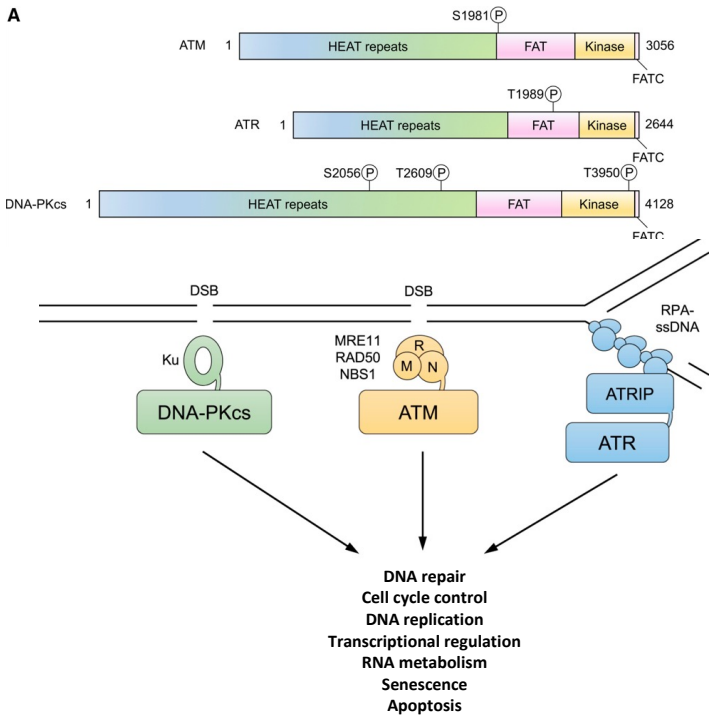


Figure 22 : Description et partenaires des PIKKs (Blackford 2017). *La partie haute de la figure montre les structures similaires des 3 protéines kinases. La partie basse montre leurs spécificités et leurs partenaires respectifs.*

3.1.A. ATM

Le premier membre de cette famille des PIKKs est ATM dont le gène fut identifié en 1995 (Savitsky et al. 1995). Cette kinase est recrutée très rapidement au niveau des sites de cassures double brins et phosphoryle la sérine 139 de l'histone H2A.X, ce qui permet l'obtention du marqueur de cassure le plus connu : γH2AX (Rogakou et al. 1998). Cette modification d'histone est rapidement étendue sur plusieurs mégabases, grâce à un changement de conformation des chromosomes avec la formation de boucles de chromatine et une meilleure accessibilité, ainsi qu'un rétrocontrôle positif entre ATM et MDC1 (Arnould et al. 2021). Cette cible est loin d'être l'unique d'ATM car des centaines de substrats ont été identifiés comme étant ciblés par cette kinase (Shuhei Matsuoka et al. 2007). Lors de l'apparition de cassures, un des premiers éléments recrutés, avant même les PIKKs est le complexe MRN (pour 'MRE11-Rad50-NBS1'). Le complexe MRN est capable de se lier directement au site de cassure grâce à Mre11 et Rad50 (Syed et Tainer 2018). Son recrutement est fortement facilité par Rad17, une protéine de checkpoint qui interagit avec NBS1 (pour 'nibrine') et permet la rétention de MRN au site de cassure (Qinhong Wang et al. 2014). ATM est recrutée et activée sur le site de dommage grâce à son interaction avec NBS1 (Carney et al. 1998; Carson et al. 2003; Uziel et al. 2003). Suite à son activation, ATM active des partenaires permettant un rétro-contrôle positif notamment avec MRN / Rad17 / ATM, et donc un renforcement de la réponse aux dommages. C'est le cas avec l'activation de TIP60 (également appelée KAT5), une acétyltransférase qui acétyle ATM (Y. Sun et al. 2005). Dans la littérature, ATM est décrite comme orientant la réponse aux cassures vers la recombinaison homologue car elle active CtIP, une endonucléase qui permet d'assurer la résection de l'ADN, une étape essentielle dans la recombinaison homologue (Sartori et al. 2007). Dans un autre registre, ATM a été identifiée comme impliquée dans la réponse au stress transcriptionnel menant à la formation de R-loop afin de résoudre ces structures (Tresini et al. 2015).

3.1.B. ATR

Autre kinase de la famille des PIKKs, ATR (pour 'ATM and Rad3-related') est la seule à être essentielle pour la prolifération cellulaire car son absence est léthale avant même qu'un embryon n'atteigne le stade de blastocyste (Brown et Baltimore 2000). Contrairement à ATM, ATR semble plus spécifique aux réponses des cassures simple brin, par des mécanismes que je détaillerai dans la partie 3.2. Son recrutement sur le site de dommage se fait grâce à son partenaire ATRIP, lui-même en interaction avec le complexe RPA qui se lie l'ADN simple brin (Zou et Elledge 2003). Le recrutement seul de ATR ne permet pas son activation, qui est assurée par d'autres acteurs comme TopB1 (pour 'DNA topoisomerase 2-binding protein 1') (Kumagai et al. 2006) ou ETAA1 (pour 'Ewing's tumor-associated antigen 1') (Bass et al. 2016). Une fois activée, ATR permet la dégradation de CDC25A via la phosphorylation des kinases de checkpoint CHK1 et CHK2, une cible commune avec ATM. CDC25 (pour 'cell division cycle 25') est une enzyme qui enlève normalement les marques inhibitrices sur les cyclines dépendantes des kinases. Grâce à la dégradation de CDC25, les cyclines sont maintenues inactives, ce qui permet l'arrêt du cycle cellulaire (Z. Guo et al. 2000; Chaturvedi et al. 1999; Hekmat-Nejad et al. 2000; S. Matsuoka, Huang, et Elledge 1998; H. Zhao et Piwnica-Worms 2001).

3.1.C. DNA-PK

La première PIKK identifiée fût DNA-PK (pour 'DNA-dependent protein kinase') en 1985 par l'équipe du docteur Walker (A. i. Walker et al. 1985). On la trouve majoritairement impliquée dans la réponse aux cassures double brins. Lors de l'apparition de ces cassures, son partenaire le complexe Ku, un hétérodimère composé de Ku80 et Ku70, est rapidement localisé au site de dommage (Taccioli et al. 1994; Rathmell et Chu 1994; Smider et al. 1994; Getts et Stamato 1994) et permet de recruter DNA-PK (Blackford et Jackson 2017). Le complexe Ku a une forme en anneau et possède une affinité forte pour l'ADN, ce qui lui permet de se lier directement aux extrémités de la cassure (J. R. Walker, Corpina, et Goldberg 2001; Gell et Jackson 1999; Blier et al. 1993). Contrairement à ATM, DNA-PK oriente la réparation vers la réponse NHEJ, en activant la nucléase ARTEMIS qui permet une courte résection au niveau de la cassure (Malu et al. 2012). Ce mécanisme de réparation est le plus courant chez les mammifères car il ne nécessite pas de brins homologues, uniquement disponibles en phase S et G2 du cycle cellulaire. Je détaillerai les mécanismes de la HR et de la NHEJ dans la partie 3.3. En plus de la nucléase, DNA-PK permet le recrutement de partenaires comme XRCC4 (pour 'X-ray repair cross-complementing protein 4'), XLF ('XRCC4-like factor') et l'ADN ligase IV pour résoudre la cassure (Blackford et Jackson 2017).

Ces trois acteurs sont primordiaux pour assurer la bonne initiation des mécanismes de réparation en cas de dommage de la chromatine. Ils peuvent également s'activer lors de la détection d'ADN microbien afin de limiter l'infection (pour revue voir Lees-Miller et al. 1996). Il faut cependant que l'activité de ces protéines soit finement régulée car une activation aberrante peut entraîner un arrêt prolongé du cycle cellulaire et mener à la sénescence ou à l'apoptose. ATM, ATR et DNA-PK sont donc dépendants de leurs co-facteurs, respectivement NBS1, ATRIP ('ATR-interacting protein') et Ku (Falck, Coates, et Jackson 2005; Zou et Elledge 2003; Gell et Jackson 1999; Singleton et al. 1999).

3.2. Les mécanismes de réparation des cassures simple brin

Les cassures simple brin de la chromatine peuvent être réparées rapidement et efficacement par plusieurs mécanismes différents que je vais détailler brièvement dans cette partie. Ces différents mécanismes se déroulent tous selon le même schéma avec (A) la détection des cassures ; (B) l'éviction du groupe problématique ; (C) le remplacement par un groupe adéquat et (D) la ligation du brin (Caldecott 2014). Deux acteurs importants de la réparation des cassures simple brins sont PARP1 (pour 'poly ADP-ribose polymerase 1') et XRCC1(pour'X-ray cross-complementing protein 1') (Abbotts et Wilson 2017). Les étapes ultérieures de ces mécanismes sont représentées en figure 23.

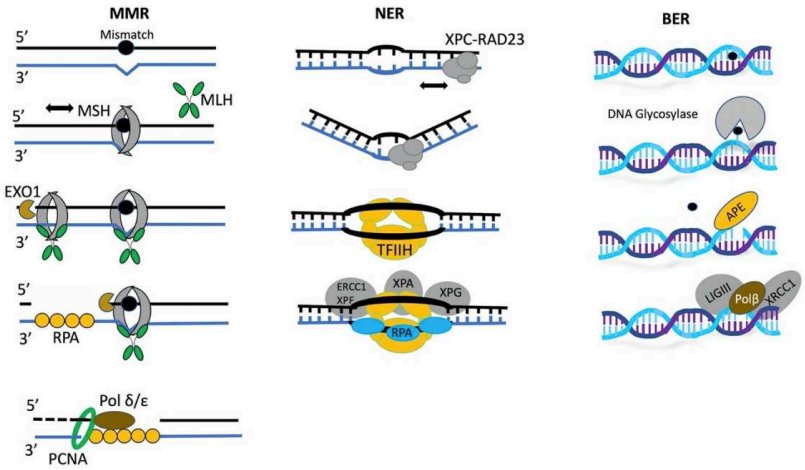


Figure 23 : Mécanismes de réparation des cassures simple brin : (Karakaidos 2020). *Dans chaque cas la résection des brins est courte et permet une réparation rapide du dommage.*

PARP1 se fixe à l'ADN grâce à des motifs en doigts de zinc et est responsable du dépôt d'une marque de PARylation sur les histones et protéines de la réparation (Hayaishi et Ueda 1977). Cette modification est très importante pour permettre la réparation et maintenir la chromatine dans un état décondensée le temps de résoudre le dommage (Benjamin et Gill 1980; Thomassin et al. 1992). Lorsque la réparation est achevée, PARP1 s'automodifie pour se décrocher de la chromatine (Zahradka et Ebisuzaki 1982) et une autre enzyme, PARG (pour 'poly-ADP ribose glycohydrolase') permet de retirer les marques de PARylation sur la zone du dommage résolu (Althaus 1992).

XRCC1 ne possède pas d'activité catalytique contrairement à PARP1 bien que sa présence soit très importante pour la résolution des cassures (Whitehouse et al. 2001). Son rôle est principalement de recruter les différents acteurs nécessaires à la réparation et également de réguler l'activité de PARP1 pour éviter un excès de PARylation (Demin et al. 2021). XRCC1 peut se lier directement à l'ADN, seul ou en complexe avec la polymérase β (Marintchev et al. 1999). Une fois sur la chromatine, XRCC1 est également PARylé, ce qui permet son interaction avec PARP1 (Pleschke et al. 2000).

3.2.A. La réparation par excision de base

Ce mécanisme décrit pour la première fois en 1974 et nommé BER (pour 'Base excision repair') intervient lorsqu'une base est modifiée (Cerutti 1974). Une enzyme ADN glycosylase clive la liaison entre la base modifiée et le désoxyribose puis l'ADN polymérase β apporte le nucléotide manquant. L'ADN ligase 1 ou 3 permet ensuite de refermer le site de cassure (Gohil, Sarker, et Roy 2023). Ce mécanisme fonctionne également lorsque plusieurs bases sont à changer, et ce jusqu'à 13. Ce phénomène est nommé long-patch BER (Roy 2023). La principale limite de ce mécanisme est la dépendance aux glycosylases, sachant que les cellules humaines n'en contiennent que 11, chacune spécifique d'un type de lésion (Zharkov et Grollman 2005).

3.2.B. La réparation par excision de nucléotide

A l'inverse du mécanisme précédent, celui-ci nécessite l'excision d'une portion d'environ 25 nucléotides pour supprimer le site lésé (Kemp 2019). Il existe 2 sous-catégories de NER (pour 'nucleotide excision repair') : la GGR (pour 'global genome repair') et la TCR (pour 'transcription-coupled repair') (Atanassov et al. 2004). Leurs noms sont très explicites car la GGR peut être mise en place sur n'importe quelle zone du génome alors que la TCR est réservée aux zones actives pour la transcription. Dans les 2 cas, la zone lésée est reconnue par un complexe de pré-incision nommé PCR (pour 'pre-incision complex'). Une ubiquitine ligase est ensuite recrutée afin de décondenser la zone lésée en induisant la dégradation des histones de cette zone (Luijsterburg et al. 2012). S'ensuit le recrutement d'hélicases afin d'ouvrir l'ADN et d'endonucléases pour cliver la séquence défaillante (F. Coin et al. 1999; Frédéric Coin, Oksenych, et Egly 2007; Wakasugi et Sancar 1998; Tantin, Kansal, et Carey 1997; Mu, Hsu, et Sancar 1996). La synthèse est ensuite assurée par la polymérase δ/κ dans les cellules non-prolifératives et par la polymérase ε dans les cellules cyclantes et pour finir, la ligation est faite par l'ADN ligase 1 ou le complexe XRCC1-ADN ligase 3 (Lindsey-Boltz et al. 2014; Sancar 2016). Je ne détaillerai pas les différences d'acteurs entrant dans l'un ou l'autre de ces mécanismes, pour revue voir (Atanassov et al. 2004).

3.2.C. La réparation des mésappariements

Ce dernier mécanisme de réparation simple brin est nommée MMR (pour 'mismatch repair'). Il est souvent utilisé pour résoudre les erreurs faites dans la réplication de la séquence afin de remplacer les mauvaises bases incorporées (G.-M. Li 2008). C'est une marque post-traductionnelle, H3K36me3 qui permet de recruter le complexe de détection du mésappariement composé de MutLα et PCNA (pour 'proliferating cell nuclear antigen'). Ce complexe permet de recruter l'endonucléase ExoI qui clive plusieurs centaines de bases, formant ainsi une portion simple brin sur l'ADN nouvellement synthétisé, et qui est rapidement protégé par RPA puis l'ADN est synthétisé par la polymérase δ et lié par la ligase I (Y. Huang et Li 2020). Ce mécanisme de réparation est soumis à un timing très serré car il doit se faire avant que la structure des nucléosomes soit complètement achevée, ce qui empêcherait la mise en place de la réparation (F. Li et al. 2009). Un autre, la protéine MutSα bloque la chromatinisation du brin néosynthétisé le temps que le mésappariement soit résolu (Y. Huang et Li 2020; Y. Huang, Gu, et Li 2018).

L'ensemble de ces mécanismes de réparation sont rapides et permettent de résoudre des lésions bénignes dans la chromatine. Les mécanismes que je vais aborder dans la partie suivante sont destinés à résoudre des cassures double brin, et sont bien plus complexes et longs à être mis en place par la cellule.

3.3. Les mécanismes de réparation des cassures double brins

3.3.A. Les cassures double brins

Ce type de cassure est plus dangereux pour les cellules car très toxique, et peut être à l'origine de problèmes chromosomiques comme des insertions, délétions ou des translocations. Ces cassures peuvent être la conséquence de stress infligés à la chromatine, ou peuvent être physiologiques, comme dans le cas de la recombinaison V(D)J, qui est à l'origine de la diversité des cibles de l'immunité adaptative (Lieberman-Aiden et al. 2009; Hozumi et Tonegawa 2004). Dans tous les cas, ces cassures doivent être réparées rapidement pour ne pas compromettre l'intégrité du génome, ce qui conduirait, dans le meilleur des cas à la sénescence ou l'apoptose (voir chapitre 1), ou à la transformation de la cellule en cellule cancéreuse (Gillyard et Davis 2021). Il existe 4 modes de réparation de ce type de cassure dont 2 majeurs, la NHEJ et la HR et deux dits accessoires, la SSA (pour 'single strand annealing') et l'alt-EJ (pour 'alternative end-joining'). Je ne détaillerai pas les voies alternatives, pour revue voir (Bhargava, Onyango, et Stark 2016; H. H. Y. Chang et al. 2017). Les mécanismes des voies majoritaires sont représentés en figure 24.

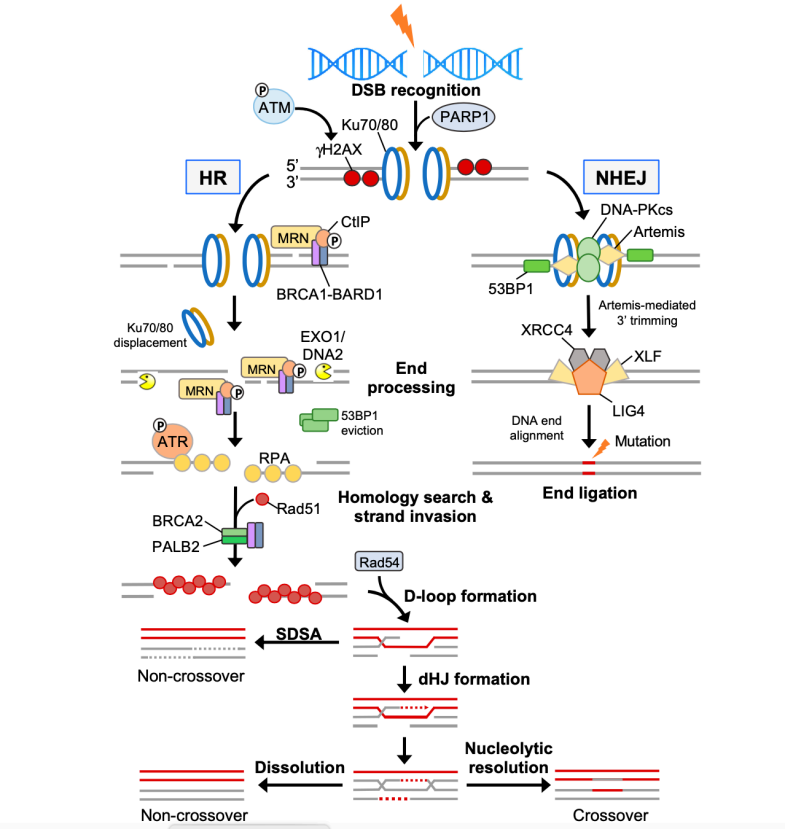


Figure 24 : Réparation des cassures double brins (Gillepsie 2023). *La réponse NHEJ se met en place grâce à la fixation de Ku. Si Ku n'est pas stabilisé au site de dommage, c'est la HR qui se met en place. Bien que hautement fiables, ces 2 mécanismes peuvent introduire des biais dans la séquence. L'absence de matrice pour la NHEJ peut être à l'origine de l'apparition de mutations et l'invasion du brin homologue dans la HR peut engendrer un crossover des portions concernées.*

3.3.B. La jonction d'extrémités non homologues

Ce premier mécanisme de réparation est le plus fréquent en cas de cassure double brin, presque le seul exécuté hors des phases S et G2 du cycle cellulaire, et même 80% durant ces phases (Beucher et al. 2009). Ce mécanisme permet une réparation sans nécessité d'avoir un brin matrice et donc une copie de la séquence lésée, contrairement à la HR (voir partie 3.3.C). A cause de l'absence de cette matrice, ce mode de réparation a longtemps été associé à des erreurs dans la synthèse de la séquence à réparer. Il reste cependant un mécanisme très fiable pour la cellule afin de préserver son intégrité génomique (Bétermier, Bertrand, et Lopez 2014). Lors de la détection des cassures, les PIKKs activent rapidement une protéine nommée MDC1 (pour 'mediator of DNA damage checkpoint protein') par phosphorylation, ce qui engendre une cascade de signalisation aboutissant au recrutement de 53BP1 (Huen et al. 2007; Thorslund et al. 2015). Le rôle de 53BP1 est d'orienter la réponse aux dommages vers la voie NHEJ en bloquant BRCA1, qui lui, oriente normalement la réponse vers la HR (Mattiroli et al. 2012; Miki et al. 1994). Cette phase préliminaire permet le recrutement plus efficace du partenaire de DNA-PK, l'hétérodimère Ku.

3.3.B.i. Le rôle du complexe Ku

Composé de Ku70 et Ku80, cet hétérodimère, une fois fixé sur la chromatine, permet de renforcer fortement la liaison de DNA-PK sur le site de cassure (de l'ordre de 100 fois). De plus, Ku est associé à l'endonucléase Artémis qui se retrouve également au site de cassure (Y. Ma et al. 2002). Ku joue un rôle primordial dans la NHEJ, car on le trouve en abondance dans le noyau des cellules, et sa morphologie en anneau permet de bloquer la récession des brins une fois qu'il se trouve fixé de part et d'autre de la zone de cassure (H. H. Y. Chang et al. 2017). DNA-PK phosphoryle Artémis, qui n'enlève que quelques bases de chaque côté de la lésion (Goodarzi et al. 2006). Cette étape peut être accomplie par une autre endonucléase en cas d'absence de Artémis.

3.3.B.ii. Le rôle de XRCC4

Suite à cette petite résection, la synthèse d'ADN est assurée par les polymérases μ ou λ qui interagissent elles aussi avec Ku via leur domaine BRCT (Y. Ma et al. 2004). Ces polymérases sont donc capables d'intégrer des nucléotides sans avoir de brin matrice pour servir d'exemple, dans le but de rendre les extrémités compatibles (Pannunzio, Watanabe, et Lieber 2018). Une fois les extrémités compatibles, le complexe ADN ligase IV-XRCC4, permet de refermer la molécule d'ADN. XRCC4 possède également un domaine de liaison avec un autre facteur, XLF ou PAXX, des protéines qui stabilisent la ligase (Ahnesorg, Smith, et Jackson 2006).

3.3.B.iii. La recombinaison V(D)J

Ce cas de NHEJ est assez particulier car il intervient dans le cas de cassures double brins physiologiques. Ces cassures sont très importantes et ont lieu durant la maturation des lymphocytes,

grâce aux protéines RAG1 (‘recombination activating 1’), RAG2 et HMGB1 (‘high mobility group box 1’) ou HMGB2 (van Gent et al. 1997). Suite à ce clivage et de façon très simplifiée, la NHEJ permet de réarranger les segments V, D et J (pour respectivement ‘variable’, ‘diversity’, ‘junction’), qui sont présents sous forme de très nombreux allèles. Chaque cellule obtient alors une combinaison unique, ce qui permet d’obtenir des récepteurs de l’immunité différents pour chaque cellule et donc d’être spécifique d’un antigène particulier (pour revue Roth 2014)). L’absence d’un des éléments de la NHEJ entraîne de graves problèmes d’immunodéficience (Moshous et al. 2001).

3.3.C La recombinaison homologue

3.3.C.i. Les conditions pour la mise en place de la HR et l’inhibition de la NHEJ

Lorsque la cellule se trouve dans une phase de son cycle avec 2 copies de son information génétique, c’est-à-dire en phase S ou G2, elle peut mettre en place une autre voie de réparation en se servant de la deuxième molécule d’ADN. Une protéine nommée CYREN (pour ‘cell cycle regulator of NHEJ’), bloque la fixation de Ku aux extrémités de la cassure, ce qui empêche la mise en place de la NHEJ (Slavoff et al. 2014). Plus précisément, lors de la phase S, BRCA1 induit le retrait de 53BP1 avec qui il est en compétition lors du déclenchement de la DDR (Bunting et al. 2010). Cette dualité entre 53BP1 et BRCA1 est très complexe et fait intervenir de nombreux facteurs en amont que je ne détaillerai pas ici (pour revue voir Daley et Sung 2014).

3.3.C.ii. La résection de l’ADN comme étape clé

La réalisation de ce mécanisme de réparation dépend de l’invasion d’un brin d’ADN au niveau de la séquence homologue. Pour ce faire, un des brins de la partie lésée doit être sous forme simple brin, ce qui nécessite une étape de résection importante de l’un des deux brins impliqués dans la cassure de 5’ en 3’ (Aymard et al. 2014). Etant donné que les protéines Ku ne sont pas présentes au niveau de la cassure, des nucléases telles que Exo1 ou DNA2 (pour ‘DNA replication ATP-dependent helicase / nuclease 2’) assurent cette importante résection (Symington 2014). Cela entraîne l’apparition d’une longue portion d’ADN simple brin en 3’, qui est rapidement protégée par la protéine Rad51. Sa fixation est en compétition avec celle de RPA, mais dès les premières unités Rad51 fixées, la fixation des suivantes est facilitée (Bell et Kowalczykowski 2016). De plus, d’autres protéines impliquées dans la HR comme BRCA2 facilitent la liaison de Rad51 sur le brin (R. B. Jensen, Carreira, et Kowalczykowski 2010). Cela aboutit à la formation d’un filament nucléoprotéique, dont le but est de trouver la séquence homologue dans le génome.

3.3.C.iii. Le mécanisme d’invasion du brin homologue et la synthèse d’ADN

La protéine RecA (pour ‘recombinase A’) permet au filament nucléoprotéique de s’insérer dans des structures double brin rapidement ouvertes et fermées si une homologie de 8 nucléotides n’est pas détectée. Si 8 nucléotides sont homologues, on parle de micro-homologie et le complexe appelé D-

loop avec l'ADN double brin et le filament nucléoprotéique devient plus stable (Qi et al. 2015). Dans cette condition, le filament nucléoprotéique s'entrelace avec sa séquence homologue grâce à la protéine Rad54 (Petukhova et al. 1999). Au sein de la D-loop se forme alors une structure appelée ADNh pour ADN hétéroduplex, dont la mise en place est également facilitée par des hélicases et la topoisomérase 1A (W. D. Wright, Shah, et Heyer 2018). Lorsque cette structure est stable, l'ADN polymérase δ assure la synthèse avec son partenaire PCNA (pour 'proliferating cell nuclear antigen') en se servant de l'extrémité 3' de la cassure comme amorce (Sebesta et al. 2011). La question qui a longtemps animé la recherche dans ce domaine était de savoir quels signaux permettent de savoir que suffisamment d'ADN a été synthétisé. Il semblerait que la structure de la D-loop soit très dynamique et qu'il y ait une grande alternance de formation et résolution de la D-loop jusqu'à ce que la synthèse soit suffisante. La résolution de la D-loop est dans un premier temps assurée par des translocases et des hélicases qui déstructurent l'ADN hétéroduplex (Sebesta et al. 2011; J. Liu et al. 2017). Ces mêmes éléments participent dans le même temps à retirer Rad51 du filament pour permettre aux bases de bien se lier par complémentarité (W. D. Wright, Shah, et Heyer 2018).

3.4. Les PML NBs dans la gestion des cassures et la dynamique des protéines de réparation

Des observations au microscope il y a une vingtaine d'années ont mis en évidence la juxtaposition des PML NBs avec les zones de cassures de l'ADN. De plus, suite à l'induction de cassures, la quantité de PML NBs augmente dans le noyau des cellules (Carbone et al. 2002; Dellaire et Bazett-Jones 2004; Dellaire et al. 2006). L'étude de Carbone et al a montré que suite à l'induction de dommages par irradiation, 20% des PML NBs sont juxtaposés avec les foyers de cassures 4h après induction, et 60% au bout de 8h (Carbone et al. 2002). Cette juxtaposition croissante a été étudiée dans les travaux de Yeung et al qui montrent que les PML NBs jouent surtout un rôle dans les étapes tardives dans un contexte de HR (Yeung et al. 2012). Le recrutement des PML NBs est assuré par la protéine 53BP1, déjà présente sur le site de dommage (Vancurova et al. 2019). Cette cascade de recrutement est initiée par RNF168 et RNF8 (pour 'RING finger protein 168 et 4'), des ubiquitines ligases qui modifient les histones pour permettre le recrutement d'autres protéines de la DDR. L'ubiquitinylation de 53BP1 permet sa séquestration au niveau des dommages (Bohgaki et al. 2013). Une étude de 2022 montre également que cette dynamique des PML NBs est permise grâce au réseau d'actine nucléaire (Cobb et al. 2022). De plus, d'autres études ont mis en évidence que l'implication des PML NBs est restreinte à la HR et n'intervient pas lors de la NHEJ (Vancurova et al. 2019; Yeung et al. 2012). Les travaux de Vancurova et al ont d'ailleurs montré que la déplétion de PML augmente la sensibilité des cellules aux radiations, signe que les PML NBs sont importants dans la stabilité du génome (Vancurova et al. 2019). Une étude plus récente suggère également que la SUMOylation seule des protéines de la réparation permet à ces mécanismes de fonctionner en l'absence de PML NBs (R. Zhao et al. 2024).

Comme mentionné précédemment, les PML NBs jouent le rôle de lieu de stockage de certaines protéines dans le noyau afin de permettre une meilleure efficacité de certaines réactions biochimiques. Parmi les protéines clientes qui transitent dans les PML NBs, on trouve un grand

nombre d'acteurs liés à la réparation de l'ADN, et notamment des cassures double brins (Dellaire et Bazett-Jones 2004). De plus, les PML NBs sont maintenant considérés comme des senseurs de cassures, jouant un rôle important dans la HR (Dellaire et al. 2006; Attwood et al. 2020). Parmi les protéines clientes des PML NBs, certaines sont présentes avant et après l'induction des dommages, ce qui suggère qu'elles sortent transitoirement pour résoudre les cassures avant de retourner dans les PML NBs comme RAD51 (Boichuk et al. 2011), RPA (S. Zhong et al. 1999), ATR (Barr et al. 2003) et BLM, une hélicase intervenant dans la HR (O. Bischof et al. 2001; X. W. Wang et al. 2001). D'autre protéines comme MRE11 et NBS1 du complexe MRN se trouvent dans les PML NBs et en sortent dès l'induction de cassures pour relocaliser au niveau de celles-ci (Mirzoeva et Petrini 2001). A un stade plus tardif, les PML NBs sont également présent au niveau des cassures persistantes, permettant l'interaction de MRE11 et p53, afin d'assurer l'arrêt du cycle cellulaire et le déclenchement de la sénescence ou de l'apoptose (Usluer et al. 2024).

Ce chapitre nous donne un aperçu sur le fait que la chromatine est une structure extrêmement dynamique, et ce, sans évoquer la transcription et la réplication. De nombreuses protéines sont liées de façon transitoire à la chromatine en fonction des besoins de la cellule, et dans le chapitre suivant je vais détailler le comportement d'un autre acteur, cGAS, dont les rôles dans le noyau suscitent l'intérêt de la communauté scientifique depuis peu de temps.

Chapitre 3 : la protéine cGAS

Dans ce dernier chapitre je vais présenter la protéine cGAS, au centre de mes travaux de thèse. Les premiers travaux ont décrit en premier lieu cGAS comme une protéine cytoplasmique, senseur d'ADN double-brin jouant un rôle essentiel dans l'immunité innée, ce que je décrirai dans les premières parties de ce chapitre. Cependant, depuis 2015, il est reconnu que la protéine cGAS a également une localisation nucléaire, et de plus en plus de travaux montrent qu'elle joue des rôles importants dans ce compartiment, en lien direct avec la dynamique de la chromatine. Je discuterai donc également de la question du contrôle de l'activité de cGAS face à l'ADN génomique endogène localisé dans le noyau.

1. Découverte et origine de cGAS, un senseur d'ADN cytoplasmique

Le corps humain doit sans cesse faire face aux infections de nombreux pathogènes comme des virus, bactéries ou parasites. Malgré les premières lignes de défense comme la peau et les muqueuses, certains microbes se retrouvent dans l'organisme où ils peuvent causer de nombreux dommages (Flowers et Grice 2020). Afin de contrer ces infections rapidement, l'organisme est équipe d'un système immunitaire inné dont les éléments majeurs sont appelés PRR (pour 'pattern recognition receptor'). Le rôle est de reconnaître des éléments étrangers nommés PAMPs (pour 'pathogen-associated molecular patterns') ou des éléments liés à un dysfonctionnement de l'organisme, les DAMPs (pour 'danger-associated molecular patterns') (Briard, Place, et Kanneganti 2020). Ces senseurs de l'immunité innée peuvent être exprimés à la surface des cellules ou se trouver à l'intérieur de celles-ci (H. Liu et al. 2022).

Lors de l'infection d'une cellule par un pathogène, il arrive que le génome de ce dernier soit accessible dans le cytoplasme de la cellule. Dans ce cas, certains PRR sont spécialisés dans la détection de matériel génétique dans le cytoplasme, afin de signaler l'infection et de déclencher une réponse immunitaire (Carty, Guy, et Bowie 2021). Parmi ces récepteurs, l'équipe du docteur Chen a identifié en 2012 la protéine cGAS (pour '2'3'-cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate'), une enzyme qui suite à la détection d'ADN double brin dans le cytoplasme est à l'origine du déclenchement d'une réponse immunitaire et notamment de la voie interféron (L. Sun et al. 2013). Par la suite, ils ont réalisé d'autres observations dans le contexte de la détection du génome viral de rétrovirus dont HIV (pour 'human immunodeficiency virus'). Dans cette étude, ils ont démontré que la transcription inverse du génome viral en ADN était essentielle pour activer cGAS (D. Gao et al. 2013). Il est important de souligner que ces découvertes fondamentales ont été reconnues par l'attribution du prestigieux prix Lasker 2024 au Dr. Chen.

La structure de cGAS et son mécanisme enzymatique que je décrirai dans les parties suivantes sont extrêmement bien conservés chez les vertébrés et même chez les invertébrés et certains organismes mono-cellulaires, ce qui indique que ce senseur d'ADN est apparu tôt au cours de l'évolution du système immunitaire des formes de vie (Margolis, Wilson, et Vance 2017; P. Gao et al. 2013; Kranzusch

et al. 2013; L. Sun et al. 2013). Dans cette voie de signalisation déclenchant une réponse immunitaire, cGAS n'est que le premier membre d'une longue cascade de signalisation. Son rôle est d'activer un partenaire nommé STING (pour 'stimulator of interferon genes'), dont je parlerai dans la partie 4 de ce chapitre.

2. La structure de cGAS

La version humaine de cette protéine comporte 522 acides aminés et est codée par le gène nommé *MB21D1* localisé sur le chromosome 6 chez l'Homme (X. Wu et al. 2014). cGAS est composé de 2 parties principales représentées en figure 25 : un domaine N-terminal comprenant les acides aminés 1 à 160 et un domaine C-terminal comprenant les acides aminés 161 à 522 que je détaillerai dans les parties suivantes (Kranzusch et al. 2013). Tous les mammifères possèdent un homologue au cGAS humain. Celui des souris est similaire à environ 60% de la séquence de l'humain. Le cGAS des humains est cependant différent de celui des autres mammifères car son activité catalytique est plus restreinte (Hopfner et Hornung 2020), ce que développerai dans la partie 4.2. L'avancée rapide des travaux sur cGAS révèle de nombreux rôles pour cette protéine, auxquels s'ajoutent un grand nombre de modifications post-traductionnelles qui affectent positivement ou négativement ses différentes capacités. Je détaillerai les modifications connues au fur et à mesure de ce chapitre, en me basant majoritairement sur une étude de 2022 de Song et al. Cette régulation de cGAS par les modifications est très fine car une même modification en fonction de sa localisation sur la protéine peut avoir des effets complètement différents, ce qui est représenté en figure 28 (pour revue Song et al. 2022).

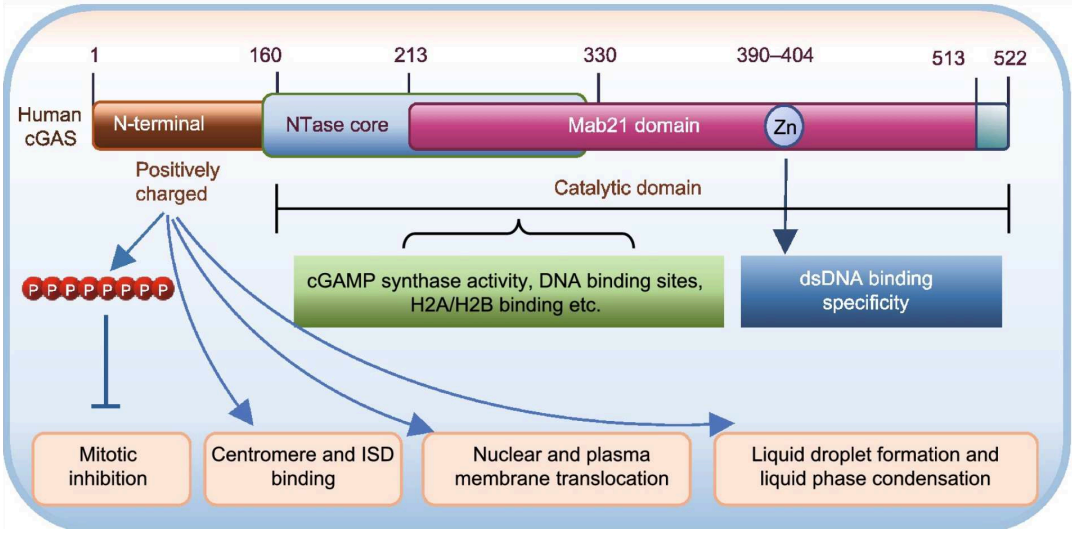


***Figure 25 : La structure de cGAS (Bai 2021)**. La partie N-terminale permet la bonne localisation de cGAS dans les différents compartiments de la cellule et le domaine C-terminal, permet la liaison à l'ADN, dont les ISD (immune stimulatory DNA), et l'activité catalytique avec la synthèse du second messager cGAMP (cyclic GMP-AMP).*

2.1. Le domaine N-terminal

Cette partie de cGAS est désordonnée, moins conservée entre les espèces et moins bien décrite dans la littérature que le domaine C-terminal. Ce domaine N-terminal contient des acides aminés chargés positivement permettant la liaison à l'ADN, et se compose de 9 feuillets β (β1-β9) entourés de 7 hélices α (α1-α7) (Pan et al. 2023). Il permet notamment l'oligomérisation de cGAS suite à la détection d'ADN et facilite la séparation de phase, ce qui augmente grandement son activité enzymatique (Xie et al. 2019; Du et Chen 2018). Ce domaine est d'ailleurs la cible de la kinase Aurora B qui phosphoryle les sérines 13 et 64 de cGAS. Cette hyperphosphorylation de cGAS en N-terminal diminue fortement sa capacité à faire de la séparation de phase en présence d'ADN, ce qui entrave son activité catalytique (Tuo Li et al. 2021). A l'inverse, cGAS possède plusieurs cibles d'acétylation dans cette même région N-terminale dont les lysines 47, 56, 62 et 83. L'acétylation de ces acides aminés par KAT5 facilite la liaison de cGAS avec l'ADN et stimule donc son activation (B. Song et al. 2020). Ce domaine joue également un rôle dans la localisation de la protéine. En effet, le domaine N-terminal a la capacité d'interagir avec des molécules nommées PI(4,5)P2 (pour 'phosphatidylinositol 4 ,5-biphosphate'). Ce phospholipide est présent au niveau de la membrane plasmique et permet donc à cGAS de s'ancrer à cette dernière, ce que je détaillerai dans la partie 3.1 (Barnett et al. 2019).

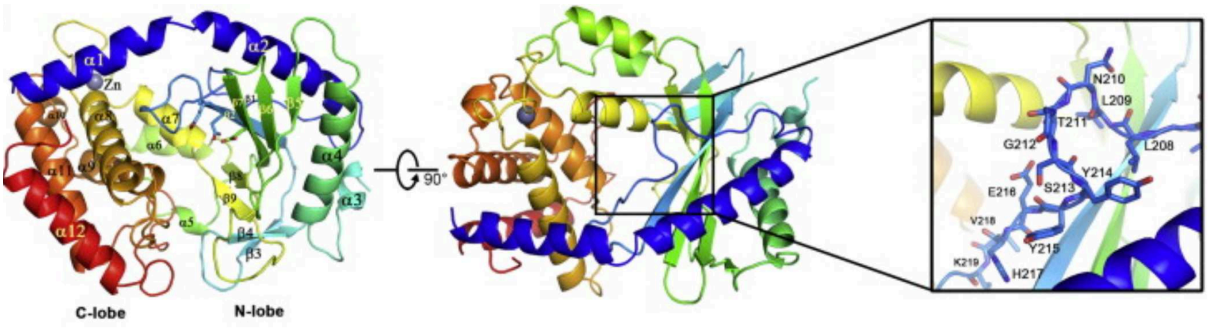


Figure 26 : Représentation cristallographique de cGAS (Zhang 2014). *Ces deux représentations perpendiculaires montrent l'organisation des feuillets β et des hélices α. La partie encadrée permet le changement de conformation de la protéine lors de la liaison avec une molécule d'ADN pour que le site enzymatique devienne actif.*

2.2. Le domaine C-terminal

Le domaine C-Terminal, composé des acides aminés 161 à 522, contient le domaine catalytique de cGAS nommé NTase (pour 'nucleotidyltransferase'), un domaine nommé Mab21 contenant les sites de liaison à l'ADNdb A et B, et un site-C de liaison à l'ADNdb en dehors de Mab21 (Lu et al. 2024). Le domaine C-terminal est composé de 2 lobes séparés par une fente et joue un rôle essentiel pour l'activité de cGAS. Le lobe N-terminal contient 2 hélices alpha et des feuillets beta composant le domaine catalytique NTase. cGAS appartient en effet à la superfamille des NTases et son activité catalytique permet la synthèse d'une molécule cyclique appelée 2'-3'cGAMP (pour 'cyclic GMP-AMP' et que je nommerai simplement cGAMP) à partir d'une molécule d'ATP et d'une molécule de GTP (L. Sun et al. 2013). Au niveau de la structure, les résidus enzymatiques de cGAS se trouvent au milieu du feuillet β de la région NTase et leurs chaînes latérales pointent vers la fente entre les deux lobes

(Civril et al. 2013; Xu Zhang et al. 2014). La mutation de certains acides aminés spécifiques entraîne la perte de l'activité catalytique de cGAS. C'est le cas de la glycine 212, de la sérine 213, de la glutamine 225, des asparagines 227 et 319 (Kranzusch et al. 2013; Xin Li et al. 2013). Le lobe C-terminal est composé d'hélices alpha et contient un domaine de liaison au zinc en position 390-405 chez l'Homme qui permet la liaison avec l'ADN (X. Wu et al. 2014). La liaison à l'ADN sera vue plus en détails dans la partie 2.3.

2.3. Les sites de liaison de cGAS avec l'ADN

La liaison de cGAS à l'ADN est totalement indépendante de la séquence, et cGAS est donc capable de se lier aussi bien à de l'ADN microbien qu'à de l'ADN cellulaire, ce que je détaillerai dans la partie 4 (West et al. 2015; Q. Chen, Sun, et Chen 2016). Cependant, la longueur de l'ADNdb lié est importante et il existe un seuil de tolérance pour que cGAS s'active, qui est d'environ 45pb chez l'Homme. En dessous de cette taille, un fragment d'ADN ne déclenche pas d'oligomérisation de cGAS ni de réponse immunitaire (Andreeva et al. 2017; Luecke et al. 2017; Stetson et Medzhitov 2006). Cette particularité est propre au cGAS humain, et on le retrouve pas chez la souris par exemple (W. Zhou et al. 2018). Cette sensibilité plus faible chez les humains représente un intérêt car elle permet d'éviter des activations aberrantes de cGAS et donc des voies de l'immunité innée. Ce sont les résidus K187 et L195 qui sont à l'origine de cette régulation, et le transfert de ces 2 seuls résidus chez la souris permet d'acquérir le même niveau de régulation (W. Zhou et al. 2018). Avec une affinité moindre, cGAS se lie également à l'ADN simple brin et déclenche une réponse plus faible car la séparation de phase est moins importante qu'avec de l'ADN double brins (Kranzusch et al. 2013). Parmi les acides nucléiques détectés, cGAS se lie aussi aux complexes ADN-ARN et à certaines structures spécifiques comme des guanosines contenues dans l'ADN simple brin dérivé de la rétrotranscription de HIV (Herzner et al. 2015).

Chez l'Homme, cGAS possède 3 sites de liaison avec l'ADN nommés sites A, B et C, dont A et B sont des sites conservés aux cours de l'évolution et le site C plus spécifique de l'Homme. Le site A, site majeur de liaison, contient notamment 2 résidus, K187 et L195, dont les mutations altèrent la capacité du site à se lier avec l'ADN (W. Zhou et al. 2018). De plus, la liaison de l'ADN au site A de cGAS induit un changement de conformation qui réarrange le site actif et facilite l'activité catalytique de cGAS. Le site B joue un rôle moindre mais complémentaire dans la détection de l'ADN et comprend les résidus S328, K350 et L354. Bien que ces sites semblent éloignés sur la séquence primaire de la protéine ils sont en réalité assez proches dans la conformation finale de la protéine se trouvent sur la même face, ce qui permet la dimérisation des complexes cGAS-ADN et la formation d'un complexe 2:2 cGAS-ADN (Xin Li et al. 2013; Xu Zhang et al. 2014). La liaison de cGAS avec les molécules d'ADN est possible car les sites de liaison sont chargés positivement (Xin Li et al. 2013; Xu Zhang et al. 2014; Civril et al. 2013). Plus récemment, un autre site de liaison, nommé site C, a été caractérisé chez cGAS par l'équipe de Xie et al. Ce site est également composé de résidus chargés positivement et est issu du repliement de plusieurs régions avec (1) une hélice α (261-286) comprenant notamment les acides aminés Q264, K275, K279, K282, K285 ; (2) une boucle KRKR comprenant les acides aminés K299,

R300, K301, R302 et (3) une boucle KKH comprenant les acides aminés K427, K428 et K432. Une mutation et / ou une altération des charges dans ces zones empêche l'activité catalytique de cGAS (Xie et al. 2019). Le site C du cGAS humain est plus basique que celui des souris, ce qui permet d'augmenter les interactions multivalentes et de faciliter la séparation de phase liquide-liquide en cas de détection d'ADN (Xie et al. 2019). Les sites de liaison de l'ADN et l'oligomérisation de cGAS sont représentés en figure 27.

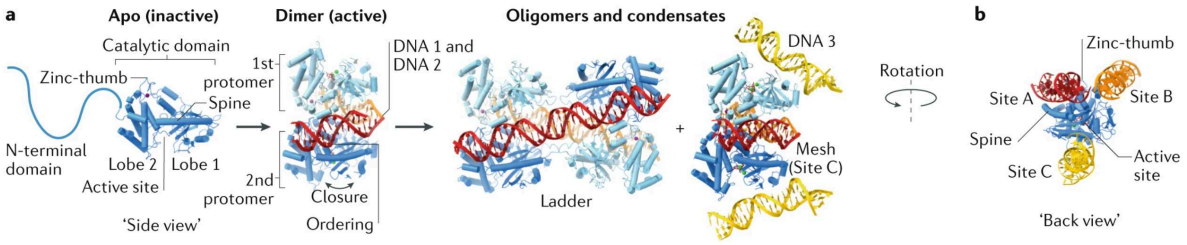


Figure 27 : La liaison de cGAS et de l'ADN permet l'oligomérisation du complexe (Hopfner 2020)*. cGAS se lie avec des molécules d'ADNdb par les sites A et B, cela entraîne la dimérisation de complexes cGAS-ADN sous forme de sandwich avec les molécules d'ADN au centre. Le site C permet la condensation de ces dimères pour former des oligomères et faire de la séparation de phase afin d'augmenter la synthèse de cGAMP.*

Ces sites de liaison sont également soumis à des modifications post-traductionnelles afin d'être accessibles dans le cytoplasme pour la liaison à l'ADN, au sein duquel cGAS a plusieurs localisations, ce que je vais détailler dans la partie 3.

2.4. Les modifications post-traductionnelles de cGAS

La capacité de cGAS à lier l'ADNdb et son activité catalytique sont fortement régulés par des modifications post-traductionnelles de son domaine C-terminal. La kinase AKT cible la sérine S305 chez l'Homme et son équivalent S291 chez la souris, ce qui entraîne une baisse de la production de cGAMP (Seo et al. 2015). De la même manière, l'ajout de glutamate sur l'acide glutamique 302 par TTLL4 ('Tubulin tyrosine ligase like 4') et sur l'acide glutamique 272 par TTLL6 bloquent la liaison avec l'ADN et la production de cGAMP (Xia et al. 2016). Comme dit précédemment, l'acétylation de cGAS en N-terminal permet de faciliter la liaison avec l'ADN, et c'est l'inverse avec l'acétylation des lysines 384, 394 et 414, qui diminue cette capacité (Dai et al. 2019). cGAS est également la cible de marques d'ubiquitines, qui servent dans certains cas à induire la dégradation de cette protéine (cf partie 7), mais peuvent également servir à moduler son activité enzymatique. Un certain nombre d'enzymes E3 ligases ont été identifiées, telles que TRIM56, RNF185 ou TRIM14 qui modulent l'activité de cGAS. TRIM56 par exemple, une protéine de la famille TRIM (pour 'tripartite motif'), permet l'ubiquitination de cGAS sur la lysine 335, ce qui facilite sa dimérisation et la production de cGAMP (Seo et al. 2018). A l'inverse, la déubiquitinase (DUB) USP15 ('Ubiquitin specific peptidase 15'), retire l'ubiquitination de cGAS et promeut la séparation de phase de cGAS grâce à sa région désordonnée IDR ('intrinsically disordered region'), deux processus parallèles qui favorisent l'activation de cGAS (Shi, Yang, Hou, et

al. 2022). USP15 est induite en réponse à un stimulus ADN fournissant à la cellule une boucle de rétroaction positive pour activer cGAS de façon efficace.

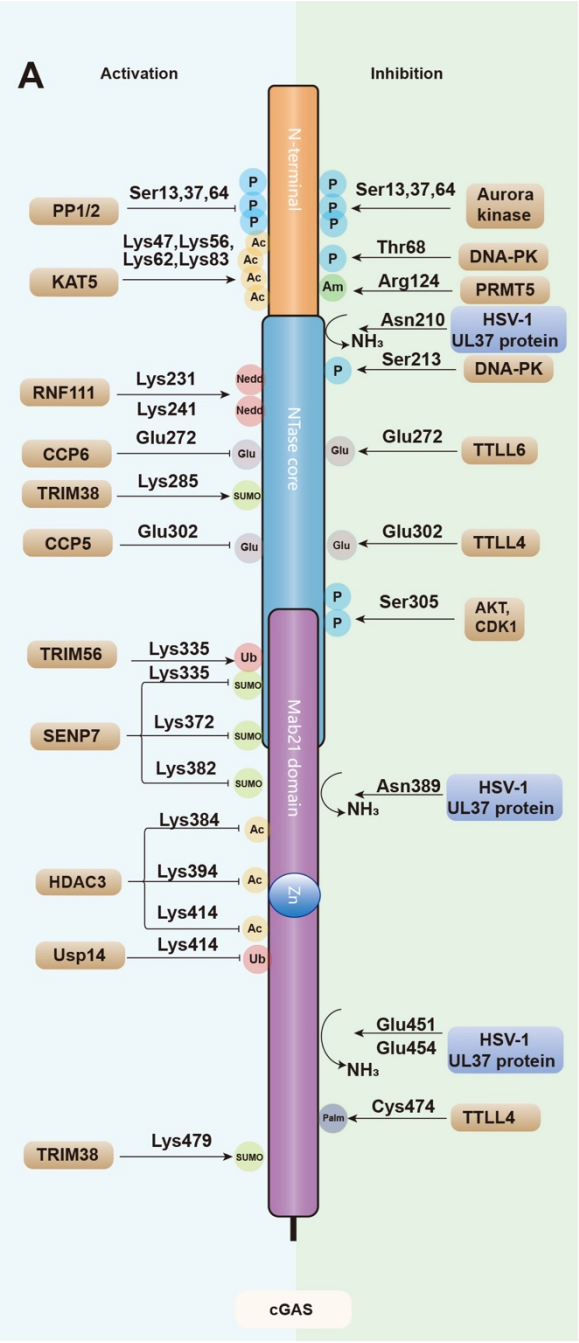


Figure 28 : Les modifications post-traductionnelles affectant l'activité catalytique de cGAS (Pan 2023). *cGAS est la cible d'un grand nombre de modifications par des enzymes cellulaires et même des protéines virales comme UL37 de HSV1 dans le but de supprimer son activité anti-virale lors d'une infection. La dynamique de cGAS étant très importante, certaines marques sont transitoires et des enzymes permettent de les retirer.*

Une autre modification, la SUMOylation dont j'ai déjà parlé lors du chapitre 1, peut avoir différents effets sur cGAS. Cette modification de cGAS sur les lysines 285 et 479 permet de stabiliser la protéine en évitant la fixation d'ubiquitine et donc sa dégradation (cf partie 7), mais lorsqu'elle est déposée sur les lysines 335,372 et 382, leur proximité avec le site de liaison à l'ADN empêche l'activation enzymatique de cGAS (M.-M. Hu et al. 2016). Une autre modification très proche de l'ubiquitinylation affectant cGAS est la NEDDylation, une marque si proche de l'ubiquitine que certains ubiquitines

ligases sont également des NEDD8 ligases (Enchev, Schulman, et Peter 2015). D'après les travaux de Li et al en 2021, la NEDDylation de cGAS est essentielle pour son activité catalytique. Le dépôt de NEDD8 sur les lysines 231 et 421 promeut la dimérisation de cGAS et augmente sa liaison à l'ADN, facilitant l'activation de la voie cGAS-STING et la production d'IFN. Cette modification est déposée par RNF111 (également nommée Arkadia), une NEDD8 E3 ligase fonctionnant en association avec la NEDD8 E2 conjugase nommée UBE2M. L'utilisation d'un inhibiteur de la NEDDylation, le MLN4924, empêche la production d'interféron (Chenhui Li et al. 2021).

cGAS est donc une protéine soumise à de nombreuses modifications qui régulent son activité catalytique, et nous verrons dans la partie 5 qu'il existe d'autres fonctions de cGAS régulées par des modifications post-traductionnelles. Il faut noter que l'ensemble de ces modifications ont été en grande partie étudiées sur le cGAS cytoplasmique, et des études futures seront importantes pour mieux comprendre comment les modifications telles que la SUMOylation, ou l'ubiquitination peuvent impacter sur les fonctions nucléaires de cGAS (cf parties 3.6 et 3.7).

3. Les localisations de cGAS dans le cytoplasme

Afin de remplir son rôle de senseur d'ADN dans le cytosol, cGAS se trouve dans la fraction soluble du cytoplasme, disponible pour des ligands potentiels, mais il est également capable d'avoir des localisations particulières dans ce compartiment, qui participent également à réguler son activité (H. Liu et al. 2022). Dans cette partie je vais détailler dans quelles régions du cytoplasme cGAS peut se trouver en plus d'être soluble, et quels sont les impacts associés.

3.1. cGAS ancré à la membrane plasmique

Comme mentionné précédemment, le domaine N-terminal de cGAS, et plus particulièrement les résidus 64 à 75 chez l'Homme, permet son ancrage à la membrane plasmique. Une mutation des acides aminés 71 à 75 empêche l'interaction avec les $PI(4,5)P_2$ et donc la localisation de cGAS sur la face interne de la membrane plasmique. D'après Barnett et al, cette localisation est liée au seuil d'activation de cGAS que j'ai mentionné précédemment. Si son ancrage dans la membrane plasmique est défectueux, cGAS a une réponse diminuée face aux infections, et a une réponse disproportionnée en cas de détection d'ADN chez des cellules non infectées. Cette caractéristique est d'ailleurs partagée avec d'autre TLR (pour 'toll like receptor') (Barnett et al. 2019). Lorsque cGAS rencontre de l'ADN dans le cytoplasme au niveau de la membrane, un changement de conformation lui permet de quitter la membrane et de se retrouver soluble dans le cytoplasme afin de faire de la séparation de phase (Barnett et al. 2019).

3.2. cGAS dans les granules de stress

Lorsqu'un stress affecte la cellule, celle-ci peut initier la formation transitoire de granules de stress dans le cytoplasme. Ces structures sont composées de ribonucléoprotéines, mélange d'ARN et de protéines et capables d'interactions protéines-protéines (Protter et Parker 2016). En 2019, deux premières études ont démontré que cGAS interagit avec la protéine G3BP1 ('GTPase-activating protein-(SH3 domain)-binding protein 1'), une helicase impliquée dans la formation des granules de stress (Z.-S. Liu et al. 2019; S. Hu et al. 2019). La colocalisation de cGAS et G3BP1, ainsi que la protéine PKR au sein des granules de stress promeut l'association de cGAS avec l'ADN et l'activation de la voie interféron. En 2022, la poursuite de ces études suggère que cGAS serait, avant même son activation par de l'ADN, dans une condition de pré-séparation de phase en étant associée à la protéine G3BP1, et que la délétion de cette dernière entraînerait une forte diminution de l'activation de cGAS en cas de détection d'ADN (Ming Zhao et al. 2022).Une étude récente de 2024 vient compléter ces études en investiguant les mécanismes moléculaires de l'activation de cGAS par les granules de stress. Zhang et al. montrent que la protéine USP8 ('ubiquitin specific peptidase 8'), une déubiquitinase, colocalise au sein des granules de stress avec les complexes cGAS-ADN suite à la détection de matériel génétique par cGAS (Xuejing Zhang et al. 2024). Plus précisément, ils montrent qu'en condition de stress, USP8, retire les chaînes K27-polyubiquitinées de la protéine DDX3X (pour 'DEAD-box helicase 3 X-linked'), une protéine des granules de stress, ce qui promeut sa condensation. Cette dernière facilite alors la séparation de phase de cGAS avec l'ADN et donc son activation (Xuejing Zhang et al. 2024).

3.3. cGAS dans les lysosomes

Dans les cellules au repos, une partie du cGAS cytoplasmique est dégradé, ce qui permet de limiter l'activation de la voie IFN-I. En effet, la lysine 414 est la cible d'une poly-ubiquitination K48, reconnue par la protéine p62, une protéine cargo qui initie la dégradation de cGAS par un phénomène d'autophagie en le délivrant vers les autophagosomes. Lors d'une activation de la voie IFN, la protéine TRIM14, qui se lie à cGAS, est activée et assure la stabilisation de cGAS en bloquant sa dégradation autophagique. Mécanistiquement TRIM14 recrute USP14, une déubiquitinase, afin de cliver les chaînes poly-ubiquitine liées à cGAS empêchant ainsi son interaction avec p62 et sa dégradation (M. Chen et al. 2016). Outre sa dégradation, cGAS est capable d'induire l'autophagie et la dégradation par les lysosomes de certains éléments comme des micronoyaux présents dans le cytoplasme et que je décrirai plus précisément dans la partie 4. En effet, cGAS est équipé d'un motif en position 355-360 qui permet sa liaison avec LC3 (pour 'microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3'). LC3 permet le transport de ces structures aux lysosomes afin de les dégrader, et tout ce mécanisme est indépendant de la synthèse de cGAMP et de STING (Mengmeng Zhao et al. 2021).Cet exemple montre la capacité de cGAS à jouer des rôles indépendants de l'axe cGAS-STING. Ces dernières années, de nouveaux rôles ont ainsi été mis en avant, et la plupart dans le compartiment nucléaire, ce que je détaillerai en partie 6.

4. L'activité enzymatique de cGAS et l'axe cGAS-STING

Comme mentionné précédemment, cGAS n'est que le premier acteur d'une cascade de signalisation importante avec son partenaire STING dont la finalité est l'activation de gènes de l'inflammation afin de combattre une infection ou un dysfonctionnement cellulaire, comme représenté en figure 29. Dans cette partie je détaillerai les différents types de stress qui activent la voie cGAS-STING.

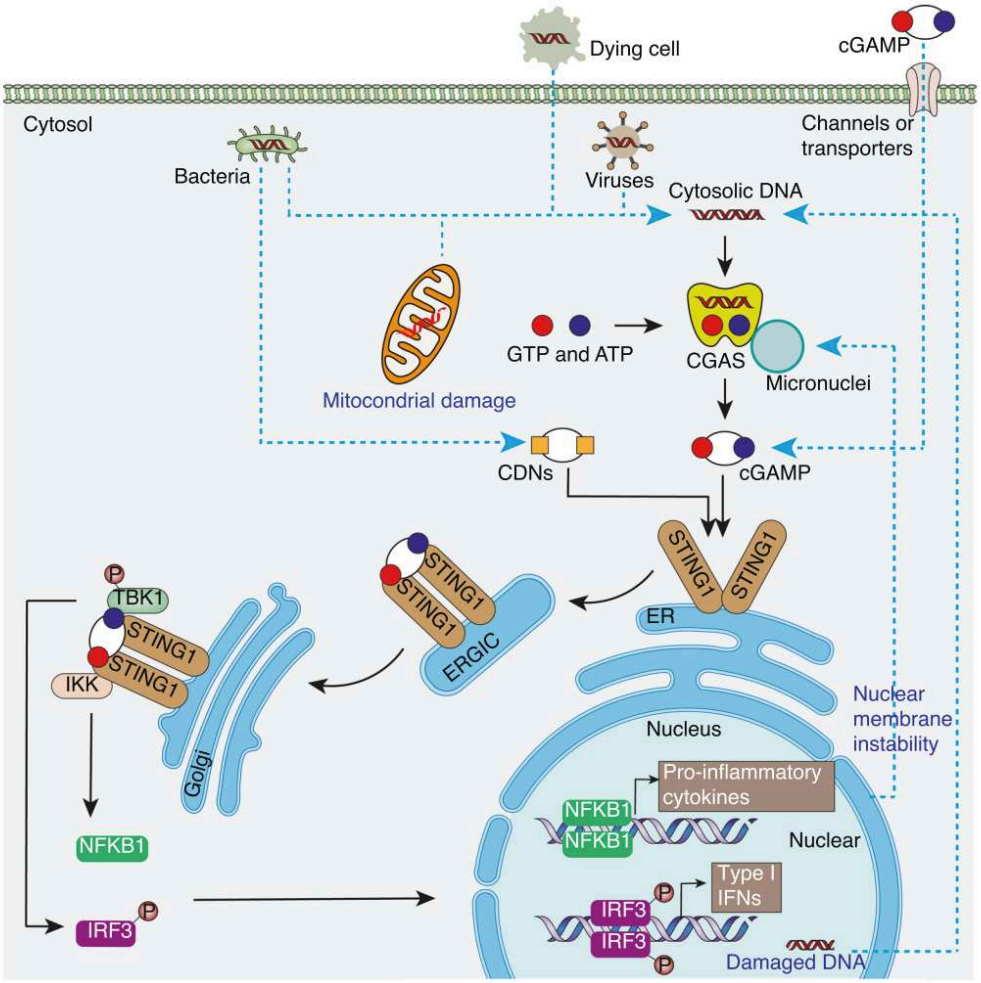


Figure 29: : Activation de la voie cGAS-STING par de l'ADN de différentes origines

***Figure 29 : Activation de la voie cGAS-STING par de l'ADN de différentes origines (Zhang 2021)**. Suite à la détection d'ADN microbien ou provenant de cellules mortes dans l'environnement, cGAS synthétise le second message cGAMP. L'activation de cGAS peut également se faire par de l'ADN cellulaire venant du noyau, sous forme soluble ou dans des micronoyaux et enfin provenant des mitochondries. cGAMP permet l'activation de STING et peut provenir de cellules voisines via des jonctions cellulaires. Certaines bactéries contenant des dinucléotides cycliques peuvent activer directement STING sans passer par cGAS.*

4.1. La détection d'ADN de différentes origines

Comme décrit auparavant, cGAS est un senseur de la structure d'ADN double brin sans que la séquence n'impacte la liaison (Q. Chen, Sun, et Chen 2016). Si à l'origine cGAS a été décrit comme liant de l'ADN exogène issu d'infections microbiennes, il est également capable de s'activer avec la détection d'ADN d'origine cellulaire, provenant du noyau de la cellule ou encore des mitochondries.

Dans tous les cas, la présence d'ADN dans le cytoplasme traduit un stress cellulaire et nécessite l'activation d'une réponse inflammatoire (Hopfner et Hornung 2020).

4 .1.A. La détection d'ADN d'origine microbienne

Parmi les micro-organismes pouvant activer cGAS se trouvent des virus dont le génome est sous forme d'ADN, même temporaire comme ceux passant par une rétrotranscription. On trouve notamment le virus de l'herpes simplex 1, le virus de la vaccine, HIV et le cytomégalovirus (X.-D. Li et al. 2013; D. Gao et al. 2013; Paijo et al. 2016; Lio et al. 2016; Ahlers et al. 2016). cGAS détecte également l'ADN provenant de bactéries intracellulaires telles que *Chlamydia trachomati, Mycobacterium tuberculosis, Francisella novicida, Listeria monocytogene* et *Neisseria gonorrhoea* (Watson et al. 2015; A. C. Collins et al. 2015; Wassermann et al. 2015; Storek et al. 2015; Hansen et al. 2014; Andrade et al. 2016). Il est également possible que cGAS détecte le génome de certains organismes plus évolués comme des parasites tels que le protozoaire *Plasmodium* (Hahn et al. 2018). Le génome de certaines bactéries induit directement l'activation de STING, ce que je détaillerai dans la partie 4.3. La détection du matériel génétique de ces microbes est dépendante d'autres mécanismes cellulaires permettant son accessibilité car ces génomes sont protégés par des structures comme des membranes ou des capsides (D. Cohen et al. 2019).

Dans la partie 5 je détaillerai les rôles que cGAS joue dans le noyau des cellules. Cette localisation lui permet également de réaliser son rôle de senseur d'ADN. En effet, le génome de certains virus se trouve dans le noyau suite à l'infection. C'est le cas de HIV qui est détecté par cGAS à l'aide de la protéine NONO (pour 'non-POU domaine-containing octamer binding protein'). NONO est capable de se lier d'une part à la capside de HIV et d'autre part à cGAS, et induit la détection du génome viral par cGAS (Lahaye et al. 2018). Il existe d'autres protéines capables d'interagir avec cGAS afin de faciliter la détection de génome microbien, et qui sont répertoriés dans le tableau 2 ci-dessous (Hopfner et Hornung 2020).

Tableau 2 : *partenaires de cGAS dans le noyau*

Partenaire de liaison	Fonction	Localisation	Référence
NONO	Facilite la détection de HIV par cGAS dans le noyau	noyau	(Lahaye et al. 2018)
PQBP1 ('polyglutamine-binding protein 1')	Liaison à l'ADN issu de la rétrotranscription de HSV1 et facilite sa détection par cGAS	Noyau / granules cytoplasmiques	(Yoh et al. 2015)
ZCCHC3 ('zinc finger CCHC-type containing 3')	Facilite la liaison d'ADN double brins avec cGAS	cytoplasme	(Lian et al. 2018)
G3BP1	Facilite la liaison d'ADN double brins avec cGAS	Noyau / cytoplasme	(Z.-S. Liu et al. 2019)

4.1.B. La détection d'ADN du soi extra-cellulaire

Suite à la mort de cellules, d'un phénomène d'apoptose ou après une mauvaise phagocytose, des débris de cellules se retrouvent libres dans le milieu extra-cellulaire. Si l'ADN de la cellule mourante n'est pas bien dégradé, il peut être internalisé dans une cellule et entraîner l'activation de l'axe cGAS-

STING (D. Gao et al. 2015). Dans certains cas, de l'ADN provenant de cellules cancéreuses peut se retrouver dans des vésicules extracellulaires, et leur internalisation dans des cellules immunitaires comme des cellules dendritiques permet de déclencher une réponse immunitaire dans la zone de la tumeur (Diamond et al. 2018; Deng et al. 2014; M. M. Xu et al. 2017).

4.1.C. La détection d'ADN nucléaire

Différents stress et dysfonctionnements de structure du noyau ou lors de la réplication peuvent causer la fuite de matériel génétique du noyau jusque dans le cytoplasme de la cellule. Ces portions de génome se retrouvent directement solubles dans le cytoplasme ou enveloppées d'une portion d'enveloppe nucléaire (Hopfner et Hornung 2020).

4.1.C.i. Les micronoyaux

Ces structures sont composées d'un fragment de génome et peuvent être le résultat de cassures double brins de la chromatine ou d'erreur lors de la mitose, si bien qu'une chromatide entière peut se retrouver dans un micronoyau (Harding et al. 2017). Bien qu'entourée d'une portion d'enveloppe nucléaire, cette structure n'est pas stable, notamment à cause du réseau de lamine sous-jacent très désorganisé (Hatch et al. 2013). La rupture de cette enveloppe permet donc à cGAS de détecter l'ADN qui s'y trouve et de déclencher la synthèse de cGAMP. Plus récemment, il a été découvert que grâce à sa localisation nucléaire, cGAS peut se trouver directement dans le micronoyau avant que celui-ci ne se retrouve dans le cytoplasme. Une fois le micronoyau formé, cGAS peut déclencher la synthèse de cGAMP avant même que l'enveloppe nucléaire ne se dégrade (Jiang et al. 2019a).

4.1.C.ii. Les fragments de chromatine cytoplasmiques

Ce type de fragments de chromatine, à l'inverse des micronoyaux, se retrouve directement dans le cytoplasme sans enveloppe autour. Ce phénomène est majoritairement observé dans un contexte de vieillissement, au cours duquel le réseau de lamine nucléaire située sous l'enveloppe nucléaire devient fragile (Ivanov et al. 2013). Cela engendre des problèmes de structure et peut mener à la rupture de l'enveloppe nucléaire et la fuite de fragments de chromatine (Lan et al. 2014). Ce phénomène est particulièrement observé lors de la sénescence des cellules avec la diminution de production de lamine comme expliqué dans le chapitre 1. Ces fragments nommés CCF activent la voie cGAS-STING ce qui aboutit à la production de molécules pro-inflammatoires, qui dans le cas de la sénescence correspondent au SASP (Glück et al. 2017; Dou et al. 2017). La formation et la fuite de CCFs dans le cytoplasme peut également être provoquée par des ruptures transitoires de l'enveloppe nucléaire lors de stress physiques. Ces stress correspondent à des déformations nucléaires survenant lors de migration cellulaire et soumises à des compressions. Cela entraîne la formation de structure appelées blebs et correspondants à des bourgeonnement et souvent accompagnés d'une rupture de l'enveloppe qui même si réparée rapidement permet la fuite de portions d'ADN (Denais et al. 2016; Raab et al. 2016). La détection de ces fragments par cGAS est facilité par le complexe chaperon HIRA, ce que je détaillerai dans la partie 4.4 (Dasgupta et al. 2024).

4.1.D. La détection d'ADN mitochondrial

L'autre source d'ADN dans la cellule hormis le noyau sont les mitochondries. Lors d'un stress provoquant l'apoptose, la membrane des mitochondrie devient perméable grâce à la formation des pores BAK/BAX (pour 'Bcl2-antagonist killer 1' et 'Bcl2-associated X protein') afin de libérer le cytochrome C dans le cytoplasme (Edlich 2015). Ceci entraîne aussi la libération d'ADN mitochondrial dans le cytoplasme qui peut activer la voie cGAS-STING et donc une réponse inflammatoire, qui peut être atténuée de façon caspase-dépendante. Ainsi, ce mécanisme procure un niveau de contrôle par les mitochondries d'une mort cellulaire immunologiquement silencieuse ou pro-inflammatoire (Rongvaux et al. 2014; West et al. 2015; White et al. 2014). De façon intéressante, l'altération des mitochondries dans le cerveau âgé entraîne également une fuite d'ADN mitochondrial dans le cytoplasme, activant la voie cGAS-STING et une inflammation chronique entraînant une neurotoxicité, freinée par l'emploi d'inhibiteurs de la voie cGAS-STING (Gulen et al. 2023). Cette activation de cGAS par l'ADN mitochondrial peut également avoir lieu dans d'autres contextes que celui de l'apoptose. En effet, l'infection par des virus comme HSV-1 ou même le virus de la dengue, qui n'est pas un virus à ADN, entraîne la fuite de l'ADN mitochondrial pour activer cGAS comme mécanisme de défense (Gulen et al. 2023). Ce phénomène est également provoqué par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-1β, qui entraîne une fuite d'ADN mitochondrial dans le cytoplasme et l'activation de la voie cGAS-STING (Aarreberg et al. 2019).

La détection de ces fragments d'ADN d'origines très variées déclenche la dimérisation de cGAS et l'activation de son activité catalytique, à savoir la synthèse d'un second messager.

4.2. La synthèse de cGAMP, un second messager dans l'initiation de la réponse interféron

La fixation de 2 molécules d'ADN sur les sites A et B de cGAS permet la dimérisation et la formation d'un sandwich avec 2 molécules d'ADN au centre des 2 molécules de cGAS. En parallèle, un changement de conformation de cGAS permet la liaison aux molécules, dans un premier temps d'ATP puis de GTP afin de déclencher son activité catalytique (Pan et al. 2023). La dimérisation est suivie d'une oligomérisation de ces dimères, et dans le cas où les molécules d'ADN sont longues, plusieurs molécules de cGAS peuvent se fixer dessus, ce qui renforce les interactions (Andreeva et al. 2017) et facilite la séparation de phase liquide-liquide (Du et Chen 2018). Le site de liaison C à l'ADN permet d'augmenter l'affinité entre les complexes cGAS-ADN (Xie et al. 2019). La présence de zinc et / ou de manganèse permet également de renforcer les interactions et donc l'activité enzymatique de cGAS (Du et Chen 2018; C. Wang et al. 2018; Hooy et al. 2020).

La réaction qui permet la synthèse du cGAMP se déroule en deux étapes. La première consiste à lier la molécule d'ATP sur le 2'OH de GTP, ce qui permet d'obtenir une molécule linéaire intermédiaire, un hétérodinucléoside phosphate pppG(2'-5')pA (Ablasser, Goldeck, et al. 2013). Il arrive que la réaction aboutisse à la formation d'homodimères pppG(2'-5')pG ou pppA(2'-5')pA dans 10 à 20% des cas (Ablasser, Goldeck, et al. 2013; Hall et al. 2017), mais ces molécules ne servent pas pour la suite de la

réaction (Kranzusch et al. 2014). La deuxième partie de la réaction permet de lier cette fois le GTP sur le 3'OH de l'ATP et ainsi permettre l'obtention d'une molécule cyclique : le 2'3'-cGAMP (Kranzusch et al. 2014). Chez les bactéries, l'homologue de cGAS permet la synthèse de 3'3'-cGAMP, car ce sont les 3'OH de chaque molécule qui sont utilisés. Cette évolution chez l'Homme ne représente que quelques acides aminés de différence, ce qui montre à quel point le mécanisme est conservé au cours de l'évolution (Hopfner et Hornung 2020). Dans le cas où les molécules de cGAS se sont pas en condensats cette synthèse se bloque souvent après la première étape et des intermédiaires linéaires sans effets diffusent dans le cytoplasme. Le site C et l'oligomérisation permettent une meilleure condensation des complexes cGAS-ADN afin que la production de cGAMP soit optimale (Xie et al. 2019).

Le cGAMP ainsi formé permet l'activation de la protéine STING que je détaillerai dans la partie suivante. Il est important de noter que la molécule de cGAMP peut être transmise dans le milieu extra-cellulaire et entrer dans des cellules voisines, majoritairement grâce à des jonctions GAP, et ainsi activer la molécule STING des cellules avoisinantes (Ablasser, Schmid-Burgk, et al. 2013).

4.3. STING, le partenaire de cGAS

La partenaire de cGAS a été découvert bien avant, en 2008 par les équipes des docteurs Barber Shu (Ishikawa et Barber 2008; B. Zhong et al. 2008). Bien que son mécanisme fût à l'époque encore méconnu, STING a été caractérisé comme jouant un rôle essentiel dans la réponse immunitaire face aux ADN cytosoliques.

4.3.A. Structure et localisation de STING

Contrairement à cGAS, STING n'est pas une protéine diffuse dans le cytoplasme mais transmembranaire, ancrée dans la membrane du ER (pour 'endoplasmic reticulum') grâce à ses 4 domaines transmembranaires. Dans le compartiment cytosolique, STING comporte un domaine LBD (pour 'ligand-binding domain'), nécessaire pour la liaison de cGAMP, et sa région C-terminale avec un domaine de liaison à TBK1 (pour 'TANK-binding kinase 1') (Shang et al. 2019; Tsuchida et al. 2010). Dans une condition standard, STING est présent sous forme de dimère dans la membrane du ER. Cette dimérisation permet la formation d'un motif en papillon / en V pour lier le ligand (Shang et al. 2012; Y.-H. Huang et al. 2012; Q. Yin et al. 2012; Ouyang et al. 2012). Je ne décrirai pas plus la structure précise de STING, pour revue voir (Hussain et al. 2022).

4.3.B. L'activation de STING

STING est capable de s'activer en liant le cGAMP mais également en liant du c-di-GMP, une molécule qui n'est pas synthétisée par cGAS. Le modèle de l'activation de STING est représenté en figure 30. Cette molécule de c-di-GMP est présente dans certaines bactéries et permet l'activation de STING en cas d'infection par ces bactéries, indépendamment de cGAS (Burdette et al. 2011). Avant la liaison du second messager à STING, les molécules TBK1 sont déjà liées ou proche de STING, mais sans changement de conformation de STING, leur activation est impossible (C. Zhang et al. 2019). Lors de la liaison avec cGAMP, STING effectue une rotation à 180°. Cette nouvelle configuration permet aux

dimères de STING de s'associer entre eux côte à côte grâce à des ponts disulfures (Hopfner et Hornung 2020). De plus, elle permet le déplacement de STING du ER vers l'appareil de Golgi grâce au complexe de transport antérograde COPII. Une fois dans ce nouveau compartiment le changement de confirmation et l'oligomérisation de STING permet la trans phosphorylation des molécules de TBK1 entre elles, toujours liées au domaine C-terminal de STING (Ergun et al. 2019). Sous sa forme active, TBK1 phosphoryle à son tour le STING sur son CTT (pour 'C-terminal tail'). CTT sous forme phosphorylée devient un site d'ancrage pour le facteur de transcription IRF3 (pour 'interferon regulatory factor 3') (B. Zhao et al. 2019; Shang et al. 2019). STING a plusieurs rôles lors de son activation comme l'activation des lysosomes, l'induction de l'autophagie, et surtout l'activation des facteurs de transcription IRF3 et NF-κB que je vais détailler dans le paragraphe suivant. Pour les autres rôles de STING voir (Hopfner et Hornung 2020).

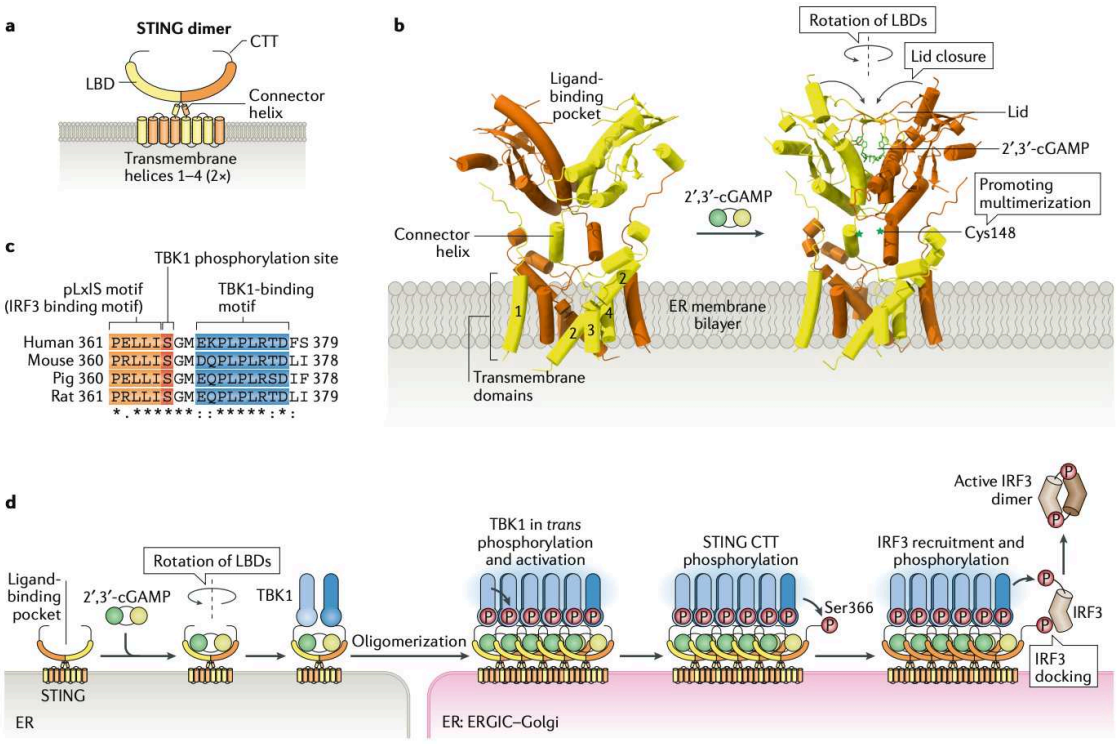


Figure 30 : Activation de STING (Hopfner 2020) *La fixation de cGAMP permet la rotation de STING et le recrutement de TBK1 ainsi que l'oligomérisation et la translocation du complexe du réticulum endoplasmique vers le compartiment intermédiaire avec l'appareil de Golgi. La phosphorylation de STING par TBK1 permet le recrutement de IRF3 et son activation.*

4.3.C. L'activation de la réponse interféron par STING

Le recrutement de IRF3 sur STING permet la phosphorylation du facteur de transcription sur les sérines 386 et 396 par TBK1 (Tanaka et Chen 2012). La phosphorylation permet un changement de conformation d'IRF3 qui expose son motif NLS, lui permettant de rentrer dans le noyau des cellules. La dimérisation stabilise la forme phosphorylée de IRF3, et c'est ainsi qu'il peut entrer dans le noyau via les importines (Tamura et al. 2008). Une fois dans le noyau, IRF3 se lie spécifiquement à des

séquences nommées ISRE. Ces séquences sont localisées sur les promoteurs des gènes de l'interféron et d' autres ISGs, et la liaison d'IRF3 permet leur expression (Fitzgerald et al. 2003).

Une autre cible de STING est un autre facteur de transcription nommé NF-κB. Ce facteur de transcription est normalement maintenu inactif par un complexe nommé IκB (pour 'inhibitor of κB'). STING permet l'activation de kinases nommées IKKα et IKKβ (pour 'inhibitor of κB kinase') qui phosphorylent IκB, menant à sa dégradation. Ainsi, le facteur de transcription NF-κB se retrouve libre et relocalise dans le noyau où il active également l'interféron grâce à son domaine régulateur nommé PRD II (pour 'positive regulatory domain II') (Pan et al. 2023).

Si l'axe cGAS-STING jouer un rôle essentiel dans l'expression de cytokines pro-inflammatoires, STING peut être activé sans l'action d'un second messager comme le montre l'étude de Dunphy et al. Leurs travaux s'intéressent à un autre senseur d'ADN cytoplasmique nommé IFI16 (pour 'interferon-γ-inducible factor 16') nécessaire pour l'expression d'IFNβ dans les cellules humaines THP1 suite à un traitement à l'étoposide. Dans un contexte de dommages à l'ADN, ATM phosphoryle p53 et IFI16 se lie à ce dernier. Le complexe p53-IFI16 s'associe également avec TRAF6 ('TNF receptor associated factor 6') et se retrouve dans le cytoplasme. La liaison de ce complexe avec STING entraîne la fixation par TRAF6 d'une chaîne de polyubiquitine K63 sur STING. La formation du complexe et l'ajout d'ubiquitine sur STING permet l'activation du facteur de transcirption NF-κB afin d'enclencher une réponse IFN suite à la génération de cassures double-brin (Dunphy et al. 2018).

4.4. Le rôle de l'axe cGAS-STING dans la sécrétion du SASP lors de la sénescence

Plusieurs études de 2017 se sont intéressées à l'effet de la déplétion de cGAS dans les MEFs. Les travaux de Yang et al, Dou et al et Glück et al ont montré que la déplétion de cGAS ou STING entraîne une immortalisation des cellules en culture ou, lors de traitement pro-sénescents, que cette déplétion est également corrélée à l'absence de marqueurs de sénescence en comparaison de cellules WT (pour 'wild type'). De plus, leurs études montrent l'importance de l'axe cGAS-STING pour l'expression et le maintien du SASP suite à des stress pro-sénescents (H. Yang et al. 2017; Glück et al. 2017; Dou et al. 2017). De plus, chez l'Homme, les patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires ont des pronostics de rémission plus mauvais lorsque l'expression de cGAS est basse dans les cellules cancéreuses (H. Yang et al. 2017). La fin de l'étude de Yang et al soulève la question d'un rôle de cGAS indépendant de STING dans la gestion du cycle cellulaire et de la sénescence des cellules du fait de son interaction avec la chromatine, ce que j'aborderai dans la partie 6.

Comme expliqué dans le chapitre 1, lors de l'induction de la sénescence, la cellule subit de nombreux changements métaboliques. La génération de cassures de la chromatine et la diminution de la synthèse de la lamine B permettent de maintenir et renforcer l'état sénescent de la cellule. Dans ce mécanisme, l'axe cGAS-STING joue un rôle essentiel puisque des fragments de chromatine vont se retrouver dans le cytoplasme sous forme de micronoyaux ou de CCF. Comme mentionné dans le chapitre 1, la présence des CCFs est observée dans tous les contextes de sénescence, réplicative, suite

à des stress ou lors de l'activation d'oncogènes. La détection de ces éléments par cGAS permet l'activation de STING et donc des facteurs de transcriptions, comme représenté en figure 31 (Glück et al. 2017; H. Yang et al. 2017; Dou et al. 2017). Les séquences spécifiques de ces derniers évoquées dans le paragraphe précédent se trouvent sur les promoteurs des gènes codant pour les molécules pro-inflammatoires présentes dans le SASP, ce qui permet leur expression grâce à l'axe cGAS-STING (X. Hao, Wang, et Zhang 2022). L'expression et la sécrétion des facteurs du SASP permet l'induction de la sénescence de façon paracrine. Après avoir été soumis à un stress oxydatif, le surnageant des MEFs WT permet d'induire la sénescence chez des MEFs $cGAS^{-/-}$ alors que le surnageant de MEFs $cGAS^{-/-}$ ne le permet pas (Glück et al. 2017). Dans un contexte in vivo, la déplétion de cGAS ou STING empêche également la mise en place de la sénescence chez des souris exprimant un oncogène (Glück et al. 2017; Dou et al. 2017).

Lors du vieillissement des organismes ou à cause de différents stress touchant la chromatine, la répression des séquences LINE-1 est moins efficace et celles-ci peuvent se réactiver (De Cecco et al. 2019; Simon et al. 2019). Cette réactivation entraîne la synthèse d'ADNc des LINEs qui se retrouvent dans le cytoplasme des cellules, et entraînent l'activation de l'axe cGAS-STING. Cette activation est à l'origine d'une inflammation chronique causée par l'IFN et associée au vieillissement, qui participe au développement de pathologies liées au vieillissement comme mentionné dans le chapitre 1 (X. Hao, Wang, et Zhang 2022).

Plus récemment, l'étude de Dasgupta et al a permis d'apporter des précisions importantes sur la régulation de cGAS en présence des CCFs. Le complexe chaperon d'histone HIRA présenté dans le chapitre 2 est en effet impliqué avec les PML NBs dans la régulation positive du SASP. La protéine p62/ est un régulateur d'autophagie également localisé sur les CCF et qui permet la dégradation de cGAS dans le cytoplasme et diminue donc l'expression du SASP. Le complexe chaperon HIRA serait capable de se lier à p62 et permet sa séquestration dans les PML NBs dans le noyau, ce qui permettrait de prévenir la dégradation de cGAS et donc d'activer l'axe CCF-cGAS-STING (Dasgupta et al. 2024).

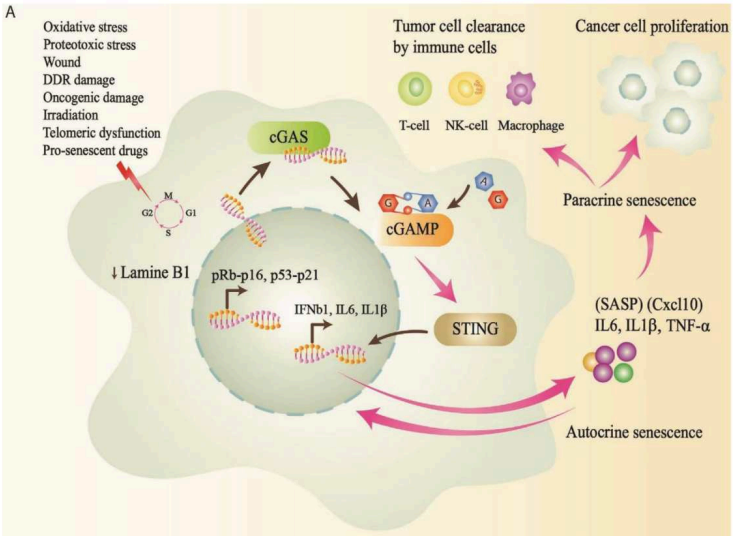


Figure 31 : cGAS-STING dans la sénescence (Saeed 2020). *Les dommages à l'ADN induits par la sénescence et la perméabilisation de l'enveloppe nucléaire permettent l'activation de la voie cGAS-STING et la production de cytokines pro-inflammatoires composant le SASP.*

Tout ce que j'ai décrit jusqu'à maintenant montre à quel point cGAS est un élément cytoplasmique essentiel pour l'immunité inné grâce à son activité enzymatique. Dans les parties suivantes je vais aborder un sujet encore plus récent qui a fait débat pendant quelque temps dans la communauté scientifique mais qui est maintenant bien admis, à savoir que cGAS est également une protéine nucléaire. Je vais donc m'attacher à décrire les différents rôles de cGAS dans le compartiment nucléaire, et je discuterai des rôles qui restent à découvrir.

5. La localisation nucléaire de cGAS et son interaction avec la chromatine

En raison de sa capacité à activer une réponse inflammatoire en cas de liaison à de l'ADN, une question essentielle toujours d'actualité dans la communauté scientifique est de décrypter quels mécanismes permettent de réguler cGAS et d'éviter son activation aberrante pouvant provoquer de l'auto-immunité. La découverte de cGAS dans le noyau (partie 5.1) a ouvert la voie à la découverte de nouveaux rôles nucléaires pour cette protéine (partie 6) et à une meilleure compréhension des mécanismes permettant de réguler son activité dans le compartiment nucléaire que je détaillerai en partie 5.3.

5.1. La découverte de cGAS dans le compartiment nucléaire

La première observation de cGAS dans le noyau remonte à 2015 avec l'étude de Orzalli et al (Orzalli et al. 2015). Dans cette étude, l'équipe du Dr. Knipe montre par des expériences de fractionnement en WB que cGAS est localisé dans le noyau de fibroblastes primaires humains et de kératinocytes immortalisés. cGAS coopère avec un autre senseur d'ADNdb nucléaire, IFI16, pour détecter le génome du virus HSV-1 et initier la réponse immunitaire (Orzalli et al. 2015). Suite à cette découverte, un débat s'est installé dans la communauté des chercheurs afin de savoir si cGAS était une protéine majoritairement cytoplasmique ou nucléaire. Ces questions sont légitimes car depuis sa découverte cGAS était uniquement décrit comme un senseur d'ADN cytoplasmique et fonctionnant avec son partenaire STING. Quelques années plus tard, différentes études ont néanmoins mis en lumière d'autres rôles de cGAS dans le noyau, avec la détection d'autres génome viraux comme HIV, ou encore l'inhibition de la réparation de l'ADN par voie HR dont je parlerai dans la partie 6 (Lahaye et al. 2018; H. Liu et al. 2018; Jiang et al. 2019a). De nombreuses questions ont alors émergées pour savoir comment cGAS pouvait se trouver dans le noyau sans être constamment activé par l'ADN contenu dans ce compartiment et si cette protéine est capable de jouer des rôles indépendamment de son activité catalytique. L'étude de Volkman et al est venue confirmer que cGAS était principalement une protéine nucléaire, indépendamment de la phase du cycle cellulaire, et était ancrée de façon très résistante à la chromatine (Volkman et al. 2019). Cette étude a ouvert la voie sur les études structurales de liaison de cGAS au nucléosome que je détaillerai dans la partie 5.3.

5.2. Le transport de cGAS entre le noyau et le cytoplasme

Les premières observations faites dans des contextes de surexpression de cGAS ont suggéré que cGAS était attiré dans le noyau juste au début de la mitose, pendant l'étape de prophase au cours de laquelle l'enveloppe nucléaire est dissociée. Sa présence dans le noyau dans des cellules qui se sont récemment divisées serait alors le résultat de l'association de cGAS avec la chromatine mitotique, avant sa redistribution dans le cytoplasme au cours de l'interphase (Gentili et al. 2019; Dou et al. 2017; L. Zhong et al. 2020). Cependant, des observations ultérieures sur cGAS endogène ont montré une localisation nucléaire de la protéine à différents moments du cycle cellulaire, ou dans des cellules post-mitotiques, signe que des mécanismes actifs peuvent réguler la quantité de cGAS nucléaire (Gentili et al. 2019; Volkman et al. 2019; Jiang et al. 2019a). De plus, la proportion de cGAS nucléaire / cytoplasmique varie en fonction du type cellulaire, ce qui suggère que d'autres mécanismes régulent la localisation de cGAS dans les cellules (Y. Wu et al. 2022). Les mécanismes d'entrée et sortie de cGAS du noyau sont représentés en figure 32. Au niveau de sa séquence, cGAS possèdent 2 sites NLS, un dans la partie C-terminale au niveau du site C de liaison à l'ADN et un dans la région N-terminale (W. Hao et al. 2023). Plusieurs équipes ont procédés à des observations sur la localisation des différentes régions de la protéine. Les travaux de Gentili et al ont montré que le domaine N-terminal seul était majoritairement localisé dans le noyau, suggérant que cette région est importante pour la localisation nucléaire de la protéine (Gentili et al. 2019). Les études des équipes de Volkman et Wu ont montré que le domaine C-terminal était également localisé dans le noyau, suggérant l'existence d'autres mécanismes pour la localisation nucléaire de cGAS (Volkman et al. 2019; Y. Wu et al. 2022). Des études plus récentes ont également mis en avant l'existence de mécanismes d'export de cGAS. Par exemple, lors d'un stress lors de la traduction des ARNm, cGAS se déplace du noyau vers le cytoplasme (Wan et al. 2021). La déméthylation de cGAS (Fang et al. 2023) ou encore l'apport d'ADN dans le cytoplasme (H. Sun et al. 2021) sont également impliqués dans l'export de cGAS. Contrairement aux motifs NLS de cGAS qui semblent varier en fonction des espèces (Orzalli et al. 2015; Xie et al. 2019), le motif NES de cGAS est très conservé chez les mammifères (H. Sun et al. 2021) et participe à la régulation de la localisation nucléocytoplasmique de cGAS. Malgré toutes ces observations il reste encore des mécanismes à découvrir à propos du trafic de cGAS entre ces deux compartiments.

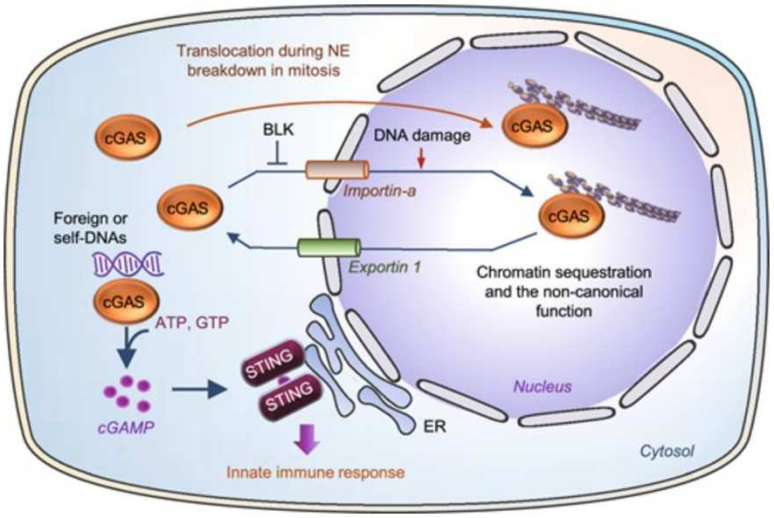


Figure 32 : Transport de cGAS entre le noyau et le cytoplasme (Bai 2021). *L'entrée de cGAS dans le noyau peut être active via son motif NLS avec les importines et peut être inhibée par la phosphorylation de cGAS. Son entrée peut également être passive lors de la mitose ou de la rupture de l'enveloppe nucléaire. Pour sortir du noyau, cGAS est pris en charge par des exportines grâce à son motif NES.*

L’interaction de cGAS avec la chromatine

Plusieurs études ont montré que dans le noyau, cGAS n’est pas diffus mais lié avec la fibre de chromatine, et que cette liaison empêche sa dimérisation et son activation par l'ADN génomique contenu dans le noyau (Bai et Liu 2021).

5.3.A. La liaison de cGAS au nucléosome

Si cGAS est capable de se lier à l’ADN internucléosomal, les observations en cryomicroscopie électronique ont permis une grande avancée dans la compréhension de l'ancrage chromatinien de cGAS, démontrant son interaction avec les nucléosomes (Boyer et al. 2020; Cao et al. 2020; Kujirai et al. 2020; Michalski et al. 2020; Pathare et al. 2020; B. Zhao et al. 2020). Dans leurs travaux initiaux, Volkman et al avaient montré dans 6 lignées de cellules différentes que cGAS est associé aux histones lors du fractionnement des cellules (Volkman et al. 2019; Zierhut et al. 2019). Une série d'études structurales prestigieuses publiées en 2020 est venue compléter ces résultats en dévoilant la structure du domaine catalytique de cGAS lié à la particule cœur du nucléosome. cGAS se lie au patch acidique du dimère H2A-H2B, un site d'ancrage essentiel de nombreux facteurs se liant aux nucléosomes, via son site B de liaison à l’ADN (Boyer et al. 2020; Cao et al. 2020; Kujirai et al. 2020; Pathare et al. 2020; Michalski et al. 2020; B. Zhao et al. 2020). Cette liaison du site B sur les nucléosome bloque la liaison à l’ADN et maintient cGAS sous sa forme monomérique, empêchant ainsi toute activation comme représenté en figure 33 (Bai et Liu 2021). En effet, même en présence d’ADN double brin, la liaison *in vitro* de cGAS aux nucléosomes inhibe son activité catalytique. L'affinité de cGAS pour le particule nucléosomale est 10 à 100 fois plus forte que pour l’ADN et est de l'ordre du nanomolaire (Oliveira Mann et Hopfner 2021). De façon importante, des mutations dans les acides R236 ou R255 qui forment des ponts salins avec des résidus accessibles de H2A, empêchent l'interaction de cGAS avec les nucléosomes *in vitro*, et son ancrage nucléaire *in vivo*, déclenchant alors une réponse immunitaire aberrante démontrant ainsi la relevance fonctionnelle de la liaison de cGAS au nucléosome (Pathare et al. 2020). Le site A de cGAS reste partiellement libre, même si la proximité du nucléosome bloque son accessibilité et sa mutation n’empêche pas la liaison de cGAS avec les nucléosomes. Le site C reste libre et est impliqué dans l'interaction avec un deuxième nucléosome en trans, favorisant ainsi l'assemblage de complexes cGAS-nucléosomes d'ordre supérieur (Kujirai et al. 2020; Pathare et al. 2020). Tout comme la liaison avec l’ADN, la liaison de cGAS avec la chromatine entraîne en effet la formation d’une structure sous forme de sandwich avec cette fois les molécules de cGAS au centre, enclavées entre 2 nucléosomes (Oliveira Mann et Hopfner 2021). Comme expliqué dans le chapitre 2, la chromatine peut avoir des niveaux de compaction différents. De façon intéressante, par ChIP-seq contre une protéine exogène GFP-cGAS, il a été montré que ce GFP-cGAS se lie préférentiellement au niveau des zones d'hétérochromatine comme les régions satellites au niveau des centromères, et est également enrichi sur les LINEs (Gentili et al. 2019). Cette observation est en accord avec le fait que les zones ouvertes de chromatine sont actives pour la transcription et que la dynamique des nucléosomes est très importante sur ces sites ce qui limite sans doute la liaison stable de cGAS dans ces régions.

De façon importante, un certain nombre de stress affectant la structure la chromatine permettent de mobiliser le cGAS accroché à la chromatine. L'utilisation de nucléases qui digèrent l'ADN (Volkman et al. 2019), ou d'aclarubucine (Pathare et al. 2020) qui disrupte la structure du nucléosome, altèrent l'ancrage chromatinien de cGAS. Une étude de 2024 démontre que lors d'un stress oncogénique, le complexe MRN et plus précisément MRE11 aide au décrochage de cGAS des nucléosomes afin de lier des fragments d'ADN dans le cytoplasme et d'activer la voie cGAS-STING, qui participerait à la réponse anti-tumorale (Cho et al. 2024). Le mécanisme par lequel MRE11 libère cGAS de la chromatine reste cependant inconnu, mais est indépendant de son activité nucléasique.

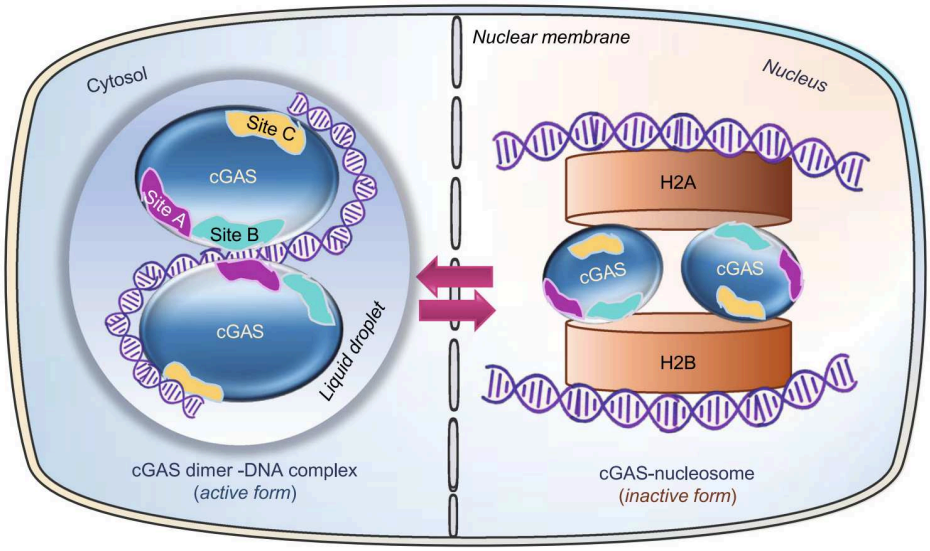


Figure 33 : Inhibition de cGAS par le nucléosome (Bai 2021). *La liaison de cGAS sur la chromatine permet l'inhibition de son site B de liaison à l'ADN. Cette liaison par le patch acidique permet également de maintenir cGAS sous forme monomérique. Cette structure participe également à l'organisation de la chromatine avec sa compaction.*

5.3.B. Les modifications post-traductionnelles de cGAS dans le noyau

Comme évoqué précédemment, les modifications post-traductionnelles de cGAS impactent fortement sa capacité à être actif ou non. La phosphorylation de cGAS sur la tyrosine 215 permet notamment de maintenir cGAS dans le cytoplasme afin de jouer le rôle de senseur d'ADNdb (H. Liu et al. 2018). La présence de dommages à l'ADN entraînerait une déphosphorylation de Y215 et ainsi une translocation de cGAS dans le noyau. A l'inverse, la méthylation de cGAS sur la lysine 362 par SUV39H1, une methyltransférase, permet le recrutement de UHRF1 (pour 'ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domain 1'), une ubiquitine ligase qui reconnaît cGAS méthylé via son domaine TUDOR. UHRF1 renforce alors la liaison de cGAS avec la chromatine (Fang et al. 2023). L'inhibition de SUV39H1 (et donc une baisse de la méthylation de cGAS) ou l'absence d'UHRF1 entraîne une augmentation de l'activation de la voie cGAS-STING et contribue à l'immunité anti-tumorale. Le fait que cGAS doive être déméthylé ou non afin de se décrocher de la chromatine est encore inconnu. Une autre phosphorylation de cGAS, sur les sérines 120 et 305 a été identifiée en 2023. Elle permet à cGAS nucléaire de se lier à TRIM41 afin de réprimer l'expression des LINEs, ce que je développerai dans la partie 6.6 (Zhen et al. 2023). Entre les modifications opérées dans le cytoplasme afin de

réguler son activité enzymatique et celles dans le noyau, cGAS est donc la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles. Le rôle d'un certain nombre de modifications comme par exemple la potentielle SUMOylation de cGAS dans le noyau reste à explorer (pour revue voir J.-X. Song et al. 2022).

5.3.C. Le cas particulier de la mitose

Ces découvertes à propos de la liaison de cGAS au nucléosome ont rapidement soulevé l'interrogation suivante : que se passe-t-il lors de la mitose quand le compartiment nucléaire devient accessible ? Lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire, cGAS se lie abondamment à la chromatine et la kinase dépendante des cyclines CDK1, active à ce moment précis du cycle cellulaire, phosphoryle cGAS sur la sérine 305 (L. Zhong et al. 2020). Cette phosphorylation bloque la synthèse de cGAMP, et même en présence d'ADN double brin, le domaine catalytique de cGAS reste inactif, comme représenté en figure 34. Cette inactivation est renforcée par la phosphorylation de plusieurs sites en N-terminal par la kinase Aurora B, ce qui bloque sa capacité à lier l'ADN et à faire de la séparation de phase (Tuo Li et al. 2021). A la fin de la mitose après reformation de l'enveloppe nucléaire, cGAS est déphosphorylé par PP1 (pour 'protein phosphatase 1') et peut de nouveau être activé (L. Zhong et al. 2020). Cette inhibition de cGAS est bien sûr dépendante de sa capaciter à se lier à la chromatine, ce qui reste le mode d'inhibition de cGAS dans le noyau par défaut tout au long du cycle cellulaire. Lors de la mitose, la protéine BAF (pour 'barrier to autointegration factor'), joue un rôle important dans la reconstruction de l'enveloppe nucléaire et la bonne ségrégation des chromosomes , ce qui permet d'éviter la fuite de fragment de génomes dans le cytoplasme (Tokuko Haraguchi et al. 2008; T. Haraguchi et al. 2001; Margalit et al. 2005; Samwer et al. 2017). Cette protéine est également un régulateur important de l'activité enzymatique de cGAS car elle se lie à l'ADN pour inhiber la liaison de ce dernier, et ce, dans le cytoplasme et le noyau, ce que je détaillerai en parties 6.4 et 6.6 respectivement.

Toutes ces récentes découvertes sur la localisation nucléaire de cGAS ont donné suite à de nombreuses recherches afin de découvrir ses potentiels rôles dans ce compartiment. cGAS est impliqué dans plusieurs mécanismes dans le noyau des cellules, ce que je vais détailler dans la partie suivante.

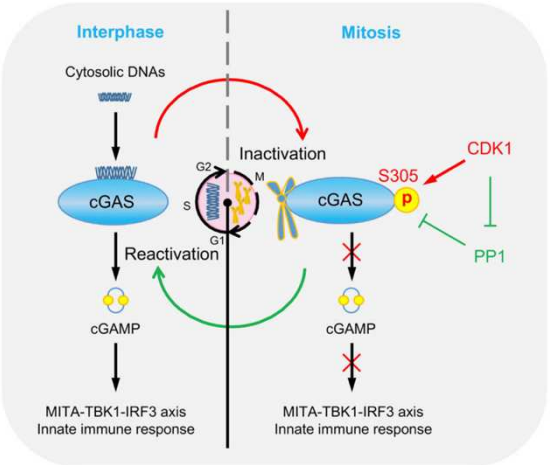


Figure 34 : : Inhibition de cGAS lors de la mitose (Zhong 2020). *Lors de la disparition de l'enveloppe nucléaire, cGAS est phosphorylé par CDK1 et également lié à la chromatine qui est sous forme de chromosomes. Même en présence d'ADN double brin, cGAS ne peut pas être activé dans cette situation.*

6. Les rôles de cGAS dans le noyau de la cellule

La forte affinité de cGAS pour les nucléosomes laisse penser que cGAS participer à réguler la dynamique de la chromatine. Si au départ cGAS semblait être uniquement lié à celle-ci afin d'être maintenu inactif, il est maintenant évident qu'il est un acteur dans la dynamique de cette structure. Tous les rôles non canoniques de cGAS dans le noyau sont représentés en figure 35.

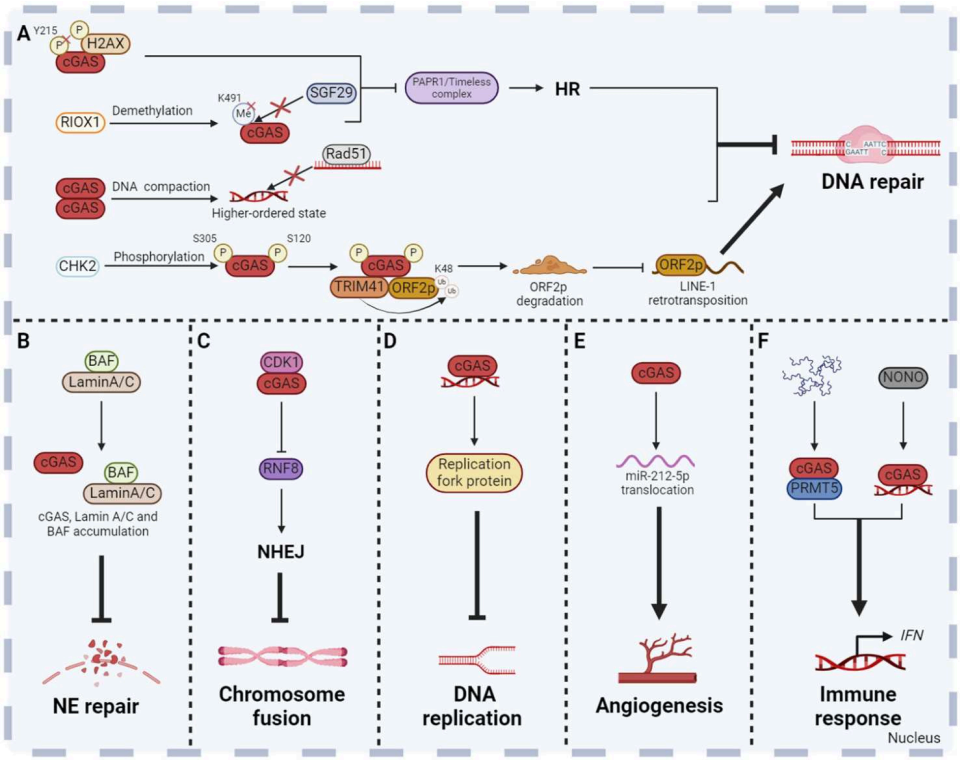


Figure 35 : cGAS dans le noyau (Lu 2024). *Les rôles de cGAS dans ce compartiment au niveau de la structure de la chromatine sont multiples avec l'inhibition de la recombinaison homologue, la réparation de l'enveloppe nucléaire avec BAF, l'inhibition de la fusion des chromosomes et le ralentissement de la réplication. cGAS permet également l'angiogenèse en régulant l'ARN miR-212-5p et exerce une activité immunitaire contre les génomes viraux présents dans le noyau.*

6.1. L'inhibition de la recombinaison homologue

Dans leur étude, Liu et al ont montré que la génération de cassures de la chromatine entraîne le recrutement de cGAS dans le noyau et plus précisément au niveau du site de cassure (H. Liu et al. 2018). La région C-terminale de cGAS interagit directement avec γH2A.X, un marqueur des DSBs. Ce recrutement de cGAS permet son interaction avec PARP1, et empêche son association avec la protéine Timeless. La formation de ce complexe étant essentielle pour le déclenchement de la HR, la restriction de PARP1 par cGAS empêche la mise en place de cette voie de réparation (H. Liu et al. 2018). Cette activité de cGAS est complètement indépendante de son activité catalytique car la mutation des résidus nécessaires à la liaison à l'ADN ou à la synthèse de cGAMP n'empêche pas l'inhibition de la HR. Ce moyen n'est pas le seul qui permet à cGAS de bloquer la HR. En effet, sa liaison avec les nucléosomes permet de condenser la chromatine afin de former des agrégats de complexes cGAS-nucléosomes. Cette compaction est un frein à l'invagination du nucléofilament recouvert par

Rad51 au niveau des brins homologues pour former une D-loop, une étape clé de la HR (Jiang et al. 2019). Cette inhibition est spécifique de la recombinaison homologue car cGAS n'a pas d'effet sur la NHEJ. Ce rôle de cGAS peut promouvoir la transformation des cellules en cellules tumorales car l'inhibition de la HR peut mener à la tumorigenèse des cellules. Suite à ces observations, cGAS est devenu une cible lors du traitement de certains cancers (H. Liu et al. 2018; Jiang et al. 2019a). Ces données illustrent le double visage de cGAS dans la tumorigénèse : cGAS est à la fois essentiel pour la sénescence (un processus anti-tumoral) et l'activation de la voie cGAS-STING peut avoir des effets anti-tumoraux in vivo, mais il peut également favoriser la tumorigénèse en inhibant la réparation et participer à une inflammation qui alimente la carcinogénèse.

6.2. La stabilisation des fourches de réplication

Un autre rôle de cGAS nucléaire indépendant de STING est celui du ralentissement de la réplication des cellules. Chen et al ont montré dans leurs travaux que cGAS se lie à la chromatine lors de la phase S du cycle cellulaire et ceci induit un ralentissement des fourches de réplication lorsqu'elles rencontrent cGAS (H. Chen et al. 2020). Dans cette situation encore, les effets de cGAS sont indépendants de son activité catalytique et de sa capacité à produire du cGAMP. Une analyse de séquençage d'ARN leur a permis de montrer que dans des fibroblastes humains déficients pour cGAS, l'expression des gènes associés à la réplication augmente significativement. Ainsi la liaison de cGAS à la chromatine permet de stabiliser et de ralentir la progression des fourches de réplication. En l'absence de cGAS, la progression trop rapide de ces fourches peut entraîner leur instabilité menant à un stress réplicatif, et rend les cellules plus sensibles aux radiations (H. Chen et al. 2020). Dans un contexte physiologique, ceci est délétère pour la cellule, mais dans le cas de cellules cancéreuses, la déplétion de cGAS peut être un atout en rendant les cellules plus sensibles à la chimiothérapie (Bai et Liu 2021).

6.3. La protection de la fusion des chromosomes

En plus des rôles évoqués ci-dessus, cGAS en joue un autre dans le domaine de la structure de la chromatine. Déjà impliqué dans le phénomène de sénescence via l'axe cGAS-STING (H. Yang et al. 2017), cGAS joue également un rôle dans les cellules vieillissantes ou déficientes pour les protéines télomériques, ce qui contribue également à réguler la sénescence. Dans ces 2 cas, les télomères trop courts ou sans protéines protectrices telles que TRF2, ne peuvent adopter la conformation qui les protègent des senseurs de cassures. La réponse aux dommages induite par ces extrémités télomériques peut être à l'origine d'une réponse NHEJ, aboutissant à la liaison de 2 extrémités et donc à la fusion de 2 chromosomes (Murnane 2012). Une étude de 2022 montre que cGAS se lie aux télomères déficients en TRF2 en mitose. cGAS permet alors le recrutement de CDK1 aux extrémités chromosomiques grâce à son interaction avec son domaine NTase. CDK1 phosphoryle la protéine RNF8 ce qui empêche son recrutement. Ceci prévient donc la mise en place de la NHEJ et limite la formation de fusions "end-to-end" (Xiaocui Li et al. 2022). Ce mécanisme permet d'entretenir la

réponse aux dommages de l'ADN (DDR) issue des télomères raccourcis et d'initier la sénescence de la cellule. En l'absence de cGAS, les fusions chromosomiques augmentent, ceci éteint la réponse DDR et la cellule échappe à la sénescence en plus de sa lourde instabilité chromosomique (Lu et al. 2024). Ainsi cGAS participe au maintien de la stabilité du génome en limitant la fusion des télomères raccourcis et facilite la sénescence réplicative de façon indépendante de STING. Ce mécanisme représente donc également une cible thérapeutique lors du traitement des cellules cancéreuses car la présence de cGAS aide à maintenir des foyers de cassures persistantes, ce qui pourrait permettre d'induire la sénescence dans ces cellules.

6.4. La rupture de l'enveloppe nucléaire

La rupture de l'enveloppe nucléaire est un stress important pour la cellule car elle peut conduire à la fuite de molécules nucléaires dans le cytoplasme et à la génération de cassures de la chromatine (Denais et al. 2016; Raab et al. 2016). Afin de palier à ces évènements et réparer le plus vite possible cette enveloppe, la lamine C s'accumule rapidement au site de rupture. Cette dynamique de la lamine C permet le recrutement de la protéine BAF et de cGAS au niveau de la zone de rupture (Kono et al. 2022). De façon intéressante, BAF et cGAS sont également requis pour l'accumulation de la lamine C sur les sites de ruptures de l'enveloppe nucléaire montrant un recrutement concerté de ces 3 protéines pour une réparation efficace de l'enveloppe nucléaire. Dans cette étude, les auteurs montrent également que les protéines cGAS relocalisant à la zone de rupture sont d'origine cytoplasmique et non nucléaire. Ils émettent l'hypothèse que cGAS participerait à la décondensation de l'ADN pour élargir les protrusions, augmentant la surface de liaison de BAF et de la lamine C. On peut se demander si l'ouverture de l'enveloppe nucléaire qui attire cGAS afin qu'il se lie à de l'ADN peut provoquer son activation. Cependant, comme mentionné plus haut, une étude de l'équipe du docteur Ablasser a montré que BAF est capable de réguler l'activité enzymatique de cGAS, en étant en compétition avec lui pour la liaison aux molécules d'ADN (Guey et al. 2020). On peut donc penser que lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire, le recrutement de cGAS et BAF est lié à la réparation de cette structure et que le mécanisme de régulation de cGAS par BAF empêche le déclenchement d'une réponse inflammatoire.

6.5. L'angiogenèse

Un autre rôle récemment décrit de cGAS et là encore, indépendant de son activité catalytique, est la stimulation de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, ce que l'on appelle l'angiogenèse. Un acteur clé de ce phénomène est le VEGF-A (pour 'vascular endothelial growth factor A'). Une étude parue en 2023 démontre que la présence de VEGF-A stimule l'import de cGAS dans le noyau des cellules où il va baisser la production d'un ARN non-codant nommé miR-212-5, qui inhibe l'expression d'ARPC3 ('actin-related protein C3'), une sous-unité du complexe Arp2/3 qui contrôle la polymérisation du cytosquelette d'actine (Luo et al. 2023). Ainsi, l'import nucléaire de cGAS permet de stimuler le cytosquelette afin que les récepteurs de VEGF (nommés VEGFR2) transitent de

l'appareil de Golgi jusqu'à la membrane plasmique. Cela forme donc un rétrocontrôle positif du VEGF-A avec une plus grande sensibilité des cellules à ce facteur. De façon intéressante, les auteurs montrent une corrélation entre l'expression de VEGF-A et la présence de cGAS nucléaire dans des gliomes, et de hauts niveaux de cGAS nucléaires corrèlent avec un mauvais pronostic. Ainsi, ce rôle de cGAS en fait une cible thérapeutique importante pour le traitement de différentes pathologies, telles que les cancers, qui sont dépendants de l'angiogenèse pour leur croissance et leur invasivité (Lugano, Ramachandran, et Dimberg 2020).

6.6. Déclenchement de l'immunité innée non cytoplasmique

Même au sein du noyau et malgré son inhibition par la chromatine, cGAS est capable d'activer l'immunité innée de plusieurs manières. En effet, cGAS est également capable de produire du cGAMP dans le noyau en cas de stress. En effet, lorsque la cellule est infectée par certains virus, l'activité enzymatique de cGAS peut se faire même dans le noyau (Y. Wu et al. 2022). Dans le cas d'une infection par HSV1, cGAS peut se détacher de la chromatine, détecter le génome viral et déclencher une réponse immunitaire. Dans le cas d'une infection par HIV, la protéine NONO reconnaît la capside virale et la met au contact du cGAS nucléaire permettant la détection du génome viral et l'activation de la réponse immunitaire dans les cellules dendritiques et les macrophages (Lahaye et al. 2018). Cependant, l'activation de cGAS dans le noyau est bien plus restreinte car la production de cGAMP est environ 200 fois moins forte que lors d'une activation dans le cytoplasme (Gentili et al. 2019). cGAS peut également restreindre l'inflammation qui pourrait être déclenchée par la retrotransposition des LINEs. En effet, cGAS augmente l'interaction de TRIM41, une ubiquitine ligase avec ORF2p ('open reading frame 2p') la rétrotransposase codée par les LINEs . Ceci facilite donc la polyubiquitination K48-Ub sur ORF2p entraînant sa dégradation et donc la suppression de la rétrotransposition (Zhen et al. 2023). Une étude récente de Broussard et al a montré que BAF, une protéine décrite précédemment et jouant le rôle de régulateur de cGAS agit aussi dans le noyau. Dans le cas d'une infection par un virus pouvant avoir une phase de latence dans le noyau comme KSHV (pour 'Kaposi sarcoma-associated herpesvirus') et EBV (pour 'Epstein Barr virus'), BAF inhibe cGAS en cas de réactivation du virus (Broussard et al. 2023).

Ces dernières années ont permis de grandes avancées dans la compréhension de la dynamique et des rôles non-canoniques de cGAS et en font une cible thérapeutique de choix notamment dans la gestion des cancers. Comme dit précédemment en chapitre 1, la production du SASP par cGAS-STING a un effet positif dans le traitement des tumeurs au stade précoce mais délétère dans les stades avancés. De plus, cGAS est maintenant identifié comme un acteur important de l'intégrité du génome et de la réponse aux dommages, des paramètres essentiels dans la mise en place de la sénescence qui interviennent en amont de son rôle dans l'expression du SASP avec l'axe cGAS-STING. Ainsi, en fonction du type de pathologie et des besoins du patient, la stimulation ou, au contraire, la suppression de cGAS aura des effets bénéfiques. La dernière partie de cette introduction va donc porter sur les mécanismes identifiés jusqu'à maintenant permettant la dégradation de cGAS.

7. La régulation de la quantité cellulaire de cGAS

cGAS étant présent dans le cytoplasme et le noyau des cellules, sa dégradation peut être assurée de différentes manières en fonction des besoins de la cellule. La dégradation de cGAS cytoplasmique par autophagie ou par le protéasome est assez bien documentée (W. Zhou et al. 2018) mais il existe très peu d'informations sur la dégradation de cGAS nucléaire dans la littérature et la complexité des modifications post-traductionnelles dont il est la cible ne facilite pas le décryptage des mécanismes de régulation de sa dégradation.

***Tableau 3** : modifications post-traductionnelles affectant les différents rôles de cGAS chez l'Homme et la souris. Les résidus grisés sont indiqués par complémentarité sans avoir été publiées.*

Chez l'Homme	**Chez la souris**	**Type de modification**	**Enzyme responsable**	**Effet de la modification**	**Référence**
Domaine N-terminal	Domaine N-terminal	Phosphorylation	AURORA B	Empêche l'oligomérisation de cGAS pendant les phases G2 et M	(Tuo Li et al. 2021)
Tyr-Y215	Tyr-Y201	Phosphorylation	BLK	Rétention de cGAS dans le cytoplasme	(H. Liu et al. 2018)
Ser-S435	Ser-S420	Déphosphorylation	PPP6C	inhibe l'activité nucléotidyltranférase	(M. Li et Shu 2020)
Thr-T68	Thr-T52	Phosphorylation	PRKDC	Inhibe l'homodimérisation	(X. Sun et al. 2020)
Ser-S213	Ser-S199	Phosphorylation	PRKDC	Inhibe l'homodimérisation	(X. Sun et al. 2020)
Ser-S305	Ser-S291	Phosphorylation	AKT	inhibe l'activité nucléotidyltranférase	(Seo et al. 2015)
Ser-S305	Ser-S291	Phosphorylation	CDK1	inhibe l'activité nucléotidyltranférase pendant la mitose	(L. Zhong et al. 2020)
Ser-S305	Ser-S291	Déphosphorylation	PP1	restaure l'activité nucléotidyltranférase après la mitose	(L. Zhong et al. 2020)
Lys-K414	Lys-K402	Polyubiquitine K48		Liaison à p62/SQSTM1 pour autophagie	(M. Chen et al. 2016)
Lys-K414	Lys-K402	Déubiquitinylation	TRIM14/USP14	Inhibe la dégradation de cGAS	(M. Chen et al. 2016)
Lys-K173 / Lys-K384	Lys-K372	Polyubiquitine K27	RNF185	Facilite l'activité enzymatique de cGAS	(Qiang Wang et al. 2017)
Lys-K347	Lys-K335	Monoubiquitine	TRIM56	Facilite l'oligomérisation de cGAS	(Seo et al. 2018)
		Monoubiquitine	TRIM41	Facilite l'activation de cGAS	(Z.-S. Liu et al. 2018)
Lys-K285 / Lys-K479	Lys-K271 / Lys-K464	Polyubiquitine K48		Dégradation de cGAS	(Q. Zhang et al. 2020; M.-M. Hu et al. 2016)
Lys-K285	Lys-K271	Déubiquitinylation	USP29	Stabilise cGAS	(Q. Zhang et al. 2020)

		Déubiquitinylation	USP27X	Stabilise cGAS	(Y. Guo et al. 2019)
Lys-K411	Lys-K399	Polyubiquitine K63	MARCHF8 (RNF178)	Inhibe la liaison à l'ADNdb	(X. Yang et al. 2022)
Lys-K427 / Lys-K428	Lys-K409 / Lys-K410	Polyubiquitine K48	CRL5	Dégradation de cGAS lié au nucléosome	(P. Xu et al. 2024)
Lys-K231 / Lys-K479	Lys-K217 / Lys-K464	SUMOylation	TRIM38	Stabilise cGAS en empêchant l'ubiquitinylation	(M.-M. Hu et al. 2016)
Lys-K231 / Lys-K479	Lys-K217 / Lys-K464	DéSUMOylation	SENP2	Dégradation de cGAS au stade tardif d'infection	(M.-M. Hu et al. 2016)
Lys-K347 / Lys-K384 / Lys-K394	Lys-K335 / Lys-K372 / Lys-K382	SUMOylation		Inhibe la liaison à l'ADN	(Cui et al. 2017)
Lys-K347 / Lys-K384 / Lys-K394	Lys-K335 / Lys-K372 / Lys-K382	DéSUMOylation	SENP7	restaure la liaison à l'ADN	(Cui et al. 2017)
Glu-E286	Glu-E272	Polyglutamylation	TTLL6	Inhibe la liaison à l'ADN	(Xia et al. 2016)
Glu-E314	Glu-E302	Monoglutamylation	TTLL4	inhibe l'activité nucléotidyltranférase	(Xia et al. 2016)
Lys-K384 / Lys-K394 / Lys-K414	Lys-K372 / Lys-K382 / Lys-K402	Acétylation	Aspirine	Inhibe la synthèse de cGAMP	(Dai et al. 2019)
Lys-K47 / Lys-K56 / Lys-K62 / Lys-K83		Acétylation	KAT5	Facilite la liaison à l'ADNdb	(Z.-M. Song et al. 2020)
Asp-D191	Glu-E176	Poly-ADP-ribosylation	PARP1	Inhibe la liaison à l'ADN	(F. Wang et al. 2022)
Cys-C474	Cys-C459	Palmitoylation	ZDHHC18	Inhibe la liaison à l'ADN	(Shi, Yang, Liu, et al. 2022)
Cys-C404 / Cys-C405	Cys-C392 / Cys-C393	Palmitoylation	ZDHHC9	Facilite la dimérisation et l'activité enzymatique	(Fan et al. 2023)
Cys-C404 / Cys-C405	Cys-C392 / Cys-C393	Dépalmitoylation	LYPLAL1	Inhibe la dimérisation et l'activité enzymatique	(Fan et al. 2023)
Lys-K506	Lys-K491	Monométhylation	SETD7	Inhibe l'interaction avec PARP1 et permet la HR	(Xiao et al. 2022)
Lys-K506	Lys-K491	Déméthylation	RIOX1	Restaure l'interaction avec PARP1 et inhibe la HR	(Xiao et al. 2022)

7.1. Dégradation cytoplasmique

Parmi les voies de dégradation des protéines, une des plus répandue est la dégradation par le protéasome, un complexe multiprotéique localisé dans le cytoplasme et le noyau qui permet de cliver les protéines grâce aux peptidases qui le composent (pour revue voir G. A. Collins et Goldberg 2017). Afin d'être dégradé par le protéasome, les protéines sont ciblées par des marques d'ubiquitines dont

le rôle majeur est de permettre l'adressage vers ce complexe de dégradation (Sommer et Wolf 2014). De plus, une autre voie de recyclage conservée chez les eucaryotes, appelée autophagie, participe également au maintien de l'homéostasie cellulaire en dégradant des organites, des protéines, des lipides ou les acides nucléiques et en recyclant leurs éléments constitutifs lorsque les cellules sont confrontées à un stress nutritionnel (pour revue Vargas et al. 2023). Cinq études ont mis en évidence l'implication de ces voies pour le contrôle de la stabilité/dégradation de cGAS. En 2016, Hu et al. mettent en évidence une SUMOylation TRIM38-dépendante du cGAS souris sur la lysine mK217 (hK231) qui régule la stabilité de cGAS en empêchant son ubiquitination par des chaînes de poly-ubiquitine K48 (liées entre elles par la lysine K48) sur mK271 (hK285). La déSUMOylase SENP2 ('SUMO specific peptidase') retire la SUMOylation de cGAS et entraîne sa dégradation de façon protéasome-dépendante en fin d'infection virale (M.-M. Hu et al. 2016).

Un certain nombre de déubiquitinases (DUBs) ont ensuite été caractérisées qui ciblent cette polyubiquinitation de cGAS et ont donc pour effet de booster la réponse inflammatoire. Guo et al. montrent que la DUB USP27X retire les chaînes de polyUb-K48 et permet ainsi de stabiliser cGAS. Les niveaux réduits en protéine cGAS dans une lignée de cellules de macrophages KO pour USP27X sont rétablis par un traitement au MG132 ou à la chloroquine indiquant que les deux voies de dégradation protéasomique et autophagique sont impliquées dans la régulation de la protéine cGAS médiée par USP27X (Y. Guo et al. 2019). Une étude similaire publiée par Zhang et al. montre un effet similaire de USP29 qui déubiquitine la lysine mK271 de cGAS ce qui stabilise cGAS et promeut ainsi la réponse anti-virale contre HSV-1 (Xuewu Zhang, Bai, et Chen 2020). Une étude récente basée sur un protéome de cGAS en cellules HeLa a également identifié la DUB OTUD3 ('OTU deubiquitinase 3') qui hydrolyse les chaînes polyUb-K48 ou K27 de cGAS et inhibe ainsi la dégradation protéasome-dépendante de cGAS et augmente son activité catalytique (Lyu et al. 2023).

Toutefois, l'ajout d'une chaîne polyUb-K48, peut également être un signal pour la dégradation de cGAS par autophagie. En effet, cette marque est reconnue par p62/SQSTM1. Dans le cas de cGAS humain, sa polyUb-K48 sur la lysine K414 est reconnue par p62 qui médie sa dégradation autophagique-dépendante. p62 recrute LC3 pour permettre la formation d'un endosome qui, une fois fusionné avec un lysosome, dégrade son contenu, p62 compris (Bjørkøy et al. 2009; M. Chen et al. 2016). De façon intéressante, TRIM14, une protéine induite par l'IFN-I, recrute la DUB USP14 qui déubiquitine cGAS et empêche ainsi sa liaison à p62 et sa dégradation par autophagie (M. Chen et al. 2016). Ainsi, l'existence d'une boucle de rétroaction positive via TRIM14 en cas d'infection virale permet l'amplification de la réponse inflammatoire en stabilisant cGAS.

Il faut noter que l'ubiquitination de cGAS a aussi un effet régulateur direct sur l'activité de cGAS, comme d'autres modifications post-traductionnelles décrites plus haut.

7.2. Dégradation nucléaire

Dans ce compartiment, les processus de dégradation de cGAS sont moins connus que dans le cytoplasme. Une grande avancée a été faite avec les travaux de l'équipe du docteur Ablasser publiés en 2024. Dans un premier temps, les auteurs mettent en évidence une diminution progressive de la

quantité de cGAS nucléaire dans des cellules synchronisées, qui n'est pas freinée avec un inhibiteur d'export, mais qui est stabilisée avec des inhibiteurs du protéasome. À l'aide d'un screen siRNA contre 972 protéines impliquées dans la voie de dégradation par le protéasome, les auteurs identifient le complexe CRL5 (pour 'cullin-RING E3 ubiquitin ligase 5'), composé de SPSB3 (pour 'SPRY domain-containing SOCS box protein 3'), CUL5 (cullin 5), RBX2 ('ring box protein 2') et ELOB/C ('elongin B/C'), à l'origine de la dégradation de cGAS (P. Xu et al. 2024). Le knockdown de SBSP3 ou de CUL5 atténue la dégradation du cGAS nucléaire, sans affecter le pool de cGAS cytoplasmique ni les transcrits de cGAS. Dans leur modèle, SPSB3 est le récepteur qui permet de relier cGAS à l'ubiquitine ligase RBX2, qui transfère l'ubiquitine depuis une E2 ligase sur cGAS au niveau des résidus K427-K428 (humain). Le fonctionnement de CRL5 est dépendant de la NEDDylation de la sous-unité cullin CUL5 par UBE2F (pour 'ubiquitin conjugating enzyme E2 F'), comme représenté en figure 36. La résolution par cryo-EM de la structure de SPSB3 lié à cGAS montre que cGAS lié à un mononucléosome est la cible du complexe CRL5-SPSB3. Les auteurs identifient les asparagines N513 et N514 comme essentielles pour la reconnaissance de cGAS par SPSB3, et la mutation de ces acides aminés empêche l'ubiquitination et la dégradation de cGAS. De façon importante, des cellules HeLa KO pour cGAS et reconstituées avec un cGAS muté sur le motif NN (et donc non dégradé) ont une susceptibilité plus faible à une infection par HSV-1 avec une réponse IFN-I augmentée (P. Xu et al. 2024).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes de dégradation de cGAS nucléaire en cas de dommages à l'ADN, identifiant potentiellement un autre mécanisme permettant de dégrader cGAS dans le noyau des cellules. Je vais donc maintenant décrire les résultats obtenus au cours de ma thèse.

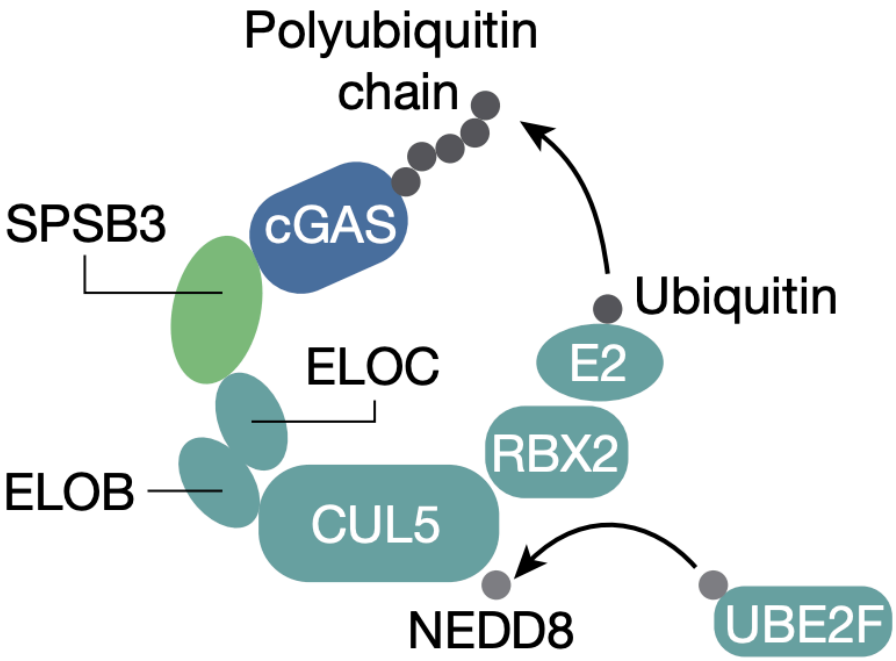


Figure 36 : Dégradation de cGAS nucléaire lié à la chromatine (Xu 2024). *Au sein du complexe CRL5, la protéine SPSB3 sert de récepteur qui permet de faire le lien entre cGAS lié au nucléosome et l'Ubiquitine E3 ligase RBX2. La NEDDylation de la sous-unité CUL5 permet d'activer l'activité E3 ligase et permet donc l'ubiquitination de cGAS afin d'induire sa dégradation par le protéasome. Les protéines ELOB et ELOC sont des protéines adaptatrices qui font le pont entre le récepteur et la protéine cullin CUL5.*

Questions biologiques

Mon projet de recherche a été initié grâce aux observations réalisées par Constance Kleijwegt lors de son doctorat réalisé dans l'équipe du Docteur Lomonte. Les travaux de Constance ont porté sur la dynamique des PML NBs et du complexe chaperon d'histones HIRA dans un contexte de réponse à l'interféron. J'ai apporté une contribution significative en tant que deuxième auteur à cette étude qui a été publié en 2023 et qui est présenté en Annexe (Kleijwegt et al. 2023). Durant ses travaux, Constance a pu observer que l'accumulation du complexe HIRA au sein des PML NBs était induite suite à la génération de dommages à l'ADN et que cela était toujours relié à une absence de cGAS nucléaire. Mes travaux ont donc commencé suite à ces observations, et au bout de quelques temps nous avons constaté que la dynamique de HIRA et cGAS n'était pas la conséquence directe de la génération des cassures de la chromatine mais de l'induction de sénescence qui en découlait.

Mon projet de thèse a donc visé à mieux comprendre la dynamique nucléaire de la protéine cGAS dans un contexte de dommages à l'ADN induisant l'entrée en sénescence des cellules. J'ai donc focalisé mes recherches sur 2 questions principales : (1) Quelle est la dynamique nucléaire de cGAS lors de dommages à l'ADN ? ; (2) Quelle est le rôle de la dynamique nucléaire de cGAS dans les phases précoces de l'induction de la sénescence ?

(1) Quelle est la dynamique nucléaire de cGAS lors de dommages à l'ADN ?

Cette question à l'origine de mon projet est venue lors des travaux de thèse de Constance Kleijwegt. Durant sa thèse, Constance a pu observer que la génération de cassures de la chromatine semblait avoir un impact sur la quantité de cGAS dans le noyau des cellules primaires. De plus, des publications au cours de ces 5 dernières années ont apporté de nombreux éléments sur le rôle de cGAS dans le noyau des cellules indépendamment de son activité catalytique. Ainsi, nous sommes partis des observations préliminaires obtenues dans notre laboratoire pour chercher à comprendre le comportement de cGAS dans un contexte de dommages à l'ADN.

(2) Quelle est le rôle de la dynamique nucléaire de cGAS dans les phases précoces de l'induction de la sénescence ?

Les domaines de compétences de notre équipe sont l'étude de la dynamique de la chromatine et s'articulent autour du rôle de l'épigénétique et des corps nucléaire PML. Le complexe chaperon de l'histone H3.3 HIRA a été identifié comme un marqueur de sénescence précoce et les premiers résultats de cette étude montrent que l'absence de cGAS empêche la mise en place de ce marqueur précoce. Nous avons donc cherché à comprendre le lien entre la dynamique de cette protéine et les phases précoces de la sénescence. De plus, nous avons pu commencer à comparer cette dynamique dans des lignées de cellules primaires et cancéreuses.

Modèles cellulaires utilisés

Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé des cellules primaires qui présentent une réponse physiologique aux dommages de l'ADN et rentrent en sénescence, un processus qui est altéré dans les cellules cancéreuses. J'ai ainsi utilisé en majorité des cellules primaires humaines de type BJ, des fibroblastes prélevés sur des prépuces de nouveau-nés. Les fibroblastes sont des cellules adhérentes du tissu conjonctif et couramment utilisées dans les études de sénescence depuis la découverte de la limite de Hayflick. De plus, les observations faites au préalable ont été réalisées sur ce modèle.

Les BJ sont des fibroblastes faciles à cultiver car ils ne nécessitent pas d'être mis en présence de facteurs particuliers ou de pousser sur un matériau spécial. Ces cellules primaires ont une durée de vie longue, avec une capacité de doublement pouvant atteindre 72 (d'après la fiche technique d'ATCC CRL-2522). Comme mentionné précédemment elles sont utilisées depuis plusieurs années par des membres du laboratoire (Maroui et al. 2016; C. Cohen et al. 2018; Kleijwegt et al. 2023; Roubille et al. 2024). Néanmoins, il est important de préciser que comparé à d'autres fibroblastes, les cellules BJ expriment des niveaux très faibles de la protéine p16 (un inducteur de la sénescence) dans un contexte de dommages à l'ADN, ce qui apporter un biais. L'expression de p16 est cependant très bonne dans un contexte de stress oncogénique.

Mon projet de thèse s'est donc un peu éloigné des thématiques habituelles investiguées par notre équipe et qui portent sur le rôle des PML NBs dans la régulation de la dynamique de la chromatine dans différents contextes physio-pathologiques telles qu'une infection par des virus à ADN comme HSV1. Cependant, le docteur Armelle Corpet qui a encadré mes recherches a une expérience solide dans le domaine de la sénescence qu'elle a étudié pendant ses travaux de post-doctorat. De plus, de façon fortuite, nous avons mis en lumière le rôle des PML NBs pour la régulation de la quantité nucléaire de cGAS, nous ramenant vers notre domaine d'expertise. Dans tous les cas, le choix de nous intéresser à la dynamique de cGAS, une protéine au cœur de nombreux travaux de recherches actuels dans le monde a été un défi passionnant à relever et nous a permis d'élargir les domaines de compétences de l'équipe et nos interactions avec la communauté scientifique.

Résultats

Rôle des PML NBs et de p97 dans la dégradation de cGAS au cours de la réponse aux dommages de l'ADN

Dans cet article, nous présentons les résultats obtenus sur le rôle des PML NBs et de la protéine p97 dans la dégradation de cGAS au cours de la réponse aux dommages de l'ADN. Dans un souci de simplifier le message de l'article, nous avons fait le choix de ne pas inclure les résultats obtenus avec le siRNA de cGAS qui montrent une altération STING-indépendante de l'entrée en sénescence précoce après dommages à l'ADN, car ils nous apparaissaient difficilement compatibles avec le message principal de l'article qui porte sur la dégradation de cGAS comme un mécanisme essentiel pour la mise en place de la DDR et de la sénescence. Je discuterai de ces résultats dans la partie Résultats supplémentaires.

De plus, les résultats obtenus sur la protéine RNF111 ou avec l'inhibiteur de la NEDDylation (MLN4924) seront également présentés dans la partie Résultats supplémentaires car ils sont assez complexes et demanderont des études plus poussées pour être intégrés à cette histoire.

Nuclear cGAS degradation depends on a p97-PML NBs axis upon senescence-prone DNA damage

Florent Bressac[1], Constance Kleijwegt[2], Wilhelm Bouchereau[1], Tristan Bargain[1], Patrick Lomonte[1*] and Armelle Corpet[1,3*]

1. Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5261, INSERM U 1315, LabEx DEV2CAN, Institut NeuroMyoGène (INMG), Pathophysiology and Genetics of the Neuron and Muscle (PGNM) laboratory, team Chromatin Assembly, Nuclear Domains, Virus. F-69008, Lyon, France

2. Current address: Institute of Human Genetics, UMR9002 CNRS-Université de Montpellier, Laboratory of Biology of Repetitive Sequences, F-34000 Montpellier, France

3. Institut Universitaire de France

* To whom correspondence should be addressed.

Email : armelle.corpet@univ-lyon1.fr; patrick.lomonte@univ-lyon1.fr

Abstract

Cyclic GMP-AMP synthase (cGAS), initially identified as a cytosolic sensor for double-stranded DNA, is now widely recognized as a nuclear protein with distinct STING-independent functions. However, its presence in the same compartment as genomic DNA highlights the critical need to regulate its nuclear levels to balance the risk of cell-intrinsic immune activation with the recognition of pathogenic DNA. The recent discovery of a proteasome-dependent degradation mechanism for nucleosome-bound cGAS offers new insights into the regulation of nuclear cGAS. In this study, we examine the dynamics and stability of nuclear cGAS following DNA damage in human primary fibroblasts. We demonstrate that cGAS is released from chromatin in a process dependent on the p97 segregase, followed by its partial degradation. When cGAS degradation is inhibited, it accumulates in foci near PML nuclear bodies (PML NBs), which are necessary for its degradation. Interestingly, inhibiting the removal of cGAS from chromatin or preventing its degradation correlates with an impaired DNA damage response and senescence entry. Overall, our findings show that a p97-PML NBs axis modulates cGAS abundance, which may participate in the proper regulation of the DNA damage response and prevent the possible cell-intrinsic activation of innate immune responses.

Introduction

The innate immune response is the first line of defense against infections. Cells have evolved a number of specialized immunity receptors called PRRs (Pattern Recognition Receptors) that recognize pathogen-specific patterns and induce intracellular signaling pathways leading to an inflammatory response to fight pathogen infection (X. Cao 2016). Among the various PRRs, the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS, also known as MB21D1), was identified as an essential cytosolic DNA sensor which plays a key role in response to microbial infections (L. Sun et al. 2013b). Upon binding to cytosolic double-stranded DNA such as foreign viral DNA, cGAS undergoes a conformational change and dimerizes to catalyze the synthesis of cGAMP, a cyclic dinucleotide that induces interferon type I (IFN-I) and innate immunity responses through a STING-TBK1-IRF3 axis (Jenson et Chen 2024). Due to its inherent property to recognize DNA in a sequence-independent manner, cGAS can also be activated by DNA that has been mislocalized following genotoxic stresses. This self-DNA, leaking from the nucleus in the form of micronuclei (Harding et al. 2017b; Mackenzie et al. 2017b), cytosolic chromatin fragments (CCFs) (Dou et al. 2017b; Glück et al. 2017b) or from mitochondrial sources (Gulen et al. 2023b; West et al. 2015b), can potentially trigger aberrant activation of cGAS, which contributes to

autoimmunity, inflammation as well as senescence. It is thus essential for cells to maintain a delicate balance between detecting pathogenic DNA and keeping cGAS inactive in response to host DNA.

It is now well established that a great proportion of cGAS is also nuclear (W. Hao et al. 2023b; Lu et al. 2024b). Structural studies have revealed that the tight tethering of cGAS to the acidic patch of the histones, the main protein component of the nucleosome, is key to prevents its auto-reactivity towards self-DNA (Boyer et al. 2020b; D. Cao et al. 2020b; Kujirai et al. 2020b; Michalski et al. 2020b; Pathare et al. 2020b; B. Zhao et al. 2020b). In addition, a growing number of studies have uncovered various STING-independent functions for cGAS in the nucleus such as inhibition of DNA repair (Jiang et al. 2019b; H. Liu et al. 2018b), regulation of DNA replication (H. Chen et al. 2020b) or nuclear envelope repair (Kono et al. 2022b). Remarkably, nuclear cGAS is maintained at low levels during interphase by a specific degradation mechanism (P. Xu et al. 2024b). Indeed, the Cullin-RING E3 ubiquitin ligase 5 complex (CRL5), as well as its substrate receptor SPSB3, are essential mediators for the proteasome-dependent degradation of nucleosome-bound cGAS (P. Xu et al. 2024b).

Upon DNA damage, chromatin architecture is dramatically altered. While chromatin unfolding/decompaction contributes to the access and timely repair of DNA lesions, histone dynamics also participates in the restoration of epigenome integrity (Ferrand, Plessier, et Polo 2021). Interestingly, chromatin-bound cGAS inhibits double-strand breaks (DSBs) repair by homologous recombination, notably by preventing the recruitment of RAD51 through DNA compaction (Jiang et al. 2019b; H. Liu et al. 2018b). Binding of the MRE11-RAD50-NBS1 complex to DNA damage sites has a crucial role in releasing cGAS from nucleosome sequestration to enable its activation by dsDNA in the cytoplasm (Cho et al. 2024b). However, the mechanisms underlying the regulation of nuclear cGAS activity and its nuclear functions are still poorly defined. In particular, the mechanisms by which cells cope with a pool of nucleoplasmic cGAS unhooked from chromatin following DNA damage and whether this could influence the early entry into senescence has remained unexplored.

Within the densely packed nuclear space, PML Nuclear Bodies (PML NBs), form membrane-less organelles (MLOs) of 0.1-1mm diameter which, by concentrating proteins at specific places, play pivotal roles in controlling biochemical reactions in space and time (Corpet et al. 2020b; Yuwen Li et al. 2020). Interestingly, PML NBs have both been implicated in the regulation of essential physiological responses such as DNA repair and senescence entry, as well as in protein-degradation mechanisms (Abou-Ghali et Lallemand-Breitenbach 2024b), thus placing them as ideal candidates to maintain nuclear protein homeostasis upon DNA damage. One component of PML NBs (Jaffray et al. 2023b),

the ubiquitin-dependent unfoldase/segregase p97, also known as VCP, is a central component of the ubiquitin-proteasome system. With the help of cofactors, p97 binds to ubiquitinated substrates and, using its ATPase activity, processes them by unfolding or extracting them from various cellular locations, including chromatin (Torrecilla, Oehler, et Ramadan 2017). Processed proteins can then be addressed to the proteasome for their degradation illustrating the essential function of p97 in regulating protein homeostasis.

Here, we investigate the dynamics and stability of nuclear cGAS upon DNA damage in human primary fibroblasts. Upon DSB induction, we show that cGAS is mobilized from chromatin and partially degraded in a proteasome-dependent manner. Importantly, preventing cGAS degradation triggers its accumulation in foci that juxtapose PML NBs. The p97/VCP segregase participates in cGAS mobilization from chromatin and foci formation next to PML NBs, which are then involved in cGAS degradation. Inhibition of cGAS removal from chromatin and preventing its degradation correlates with an altered the DNA damage response and an impaired senescence entry. Thus, we unveil a novel p97-PML NBs axis that controls the nucleoplasmic pool of cGAS upon chromatin damage which may contribute to fine-tune the risk of autoimmunity activation and senescence entry.

Results

Chromatin destabilization mobilizes cGAS from chromatin and leads to its partial degradation. cGAS is constitutively inactivated by its tight binding to nuclear chromatin which prevents its binding to dsDNA and dimerization. While DNA damage triggers its MRN-dependent release from chromatin to activate a cytosolic dsDNA sensing and inflammatory response (Cho et al. 2024b), what happens to the pool of remaining nuclear cGAS after DNA damage is currently unknown. As a first steps towards deciphering the dynamics of nuclear cGAS after DNA damage, we examined its levels in human primary foreskin diploid fibroblasts BJ cells treated with etoposide, a well-established inhibitor of topoisomerase II which triggers DNA damage in the form of double-strand breaks (DSBs) (Montecucco, Zanetta, et Biamonti 2015). The use of primary cells is key to investigate the physiological response to DNA damage which can ultimately lead to senescence entry, a pathway that is inactivated in cancerous cells (L. Wang, Lankhorst, et Bernards 2022). Treatment of BJ cells with etoposide for 24 hours triggers a strong accumulation of γH2AX, a marker of DSBs (Figure 1A). In parallel, a strong decrease in the nuclear signal of cGAS was observed, concomitant with a significant

decrease in the total pool of cGAS by western blotting (Figure 1B), without diminishing cGAS mRNA levels (Sup. Figure 1A). Use of neocarzinostatin (NCS), a radiomimetic DNA-cleaving agent, which mainly induces DSBs, confirmed these observations (Figures 1A-B). Use of leptomycin B, an inhibitor of the nuclear export machinery, did not rescue cGAS levels in the nucleus (Sup. Figure 1B), suggesting a potential degradation of cGAS upon DNA damage. In order to further substantiate our observations, we treated BJ cells with TSA, a well-known HDAC inhibitor which triggers the opening of chromatin condensed regions (Tóth et al. 2004), on which cGAS is particularly bound (Gentili et al. 2019b). TSA induced a strong decrease of cGAS presence in the nucleus as well as a significant reduction in its total amount in the cells, without any significant accumulation of γH2AX (Figures 1A-B), thus extending our findings to other chromatin destabilizing agents. To track cGAS localization more thoroughly, we established BJ cells stably expressing an epitope-tagged version of cGAS by lentiviral transduction. While cGAS levels are low in primary BJ cells, expression of higher levels of GFP-cGAS could be achieved by doxycyclin induction (Sup. Figure 1C). Cellular fractionation confirmed the tight tethering of GFP-cGAS to the chromatin (Figure 1C) and its low abundance in the cytosolic and nuclear soluble fractions in non-treated cells. Addition of etoposide or TSA induced a significant decrease of the chromatin-bound pool of cGAS, without any major increase in the other fractions (Figure 1C). cGAS mobilization from chromatin following DNA damage was confirmed on the endogenous cGAS (Figure 1D). In contrast, we could not detect any effect of etoposide on cGAS nuclear localization/levels in the HeLa cancerous cell line (Sup. Figures 1D-F). Thus, our data suggest that chromatin destabilization and opening leads to cGAS mobilization from chromatin and to its degradation in primary cells.

Proteasome inhibition leads to the accumulation of cGAS in foci juxtaposed to PML NBs.

While cGAS degradation mechanisms have extensively been studied in the cytosol (Y. Wu et Li 2020), its turn-over in the nucleus remains under-investigated. The recent characterization of the CRL5-SPSB3 complex required for the proteasome-dependent degradation of chromatin-bound cGAS (P. Xu et al. 2024b) has opened up new perspectives on the importance of regulating cGAS nuclear levels. We treated BJ cells with MG132, a proteasome inhibitor, in the last 8 hours of the etoposide treatment, since longer treatments caused cell toxicity. Addition of MG132 restored the total and chromatin-bound pool of cGAS after damage (Figure 2A-B) and increased cGAS pan-nuclear levels as

visualized by immunofluorescence of cGAS (Figure 2C). Remarkably, nuclear cGAS formed intense foci in the nucleus, that juxtapose perfectly next to PML NBs (Figure 2C). Addition of MG132 following TSA treatment was sufficient to restore cGAS nuclear/total levels, and also led to the appearance of cGAS foci juxtaposed to PML NBs (Sup. Figures 2A-B). While all PML NBs were not necessarily juxtaposed to cGAS foci, on the contrary, every single cGAS spot was found juxtaposed to a PML NB. Quantification of the distance between cGAS and PML signal confirmed a minimal distance of 0,02μm underscoring the close spatial proximity of cGAS foci and PML NBs (Figure 2D).

Given its known binding to centromeric satellite DNA (Gentili et al. 2019b), we examined whether non-degraded nuclear cGAS foci may colocalize with centromeres. Use of the anti-centromeres antibodies human ACA unequivocally showed that cGAS foci do not accumulate on/close to centromeres (Sup. Figure 2C). Remarkably, while PML NBs have been shown to juxtapose DNA damage foci (H. R. Chang et al. 2018), their close proximity with γH2AX was exclusive with cGAS foci (Sup. Figure 2D). This suggests the existence of two different pools of PML NBs, one implicated in the DNA damage response and another one dealing with the undegraded nuclear cGAS. Thus, we conclude that the ubiquitin-proteasome system (UPS) is essential to regulate the amount of nuclear cGAS following DNA damage. cGAS accumulation close to PML NBs upon proteasome inhibition suggests an implication of these membrane-less organelles in this process.

PML NBs are implicated in cGAS degradation but not foci formation.

PML NBs have been implicated in degradation processes, particularly through their interaction with components of the UPS. Upon arsenic-induced stress, which greatly enhances PML SUMOylation, ubiquitinated proteins as well as subunits of the proteasome localize within PML NBs, which sustains catabolism of SUMOylated proteins (Valérie Lallemand-Breitenbach et al. 2008b). Using the FK2 antibody which recognizes mono- and poly-ubiquitinated proteins, we first verified that ubiquitinated proteins accumulate in PML NBs upon addition of MG132 following etoposide treatment (Sup. Figure 3A). In addition, cGAS foci closely juxtapose FK2 foci (Sup. Figure 3B) as expected given their juxtaposition to PML NBs (Figure 2C). To investigate the role of PML NBs in controlling cGAS nuclear levels, we undertook an siRNA-based approach. This approach was previously used to efficiently knock-down PML in human primary cells (Kleijwegt et al. 2023b). Western blot analysis confirmed the significant decrease in PML total levels in siPML-treated cells

compared to the control siRNA (Figure 3A). While PML knock-down did not significantly altered cGAS total levels in non-treated cells, it abrogated the previously observed decrease of total cGAS upon addition of etoposide. Addition of MG132 in presence of DNA damage led to an even greater restoration of cGAS levels (Figure 3A), suggesting that PML is required to degrade nuclear cGAS following its mobilization from chromatin. Importantly, close examination of siPML-depleted cells revealed that cGAS foci remained present in the nuclei, suggesting that their formation is independent of PML (Figure 3B) and may happen before juxtaposition with PML NBs.

Protein localization within/next to PML NBs is intimately linked with SUMOylation. UBC9, the sole SUMO E2-conjugating enzyme localizes withing PML NBs where it SUMOylates proteins which may help in the retention of proteins through binding to the PML SUMO-interacting Motif (SIM) (Yuwen Li et al. 2020). To investigate the role of SUMOylation for cGAS nuclear dynamics upon proteasome inhibition, we conducted experiments in the presence of ML-792, a SUMO activating enzyme (SAE) inhibitor, which prevents protein SUMOylation. ML-792 altered PML NBs structure resulting in the appearance of enlarged PML NBs (Figure 3C and (Hirano et Udagawa 2021)), mimicking the SUMO1/2/3 depletion (Kleijwegt et al. 2023b). Accordingly, ML-792 prevented PML SUMOylation (Figure 3D). cGAS foci formation could still occur in absence of SUMOylation, but their juxtaposition next to PML NBs was lost (Figure 3C), consistent with our previous results showing that cGAS foci can form independently of PML NBs. Mean minimal distance between cGAS foci and PML NBs increased from 0,02 to 0,25µm as shown by quantification (Figure 3C), thus underscoring the loss of juxtaposition. Given that PML NBs are implicated in cGAS degradation, preventing its juxtaposition to PML NBs should alter its degradation. Indeed, addition of ML-792 blunted the decrease of cGAS levels after etoposide treatment (Figure 3D). Together, our data shows that SUMOylation plays an important function in targeting/retaining cGAS juxtaposed to PML NBs, which may then participate in cGAS degradation.

p97/VCP is implicated in the removal of chromatin-bound cGAS following DNA damage

The p97/VCP segregase, which is a component of PML NBs (Jaffray et al. 2023b), is recruited to DNA damage sites where it disassembles ubiquitinated protein substrates, ensuring protein turnover and the regulation of chromatin structure around DSBs which in turn, helps to preserve genome stability (Torrecilla, Oehler, et Ramadan 2017). We thus investigated the role of p97 in the regulation of cGAS

protein turnover after DNA damage. We first monitored the total pool of cGAS, when p97 ATPase activity was blocked, by acute chemical inhibition with CB5083. Inactivation of p97 blunted the decrease of total cGAS levels observed upon etoposide addition in the non-treated control cells (Figure 4A). Addition of MG132 restored even higher cGAS levels after etoposide treatment (Figure 4A), as compared to the cells without CB5083 (Figure 2A). Since p97 is required to extract ubiquitinated proteins from chromatin after damage, we then looked at cGAS chromatin-bound levels by cellular fractionation. The reduction of cGAS chromatin-bound levels upon etoposide addition was abrogated when p97 is inhibited (Figure 4B), demonstrating a key role for p97 in regulating cGAS chromatin-bound levels after DNA damage. Since cGAS forms nuclear foci upon proteasome inhibition (Figure 2C), which are independent of PML (Figure 3C), we wanted to test the hypothesis that cGAS foci form in conditions of proteasome inhibition after its removal from chromatin. We thus inspected cGAS foci formation in absence of p97 activity, which inhibits cGAS removal from chromatin. In conditions of CB5083 alone, no foci were observed for cGAS (Sup. Figure 4A). Upon DNA damage and proteasome inhibition, foci formation of cGAS was lost upon p97 inhibition, in contrast to the situation without CB5083 (Figures 4C-D), suggesting that cGAS foci formation is downstream of the effect of p97.

Since cGAS was recently found to be degraded by the SPSB3-CRL5 complex (P. Xu et al. 2024b), we checked whether this complex impacted on the regulation of cGAS total levels and cGAS foci formation after DNA damage. Removal of SPSB3 or CUL5 by siRNA treatment did not significantly impact on cGAS total levels in non-treated cells (Sup. Figure 4B), suggesting that their role in cGAS degradation may not be conserved in primary cells. In addition, upon DNA damage combined with proteasome inhibition, knock-down of SPSB3 or CUL5 had no impact on cGAS foci formation, as shown by quantification (Sup. Figure 4C), suggesting the existence of an alternative specific pathway for nuclear cGAS degradation upon DNA damage.

cGAS extraction from chromatin is required for the DNA damage response

While so far our data have showed that cGAS is unhooked from chromatin and degraded after DNA damage, this may seem contradictory with earlier studies showing cGAS accumulation at DNA damage sites. Indeed, cGAS is recruited to DNA damage sites at early times after damage and abrogates the formation of a functional PARP1-Timeless complex required for homologous

recombination (HR) (H. Liu et al. 2018b). In addition, cGAS also negatively regulates HR through DNA compaction which inhibits the formation of the Rad51 filament for homology searching (Jiang et al. 2019b). We hypothesized that cGAS recruitment at DNA breaks is followed by its rapid degradation, preventing us from detecting it at damage sites at one hour after NCS treatment (Figure 1A). We thus treated cells with MG132 1 hour before inducing DSBs with NCS, followed by one hour of recovery. In these conditions, cGAS accumulated at DNA damage sites (Figure 5A), suggesting that it can be trapped early at DNA breaks upon proteasome inhibition. We then wondered whether preventing cGAS extraction from chromatin or preventing its degradation after DNA damage would alter the DDR. Cells treated with etoposide together with MG132 in the last 8 hours, showed diminished γH2A.X levels, as shown by immunofluorescence and western blot (Figure 5B-C). The lower amount of γH2A.X foci and their smaller size was intimately linked with higher cGAS nuclear levels and cGAS foci formation juxtaposed to PML NBs (Figure 5B). Treatment with CB5083 (p97i) concomitant with etoposide had similar effects, blunting the amount of γH2A.X which anti-correlated with cGAS amounts in the nucleus (Figure 5D) and on chromatin (Figure 4B). p97i effect was more drastic than the effect of MG132 on dampening γH2A.X levels, possibly owing to the fact that MG132 was only added in the last 8 hours of etoposide treatment, when a pool of cGAS is already being detached from chromatin, allowing the formation of small γH2A.X foci. Notably, no cGAS foci were detected after p97i, consistent with our earlier observations that p97i prevents cGAS unhooking from chromatin (Figure 4C), which may therefore hinder cGAS foci formation. In contrast, treatment with TSA, which triggers cGAS removal from chromatin, led to a significant increase in γH2A.X levels (Figure 5E). Collectively, these results suggest that preventing cGAS removal from chromatin or blocking its degradation correlates with an impaired DNA damage response, while removing cGAS from chromatin correlates with an increase in γH2A.X.

cGAS degradation is essential for the early steps of senescence induction following DNA damage

Given the importance of the DNA damage response for senescence induction (Gorgoulis et al. 2019b), we thought to investigate whether cGAS could impact on DDR and thus regulate the early steps of senescence induction following DNA damage. It is well established that the cGAS-STING pathway is key to promote the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in late senescent cells, at 7

days post-stress-induced senescence (Dou et al. 2017b; Glück et al. 2017b; H. Yang et al. 2017b). Yet, whether the dynamics of nuclear cGAS could contribute to early senescence entry through STING-independent functions remains unclear. In order to test this hypothesis, we first investigated which of the hallmarks of senescence (Hernandez-Segura, Nehme, et Demaria 2018b) could be detected in BJ cells, as early as after 24h of etoposide treatment. As expected, a global loss of proliferation was observed via EdU-incorporation at day 1 post-etoposide treatment, which remained at day 5 or 7 post-etoposide (Sup. Figure 5A). In contrast, in a time-course experiment, SASP induction could only be detected at 7 and 10 days post-etoposide treatment (Sup. Figure 5B). BJ cells were also positive for the senescence associated beta-galactosidase activity (SA-β-gal) at day 10 post-treatment (Sup. Figure 5C). Interestingly, the accumulation of the histone chaperone HIRA in PML NBs, which is another known marker of senescence required for senescence associated heterochromatin foci (SAHF) formation (Ye, Zerlanko, Zhang, et al. 2007b; R. Zhang et al. 2005b) and SASP induction (Dasgupta et al. 2023), could be detected as early as 24 hours post-treatment, prior to the onset of the other senescence markers and concomitant with γH2A.X induction (Figure 6A). DNA damage itself did not trigger HIRA accumulation in PML NBs (Sup. Figure 5D and (Rai et al. 2017a)). While IFN-I treatment or viral infections can also trigger HIRA accumulation in PML NBs, we verified that its relocalization in PML NBs upon etoposide treatment was not dependent on IFN-I pathway by using ruxolitinib, an inhibitor of the JAK-STAT pathway downstream of the IFN-I receptor. Addition of ruxolitinib during the course of etoposide treatment had no impact on HIRA accumulation in PML NBs (Sup. Figure 5E), confirming that it is a key marker for early senescence entry in primary cells (Dasgupta et al. 2023). The number of 'HIRA in PML NBs'-positive cells after 24h of etoposide was around 30% but increased after a time-course recovery from etoposide (Sup. Figure 5F), underscoring the progressive entry of cells into senescence. RNA-Seq analysis performed on human primary BJ fibroblasts treated or not with 24 hours of etoposide resulted in widespread time-dependent changes in gene expression, maintained at 72h after etoposide treatment (Sup. Figure 5G). Gene Ontology (GO) analysis revealed that genes involved in cell cycle or DNA replication were downregulated, whereas genes implicated in p53 signaling pathway and apoptosis or autophagy were upregulated in etoposide-treated cells confirming the presence of early senescence markers at 24h post-etoposide (Sup. Figure 5G). We thus investigated whether preventing cGAS degradation prevents early senescence entry by quantifying the amount of cells with HIRA accumulation in PML NBs. Addition of MG132, which increased the pool of nuclear cGAS, prevented HIRA relocalization in PML NBs, indicating an impaired senescence entry (Figure 6B). Together, these findings suggest that the DNA

damage-induced chromatin destabilization triggering cGAS unhooking from chromatin is required for early senescence induction. The p97-PML NBs axis might ensure the control of cGAS abundance to limit a potential cell-intrinsic activation of innate immune responses.

Discussion

By assessing the dynamics of nuclear cGAS following DNA damage, we provide important novel insights into the mechanisms controlling cGAS levels and role in the nucleus.

cGAS is degraded upon DNA damage correlating with the induction of the DNA damage response

While it is now well-established that cGAS is a nuclear protein, tightly bound to chromatin to remain inactivated (W. Hao et al. 2023b; Lu et al. 2024b), our data show that, upon DNA damage, cGAS is unhooked from chromatin followed by its degradation. Yet, when using proteasome inhibition before induction of DNA damage and looking at early time points after DNA damage, we could detect cGAS at DNA damage sites, confirming previous results showing an early recruitment of cGAS at laser microirradation sites (H. Liu et al. 2018b). We thus hypothesize that it is mainly cGAS present at DNA damage sites that is unhooked and degraded which is consistent with the partial degradation of cGAS observed when considering the decrease of about 30% of its total pool. Chromatin opening is required for γH2A.X spreading as shown with the decondensation of heterochromatin regions upon DSBs (Caron, Pobega, et Polo 2021). Here, by using MG132 which prevents protein degradation, or by inhibiting p97 which reduces protein turnover at DNA damage sites (J. C. Y. Liu et al. 2024; Weickert et al. 2023; Meerang et al. 2011), we correlate the presence of a higher pool of cGAS on chromatin with an impaired formation of γH2AX foci. This suggest that preventing cGAS unhooking from chromatin may participate in the alteration of the DNA damage response. Conversely, by using TSA, which drastically unhooks cGAS from chromatin, we correlate the absence of cGAS from chromatin with a strong γH2A.X signal seen upon combined TSA+etoposide treatment as compared to etoposide alone. While we cannot exclude indirect effects of these broad inhibitors which are known to impact γH2AX foci formation (A. Chandra et al. 2018; Swan, Cowell, et Austin 2021; J. Cheng et al. 2024), our data suggest a requirement for cGAS removal from the chromatin followed by its PML-dependent

degradation (see below) to allow the efficient formation of γH2AX foci, supporting a role of cGAS as a negative regulator of the DDR.

Undegraded cGAS accumulates in foci adjacent to PML NBs in a p97-dependent manner.

Post-translational modifications (PTMs) of proteins, such as SUMOylation and ubiquitination, have emerged as significant mechanisms for regulating diverse aspects of the DDR, orchestrating the recruitment/turnover of DDR proteins at DNA damage sites which is essential for preserving genome integrity (S. P. Jackson et Durocher 2013). Here, our data suggest a dynamic interplay between SUMOylation and ubiquitination to regulate cGAS nuclear dynamics upon DNA damage. While our attempts have remained so far unsuccessful in the identification of cGAS SUMOylation, probably owing to the low levels of cGAS in BJ cells, several screens have identified the lysine K285 as a target for SUMOylation (Hendriks et al. 2014; Schimmel et al. 2014). Interestingly, both the SUMO E2 conjugating enzyme UBC9 and the SUMO E3 ligases PIAS1 and PIAS4 accumulate at sites of DSBs where they are required for accrual of DDR factors and proficient DSB repair (Galanty et al. 2009a; Morris et al. 2009a). In addition, proteins belonging to the class of STUbLs (SUMO-Targeted Ubiquitin Ligases), such as RNF4 and RNF111 which can ubiquitinate SUMOylated proteins connecting them to the proteasome-dependent degradation pathway, are also recruited to DSBs where they regulate protein turnover (Galanty et al. 2012a; T. Ma et al. 2013a; Vyas, Kumar, Clermont, Helfricht, Kalev, Sotiropoulou, Hendriks, Radaelli, Hochepied, Blanpain, Sablina, Van Attikum, et al. 2013; Y. Yin et al. 2012a). Remarkably, all these actors of the SUMOylation/ubiquitination pathways localize both to DSBs as well as in PML NBs (Barroso-Gomila et al. 2021; Jaffray et al. 2023b) underscoring the tight interplay between PML NBs and the turnover of proteins during the DDR. PML NBs, by simultaneously concentrating enzymes and their substrates within a specific oxidation-protective environment, distinct from the rest of the nucleoplasm, could thus orchestrate the SUMOylation/ubiquitination of specific proteins regulating their stability (Tessier et al. 2022b; Abou-Ghali et Lallemand-Breitenbach 2024b). Since p97 is required for cGAS extraction from chromatin (see below), it is plausible that cGAS could be modified directly at DSBs and then become juxtaposed to PML NBs to be degraded. Of note, using JASSA (Beauclair et al. 2015a), we found 2 predictive SIM sites in cGAS (aa 151-154 and aa 308-311), which may also play a role in cGAS recruitment adjacent to PML NBs. Importantly,

removal of the SPSB3-CRL5 degradation complex of cGAS had no impact on cGAS foci formation upon addition of etoposide combined with MG132, suggesting the existence of an additional/complementary pathway specific for the degradation of nuclear cGAS in the presence of DNA damage.

cGAS foci are reminiscent of the ones formed by KAP1, an essential repressor of the transcription of transposable elements, which is SUMOylated by PML and accumulates in foci adjacent to PML NBs upon proteasome inhibition (Tessier et al. 2022b). Remarkably, KAP-1 which is phosphorylated upon DNA damage and plays essential role in DSB repair, is targeted for degradation by RNF4, in cooperation with the p97, to allow for HR repair (Kuo et al. 2016a; 2014). Our data suggest the role of p97 for cGAS unhooking from chromatin and its accumulation in foci adjacent to PML NBs upon proteasome-inhibition. We cannot exclude that cGAS present in foci adjacent to PML NBs is chromatin-bound or not, but it seems unlikely given that (i) cGAS would accumulate on chromatin at only a dozen of particular sites and (ii) the requirement for p97 to form cGAS foci suggests that it represents a nuclear soluble pool of undegraded cGAS.

Upon dsDNA binding, multivalent interactions of cGAS with DNA and other cGAS molecules drive the formation of phase-separated liquid droplets that concentrate cGAS with DNA in a crowded cytoplasm, which is critical to restrict DNA degradation and allows efficient innate immune activation (Du et Chen 2018b; Xie et al. 2019b; W. Zhou et al. 2021). Formation of cGAS foci in the nucleoplasm upon proteasome inhibition may resemble the formation of liquid-like droplets upon cGAS activation. In addition, following herpes simplex virus 1 infection, cGAS is released from chromatin in the nuclear soluble fraction, which activates cGAMP production following viral DNA sensing (Y. Wu et al. 2022b). Yet, after etoposide treatment, there was no increase in the expression of Interferon Stimulated Genes (data not shown) and we could still detect HIRA accumulation in PML NBs with addition of ruxolitinib which blunts the IFN-I response, suggesting that cGAS-STING pathway is not active. Together, our results suggest that, upon DNA damage, PML NBs may help to keep cGAS in check and to regulate its levels to avoid its activation.

Nuclear cGAS also regulates senescence entry

Previous studies have underscored a role of cGAS-STING in the late induction of the SASP during senescence (Dou et al. 2017b; Glück et al. 2017b; H. Yang et al. 2017b). Here, we suggest that cGAS

degradation is required for early senescence induction upon DNA damage induction, which might seem paradoxical. A few hypotheses can help to resolve this paradox : first, DNA damage induces only a partial degradation of the chromatin-bound pool of cGAS, leaving the nuclear and cytoplasmic pools of cGAS available to perform various functions; second, it may also be the dynamics of cGAS unhooking that trigger a senescence-inducing response. Notably, cGAS detachment from chromatin in itself might participate in the DDR response, that is key to launch the senescent program (Gorgoulis et al. 2019b). We cannot exclude the existence of, as yet to be discovered, specific nuclear functions for cGAS in senescence. In this regard, it is interesting to note that nuclear cGAS participates in SASP expression in a model of non-canonical senescence induced by chronic DNA demethylation (X. Chen et al. 2024).

We thus propose the following model: following DNA damage, a portion of cGAS accumulated at DNA damage sites, is unhooked from chromatin to allow an efficient DNA damage response. The detached pool of cGAS is subsequently degraded to avoid unintended innate immune activation. cGAS might be SUMOylated and ubiquitinated directly on chromatin, which is the signal for p97 to segregate it from chromatin. cGAS SUMOylation/SIM would ensure its targeting next to PML NBs, that ensure its degradation through their intimate connection with the proteasome-degradation pathway (Figure 6C). Preventing cGAS dynamic unhooking from chromatin may participate in blunting the DNA damage response and preventing the early senescence entry.

Activation of the cGAS-STING pathway has contrasting effects on cancers occurrence and progression. While cGAS-STING signaling is beneficial for antitumor immunity, the inflammatory cytokine secretion may fuel cancer progression or metastasis, suggesting that the effects of the cGAS-STING pathway could be context- and stage-dependent in various cancers. Our data underline an important difference between the response of primary cells and cancerous cells in the regulation of cGAS nuclear levels upon DNA damage, which could explain why cancerous cells fail to enter into senescence upon a DNA damage inducer such as etoposide. Together, our data underscore the critical importance of fine-tuning cGAS nuclear dynamics which warrants further investigation.

Methods

Cell lines and lentiviruses production

Human BJ primary foreskin fibroblasts (ATCC, CRL-2522) and HeLa cells, were cultivated in DMEM medium (Fisher scientific, 41966) containing 5% of fetal bovine serum (FBS) (Fischer scientific, 10453302), 1% of penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, P4458), at 37 °C under 5% CO2 and humid atmosphere. All cell lines were tested negative for mycoplasma contamination. Drugs and molecules used for cell treatments are described in the Key Resources Table in Appendix (duration is mentioned in the main text).

siRNAs

BJ cells were transfected with 40 nM of human siRNA for different timings (indicated in the main text for each experiment) using Lipofectamine RNAiMax reagent (Invitrogen, 13778–075) and Opti-MEM medium (Gibco, 31-985-070). siRNAs used and their sequences are summarized in the Key Resources Table in Appendix.

Antibodies

All the primary antibodies used in this study, together with the species, the references and the dilutions for immunofluorescence and western blotting, are summarized in the Key Resources Table in Appendix.

Immunofluorescence (IF) and EdU detection

Immunofluorescence was performed as in (Corpet et al. 2014). Briefly, cells were seeded on coverslips in 6- or 24-well plates. After treatment, cells were washed with PBS (EuroBioScience, CS0PBS01) and fixed in paraformaldehyde 2% (Euromedex, EM-15735). Cells were permeabilized with PBS 0,2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8787) for 5min and washed in PBS 2 times before saturation in a 5% BSA solution (Dutcher, P06-1391100) diluted in PBS 0,1% of Tween (Sigma-Aldrich, P9416), written PBST. Cells were incubated in primary antibodies diluted in PBST with 5% of BSA (see the Key Resources Table in Appendix for antibodies dilution). Highly cross-absorbed goat anti-mouse or anti-rabbit (H+L) Alexa-488, Alexa-488 IgG1, Alexa-555, Alexa-594 IgG2b or Alexa-647 (Invitrogen Life Technologies) were used as secondary antibodies. Cells were then incubated in DAPI (Invitrogen Life Technologies,

D1306) diluted in PBS at 0.1 µg/mL for 5 min at RT°C. Coverslips were mounted in Fluoromount-G (SouthernBiotech, 0100–01) and stored at 4 °C before observation.

EdU incorporation

Proliferating and senescent BJ cells were seeded on coverslips in 6-well plates. To label proliferating cells, cells were incubated with EdU (ethynyl deoxyuridine) at 20uM, an analog of thymidine, for 2h at 37°C. EdU detection was performed using the Click-iT EdU Alexa Fluor 555 imaging kit (Invitrogen, C10338). Cells were imaged such as mentioned in microscopy part.

Senescence assay

For senescence detection, cells, grown on coverslips, were fixed with 3.7% formaldehyde for 3min and washed 3 times in PBS. SA-βGal activity was detected by incubating cells overnight at 37°C (without CO_2) in a staining solution containing 1mg/mL of X-Gal (Sigma, B4252), 40mM citric acid/sodium phosphate buffer at pH=6, 5mM potassium ferricyanide, 5mM potassium ferrocyanide, 150mM NaCl and 2mM MgCl2. The cells were then washed 3 times with PBS and mounted in Fluoromount-G (SouthernBiotech, 0100–01) and stored at 4 °C before observation. Images were acquired on the Axioskop (Zeiss) upright and a color camera AxioCam ICc5 (Zeiss).

Microscopy, imaging, and quantification

Images were acquired with the Axio Observer Z1 inverted wide-field epifluorescence microscope (100 X or 63 X objectives/N.A. 1.46 or 1.4) (Zeiss) and a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics) or a ORCA-Flash4.OLT3 (Hamamatsu). Identical settings and contrast were applied for all images of the same experiment to allow data comparison. Raw images were treated with Fiji software. HIRA complex accumulation in PML NBs and cGAS foci were attested by manual counting of a minimum of 100 cells for each condition and per replicate. PML-NBs and cGAS foci proximity was measured using the Fiji RenyiEntropy mask on PML and cGAS staining. X and Y coordinates for the center of the spots were recovered and all distances between each PML NB and cGAS foci were calculated using the formula $d = \sqrt{((x1-x2)^2 + (y1-y2)^2)}$ to find the minimal distance in each nucleus. Quantification of nuclear intensities was performed with Fiji. To quantify cGAS intensity in the nucleus, we created a mask of

nuclei based on DAPI staining threshold (Image calculator function of Fiji) and then applied the measure function on cGAS channel.

Western blotting (WB)

Total cellular extracts were obtained by directly lysing the cells in 2 X Laemmli sample buffer (LSB) (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, bromophenol blue) containing 100 mM DTT. Samples were boiled for 10min and loaded on 7,5 or 10% SDS-polyacrylamide gels (Biorad, 161-0181 and 161-0183). After electrophoresis, protein were transferred on nitrocellulose membranes using a Transfer kit (Biorad, 1704271) in the Biorad Trans-Blot Turbo apparatus. Membranes were saturated in PBST with 5% of milk for 30min and then incubated in primary antibody diluted in PBST 5% BSA for 1h at room temperature or at 4°C overnight. After 3 washes in PBST, membranes were incubated with secondary antibodies diluted in PBST (see the Key Resources Table in Appendix for antibodies dilution). Signal was revealed on ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) by using Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, RPN2236) or Clarity Max Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad, 1705062).

Reverse transcription (RT)

TRIzol reagent protocol (Invitrogen, 15596026) or RNeasy Mini kit (Qiagen, 74104) were used to isolate total RNAs, resuspended in ddH2O according to the manufacturer instructions. Contaminant DNA was removed with the RNAse-free DNase Ambion (Invitrogen, AM2222). We used 1 µg of RNA for reverse transcription (RT). RNAs were annealed with Random Primers (Promega, C118A) and RT was performed with the RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, EP0452) according to the manufacturer instructions. cDNAs were stored at –20 °C before qPCR analysis.

Quantitative PCR (qPCR)

qPCRs were performed using the KAPA SYBR qPCR Master Mix (SYBR Green I dye chemistry) (KAPA BIOSYSTEMS, KK4618). Primers used for qPCR are described in the Key Resources Table in Appendix.

RNA-seq

BJ cells were treated for 24h or 72h with etoposide at 10μM or left untreated. RNAs were collected with the RNeasy Mini kit (Qiagen, 74104) and sent to BGI for sequencing on a DNBSEQ. Standard bioinformatics analysis was performed by BGI with the version 38 of the human reference genome (hg38). Dr. Tom Data Visualisation Solution (BGI) was used to perform the KEGG enrichment analysis. Heatmaps were done in R.

Fractionation

Subcellular fractionation of proteins was performed using the Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells (Thermo Fisher Scientific, #78840). Briefly, the cells were washed once with ice-cold PBS. After completely removing PBS, the cells were collected in cold PBS with 1 mL per well in a 6 wells plate. After PBS removal the cells were dissolved using 200uL of CEB solution. The lysates tubes were incubated for 10min at 4°C. The supernatants were collected as cytoplasmic fraction after centrifugation at 500g for 5min. The cell pellets were dissolved using 200 µL of MEB solution. After a 5-s vortex, the lysate tubes were incubated for 10 min at 4°C. The supernatants were collected as membrane fraction after centrifugation at 3000 x g for 5 min. The pellets were dissolved using 100uL of NEB solution. After 15s vortex, the lysates tubes were incubated for 30min at 4°C. The supernatants were collected as nuclear soluble fraction after centrifugation at 5000g for 5min. The pellets were dissolved using 100uL of NEB complemented solution. After 15s vortex, the lysates tubes were incubated for 15min at room temperature. The supernatants were collected as chromatin-bound fraction after centrifugation at 16000g for 5min. Samples concentrations were determined by Bradford assay. Same amounts of lysates were diluted in 2X LSB containing 100mM DTT and loaded on gels.

Statistical analyses and figures

Histograms and statistical analyses were performed using GraphPad Prism 10. To perform Student t test, we verified normal distribution of samples using Shapiro test and variance equality with Fisher test. Mann-Whitney u-test was applied in absence of normality for the sample distribution. p-Values

are depicted on graphs as follows: *<0.05; **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001. Biorender.com was used to generate figures schemes and model.

Materials availability

All plasmids and cell lines generated in this study can be accessed upon request to the corresponding authors.

Reagent type (species) or resource	**Designation**	**Source of reference**	**Identifiers**	**Additional information**
Cell line (H.sapiens)	BJ	ATCC	CRL-2522	human primary foreskin fibroblasts
Cell line (H.sapiens)	HeLa			
Antibody	Anti-cGAS (D1D3G) (rabbit monoclonal)	Cell signaling	15102	WB 1:500 IF 1:100
Antibody	Anti-HIRA (WC119 mouse monoclonal)	Millipore	04-1488	WB 1:1000 IF 1:500
Antibody	Anti-PML #1 (rabbit polyclonal)	Sigma	PLA0172	WB 1:2000 IF 1:2000
Antibody	Anti-PML #2 (clone G-8 mouse monoclonal IgG2b)	Santa cruz	sc-377340	IF 1:200

Antibody	Anti-γH2AX #1 (phospho S139 rabbit polyclonal)	Abcam	ab2893	WB 1:2000 IF 1:2000
Antibody	Anti-γH2AX #2 (phospho S139 clone JBW301 mouse monoclonal)	millipore	05-636	IF 1:500
Antibody	Anti-FK2 (mouse monoclonal IgG1)	millipore	04-263	IF 1:100
Antibody	Actin (polyclonal rabbit)	sigma	A2066	WB 1:2000
Antibody	anti-alpha-tubulin (mouse monoclonal)	sigma	clone DM1A - T6199	WB 1:20000
Sequence-based reagent	siLuc	Adam et al 2013	siRNA	5' CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT
Sequence-based reagent	siPML	Everett et al 2006	siRNA	5' AGATGCAGCTGTATCCAAG dTdT
Sequence-based reagent	siUBE2M	Jimeno et al 2015	siRNA	5' GGGCUUCUACAAGAGUGGGAAGUUUdTdT

Sequence-based reagent	siSPSB3_02	Xu et al 2024	siRNA	5' GUCAUAGACUUAAAGGACUdTdT
Sequence-based reagent	siCUL5	Xu et al 2024	siRNA	5' GGAAUAGUUCAACUACGAAdTdT
primers des qPCR	cGAS-F	this paper	RT qPCR primer	5' AAGAAGAGAAATGTTGCAGGAAAG
primers des qPCR	cGAS-R	this paper	RT qPCR primer	5' GACTGTCTTGAGGGTTCTGGG
primers des qPCR	GAPDH-F	Kleijwegt and al 2023	RT qPCR primer	5' GAGTCAACGGATTTGGTCGT
primers des qPCR	GAPDH-R	Kleijwegt and al 2023	RT qPCR primer	5' TTGATTTTGGAGGGATCTCG
primers des qPCR	IL6-F	This paper	RT qPCR primer	5' AGTGAGGAACAAGCCAGAGC
primers des qPCR	IL6-R	This paper	RT qPCR primer	5' GTCAGGGGTGGTTATTGCAT
primers des qPCR	IL8-F	This paper	RT qPCR primer	5' GGGCCATCAGTTGCAAATC
primers des qPCR	IL8-R	This paper	RT qPCR primer	5' TTCCTTCCGGTGGTTTCTTC
primers des qPCR	IL1β-F	This paper	RT qPCR primer	5' GGGCCATCAGTTGCAAATC
primers des qPCR	IL1β-R	This paper	RT qPCR primer	5' TTCCTTCCGGTGGTTTCTTC
chemical compound	etoposide	Sigma-Aldrich	E1383	final concentration : 2,5µM
chemical compound	EdU	Thermo scientific	C10338	final concentration : 20uM

chemical compound	doxycycline	Sigma-Aldrich	D9891	final concentration : 20ng/mL
chemical compound	ruxolitinib	Invivogen	trlr-rux	final concentration : 2µM
chemical compound	CB5083	CliniScience	CB-5083	final concentration : 1µM
chemical compound	ML-792	Axon Med Chem	3109	final concentration : 1µM
chemical compound	MG132	MedChemExpress	HY-13259	final concentration : 2,5µM
chemical compound	MLN 4924	MedChemExpress	HY-70062	final concentration : 1µM
chemical compound	Bradford	Biorad	500-0006	
chemical compound	DTT	Sigma-Aldrich	43816	final concentration : 100mM
chemical compound	protein ladder	Biorad	1610374	
chemical compound	Leptomycin B	Invivogen	inh-lep-10	Final concentration : 50nM

Figure legends

Figure 1: **Chromatin destabilization induces a global and chromatin-bound decrease of cGAS levels in primary cells**. (A) (left) Fluorescence microscopy visualization of cGAS (red) and γH2AX (green) in BJ cells treated with etoposide at 10µM for 24h or NCS at 200ng/L for 20min followed by 1h of recovery or TSA at 2uM for 24h. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar is 10µm. (Right) Plot shows quantitative analysis of nuclear cGAS intensity in cells. P-values (Student t-test) : * <0,05 ; **<0,01 ; ***<0,001 ****<0,0001. (B) Western-blot visualization of cGAS from total cell extracts on BJ cells treated with the same conditions. Actin is a loading control and quantification of cGAS levels relative to actine are shown below the WB (numbers are representative from three independent experiments). (C) Western-blot visualization of cGAS from different fractions of BJ GFP-cGAS WT cells treated with etoposide at 10µM for 24h or TSA at 2µM for 24h and Doxycycline at

100ng/mL for 24h. H3 is a loading control for the chromatin-bound fraction. Quantification of cGAS levels relative to actin levels (cytosolic and nuclear fractions) or relative to H3 (chromatin-bound fraction) are shown below. (D) Western-blot visualization of cGAS and H3 in the chromatin-bound fraction of BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h. Quantification of cGAS levels relative to H3 are shown below.

Figure 2: Proteasome inhibition prevents the decrease of cGAS in the nucleus and leads to the formation of cGAS foci juxtaposed to PML NBs. (A) Western-blot visualization of cGAS from total cell extracts on BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h and MG132 at 2,5μM for the last 8h. Actin is a loading control and quantification of cGAS levels relative to actin are shown below the WB (numbers are representative from three independent experiments). (B) Western-blot visualization of cGAS from the chromatin-bound fraction of BJ cells treated as in (A). H3 is a loading control and quantification of cGAS levels relative to H3 are shown below. (C) (left) Fluorescence microscopy visualization of PML (green) and cGAS (red) in BJ cells treated as in (A). Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Proportion of cells showing cGAS juxtaposed to PML NBs is shown on the right (numbers are representative from 3 independent experiments). Scale bar is 10μm. Insets represent enlarged images (3X) of selected areas. (Right) Upper plot shows quantitative analysis of nuclear cGAS intensity from immunofluorescence images. P-values (Student t-test) : **<0,01 ; ****<0,0001, ns : non-significant. Lower plot shows distance in μm between the center of cGAS foci and the center of the closest PML NB.

Figure 3: PML NBs are implicated in cGAS degradation but not foci formation. (A) (Left) Western-blot visualization of cGAS and PML from total cell extracts on BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h, MG132 at 2,5μM for 8h and siLuc or siPML for 48h. Actin is a loading control and quantification of cGAS levels relative to actin is shown below the WB. Histograms on the right also show quantification of cGAS and PML levels from two independent experiments. (B) Fluorescence microscopy visualization of PML (green) and cGAS (red) in BJ cells treated as in (A). Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar is 10μm. Insets represent enlarged images (3X) of selected areas. (C) (left) Fluorescence microscopy visualization of PML (green) and cGAS (red) in BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h, ML792 at 1μM for 8h and with MG132 at 2,5μM for 8h. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar is 10μm. Insets represent enlarged images (3X) of selected areas. (Right) Plot shows quantification of the distance in μm between the center of cGAS foci and the center of the closest PML NB. P-values (Student t-test) : * <0,05 ; **<0,01 ; ***<0,001 ****<0,0001. (D) Western-blot visualization of cGAS and PML from total cell extracts on BJ cells treated as in (C). Actin is a loading control and quantification of cGAS and PML levels relative to actin are shown below the WB.

Figure 4: p97 extracts cGAS from chromatin and allows cGAS foci formation. (A) Western-blot visualization of cGAS from total cell extracts on BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h, CB5083 at 1μM for 24h and MG132 at 2,5μM for 8h. Actin is a loading control and quantification of cGAS levels relative to actin are shown below the WB (numbers are representative from 2-3 independent experiments). (B) Western-blot visualization of cGAS from the chromatin-bound fraction of BJ cells treated as in (A). H3 is a loading control and quantification of cGAS levels relative to H3 are shown below. (C) Fluorescence microscopy visualization of PML (green) and cGAS (red) in BJ cells treated as in (A). Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar is 10μm. Insets represent enlarged images (3X) of selected areas. (D) Left histograms show quantitative analysis of cells with cGAS foci from cells treated as in (A). P-values (Student t-test) : * <0,05 ; **<0,01 ; ***<0,001 ****<0,0001. Numbers on all histograms represent the mean of three independent experiments. Right plot shows quantitative analysis of nuclear cGAS intensity in cells treated as in (A). P-values (Student t-test) : * <0,05 ; **<0,01 ; ***<0,001 ****<0,0001.

Figure 5: Inhibition of cGAS degradation correlates with a decreased DDR. (A) Fluorescence microscopy visualization of γH2AX (green) and cGAS (red) in BJ cells treated with NCS at 100ng/mL for 15 min followed by 1h of recovery or left untreated (NT). All cells were pretreated with MG132 at 2.5μM for 1h before NCS treatment and during the 1h of recovery. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar is 10μm. (B) Fluorescence microscopy visualization of γH2AX (green) and cGAS (red) in BJ cells treated etoposide at 10μM for 24h and with MG132 at 2,5μM for 8h. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar is 10μm. (Right) Plot shows quantitative analysis of nuclear γH2AX intensity in cells. P-values (Student t-test) : * <0,05 ; **<0,01 ; ***<0,001 ****<0,0001. (C) Western-blot visualization of γH2AX from total cell extracts on BJ cells treated with the same conditions as in (A). Actin is a loading control and quantification of γH2AX levels relative to actin are shown below the WB (numbers are representative from three independent experiments). (D) Fluorescence microscopy visualization of γH2AX (green) and cGAS (red) in BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h, and CB5083 at 1μM for 24h. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar is 10μm. (E) Western-blot visualization of γH2AX from total cell extracts on BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h, TSA at 2μM for 24h and MG132 at 2,5μM for 8h. Tubulin is a loading control and quantification of γH2AX levels relative to tubulin are shown below the WB (numbers are representative from one experiment).

Figure 6: cGAS nuclear degradation may participate in the early steps of senescence induction following DNA damage. (A) (Left) Fluorescence microscopy visualization of HIRA (green), PML (red) and γH2AX (cyan) in BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar is 10μm. Insets represent enlarged images (3X) of selected areas. (Right) Histogram shows quantitative analysis of cells with HIRA localization at PML NBs. P-values (Student t-test) : * <0,05 ; **<0,01 ; ***<0,001 ****<0,0001. Numbers on all histograms represent the mean of

three independent experiments. (B) (Left) Fluorescence microscopy visualization of HIRA (green) and cGAS (red) in BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h and with MG132 at 2,5μM for 8h. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar is 10μm. (Right) Histogram shows quantitative analysis of cells with HIRA localization at PML NBs. P-values (Student t-test) : * <0,05 ; **<0,01 ; ***<0,001 ****<0,0001. Numbers on all histograms represent the mean of three independent experiments. (C) Putative model for nuclear cGAS dynamics upon DNA damage. Upon DSB induction, cGAS present on chromatin might transiently accumulate on DSBs sites where it is modified to allow its unhooking by VCP/p97 (1). Nucleoplasmic cGAS then localizes next to PML NBs (2i) which participates in its degradation in a proteasome-dependent manner (3i). cGAS removal from chromatin is required for establishment of a complete DDR (DNA damage response) (2ii) which triggers the early senescence program in primary cells, as exemplified by HIRA accumulation in PML NBs (3ii).

Supplementary Figure 1: (A) Histograms shows relative *cGAS* mRNA levels (normalized on *β-actin* mRNA levels) of BJ cells treated or not with etoposide at 10uM for 24h. Rationalization was performed on the non-treated condition. P-values (Student t-test) : * <0,05. Numbers represent the mean of three independent experiments. (B) Dot plot shows quantitative analysis of nuclear cGAS intensity in BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h and Leptomycin B 100nM for 2h. P-values (Student t-test) : **<0,01 ; ****<0,0001. (C) (Left) Western-blot visualization of cGAS and GFP-cGAS from total cell extracts on BJ GFP-cGAS cells treated with Doxycycline at 20ng/mL for 24h. Actin is a loading control. (Right) Fluorescence microscopy visualization of GFP-cGAS (green) in cells treated as on the left panel. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar is 10μm. (D)(Right) Fluorescence microscopy visualization of cGAS (red) in HeLa cells treated or not with etoposide at 10μM for 24h. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar is 10μm. (Left) Dot plot shows quantitative analysis of nuclear cGAS intensity in cells. P-values (Student t-test) : ****<0,0001. (E) Western-blot visualization of cGAS from total cell extracts on HeLa cells treated as in (D). Actin is a loading control and quantification of cGAS levels relative to actin are shown below the WB (numbers are representative from three independent experiments). (F) Western-blot visualization of cGAS from different fractions of HeLa cells treated with etoposide at 10μM for 24h. Actin is a loading control and quantification of cGAS levels relative to actin are shown below the WB.

Supplementary Figure 2: (A) Western-blot visualization of cGAS and γH2AX from total cell extracts on BJ cells treated with TSA at 2μM for 24h and MG132 at 2,5μM for 8h. Actin is a loading control and quantification of cGAS and γH2AX levels relative to actin are shown below the WB. (B) Fluorescence microscopy visualization of PML (green) and cGAS (red) in BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h and with MG132 at 2,5μM for 8h. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar is 10μm. Insets represent enlarged images (3X) of selected areas. (C) Fluorescence microscopy visualization of ACA (green) and cGAS (red) in BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h and with MG132 at 2,5μM for 8h. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar is 10μm. (D)

Fluorescence microscopy visualization of PML (green), cGAS (red) and γH2AX (cyan) in BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h and with MG132 at 2,5μM for 8h. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar represents 10μm. Insets represent enlarged images (3X) of selected areas.

Supplementary Figure 3: (A) Fluorescence microscopy visualization of FK2 (green) and PML (red) in BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h and with MG132 at 2,5μM for 8h. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar represents 10μm. Insets represent enlarged images (3X) of selected areas. (B) Fluorescence microscopy visualization of FK2 (green) and cGAS (red) in BJ cells treated as in (A). Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar represents 10μm. Insets represent enlarged images (3X) of selected areas.

Supplementary Figure 4: (A) Fluorescence microscopy visualization of PML (green) and cGAS (red) in BJ cells treated with CB5083 at 1μM for 24h. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar represents 10μm. Insets represent enlarged images (3X) of selected areas. (B) Western-blot visualization of cGAS and SPSB3 from total cell extracts on BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h, MG132 at 2,5μM for 8h and treated with the indicated siRNAs for 48h. Actin is a loading control and quantification of cGAS and SPSB3 levels relative to actin are shown below the WB. (C) (Left) Fluorescence microscopy visualization of PML (green) and cGAS (red) in BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h and with MG132 at 2,5μM for 8h and siLuc, siSPSB3, or siCUL5 for 48h. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar represents 10μm. Insets represent enlarged images (3X) of selected areas. (Right) Histogram shows quantitative analysis of cells with cGAS foci from 2 independent experiments.

Supplementary Figure 5: (A) Histogram shows quantitative analysis of cells with EdU incorporation on BJ cells treated or not with etoposide at 10μM for 24h and recovered for 5 days, 7 days or 10 days. (B) Histograms shows relative *IL-6*, *IL-8* or *IL1-β* mRNA levels (normalized on *β-actin* mRNA levels) of BJ cells treated or not with etoposide at 10μM for 24h and recovered for 7 days or 10 days. Rationalization was performed on the non treated condition. (C) Bright-field microscopy visualization of SA-βgal on BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h and recovered for 10 days. (D) (Upper part) Fluorescence microscopy visualization of HIRA (green) and PML (red) in BJ cells treated with NCS at 200ng/L for 20min followed by 1h of recovery. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar represents 10μm. Insets represent enlarged images (3X) of selected areas. (Lower part) Histogram shows quantitative analysis of cells with HIRA localization at PML NBs. (E) Histogram shows quantitative analysis of cells with HIRA localization at PML NBs on BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h and ruxolitinib at 2μM for 24h. (F) Histograms show quantitative analysis of cells with HIRA localization at PML NBs on BJ cells treated with etoposide at 10μM for 24h and recovered for 5 days, 7 days or 10 days. (G) (Left) RNA-Seq data from BJ cells treated with etoposide for 24h, 72h, or

left untreated (NT). Heatmap of the expression of differentially expressed genes between NT and eto 24h in the different conditions. (Right) Bubble chart showing KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed genes (DEGs) upregulated or downregulated in the eto 24h condition compared to the NT condition.

Bibliographie

Abou-Ghali, Majdouline, et Valérie Lallemand-Breitenbach. 2024. « PML Nuclear Bodies: The Cancer Connection and Beyond ». *Nucleus* 15 (1): 2321265. https://doi.org/10.1080/19491034.2024.2321265.

Barroso-Gomila, Orhi, Fredrik Trulsson, Veronica Muratore, Iñigo Canosa, Laura Merino-Cacho, Ana Rosa Cortazar, Coralia Pérez, et al. 2021. « Identification of Proximal SUMO-Dependent Interactors Using SUMO-ID ». *Nature Communications* 12 (1): 6671. https://doi.org/10.1038/s41467-021-26807-6.

Beauclair, Guillaume, Antoine Bridier-Nahmias, Jean-François Zagury, Ali Saïb, et Alessia Zamborlini. 2015. « JASSA: A Comprehensive Tool for Prediction of SUMOylation Sites and SIMs ». *Bioinformatics* 31 (21): 3483-91. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv403.

Boyer, Joshua A., Cathy J. Spangler, Joshua D. Strauss, Andrew P. Cesmat, Pengda Liu, Robert K. McGinty, et Qi Zhang. 2020. « Structural Basis of Nucleosome-Dependent cGAS Inhibition ». *Science* 370 (6515): 450-54. https://doi.org/10.1126/science.abd0609.

Cao, Duanfang, Xiaonan Han, Xiaoyi Fan, Rui-Ming Xu, et Xinzheng Zhang. 2020. « Structural Basis for Nucleosome-Mediated Inhibition of cGAS Activity ». *Cell Research* 30 (12): 1088-97. https://doi.org/10.1038/s41422-020-00422-4.

Cao, Xuetao. 2016. « Self-Regulation and Cross-Regulation of Pattern-Recognition Receptor Signalling in Health and Disease ». *Nature Reviews Immunology* 16 (1): 35-50. https://doi.org/10.1038/nri.2015.8.

Caron, Pierre, Enrico Pobega, et Sophie E. Polo. 2021. « DNA Double-Strand Break Repair: All Roads Lead to HeterochROMAtin Marks ». *Frontiers in Genetics* 12 (septembre):730696. https://doi.org/10.3389/fgene.2021.730696.

Chandra, Abhishek, Luqiang Wang, Tiffany Young, Leilei Zhong, Wei-Ju Tseng, Michael A. Levine, Keith Cengel, et al. 2018. « Proteasome Inhibitor Bortezomib Is a Novel Therapeutic Agent for Focal Radiation-Induced Osteoporosis ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32 (1): 52-62. https://doi.org/10.1096/fj.201700375R.

Chang, Hae Ryung, Anudari Munkhjargal, Myung-Jin Kim, Seon Young Park, Eunyoung Jung, Jae-Ha Ryu, Young Yang, Jong-Seok Lim, et Yonghwan Kim. 2018. « The Functional Roles of PML Nuclear Bodies in Genome Maintenance ». *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 809 (mai):99-107. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.05.002.

Chen, Hao, Hao Chen, Jiamin Zhang, Yumin Wang, Antoine Simoneau, Hui Yang, Arthur S. Levine, Lee Zou, Zhijian Chen, et Li Lan. 2020. « cGAS Suppresses Genomic Instability as a

Decelerator of Replication Forks ». *Science Advances* 6 (42): eabb8941. https://doi.org/10.1126/sciadv.abb8941.

Chen, Xiaoying, Kosuke Yamaguchi, Brianna Rodgers, Delphine Goerhig, David Vindrieux, Xavier Lahaye, Matthieu Nolot, et al. 2024. « DNA Methylation Protects Cancer Cells against Non-Canonical Senescence ». bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2024.08.23.609297.

Cheng, Jin, Haoyin Liu, Wenpei Yu, Xunhu Dong, Yan Sai, Feng Ye, Guorong Dan, et al. 2024. « Nitrogen Mustard Induces Dynamic Nuclear Protein Spectrum Change and DNA-Protein Crosslinking, with P97 Mediating Repair ». *Heliyon* 10 (17): e37401. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37401.

Cho, Min-Guk, Rashmi J. Kumar, Chien-Chu Lin, Joshua A. Boyer, Jamshaid A. Shahir, Katerina Fagan-Solis, Dennis A. Simpson, et al. 2024. « MRE11 Liberates cGAS from Nucleosome Sequestration during Tumorigenesis ». *Nature* 625 (7995): 585-92. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06889-6.

Corpet, Armelle, Constance Kleijwegt, Simon Roubille, Franceline Juillard, Karine Jacquet, Pascale Texier, et Patrick Lomonte. 2020. « PML Nuclear Bodies and Chromatin Dynamics: Catch Me If You Can! » *Nucleic Acids Research* 48 (21): 11890-912. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa828.

Corpet, Armelle, Teresa Olbrich, Myriam Gwerder, Daniel Fink, et Manuel Stucki. 2014. « Dynamics of histone H3.3 deposition in proliferating and senescent cells reveals a DAXX-dependent targeting to PML-NBs important for pericentromeric heterochromatin organization ». *Cell Cycle* 13 (2): 249-67. https://doi.org/10.4161/cc.26988.

Dasgupta, Nirmalya, Xue Lei, Rouven Arnold, Marcos Garcia Teneche, Karl N. Miller, Adarsh Rajesh, Andrew Davis, et al. 2023. « Histone Chaperone HIRA, Promyelocytic Leukemia (PML) Protein and P62/SQSTM1 Coordinate to Regulate Inflammation during Cell Senescence and Aging ». Preprint. Cell Biology. https://doi.org/10.1101/2023.06.24.546372.

Dou, Zhixun, Kanad Ghosh, Maria Grazia Vizioli, Jiajun Zhu, Payel Sen, Kirk J. Wangensteen, Johayra Simithy, et al. 2017. « Cytoplasmic Chromatin Triggers Inflammation in Senescence and Cancer ». *Nature* 550 (7676): 402-6. https://doi.org/10.1038/nature24050.

Du, Mingjian, et Zhijian J. Chen. 2018. « DNA-Induced Liquid Phase Condensation of cGAS Activates Innate Immune Signaling ». *Science* 361 (6403): 704-9. https://doi.org/10.1126/science.aat1022.

Ferrand, Juliette, Alexandre Plessier, et Sophie E. Polo. 2021. « Control of the Chromatin Response to DNA Damage: Histone Proteins Pull the Strings ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 113 (mai):75-87. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.07.002.

Galanty, Yaron, Rimma Belotserkovskaya, Julia Coates, et Stephen P. Jackson. 2012. « RNF4, a SUMO-Targeted Ubiquitin E3 Ligase, Promotes DNA Double-Strand Break Repair ». *Genes & Development* 26 (11): 1179-95. https://doi.org/10.1101/gad.188284.112.

Galanty, Yaron, Rimma Belotserkovskaya, Julia Coates, Sophie Polo, Kyle M. Miller, et Stephen P. Jackson. 2009. « Mammalian SUMO E3-Ligases PIAS1 and PIAS4 Promote Responses to DNA Double-Strand Breaks ». *Nature* 462 (7275): 935-39. https://doi.org/10.1038/nature08657.

Gentili, Matteo, Xavier Lahaye, Francesca Nadalin, Guilherme P.F. Nader, Emilia Puig Lombardi, Solène Herve, Nilushi S. De Silva, et al. 2019. « The N-Terminal Domain of cGAS Determines Preferential Association with Centromeric DNA and Innate Immune Activation in the Nucleus ». *Cell Reports* 26 (9): 2377-2393.e13. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.105.

Glück, Selene, Baptiste Guey, Muhammet Fatih Gulen, Katharina Wolter, Tae-Won Kang, Niklas Arndt Schmacke, Anne Bridgeman, Jan Rehwinkel, Lars Zender, et Andrea Ablasser.

2017. « Innate Immune Sensing of Cytosolic Chromatin Fragments through cGAS Promotes Senescence ». *Nature Cell Biology* 19 (9): 1061-70. https://doi.org/10.1038/ncb3586.

Gorgoulis, Vassilis, Peter D. Adams, Andrea Alimonti, Dorothy C. Bennett, Oliver Bischof, Cleo Bishop, Judith Campisi, et al. 2019. « Cellular Senescence: Defining a Path Forward ». *Cell* 179 (4): 813-27. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005.

Gulen, Muhammet F., Natasha Samson, Alexander Keller, Marius Schwabenland, Chong Liu, Selene Glück, Vivek V. Thacker, et al. 2023. « cGAS–STING Drives Ageing-Related Inflammation and Neurodegeneration ». *Nature* 620 (7973): 374-80. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06373-1.

Hao, Wenzhuo, Wenjun Li, Lingyan Wang, et Shitao Li. 2023. « The Odyssey of cGAS: From Cytosol to Nucleus ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 74 (décembre):29-39. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2023.09.004.

Harding, Shane M., Joseph L. Benci, Jerome Irianto, Dennis E. Discher, Andy J. Minn, et Roger A. Greenberg. 2017. « Mitotic Progression Following DNA Damage Enables Pattern Recognition within Micronuclei ». *Nature* 548 (7668): 466-70. https://doi.org/10.1038/nature23470.

Hendriks, Ivo A, Rochelle C J D'Souza, Bing Yang, Matty Verlaan-de Vries, Matthias Mann, et Alfred C O Vertegaal. 2014. « Uncovering Global SUMOylation Signaling Networks in a Site-Specific Manner ». *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (10): 927-36. https://doi.org/10.1038/nsmb.2890.

Hernandez-Segura, Alejandra, Jamil Nehme, et Marco Demaria. 2018. « Hallmarks of Cellular Senescence ». *Trends in Cell Biology* 28 (6): 436-53. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001.

Hirano, Seishiro, et Osamu Udagawa. 2021. « Effects of Arsenic on the Topology and Solubility of Promyelocytic Leukemia (PML)-Nuclear Bodies ». https://doi.org/10.1101/2021.01.13.426540.

Jackson, Stephen P., et Daniel Durocher. 2013. « Regulation of DNA Damage Responses by Ubiquitin and SUMO ». *Molecular Cell* 49 (5): 795-807. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.017.

Jaffray, Ellis G., Michael H. Tatham, Barbara Mojsa, Magda Liczmanska, Alejandro Rojas-Fernandez, Yili Yin, Graeme Ball, et Ronald T. Hay. 2023. « The P97/VCP Segregase Is Essential for Arsenic-Induced Degradation of PML and PML-RARA ». *Journal of Cell Biology* 222 (4): e202201027. https://doi.org/10.1083/jcb.202201027.

Jenson, Justin M., et Zhijian J. Chen. 2024. « cGAS Goes Viral: A Conserved Immune Defense System from Bacteria to Humans ». *Molecular Cell* 84 (1): 120-30. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.12.005.

Jiang, Hui, Xiaoyu Xue, Swarupa Panda, Ajinkya Kawale, Richard M Hooy, Fengshan Liang, Jungsan Sohn, Patrick Sung, et Nelson O Gekara. 2019. « Chromatin-bound cGAS Is an Inhibitor of DNA Repair and Hence Accelerates Genome Destabilization and Cell Death ». *The EMBO Journal* 38 (21). https://doi.org/10.15252/embj.2019102718.

Kleijwegt, Constance, Florent Bressac, Coline Seurre, Wilhelm Bouchereau, Camille Cohen, Pascale Texier, Thomas Simonet, Laurent Schaeffer, Patrick Lomonte, et Armelle Corpet. 2023. « Interplay between PML NBs and HIRA for H3.3 Dynamics Following Type I Interferon Stimulus ». *eLife* 12 (mai):e80156. https://doi.org/10.7554/eLife.80156.

Kono, Yohei, Stephen A. Adam, Yuko Sato, Karen L. Reddy, Yixian Zheng, Ohad Medalia, Robert D. Goldman, Hiroshi Kimura, et Takeshi Shimi. 2022. « Nucleoplasmic Lamin C Rapidly Accumulates at Sites of Nuclear Envelope Rupture with BAF and cGAS ». *Journal of Cell Biology* 221 (12): e202201024. https://doi.org/10.1083/jcb.202201024.

Kujirai, Tomoya, Christian Zierhut, Yoshimasa Takizawa, Ryan Kim, Lumi Negishi, Nobuki Uruma, Seiya Hirai, Hironori Funabiki, et Hitoshi Kurumizaka. 2020. « Structural Basis for the Inhibition of cGAS by Nucleosomes ». *Science* 370 (6515): 455-58. https://doi.org/10.1126/science.abd0237.

Kuo, Ching-Ying, Xu Li, Xiang-Qian Kong, Cheng Luo, Che-Chang Chang, Yiyin Chung, Hsiu-Ming Shih, Keqin Kathy Li, et David K. Ann. 2014. « An Arginine-Rich Motif of Ring Finger Protein 4 (RNF4) Oversees the Recruitment and Degradation of the Phosphorylated and SUMOylated Krüppel-Associated Box Domain-Associated Protein 1 (KAP1)/TRIM28 Protein during Genotoxic Stress ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (30): 20757-72. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.555672.

Kuo, Ching-Ying, Xu Li, Jeremy M. Stark, Hsiu-Ming Shih, et David K. Ann. 2016. « RNF4 Regulates DNA Double-Strand Break Repair in a Cell Cycle-Dependent Manner ». *Cell Cycle* 15 (6): 787-98. https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1138184.

Lallemand-Breitenbach, Valérie, Marion Jeanne, Shirine Benhenda, Rihab Nasr, Ming Lei, Laurent Peres, Jun Zhou, Jun Zhu, Brian Raught, et Hugues de Thé. 2008. « Arsenic Degrades PML or PML–RARα through a SUMO-Triggered RNF4/Ubiquitin-Mediated Pathway ». *Nature Cell Biology* 10 (5): 547-55. https://doi.org/10.1038/ncb1717.

Li, Yuwen, Xiaodan Ma, Wenyu Wu, Zhu Chen, et Guoyu Meng. 2020. « PML Nuclear Body Biogenesis, Carcinogenesis, and Targeted Therapy ». *Trends in Cancer* 6 (10): 889-906. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.05.005.

Liu, Haipeng, Haiping Zhang, Xiangyang Wu, Dapeng Ma, Juehui Wu, Lin Wang, Yan Jiang, et al. 2018. « Nuclear cGAS Suppresses DNA Repair and Promotes Tumorigenesis ». *Nature* 563 (7729): 131-36. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0629-6.

Liu, Julio C. Y., Leena Ackermann, Saskia Hoffmann, Zita Gál, Ivo A. Hendriks, Charu Jain, Louise Morlot, et al. 2024. « Concerted SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase Activities of TOPORS and RNF4 Are Essential for Stress Management and Cell Proliferation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 31 (9): 1355-67. https://doi.org/10.1038/s41594-024-01294-7.

Lu, Yikai, Mengmeng Zhao, Li Chen, Yan Wang, Tianhao Liu, et Haipeng Liu. 2024. « cGAS: Action in the Nucleus ». *Frontiers in Immunology* 15 (mars):1380517. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1380517.

Ma, Teng, Yibin Chen, Feng Zhang, Chao-Yie Yang, Shaomeng Wang, et Xiaochun Yu. 2013. « RNF111-Dependent Neddylation Activates DNA Damage-Induced Ubiquitination ». *Molecular Cell* 49 (5): 897-907. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.006.

Mackenzie, Karen J., Paula Carroll, Carol-Anne Martin, Olga Murina, Adeline Fluteau, Daniel J. Simpson, Nelly Olova, et al. 2017. « cGAS Surveillance of Micronuclei Links Genome Instability to Innate Immunity ». *Nature* 548 (7668): 461-65. https://doi.org/10.1038/nature23449.

Meerang, Mayura, Danilo Ritz, Shreya Paliwal, Zuzana Garajova, Matthias Bosshard, Niels Mailand, Pavel Janscak, Ulrich Hübscher, Hemmo Meyer, et Kristijan Ramadan. 2011. « The Ubiquitin-Selective Segregase VCP/P97 Orchestrates the Response to DNA Double-Strand Breaks ». *Nature Cell Biology* 13 (11): 1376-82. https://doi.org/10.1038/ncb2367.

Michalski, Sebastian, Carina C. de Oliveira Mann, Che A. Stafford, Gregor Witte, Joseph Bartho, Katja Lammens, Veit Hornung, et Karl-Peter Hopfner. 2020. « Structural Basis for Sequestration and Autoinhibition of cGAS by Chromatin ». *Nature* 587 (7835): 678-82. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2748-0.

Montecucco, Alessandra, Francesca Zanetta, et Giuseppe Biamonti. 2015. « Molecular Mechanisms of Etoposide ». *EXCLI Journal; 14:Doc95; ISSN 1611-2156*. https://doi.org/10.17179/EXCLI2014-561.

Morris, Joanna R., Chris Boutell, Melanie Keppler, Ruth Densham, Daniel Weekes, Amin Alamshah, Laura Butler, et al. 2009. « The SUMO Modification Pathway Is Involved in the BRCA1 Response to Genotoxic Stress ». *Nature* 462 (7275): 886-90. https://doi.org/10.1038/nature08593.

Pathare, Ganesh R., Alexiane Decout, Selene Glück, Simone Cavadini, Kristina Makasheva, Ruud Hovius, Georg Kempf, et al. 2020. « Structural Mechanism of cGAS Inhibition by the Nucleosome ». *Nature* 587 (7835): 668-72. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2750-6.

Rai, Taranjit Singh, Mandy Glass, John J. Cole, Mohammad I. Rather, Morgan Marsden, Matthew Neilson, Claire Brock, Ian R. Humphreys, Roger D. Everett, et Peter D. Adams. 2017. « Histone Chaperone HIRA Deposits Histone H3.3 onto Foreign Viral DNA and Contributes to Anti-Viral Intrinsic Immunity ». *Nucleic Acids Research* 45 (20): 11673-83. https://doi.org/10.1093/nar/gkx771.

Schimmel, Joost, Karolin Eifler, Jón Otti Sigurðsson, Sabine A.G. Cuijpers, Ivo A. Hendriks, Matty Verlaan-de Vries, Christian D. Kelstrup, et al. 2014. « Uncovering SUMOylation Dynamics during Cell-Cycle Progression Reveals FoxM1 as a Key Mitotic SUMO Target Protein ». *Molecular Cell* 53 (6): 1053-66. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.001.

Sun, L., J. Wu, F. Du, X. Chen, et Z. J. Chen. 2013. « Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway ». *Science* 339 (6121): 786-91. https://doi.org/10.1126/science.1232458.

Swan, Rebecca L., Ian G. Cowell, et Caroline A. Austin. 2021. « A Role for VCP/P97 in the Processing of Drug-Stabilized TOP2-DNA Covalent Complexes ». *Molecular Pharmacology* 100 (1): 57-62. https://doi.org/10.1124/molpharm.121.000262.

Tessier, Sarah, Omar Ferhi, Marie-Claude Geoffroy, Román González-Prieto, Antoine Canat, Samuel Quentin, Marika Pla, et al. 2022. « Exploration of Nuclear Body-Enhanced Sumoylation Reveals That PML Represses 2-Cell Features of Embryonic Stem Cells ». *Nature Communications* 13 (1): 5726. https://doi.org/10.1038/s41467-022-33147-6.

Torrecilla, Ignacio, Judith Oehler, et Kristijan Ramadan. 2017. « The Role of Ubiquitin-Dependent Segregase P97 (VCP or Cdc48) in Chromatin Dynamics after DNA Double Strand Breaks ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 372 (1731): 20160282. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0282.

Tóth, Katalin Fejes, Tobias A. Knoch, Malte Wachsmuth, Monika Frank-Stöhr, Michael Stöhr, Christian P. Bacher, Gabriele Müller, et Karsten Rippe. 2004. « Trichostatin A-Induced Histone Acetylation Causes Decondensation of Interphase Chromatin ». *Journal of Cell Science* 117 (18): 4277-87. https://doi.org/10.1242/jcs.01293.

Vyas, R, R Kumar, F Clermont, A Helfricht, P Kalev, P Sotiropoulou, I A Hendriks, et al. 2013. « RNF4 Is Required for DNA Double-Strand Break Repair in Vivo ». *Cell Death & Differentiation* 20 (3): 490-502. https://doi.org/10.1038/cdd.2012.145.

Wang, Liqin, Lina Lankhorst, et René Bernards. 2022. « Exploiting Senescence for the Treatment of Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 22 (6): 340-55. https://doi.org/10.1038/s41568-022-00450-9.

Weickert, Pedro, Hao-Yi Li, Maximilian J. Götz, Sophie Dürauer, Denitsa Yaneva, Shubo Zhao, Jacqueline Cordes, et al. 2023. « SPRTN Patient Variants Cause Global-Genome DNA-Protein Crosslink Repair Defects ». *Nature Communications* 14 (1): 352. https://doi.org/10.1038/s41467-023-35988-1.

West, A. Phillip, William Khoury-Hanold, Matthew Staron, Michal C. Tal, Cristiana M. Pineda, Sabine M. Lang, Megan Bestwick, et al. 2015. « Mitochondrial DNA Stress Primes the Antiviral Innate Immune Response ». *Nature* 520 (7548): 553-57. https://doi.org/10.1038/nature14156.

Wu, Yakun, et Shitao Li. 2020. « Role of Post-Translational Modifications of cGAS in Innate Immunity ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (21): 7842. https://doi.org/10.3390/ijms21217842.

Wu, Yakun, Kun Song, Wenzhuo Hao, Jack Li, Lingyan Wang, et Shitao Li. 2022. « Nuclear Soluble cGAS Senses Double-Stranded DNA Virus Infection ». *Communications Biology* 5 (1): 433. https://doi.org/10.1038/s42003-022-03400-1.

Xie, Wei, Lodoe Lama, Carolina Adura, Daisuke Tomita, J. Fraser Glickman, Thomas Tuschl, et Dinshaw J. Patel. 2019. « Human cGAS Catalytic Domain Has an Additional DNA-Binding Interface That Enhances Enzymatic Activity and Liquid-Phase Condensation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (24): 11946-55. https://doi.org/10.1073/pnas.1905013116.

Xu, Pengbiao, Ying Liu, Chong Liu, Baptiste Guey, Lingyun Li, Pauline Melenec, Jonathan Ricci, et Andrea Ablasser. 2024. « The CRL5–SPSB3 Ubiquitin Ligase Targets Nuclear cGAS for Degradation ». *Nature*, février. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07112-w.

Yang, Hui, Hanze Wang, Junyao Ren, Qi Chen, et Zhijian J. Chen. 2017. « cGAS Is Essential for Cellular Senescence ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (23). https://doi.org/10.1073/pnas.1705499114.

Ye, Xiaofen, Brad Zerlanko, Rugang Zhang, Neeta Somaiah, Marc Lipinski, Paolo Salomoni, et Peter D. Adams. 2007. « Definition of pRB- and P53-Dependent and -Independent Steps in HIRA/ASF1a-Mediated Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (7): 2452-65. https://doi.org/10.1128/MCB.01592-06.

Yin, Yili, Anne Seifert, Joy Shijia Chua, Jean-François Maure, Filip Golebiowski, et Ronald T. Hay. 2012. « SUMO-Targeted Ubiquitin E3 Ligase RNF4 Is Required for the Response of Human Cells to DNA Damage ». *Genes & Development* 26 (11): 1196-1208. https://doi.org/10.1101/gad.189274.112.

Zhang, Rugang, Maxim V. Poustovoitov, Xiaofen Ye, Hidelita A. Santos, Wei Chen, Sally M. Daganzo, Jan P. Erzberger, et al. 2005. « Formation of MacroH2A-Containing Senescence-Associated Heterochromatin Foci and Senescence Driven by ASF1a and HIRA ». *Developmental Cell* 8 (1): 19-30. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.10.019.

Zhao, Baoyu, Pengbiao Xu, Chesley M. Rowlett, Tao Jing, Omkar Shinde, Yuanjiu Lei, A. Phillip West, Wenshe Ray Liu, et Pingwei Li. 2020. « The Molecular Basis of Tight Nuclear Tethering and Inactivation of cGAS ». *Nature* 587 (7835): 673-77. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2749-z.

Zhou, Wen, Lisa Mohr, John Maciejowski, et Philip J. Kranzusch. 2021. « cGAS Phase Separation Inhibits TREX1-Mediated DNA Degradation and Enhances Cytosolic DNA Sensing ». *Molecular Cell* 81 (4): 739-755.e7. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.01.024.

Figure 1

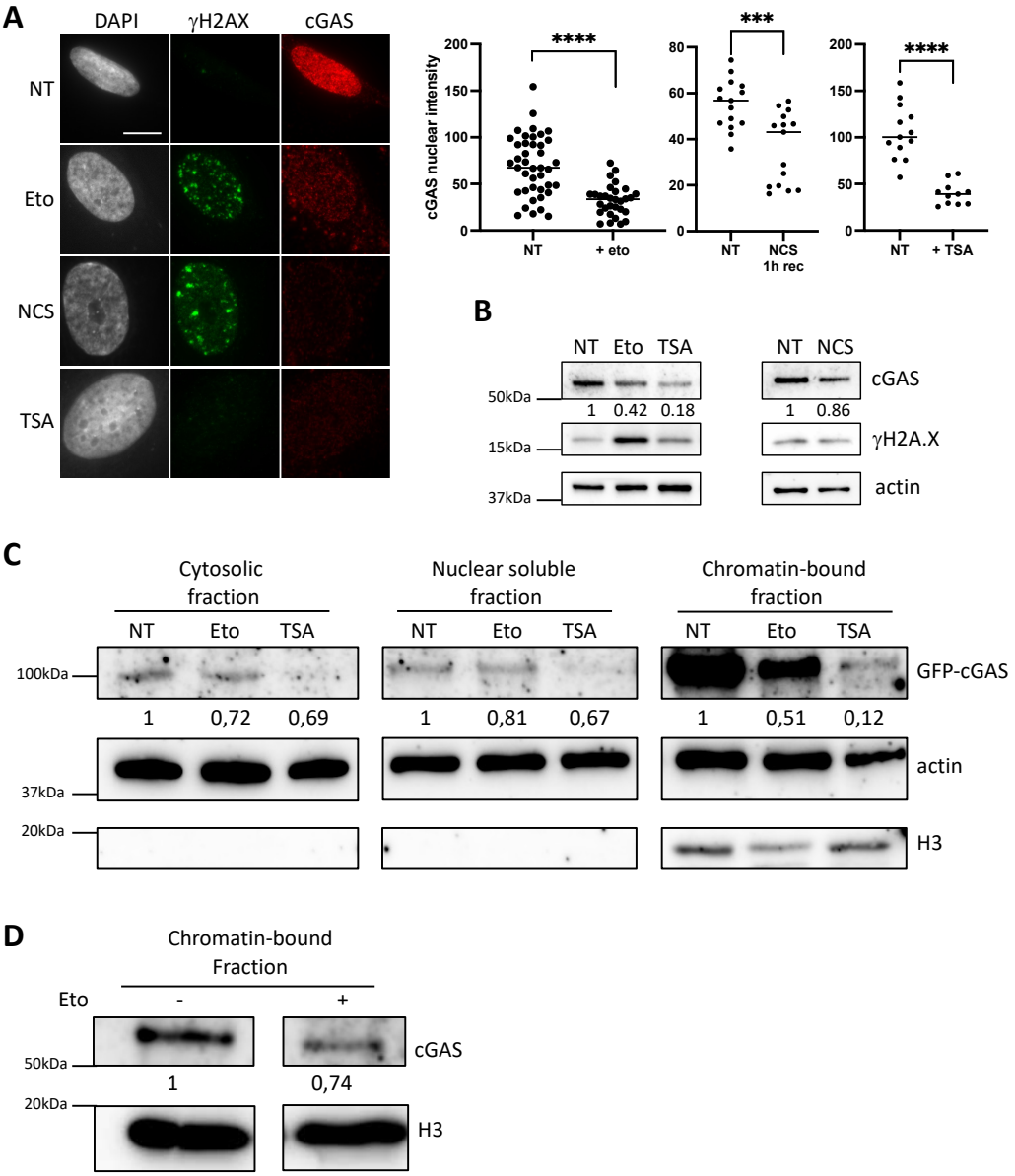

A
DAPI
γH2AX
cGAS
NT
Eto
NCS
TSA
cGAS nuclear intensity
****
***
****
NT
+ eto
NT
NCS
1h rec
NT
+ TSA
B
NT Eto TSA
NT NCS
50kDa
15kDa
37kDa
1 0.42 0.18
1 0.86
cGAS
γH2A.X
actin
C
Cytosolic fraction
Nuclear soluble fraction
Chromatin-bound fraction
NT Eto TSA
100kDa
37kDa
20kDa
1 0,72 0,69
1 0,81 0,67
1 0,51 0,12
GFP-cGAS
actin
H3
D
Chromatin-bound Fraction
Eto - +
50kDa
20kDa
1 0,74
cGAS
H3

Figure 2

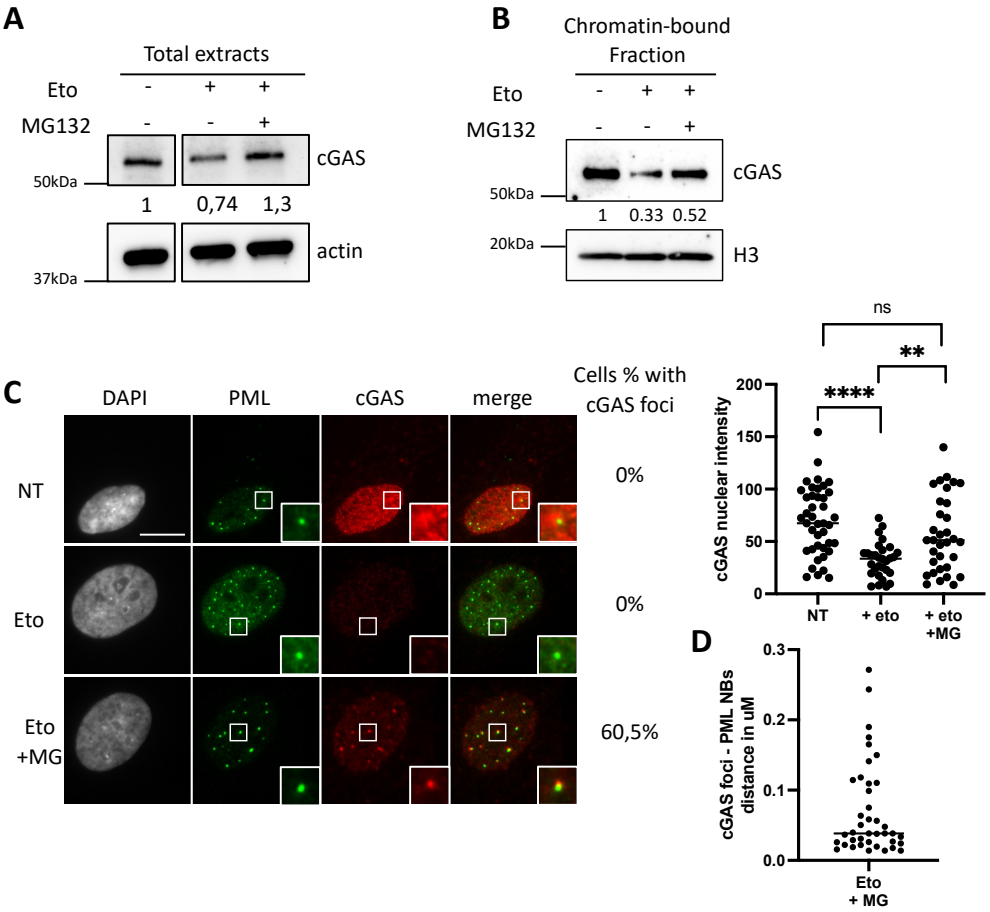

A
Total extracts
Eto
MG132
50kDa
cGAS
1
0,74
1,3
37kDa
actin
B
Chromatin-bound
Fraction
Eto
MG132
cGAS
50kDa
1
0.33
0.52
20kDa
H3
C
DAPI
PML
cGAS
merge
Cells % with
cGAS foci
NT
0%
Eto
0%
Eto
+MG
60,5%
ns
**
****
cGAS nuclear intensity
NT
+ eto
+ eto
+MG
D
cGAS foci - PML NBs
distance in uM
Eto
+ MG

Figure 3

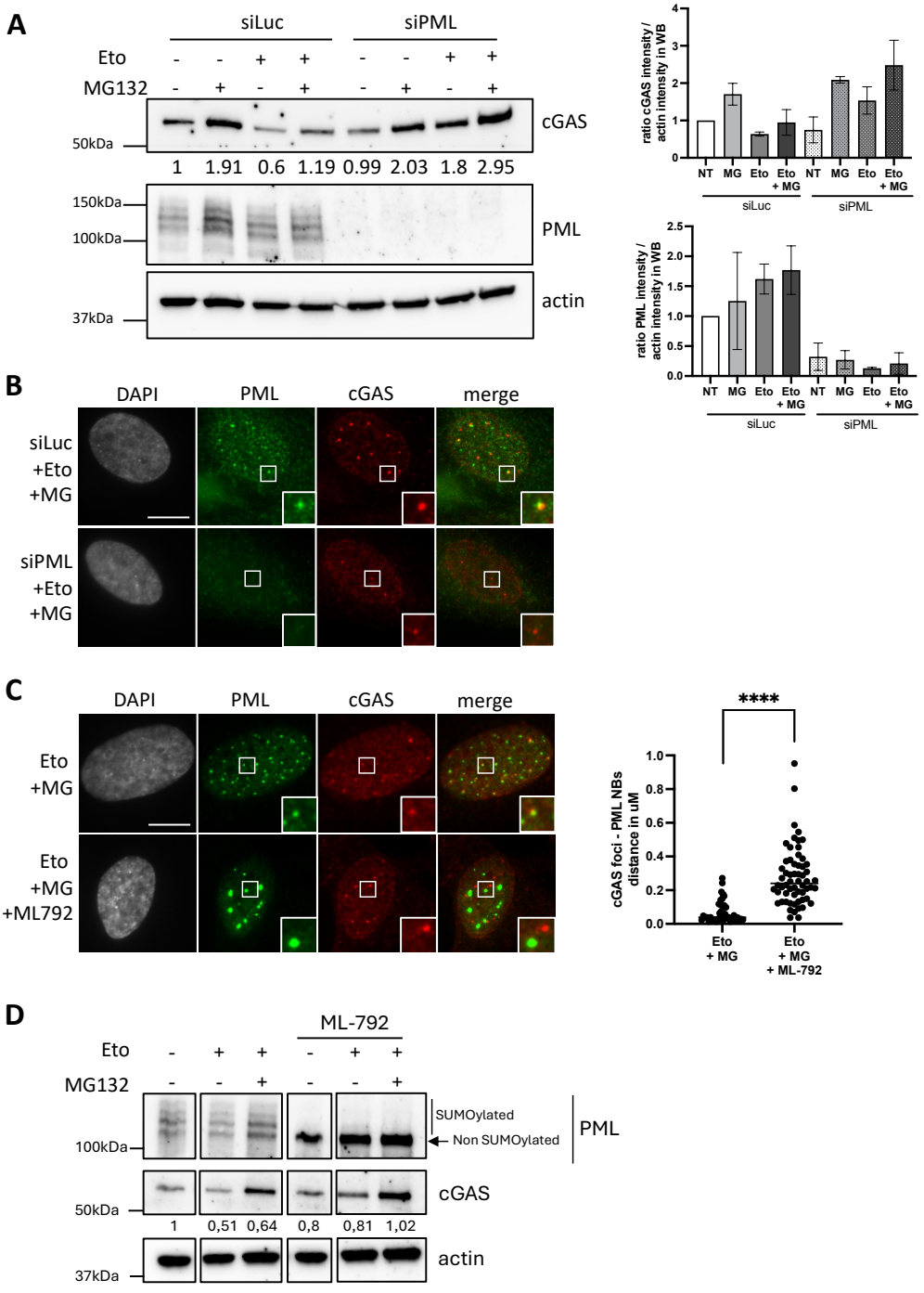

A
siLuc
siPML
Eto
MG132
cGAS
50kDa
1 1.91 0.6 1.19 0.99 2.03 1.8 2.95
150kDa
100kDa
PML
37kDa
actin
ratio cGAS intensity / actin intensity in WB
NT MG Eto Eto + MG NT MG Eto Eto + MG
siLuc
siPML
ratio PML intensity / actin intensity in WB
B
DAPI
PML
cGAS
merge
siLuc +Eto +MG
siPML +Eto +MG
C
Eto +MG
Eto +MG +ML792
****
cGAS foci - PML NBs distance in uM
Eto + MG
Eto + MG + ML-792
D
ML-792
Eto
MG132
SUMOylated
Non SUMOylated
PML
100kDa
cGAS
50kDa
1 0,51 0,64 0,8 0,81 1,02
actin
37kDa

Figure 4

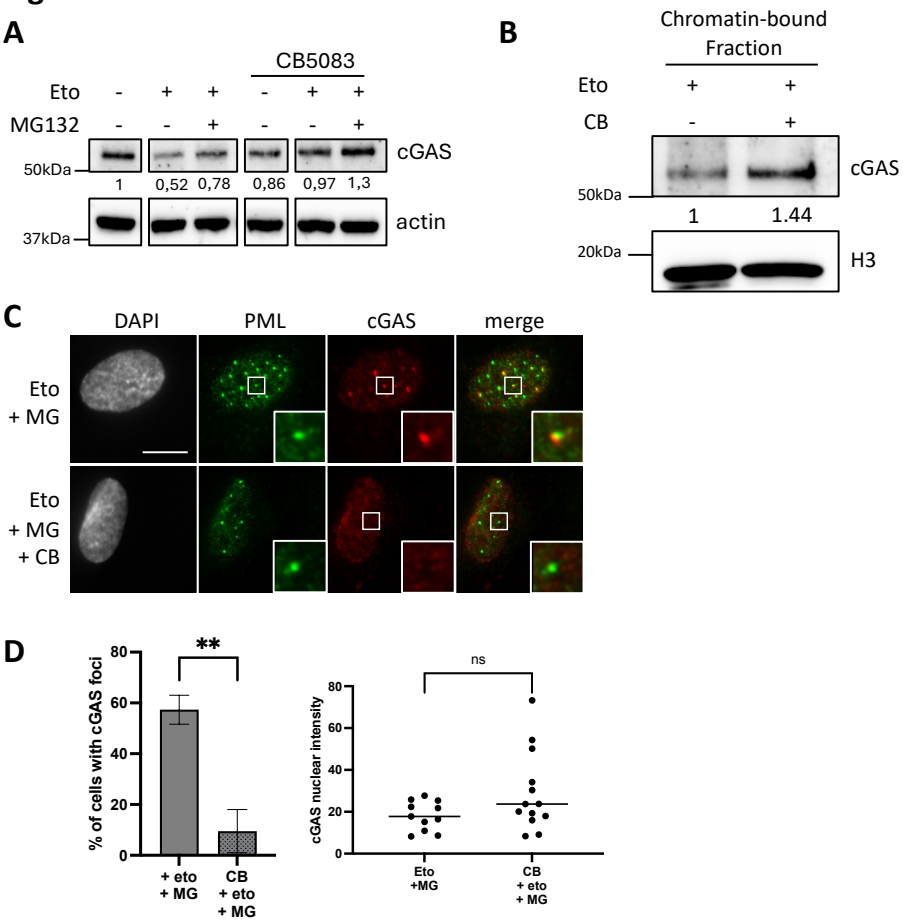

A
CB5083
Eto - + + - + +
MG132 - - + - - +
50kDa
cGAS
1 0,52 0,78 0,86 0,97 1,3
37kDa
actin
B
Chromatin-bound Fraction
Eto + +
CB - +
cGAS
50kDa
1 1.44
20kDa
H3
C
DAPI PML cGAS merge
Eto + MG
Eto + MG + CB
D
% of cells with cGAS foci
**
+ eto + MG
CB + eto + MG
cGAS nuclear intensity
ns
Eto +MG
CB + eto + MG

Figure 5

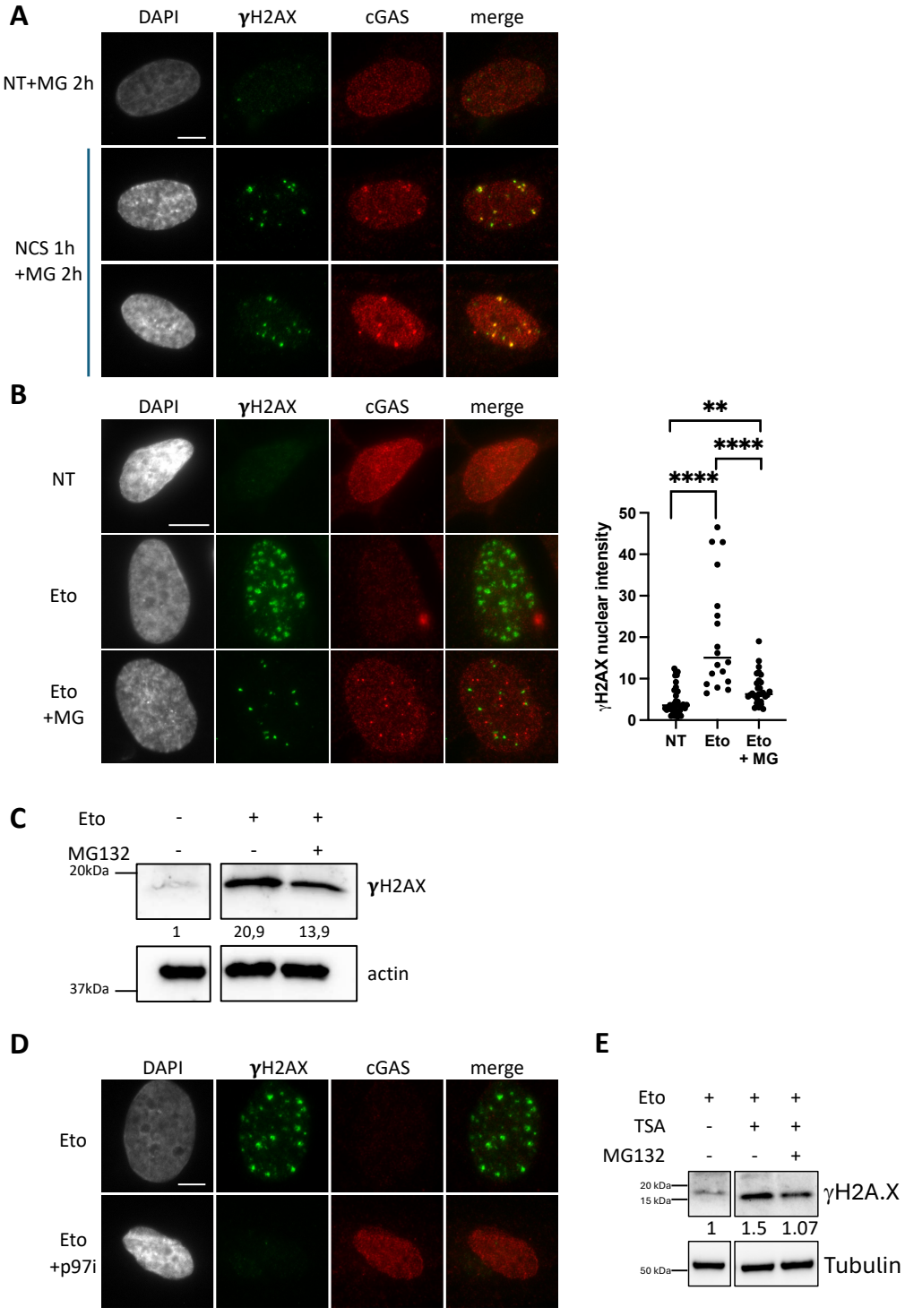
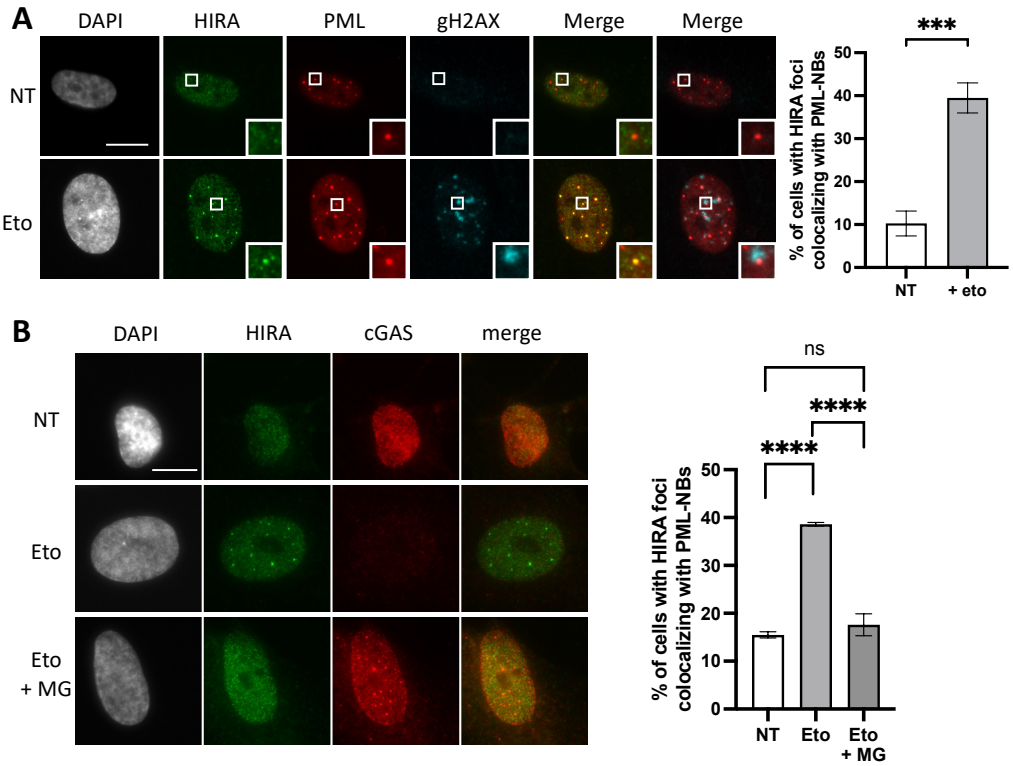
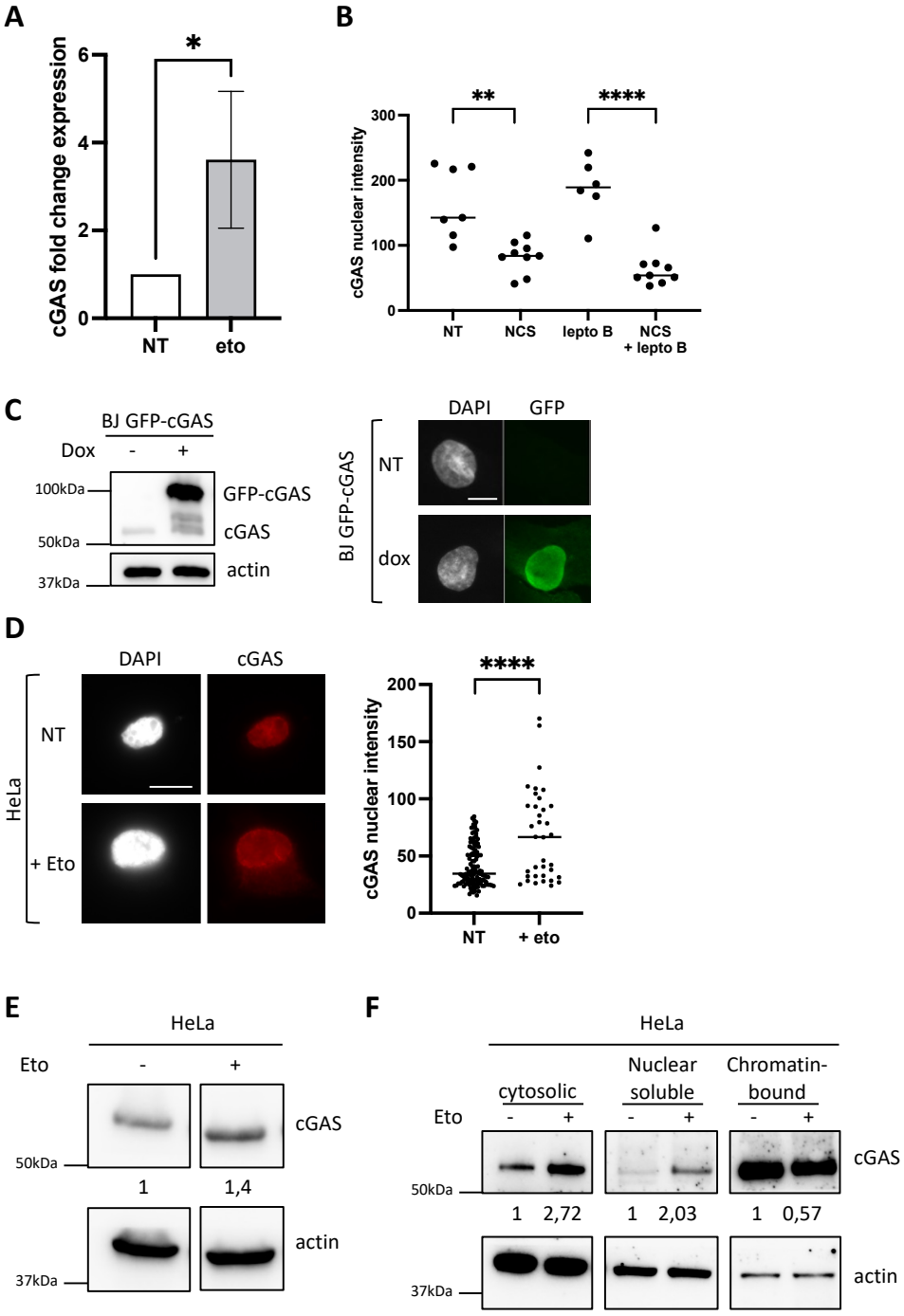

A
DAPI
γH2AX
cGAS
merge
NT+MG 2h
NCS 1h
+MG 2h
B
DAPI
γH2AX
cGAS
merge
NT
Eto
Eto
+MG
**
****
****
γH2AX nuclear intensity
50
40
30
20
10
0
NT
Eto
Eto
+ MG
C
Eto - + +
MG132 - - +
20kDa
γH2AX
1
20,9
13,9
37kDa
actin
D
DAPI
γH2AX
cGAS
merge
Eto
Eto
+p97i
E
Eto + + +
TSA - + +
MG132 - - +
20 kDa
15 kDa
γH2A.X
1
1.5
1.07
50 kDa
Tubulin

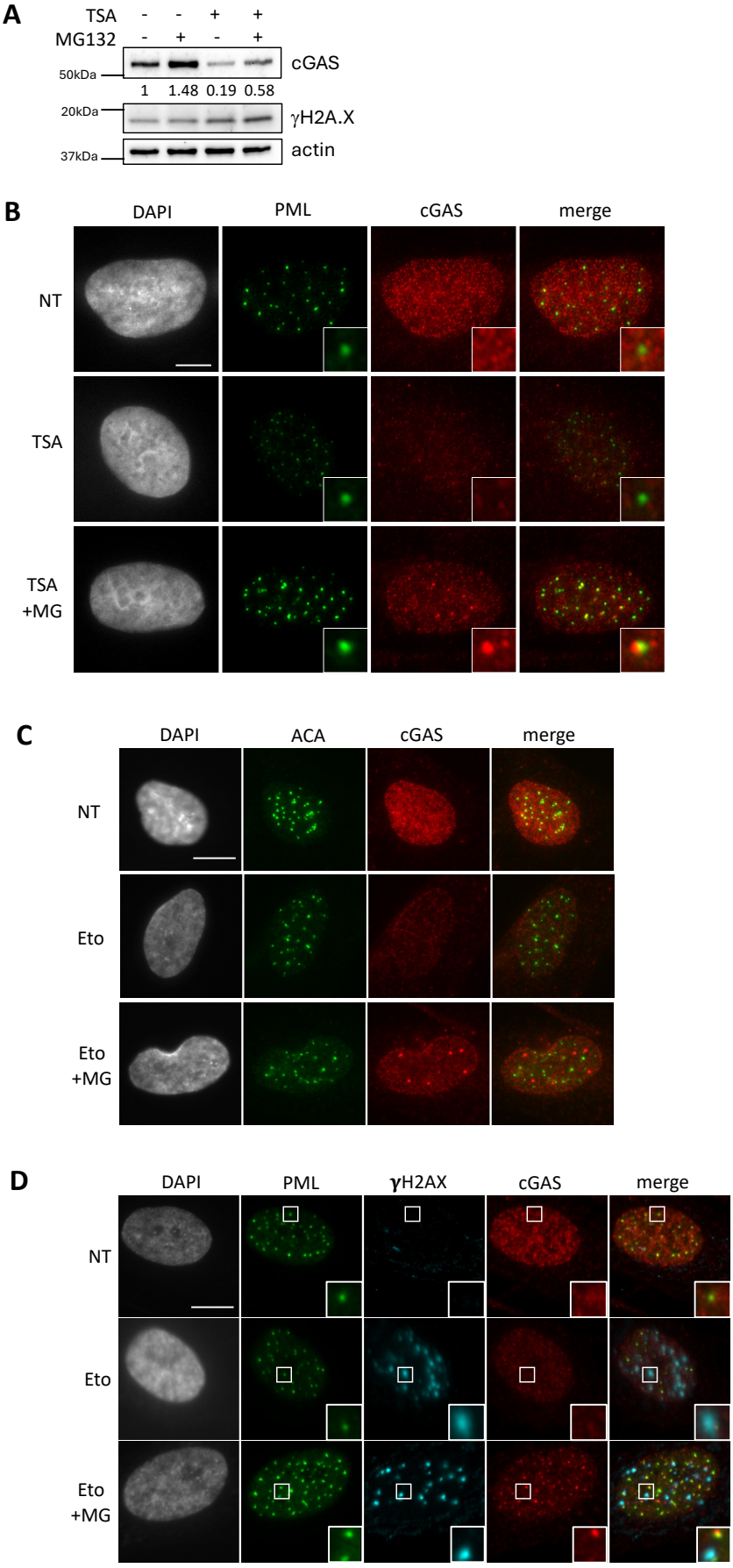
Figure 6


A
DAPI
HIRA
PML
gH2AX
Merge
Merge
NT
Eto
***
% of cells with HIRA foci colocalizing with PML-NBs
50
40
30
20
10
0
NT
+ eto
B
DAPI
HIRA
cGAS
merge
NT
Eto
Eto + MG
ns
****
****
% of cells with HIRA foci colocalizing with PML-NBs
50
40
30
20
10
0
NT
Eto
Eto + MG
C
DSBs
cGAS
VCP/p97
(1)
(2ii)
P
H2A.X
DDR
P
P
P
H3.3-H4
HIRA complex
ASF1A
early senescence program
(2i)
(3ii)
cGAS
(3i)
PML NB outer shell

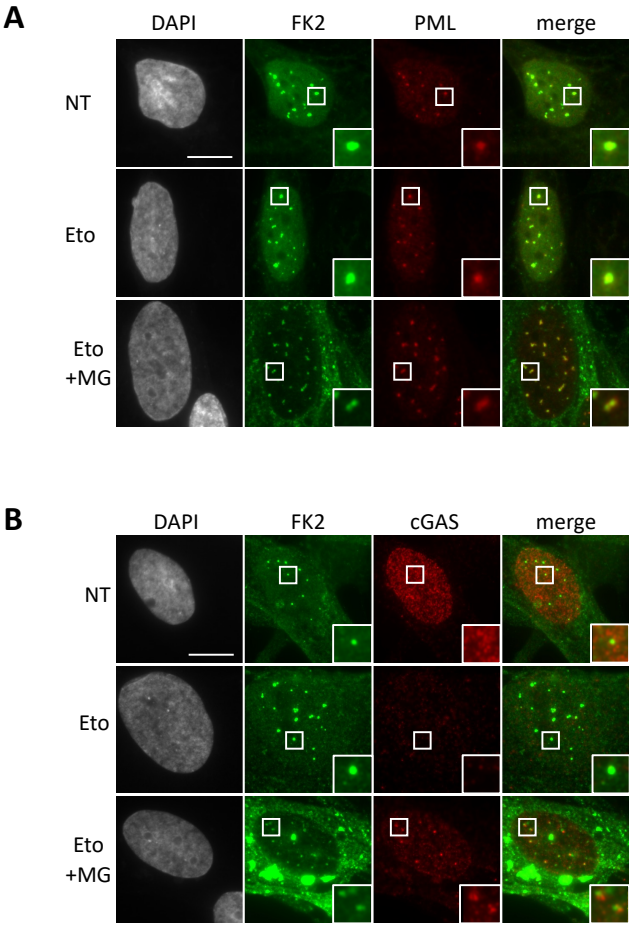
Sup. Figure 1


A
cGAS fold change expression
6
4
2
0
*
NT
eto
B
cGAS nuclear intensity
300
200
100
0
**
****
NT
NCS
lepto B
NCS
+ lepto B
C
BJ GFP-cGAS
Dox - +
100kDa
50kDa
37kDa
GFP-cGAS
cGAS
actin
DAPI
GFP
BJ GFP-cGAS
NT
dox
D
DAPI
cGAS
HeLa
NT
+ Eto
cGAS nuclear intensity
200
150
100
50
0
****
NT
+ eto
E
HeLa
Eto - +
50kDa
cGAS
1 1,4
37kDa
actin
F
HeLa
cytosolic
Nuclear soluble
Chromatin-bound
Eto - + - + - +
50kDa
cGAS
1 2,72 1 2,03 1 0,57
37kDa
actin

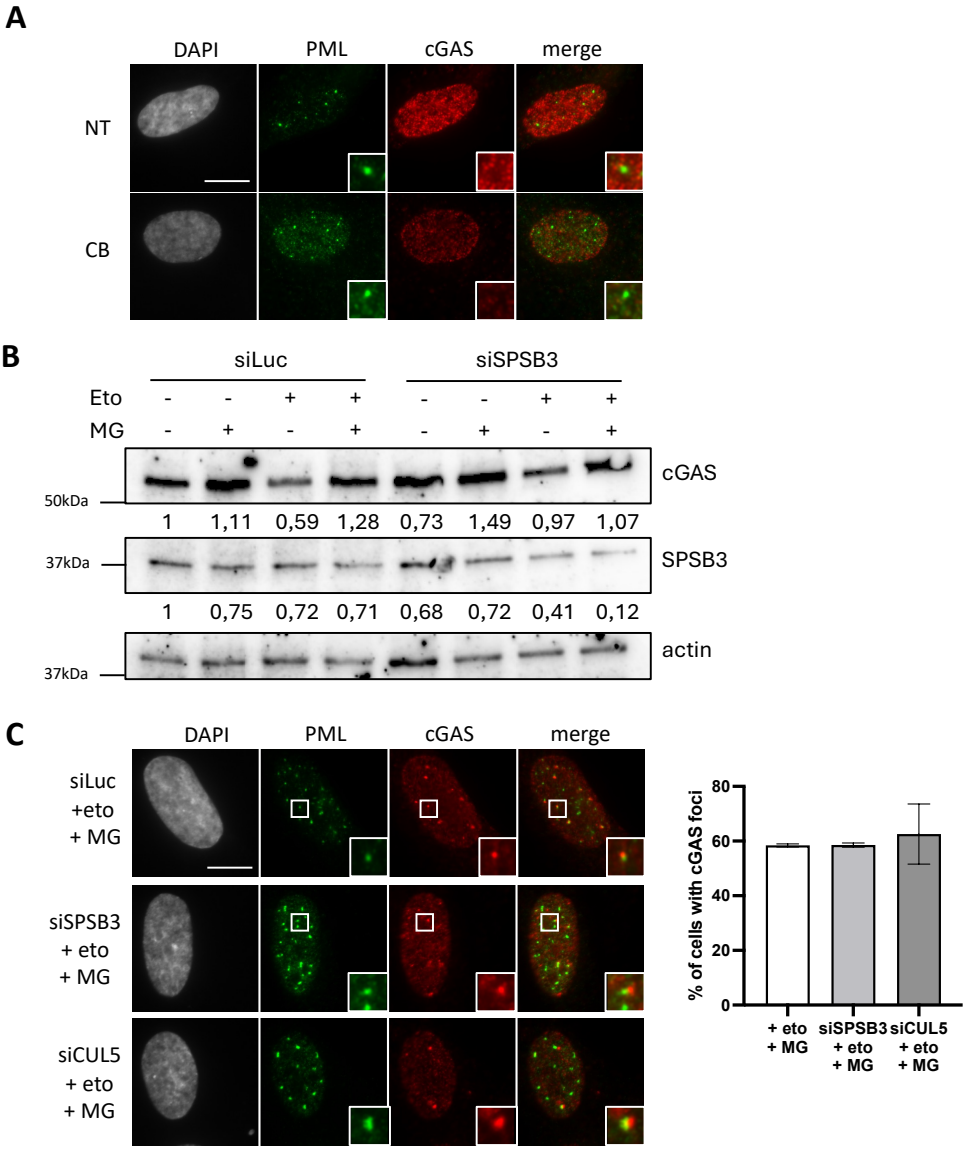
Sup. Figure 2


A
TSA - - + +
MG132 - + - +
50kDa
cGAS
1 1.48 0.19 0.58
20kDa
γH2A.X
37kDa
actin
B
DAPI
PML
cGAS
merge
NT
TSA
TSA +MG
C
DAPI
ACA
cGAS
merge
NT
Eto
Eto +MG
D
DAPI
PML
γH2AX
cGAS
merge
NT
Eto
Eto +MG

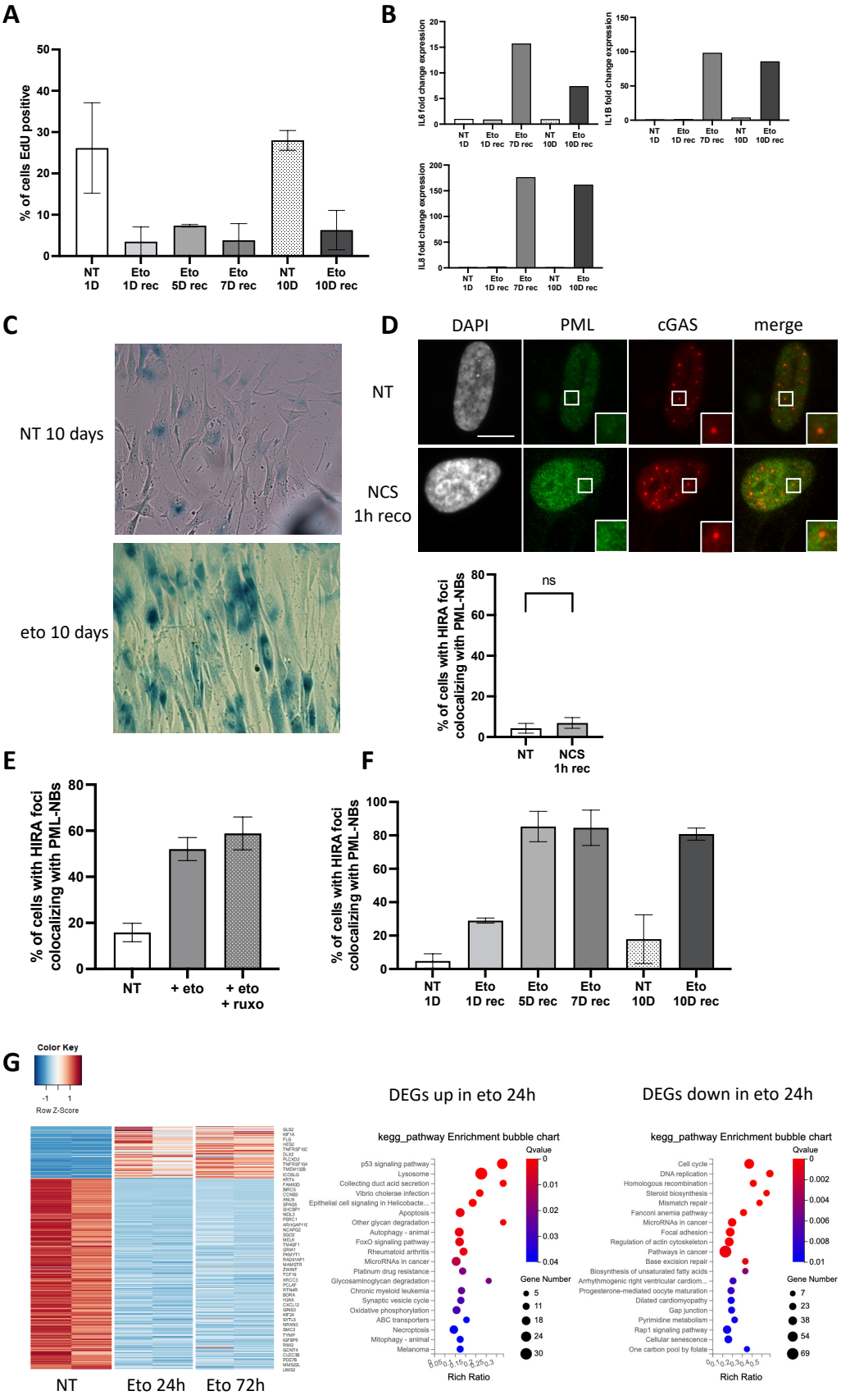
Sup. Figure 3


A
DAPI
FK2
PML
merge
NT
Eto
Eto
+MG
B
DAPI
FK2
cGAS
merge
NT
Eto
Eto
+MG

Sup. Figure 4


A
DAPI
PML
cGAS
merge
NT
CB
B
siLuc
siSPSB3
Eto
MG
50kDa
cGAS
1 1,11 0,59 1,28 0,73 1,49 0,97 1,07
37kDa
SPSB3
1 0,75 0,72 0,71 0,68 0,72 0,41 0,12
37kDa
actin
C
DAPI
PML
cGAS
merge
siLuc +eto + MG
siSPSB3 + eto + MG
siCUL5 + eto + MG
% of cells with cGAS foci
80
60
40
20
0
+ eto + MG
siSPSB3 + eto + MG
siCUL5 + eto + MG

Sup. Figure 5


A
% of cells EdU positive
NT 1D
Eto 1D rec
Eto 5D rec
Eto 7D rec
NT 10D
Eto 10D rec
B
IL6 fold change expression
IL1B fold change expression
IL8 fold change expression
C
NT 10 days
eto 10 days
D
DAPI
PML
cGAS
merge
NT
NCS 1h reco
% of cells with HIRA foci colocalizing with PML-NBs
ns
NT
NCS 1h rec
E
% of cells with HIRA foci colocalizing with PML-NBs
NT
+ eto
+ eto + ruxo
F
% of cells with HIRA foci colocalizing with PML-NBs
NT 1D
Eto 1D rec
Eto 5D rec
Eto 7D rec
NT 10D
Eto 10D rec
G
Color Key
Row Z-Score
NT
Eto 24h
Eto 72h
DEGs up in eto 24h
kegg_pathway Enrichment bubble chart
p53 signaling pathway
Lysosome
Collecting duct acid secretion
Vibrio cholerae infection
Epithelial cell signaling in Helicobacte...
Apoptosis
Other glycan degradation
Autophagy - animal
FoxO signaling pathway
Rheumatoid arthritis
MicroRNAs in cancer
Platinum drug resistance
Glycosaminoglycan degradation
Chronic myeloid leukemia
Synaptic vesicle cycle
Oxidative phosphorylation
ABC transporters
Necroptosis
Mitophagy - animal
Melanoma
Rich Ratio
Qvalue
Gene Number
DEGs down in eto 24h
kegg_pathway Enrichment bubble chart
Cell cycle
DNA replication
Homologous recombination
Steroid biosynthesis
Mismatch repair
Fanconi anemia pathway
MicroRNAs in cancer
Focal adhesion
Regulation of actin cytoskeleton
Pathways in cancer
Base excision repair
Biosynthesis of unsaturated fatty acids
Arrhythmogenic right ventricular cardiom...
Progesterone-mediated oocyte maturation
Dilated cardiomyopathy
Gap junction
Pyrimidine metabolism
Rap1 signaling pathway
Cellular senescence
One carbon pool by folate
Rich Ratio
Qvalue
Gene Number

Résultats supplémentaires

Outre les résultats présentés précédemment dans le manuscrit, mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence le rôle d'acteurs supplémentaires dans la dynamique de cGAS dans un contexte d'induction de cassures de la chromatine. Ces résultats supplémentaires sont présentés dans cette partie.

Si p97 semble jouer un rôle dans la dynamique nucléaire de cGAS, et notamment sur sa liaison à la chromatine, la protéine RNF111 semble également capable d'influencer la formation des foyers de cGAS dans un contexte de cassure de la chromatine. De plus, la formation des spots de cGAS ne semble pas être exclusivement la conséquence de l'inhibition du protéasome. Nous nous sommes intéressés à une modification post-traductionnelle proche de l'ubiquitinylation nommée NEDDylation, qui semble impliquée dans la dynamique nucléaire de cGAS.

Matériel et méthodes complémentaire

Une grande partie des matériels et méthodes est décrit dans le manuscrit de l'article scientifique. Cependant, les résultats supplémentaires présentés ci-dessous m'amènent à préciser de nouveaux éléments.

Lignées cellulaires supplémentaires

Les lignée BJ-Ras et IMR90-Ras ont été obtenues du laboratoire du Dr. Manuel Stucki (Zürich, Suisse). Ces cellules expriment la protéine de fusion ER:H-RasV12 de façon inductible par le tamoxifène (4-OHT, 100nM). Les cellules BJ exprimant un transgène GFP-cGAS ont été obtenues par transduction avec des lentivirus. Les cellules ont été sélectionnées 24h après transduction avec ajout de la drogue appropriée (puromycine (Invivogen, ant-pr) à 1 µg/mL ou blasticidine (Invivogen, ant-bl) à 5 µg/mL.

Plasmides supplémentaires

Les transgènes GFP-Flag-cGAS WT et mutant catalytique E225A-D227A, nommé GFP-Flag-cGAS CAT ont été obtenus par PCR en utilisant le plasmide pTRIP-CMV-GFP-Flag-cGAS WT ou CAT (Addgene #86675 et #86674) comme modèles et ont été clonés dans le plasmide pLVX-TetOne résistant à la puromycine, avec les enzymes de restriction BstZ17I et AgeI. Les mutations pour la résistance au sicGAS ont été réalisées avec le kit de mutagenèse dirigée (Agilent Technologies, #210518). Les plasmides utilisés pour les études supplémentaires sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 4 : liste des plasmides utilisés dans les résultats supplémentaires

Plasmide	**Fournisseur**	**Référence**	

pLentiN (plasmid)	Addgene	#37444	Plasmide lentiviral
pLVX-TetOne (plasmid)	Clontech	631849	Plasmide lentivirale inductible à la doxycyxline
pTRIP-CMV-GFP-FLAG-cGAS	Addgene	#86675	Plasmide lentiviral contenant GFP-FLAG-cGAS WT
pTRIP-CMV-GFP-FLAG-cGAS WT siRNA résistant	Cette étude		Mutagenèse dirigée contre le plasmide pTRIP-CMV-GFP-FLAG-cGAS. Mutations sur cGAS : (649) 5'- CAC GT**A** AA**A** ATT TCT GCA CCT-3' (669)
pLVX TetOne -puro-GFP-FLAG- cGAS WT	Cette étude		GFP-FLAG-cGAS WT cloné dans pLVX-TetOne
pTRIP-CMV-GFP-FLAG-cGAS E225A-D227A	addgene	#86674	Plasmide lentiviral avec GFP-FLAG-cGAS mutant catalytique (CAT).
pTRIP-CMV-GFP-FLAG-cGAS E225A D227A siRNA résistant (Clone 1)	Cette étude		Mutagenèse dirigée contre le plasmide pTRIP-CMV-GFP-FLAG-cGAS E225A-D227A. Mutations sur cGAS : (649) 5'- CAC GT**A** AA**A** ATT TCT GCA CCT-3' (669)

pLVX TetOne-puro-GFP-FLAG-cGAS catalytic mutant E225A D227A	Cette étude		GFP-FLAG-cGAS CAT cloné dans pLVX-TetOne

Séquences oligomériques supplémentaires

Le protocole de transfection avec un siRNA utilisé est décrit dans le matériel et méthode du manuscrit d'article. Les siRNAs et autres séquences oligomériques utilisés pour les études supplémentaires et leurs séquences sont résumés dans le tableau 5.

Tableau 5 : Liste des siRNAs utilisés dans les résultats supplémentaires

Type de séquence	**Nom**	**Référence**	**Séquence**
siRNA	siRNF111	(van Cuijk et al. 2015)	5' GGAUAUUAAUGCAGAGGAAdTdT
siRNA	sicGAS	(Glück et al. 2017)	5' CGUGAAGAUUUCUGCACCUdTdT
siRNA	siSTING	(J. Wu et al. 2013)	5' CCUCAUCAGUGGAAUGGAAdTdT
Amorce pour mutagenèse	cGAS-siRNA-resistant-F	Cette étude	5' CGGGAGCTACTATGAGCACGTAAAAATTTCTGCACCTAATG
Amorce pour mutagenèse	cGAS-siRNA-resistant-R	Cette étude	5' CATTAGGTGCAGAAATTTTTACGTGCTCATAGTAGCTCCCG

Anticorps supplémentaires

La liste des anticorps supplémentaires utilisés ainsi que les espèces chez lesquelles ils ont été produits, les références et les dilutions sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés dans les résultats supplémentaires

Anticorps	**Espèce**	**Référence**	**Dilution**
RNF111	clone 1C4 mouse monoclonal	ABNOVA : H00054778-M05	WB : 1/1000 IF : 1/500
Ras	Mouse monoclonal	BD Biosciences	WB : 1/1000
Tubuline alpha	Mouse monoclonal	SIGMA : clone DM1A - T6199	WB : 1/20 000
STING	Mouse monoclonal	R&D system : MAB7169	WB : 1/1000

Drogues supplémentaires

La liste des drogues supplémentaires utilisées ainsi que leurs références et concentrations finales et la durée d'exposition sont résumées dans le tableau 7.

Tableau 7 : liste des drogues utilisées dans les résultats supplémentaires

Drogue	Référence	Concentration finale	Temps d'exposition
MLN4924	MedChemExpress HY-70062	1μM	8h
4OHT (4-Hydroxytamoxifène)	Sigma-Aldrich H7904	100nM	3 / 4 / 5 jours
Doxycycline	Sigma-Aldrich D9891	20ng/mL	24h

Résultats

La formation des foyers de cGAS est dépendante de RNF111 lors de l'inhibition du protéasome

La formation des foyers de cGAS juxtaposant avec les PML NBs lors de l'inhibition du protéasome a orienté nos recherches vers les SUMO-targeted Ub E3 Ligase (STUbLs) pouvant localiser aux PML NBs. Ces enzymes sont impliquées dans la dégradation des protéines SUMOylées, ce qui en font des candidats sérieux dans la dynamique nucléaire de cGAS. Afin d'étudier le rôle de ces STUbLs dans la dynamique de cGAS, nous avons utilisé une approche par candidats. Nous nous sommes focalisés sur RNF111 et RNF4, deux STUbLs impliquées dans la dégradation des PML NBs (Lallemand-Breitenbach 2008; Tatham 2008; Erker 2013) et de façon plus générale, dans la dégradation protéasome-dépendante de protéines polySUMOylées (J. D. Wright, Mace, et Day 2016). De façon intéressante, RNF111 et RNF4 sont également des acteurs essentiels dans la réponse aux dommages de l'ADN. RNF4 agit principalement comme une STUbL en induisant la dégradation de protéines polySUMOylées aux sites de dommages, telles que MDC1, facilitant ainsi leur turnover et le loading de Rad51 (Galanty et al. 2012; Vyas et al. 2013). RNF111 agit à la fois comme une STUbL aux sites de dommages où elle régule l'Ubiquitination K63 de protéines impliquées dans la réparation (Poulsen et al. 2013), mais elle agit également comme une NEDD8 E3 ligase aux sites de dommages participant à la régulation du choix de la voie de réparation (T. Ma et al. 2013; Jimeno et al. 2015). Nous avons donc tout d'abord étudié l'effet de la déplétion de ces protéines sur la dynamique nucléaire de cGAS (figure 37A). L'utilisation d'ARN interférent (siRNA) nous a permis de déplèter RNF111 et RNF4. La déplétion de RNF4 n'a pas encore été confirmée en western-blot mais nous avons utilisé une séquence publiée dans plusieurs études (Y. Yin et al. 2012; I et al. 2015; Galanty et al. 2012). Nous avons observé que la déplétion de RNF4 ne semble pas avoir d'impact sur la formation des foyers de cGAS et leur juxtaposition aux PML NBs (figure 37A), même si cela doit encore être validé par quantification. A l'inverse, la déplétion de RNF111 a pour effet d'inhiber la formation des foyers de cGAS (figure 37A), passant d'environ 60% de cellules avec des foyers nucléaires à seulement 10%. Cet effet est similaire à celui observé avec l'inhibition de p97. En western-blot, la déplétion de RNF111 montre que la quantité totale de cGAS ne diminue plus avec l'ajout d'étoposide (figure 37B). Au niveau de la quantité de cGAS nucléaire lors d'ajout d'étoposide et de MG132, nous avons constaté une légère augmentation avec la déplétion de RNF111 (figure 37B), suggérant son implication dans la dégradation de cGAS nucléaire. Nous avons donc concentré nos recherches sur RNF111 et observé sa localisation par immunofluorescence (figure 37C). Nous avons pu constater que RNF111 est diffus dans le noyau des cellules BJ en condition contrôle, alors que l'ajout d'étoposide et de MG132 induit son accumulation dans les PML NBs (figure 37C). De plus, dans ces mêmes conditions, les foyers de

RNF111 juxtaposent avec les foyers de cGAS (figure 37C). Ces résultats suggèrent que RNF111 est impliqué dans les étapes précoces de la dynamique de cGAS puisque son absence empêche la formation des foyers lorsque le protéasome est inhibé (figure 37A), et / ou un rôle plus tardif étant donné son association avec les PML NBs et la juxtaposition avec les foyers de cGAS, ainsi que la régulation de la quantité nucléaire de cGAS (figure 37B).

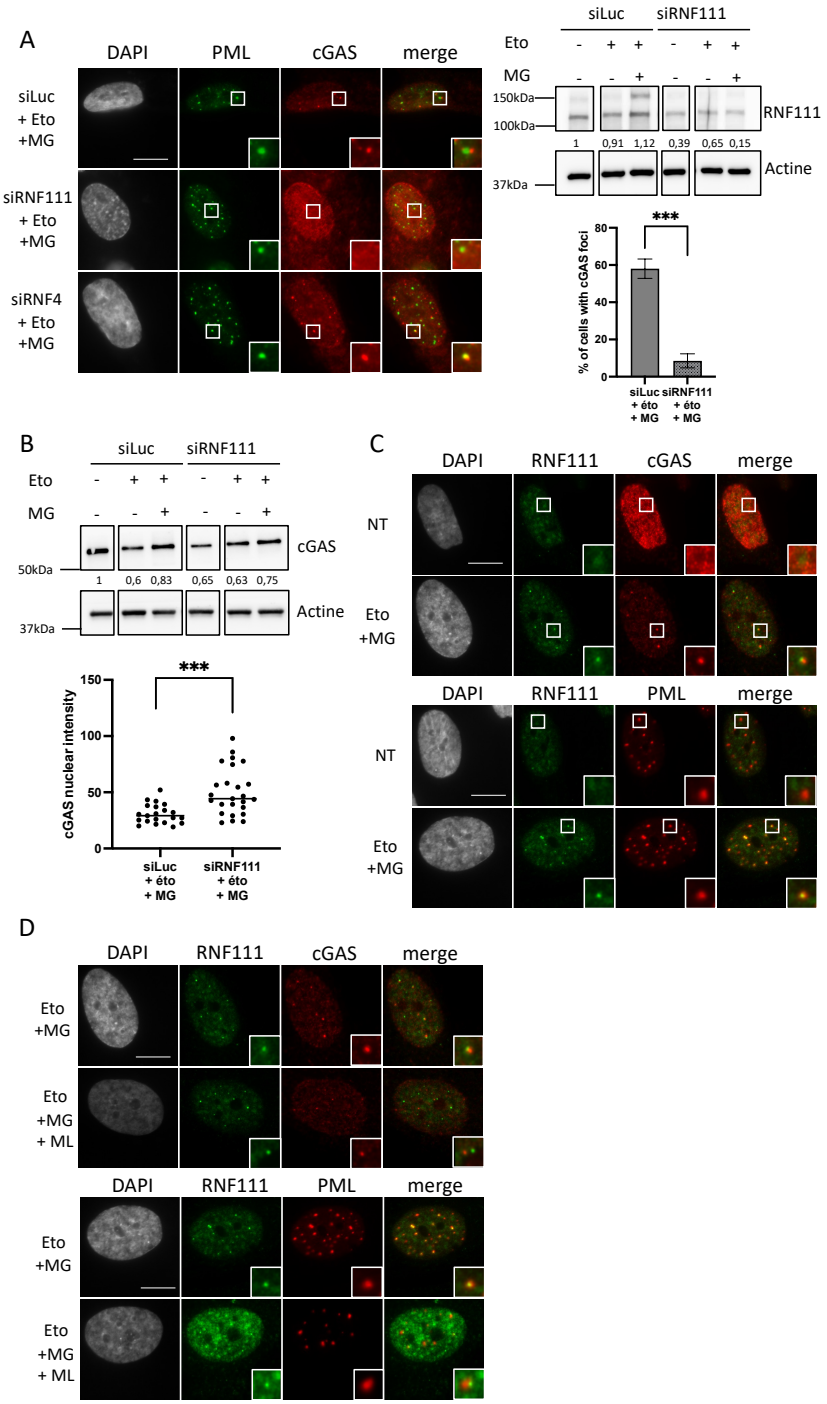


Figure 37 : La formation des foyers de cGAS est dépendante de RNF111. *(A) (Gauche) Visualisation de PML (vert) et cGAS (rouge) par microscopie à fluorescence. Le noyau des cellules est visualisé par un marquage DAPI (gris). La barre d'échelle représente 10µm. Les cellules ont été traitées avec 40nM de siRNA contre la luciférase (siLuc), RNF4 ou RNF111 pendant 48h ainsi que 10µM d'étoposide (Eto) pendant 24h et 2,5µM de MG132 (MG) pendant 8h. (Droite haut). Visualisation par western-blot de RNF111 et de l'actine à partir d'extraits cellulaires totaux de BJ. L'actine sert de contrôle de dépôt. La quantification du niveau de RNF111 est relatif à celui de l'actine.*

*(Droite bas) Analyse quantitative du pourcentage de cellules présentant des foyers de cGAS. Moyenne de 3 expériences indépendantes ±SD. P-value (Student t-test) : ***<0,001. (B) (Haut) Visualisation par western-blot de cGAS et de l'actine à partir d'extraits cellulaires totaux de BJ. L'actine sert de contrôle de dépôt. La quantification du niveau de cGAS est relatif à celui de l'actine. (Bas) Quantification du signal nucléaire de cGAS en immunofluorescence. Chaque point correspond à un noyau. La barre représente la moyenne. Les noyaux analysés sont issus d'une même expérience. P-value (Student t-test) : ***<0,001. Les cellules ont été traitées comme en (A). (C) (Haut) Visualisation de RNF111 (vert) et cGAS (rouge) par microscopie à fluorescence. Le noyau des cellules est visualisé par un marquage DAPI (gris). La barre d'échelle représente 10μm. Les cellules ont été traitées avec 10μM d'étoposide (Eto) pendant 24h et 2,5μM de MG132 (MG) pendant 8h. (Bas) Visualisation de RNF111 (vert) et PML (rouge) par microscopie à fluorescence. Le noyau des cellules est visualisé par un marquage DAPI (gris). La barre d'échelle représente 10μm. Les cellules ont été traitées de la même manière. (D) (Haut) Visualisation de RNF111 (vert) et cGAS (rouge) par microscopie à fluorescence. Le noyau des cellules est visualisé par un marquage DAPI (gris). La barre d'échelle représente 10μm. Les cellules ont été traitées avec 10μM d'étoposide (Eto) pendant 24h, 1μM de ML-792 et 2,5μM de MG132 (MG) pendant 8h. (Bas) Visualisation de RNF111 (vert) et PML (rouge) par microscopie à fluorescence. Le noyau des cellules est visualisé par un marquage DAPI (gris). La barre d'échelle représente 10μm. Les cellules ont été traitées de la même manière.*

Etant donné la présence de RNF111 dans les PML NBs et sa juxtaposition avec les foyers cGAS lors de l'inhibition du protéasome et dommages à l'ADN, nous avons investigué son comportement lors de l'inhibition de la SUMOylation (figure 37D). En ajoutant du ML-792, un inhibiteur des SUMO Activating Enzymes (SAE), en plus du traitement à l'étoposide et au MG132, nous avons constaté que RNF111 n'est plus localisé dans les PML NBs même s'il semble y être juxtaposé (figure 37D). De plus, sa juxtaposition avec cGAS est abolie, mais les foyers de cGAS restent présents. Ceci suggère que la formation des foyers de cGAS dépendante de RNF111 est indépendante de la SUMOylation (comme montré dans l'article) et de l'accumulation de RNF111 dans les PML NBs.

L'inhibition de la NEDDylation induit la formation des foyers de cGAS sans inhibition du protéasome

Lors de l'introduction j'ai mentionné le fait que cGAS est la cible d'un grand nombre de modifications post traductionnelles, permettant de réguler son affinité pour l'ADN ou la chromatine. Lors de cette étude nous avons déjà vu que la SUMOylation est requise pour la juxtaposition de cGAS avec les PML NBs. Nous nous sommes également intéressés à une autre modification, la NEDDylation. La protéine NEDD8 présente une forte similarité avec l'ubiquitine et régule de nombreux mécanismes dans le domaine de l'immunité et de la tumorigenèse (S. Zhang et al. 2024). La NEDDylation joue un rôle central dans la dégradation de cGAS lié au nucléosome dans des conditions physiologiques car elle permet l'activation de la cullin5 pour promouvoir l'ubiquitination de cGAS (P. Xu et al. 2024). Dans l'article présenté précédemment, nous avons vu que l'inactivation du complexe SPSB3-CUL5, dont le fonctionnement repose sur la NEDDylation, n'a pas d'impact sur la dynamique nucléaire de cGAS dans un contexte de dommages à l'ADN et d'inhibition du protéasome. Dans ces conditions nous avons inhibé la NEDDylation avec le MLN4924 afin de voir si la dégradation de cGAS dans ce contexte implique également un rôle de cette modification. Nous avons constaté que l'ajout de MLN4924 entraine la formation de foyers de cGAS, sans utilisation de MG132 (figure 38A).

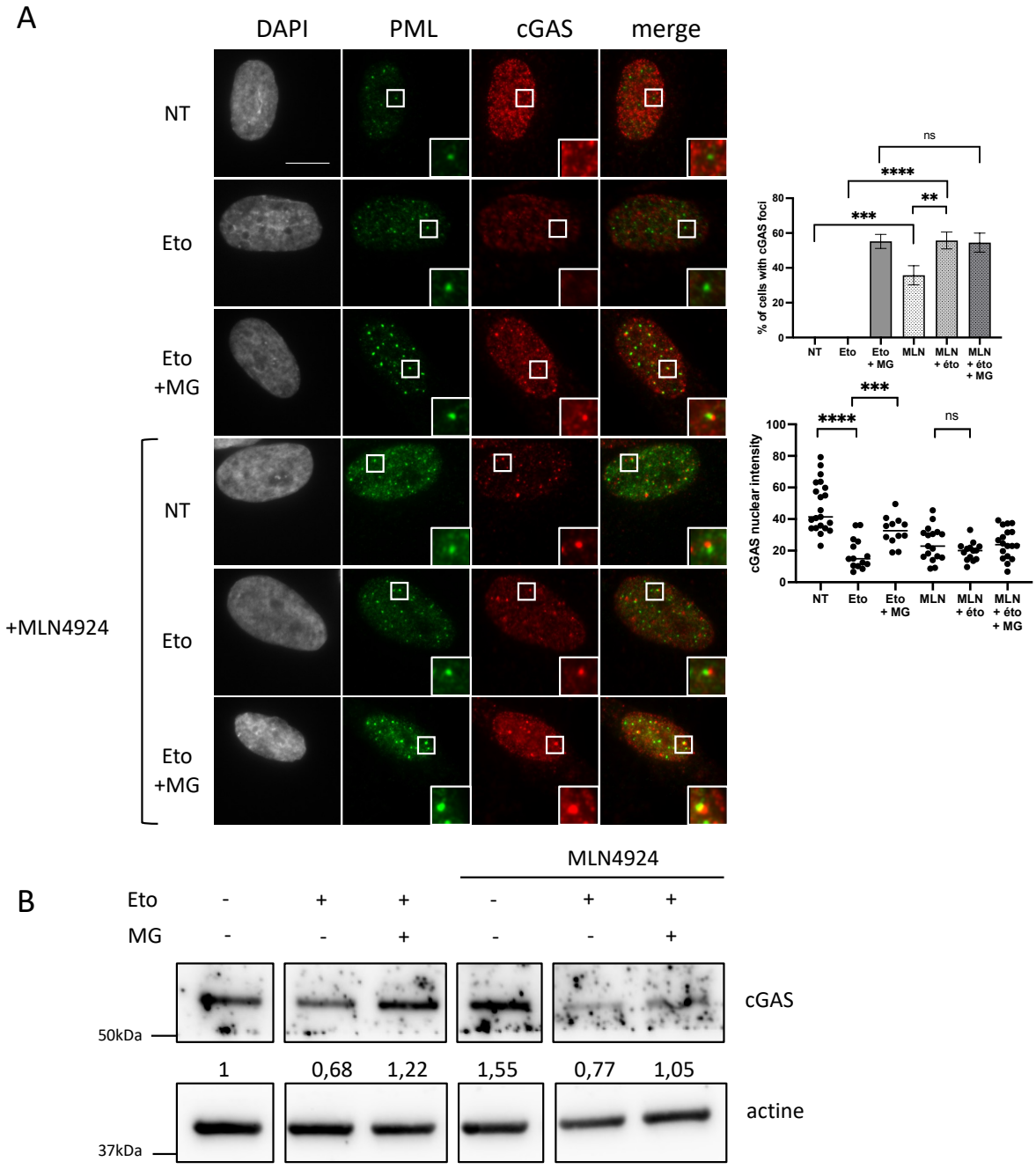


Figure 38 : L'inhibition de la NEDDylation induit la formation de foyers de cGAS. *(A) (Gauche) Visualisation de PML (vert) et cGAS (rouge) par microscopie à fluorescence. Le noyau des cellules est visualisé par un marquage DAPI (gris). La barre d'échelle représente 10µm. Les cellules ont été traitées avec 10µM d'étoposide (Eto) pendant 24h, 1µM de MLN4924 (MLN) et 2,5µM de MG132 (MG) pendant 8h. (Droite haut) Analyse quantitative du pourcentage de cellules présentant des foyers de cGAS. Moyenne de 3 expériences indépendantes ±SD. P-value (Student t-test) : ****<0,0001 ; ***<0,001 ; ns=non significatif. (Droite bas) Quantification du signal nucléaire de cGAS en immunofluorescence. Chaque point correspond à un noyau. La barre représente la moyenne. Les noyaux analysés sont issus d'une même expérience. P-value (Student t-test) : ****<0,0001 ; **<0,01 ; ns=non significatif. (B) Visualisation par western-blot de cGAS et de l'actine à partir d'extraits cellulaires totaux de BJ. Les cellules ont été traitées comme en (A). L'actine sert de contrôle de dépôt. La quantification du niveau de cGAS est relative à celui de l'actine.*

Cela suggère qu'au niveau de la dynamique de cGAS, l'inhibition de la NEDDylation a le même effet que l'inhibition du protéasome. L'inhibition de la NEDDylation seule entraine la formation de ces

foyers dans environ 35% des cellules et l'ajout d'étoposide en plus permet d'atteindre presque 60%. Cela suggère qu'il existe un lien entre la formation des foyers de cGAS, la NEDDylation et les cassures de la chromatine. Étonnamment, l'ajout de MG132 n'augmente pas la proportion de cellules avec des foyers de cGAS comparé à la condition précédente (figure 38A). L'inhibition de la NEDDylation pourrait également avoir un impact sur la quantité de cGAS dans les cellules. Cependant, la quantification du signal nucléaire de cGAS et la quantification de cGAS total en western-blot donne des résultats opposés. On observe qu'en présence de MLN4924, l'ajout d'étoposide ne semble pas affecter l'intensité de cGAS nucléaire en immunofluorescence, alors que le western-blot montre une diminution importante (figure 38B). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la NEDDylation pourrait provoquer l'apparition de foyers de cGAS, pouvant correspondre à des agrégats non dégradés de la protéine, ce que je discuterai dans le chapitre suivant. Cet effet est le contraire de celui de l'inhibition de RNF111 ou de p97, comme vu précédemment. De plus, cela suggère que la NEDDylation est impliquée dans un autre mécanisme de régulation de cGAS que celui identifié récemment par l'équipe du Dr Ablasser (P. Xu et al. 2024), car la déplétion de SPSB3 ou de CUL5 n'impacte pas la formation de ces foyers.

L'action de p97 et RNF111 est antérieure à celle de la NEDDylation

Les résultats précédents suggèrent que la formation des foyers de cGAS est contrôlée par RNF111, p97 et la NEDDylation. Afin de comprendre la dynamique impliquée dans la formation des foyers de cGAS nous avons combiné les différentes inhibitions vues précédemment. Nos observations sont résumées dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 8 : effet des inhibiteurs et déplétions sur la formation des foyers de cGAS nucléaires.

Inhibiteur / déplétion	Foyers de cGAS sans inhibition du protéasome avec ou sans étoposide	Foyers de cGAS avec inhibition du protéasome (MG132)
contrôle	non	Oui (55% des cellules)
CB5083 (inhibiteur de p97)	non	Diminution (10% des cellules)
siRNF111	non	Diminution (10% des cellules)
MLN4924 (inhibiteur de NEDDylation)	Oui (35% des cellules)	Oui (55% des cellules)
CB5084 + MLN4924 (figure 39A)	Diminution (5% des cellules)	Diminution (15% des cellules)
siRNF111 + MLN4924 (figure 39C)	Diminution (15% des cellules)	Diminution (20% des cellules)

Notre première observation en western-blot avec la double inhibition de p97 et de la NEDDylation montre une importante augmentation de la quantité totale de cGAS dans les cellules lors de l'ajout d'étoposide (figure 39B). Nous avions déjà montré que l'inhibition de p97 empêche la diminution de cGAS lors de l'ajout d'étoposide, et il semblerait que l'inhibition de la NEDDylation dans le même contexte permette une stabilité encore plus importante de la protéine. Cette observation n'a été faite qu'une seule fois et est donc à confirmer.

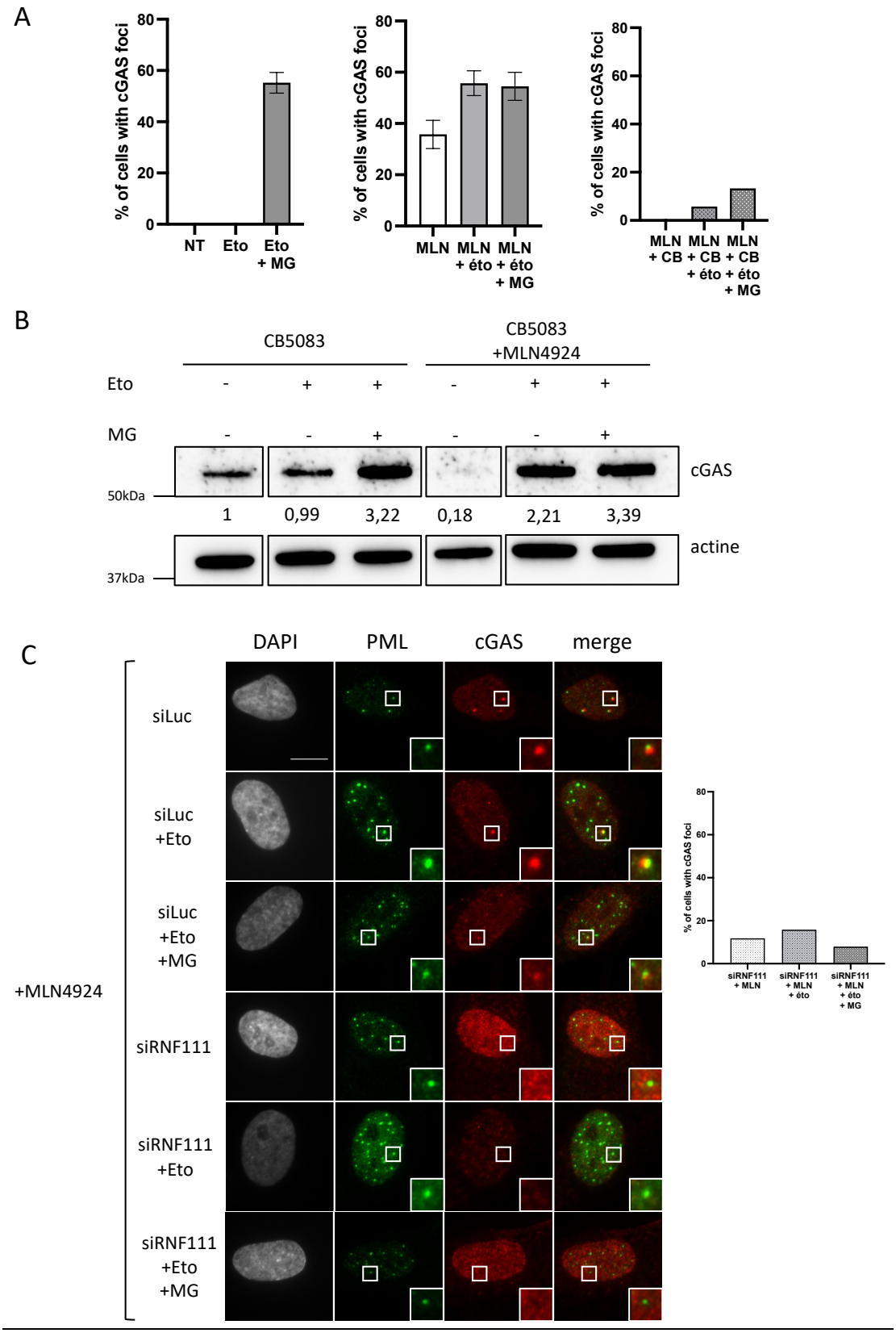


Figure 39 : Le rôle de p97 et RNF111 est antérieur à celui de la NEDDylation dans la formation des foyers de cGAS. *(A) Analyse quantitative du pourcentage de cellules présentant des foyers de cGAS. Moyenne de 3 expériences indépendantes pour les panels de gauche et du milieu. Les cellules ont été traitées avec 10µM d'étoposide (Eto) pendant 24h, 1µM de MLN4924 (MLN), 1µM de CB5083 (CB) et 2,5µM de MG132 (MG) pendant 8h. (B) Visualisation par western-blot de cGAS et de l'actine à partir d'extraits cellulaires totaux de BJ. Les cellules ont été traitées comme en (A). L'actine sert de contrôle de dépôt. La quantification du niveau de*

cGAS est relative à celui de l'actine. (C) (Gauche) Visualisation de PML (vert) et cGAS (rouge) par microscopie à fluorescence. Le noyau des cellules est visualisé par un marquage DAPI (gris). La barre d'échelle représente 10μm. Les cellules ont été traitées avec 40nM de siRNA contre la luciférase (siLuc) ou RNF111 pendant 48h ainsi que 10μM d'étoposide (Eto) pendant 24h, 1μM de MLN4924 (MLN) et 2,5μM de MG132 (MG) pendant 8h. (Droite) Analyse quantitative du pourcentage de cellules présentant des foyers de cGAS.

L'apparition du marqueur précoce de sénescence est dépendante de cGAS mais pas de l'axe cGAS-STING.

Nos travaux portant sur la dynamique nucléaire de cGAS, nous n'avons pas fait d'investigations sur la dynamique de la protéine STING, le partenaire de cGAS lors d'une réponse inflammatoire. Cependant, nous avons quand même examiné le rôle de cGAS et de STING sur le déclenchement des phrases précoces de la sénescence dans nos conditions de traitement à l'étoposide pendant 24 heures. Pour cela, nous avons déplété cGAS et STING avec une technique d'ARN interférents en présence d'étoposide (figure 40A). La déplétion de STING n'a pas eu d'impact sur l'apparition du marqueur précoce de sénescence (accumulation de HIRA aux PML NBs, cf article) lors d'ajout d'étoposide. A l'inverse, la déplétion de cGAS a fortement diminué l'apparition de ce marqueur (figure 40A), ce qui suggère que cGAS est bien un élément essentiel pour le déclenchement du processus de sénescence. Afin de renforcer l'hypothèse que cGAS est bien essentiel pour ce déclenchement, nous avons utilisé une lignée de BJ exprimant de façon inductible un GFP-cGAS WT (figure 40B) résistant au siRNA contre le cGAS endogène. L'expression de GFP-cGAS sauvage exogène lors de la déplétion de cGAS endogène en présence d'étoposide permet de restaurer l'apparition du marqueur précoce de sénescence (figure 40B). De plus, nous avons réalisé la même expérience avec un cGAS exogène muté sur son site catalytique (E225A ; D227A) (figure 40C), et nous avons également observé la restauration de l'accumulation du complexe chaperon HIRA dans les PML NBs (figure 40C). Ces résultats suggèrent que cGAS est bien un acteur essentiel pour déclencher les étapes précoces de la sénescence et que cela est indépendant de son activité catalytique et de son partenaire STING. Ces observations sont cependant intrigantes car nous avons également vu que la diminution de cGAS est essentielle pour la mise en place de la sénescence (cf Article), ce que je discuterai dans le chapitre suivant.

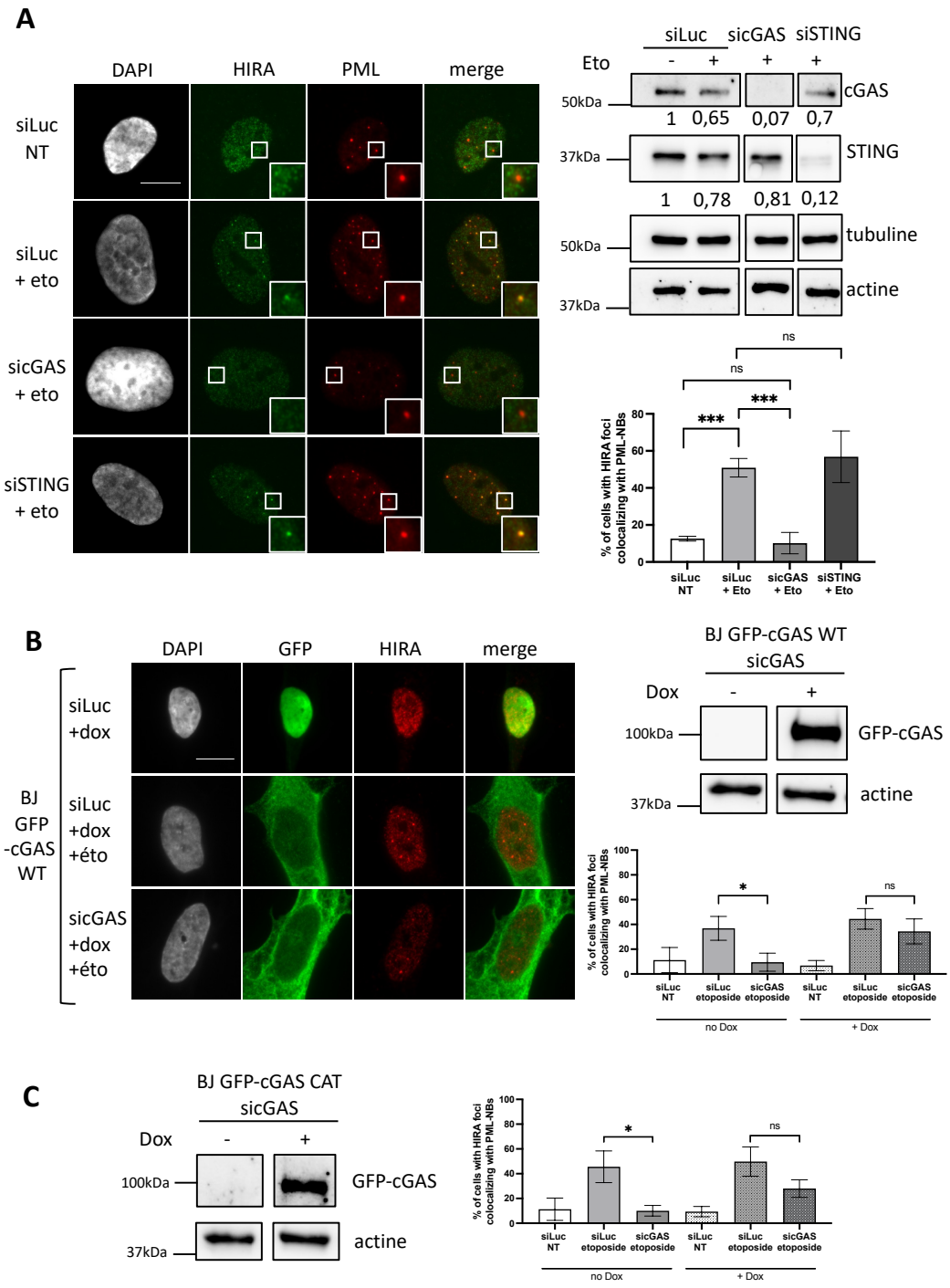


Figure 40 : l'induction de la sénescence est dépendante de cGAS et indépendante de la voie cGAS-STING. *(A) (Gauche) Visualisation de HIRA (vert) et PML (rouge) par microscopie à fluorescence. Le noyau des cellules est visualisé par un marquage DAPI (gris). La barre d'échelle représente 10µm. Les cellules ont été traitées avec 40nM de siRNA contre la luciférase (siLuc), cGAS ou STING pendant 48h ainsi que 10µM d'étoposide (Eto) pendant 24h. (Droite haut) Visualisation par western-blot de cGAS, STING, tubuline et de l'actine à partir d'extraits cellulaires totaux de BJ. L'actine sert de contrôle de dépôt. La quantification du niveau de cGAS est relatif à celui de l'actine et celle de STING relatif à la tubuline. Les cellules ont été traitées de la même manière. (Droite bas) Analyse quantitative du pourcentage de cellules présentant des foyers de HIRA co-localisant avec les PML NBs. Moyenne de 3 expériences indépendantes ±SD. P-value (Student t-test) : ***<0,001 ; ns=non significatif. (B) (Gauche) Visualisation de GFP-cGAS WT (vert) et HIRA (rouge) par microscopie à fluorescence. Le noyau des cellules est visualisé par un marquage DAPI (gris). La barre d'échelle représente 10µm. Les cellules ont été traitées avec 40nM de siRNA contre la luciférase (siLuc) ou cGAS pendant 48h ainsi que 10µM d'étoposide (Eto) pendant 24h et 20ng/mL de doxycyxline (dox) pendant 24h. (Droite haut)) Visualisation par western-blot de GFP-cGAS et de l'actine à partir*

*d'extraits cellulaires totaux de BJ GFP-cGAS WT. L'actine sert de contrôle de dépôt. (Droite bas) Analyse quantitative du pourcentage de cellules présentant des foyers de HIRA co-localisant avec les PML NBs. Moyenne de 3 expériences indépendantes ±SD. P-value (Student t-test) : *<0,05 ; ns=non significatif. Les cellules ont été traitées de la même manière. (C) (Gauche) Visualisation par western-blot de GFP-cGAS et de l'actine à partir d'extraits cellulaires totaux de BJ GFP-cGAS CAT traitées avec 40nM de siRNA contre la luciférase (siLuc) ou cGAS pendant 48h ainsi que 10µM d'étoposide (Eto) pendant 24h et 20ng/mL de doxycyxline (dox) pendant 24h . L'actine sert de contrôle de dépôt. (Droite) Analyse quantitative du pourcentage de cellules présentant des foyers de HIRA co-localisant avec les PML NBs. Moyenne de 3 expériences indépendantes ±SD. P-value (Student t-test) : *<0,05 ; ns=non significatif. Les cellules ont été traitées de la même manière.*

Le lien entre la dynamique nucléaire de cGAS et la mise en place de la sénescence semble être le même lors d'un stress oncogénique

Mes travaux de thèse ont permis de faire le lien entre la dynamique nucléaire de cGAS et les étapes précoces d'induction de la sénescence dans un contexte de dommages à l'ADN. Nous avons également commencé à étudier ce mécanisme dans un contexte de stress oncogénique, ce qui fait l'objet d'une collaboration avec le Dr Michallet et son étudiant en thèse au CRCL. Tout comme les dommages à l'ADN, le stress oncogénique provoque l'induction de sénescence dans les cellules primaires afin d'empêcher toute transformation tumorale. Nous avons donc travaillé avec une lignée de cellules BJ exprimant l'oncogène RasV12 couplé à un récepteur aux œstrogènes. L'ajout de 4-Hydroxytamoxifène (4OHT) sur les cellules induit l'expression de l'oncogène (figure 41A). Nous avons observé que l'expression de RasV12 entraine l'hyperprolifération des cellules pendant 3-4 jours, timing à partir duquel elles entrent massivement en sénescence. La mise en place de cette sénescence est facilement observable dans ce contexte, car contrairement au traitement avec l'étoposide, la surexpression d'un oncogène permet l'expression de p16 dans les cellules BJ, ce qui permet la formation de SAHFs, des foyers denses en hétérochromatine visibles grâce au marquage au DAPI (figure 41A). En parallèle de la formation des SAHFs, nous avons observé que la proportion de cellules montrant une accumulation de HIRA aux PML NBs augmente fortement à partir du jour 4 de traitement (figure 41A). L'hyperprolifération des cellules lors des premiers jours de traitement au tamoxifène induit la formation de cellules avec des noyaux de petite taille ayant une forte intensité de cGAS. A partir du troisième jour, lors de la transition en sénescence nous avons observé des intensités nucléaires de cGAS très variables avec des valeurs très élevées correspondant aux cellules toujours en hyperprolifération, et d'autres valeurs plus basses, qui deviennent prépondérantes au cinquième jour. Ces résultats suggèrent que la dynamique nucléaire de cGAS et de HIRA est similaire lors de l'induction de sénescence par un stress oncogénique ou lors de dommages à l'ADN. Ces observations ont été confirmées sur une autre lignée cellulaire, des IMR90, exprimant le même oncogène (figure 41B). Lorsque ces fibroblastes de poumon expriment RasV12, nous observons le même comportement de cGAS nucléaire et de HIRA pour la mise en place de la sénescence (figure 41B).

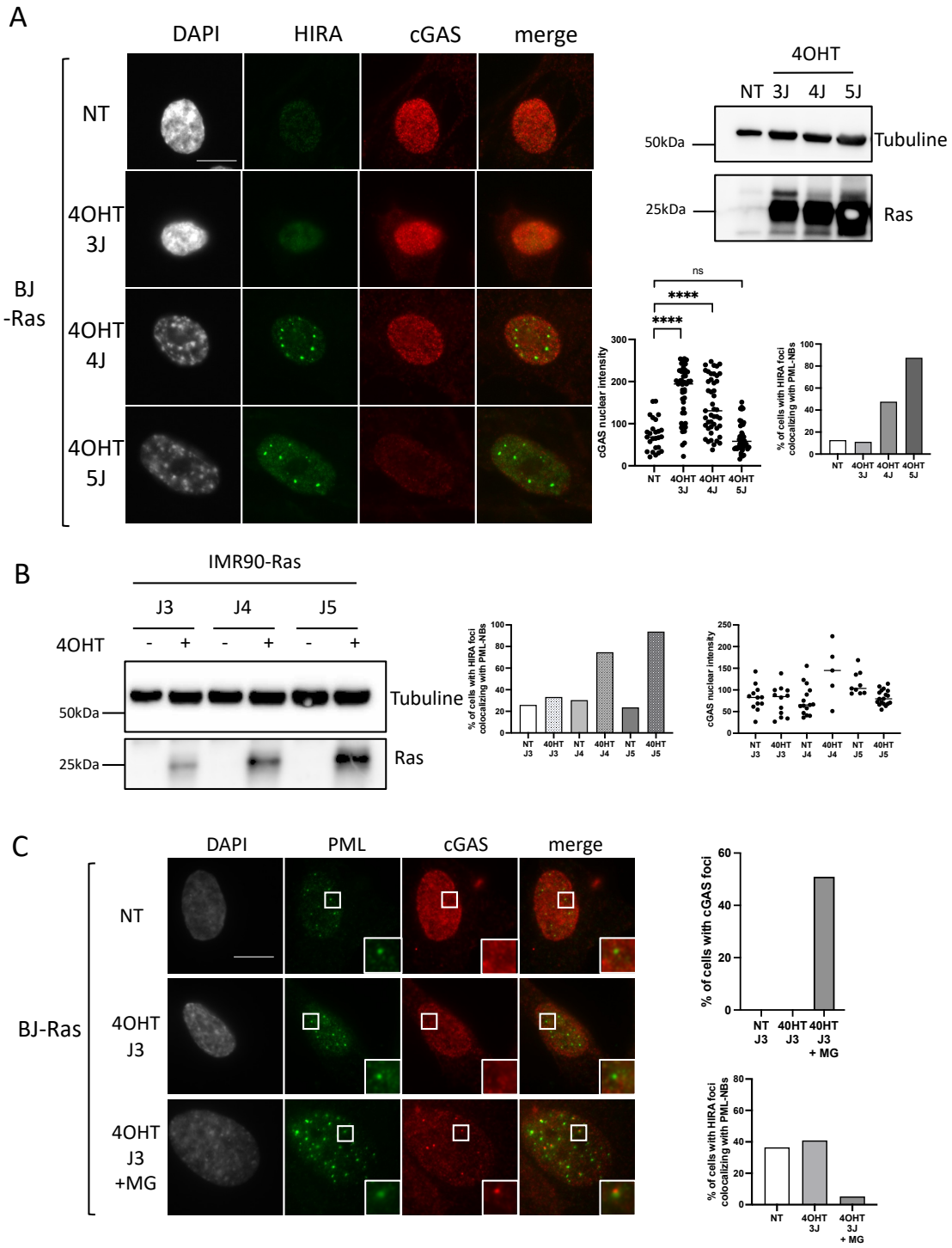


Figure 41: Le lien entre la dynamique nucléaire de cGAS et la mise en place de la sénescence est similaire lors d'un stress oncogénique. *(A) (Gauche) Visualisation de HIRA (vert) et cGAS (rouge) par microscopie à fluorescence. Le noyau des cellules est visualisé par un marquage DAPI (gris). La barre d'échelle représente 10μm. Les cellules ont été traitées avec 100ng/mL de 4-Hydroxytamoxifène pendant les temps indiqués sur la figure. (Droite haut) Visualisation par western-blot de Ras et de la tubuline à partir d'extraits cellulaires totaux de BJ-Ras. La tubuline sert de contrôle de dépôt. La quantification du niveau de Ras est relative à celle de la tubuline. (Droite bas) Quantification du signal nucléaire de cGAS en immunofluorescence. Chaque point correspond à un noyau. La barre représente la moyenne. Les noyaux analysés sont issus d'une même expérience. P-value (Student t-test) : ****<0,0001 ; ns=non significatif. Analyse quantitative du pourcentage de cellules présentant des foyers de HIRA co-localisant avec les PML NBs. (B) (Gauche) Visualisation par western-blot de Ras et de la tubuline à partir d'extraits cellulaires totaux de IMR90-Ras. La tubuline sert de contrôle de dépôt. La quantification du niveau de Ras est relative à celle de la tubuline. Les cellules ont été traitées avec 100ng/mL de 4-Hydroxytamoxifène pendant les temps indiqués sur la figure. (Milieu) Analyse quantitative du pourcentage de cellules présentant des foyers de HIRA co-localisant avec les PML NBs. (Droite) Quantification du signal nucléaire de cGAS en immunofluorescence. Chaque*

point correspond à un noyau. La barre représente la moyenne. Les noyaux analysés sont issus d'une même expérience. (C) (Gauche) Visualisation de PML (vert) et cGAS (rouge) par microscopie à fluorescence. Le noyau des cellules est visualisé par un marquage DAPI (gris). La barre d'échelle représente 10μm. Les cellules ont été traitées avec 100ng/mL de 4-Hydroxytamoxifène pendant 3 jours ainsi que 2,5μM de MG132 (MG) pendant 8h. (Droite haut) Analyse quantitative du pourcentage de cellules présentant des foyers de cGAS. (Droite bas)) Analyse quantitative du pourcentage de cellules présentant des foyers de HIRA co-localisant avec les PML NBs.

Pour aller plus loin dans l'étude des similarités entre dommages à l'ADN et stress oncogénique au niveau de la dynamique nucléaire de cGAS nous avons traité ces cellules avec du MG132. L'inhibition du protéasome induit la formation de foyers de cGAS juxtaposant avec les PML NBs dans un contexte de surexpression oncogénique (figure 41C). En parallèle de la formation de ces foyers de cGAS, la proportion de cellules montrant une accumulation de HIRA aux PML NBs diminue (figure 41C). Cette observation suggère que l'inhibition du protéasome lors d'un stress oncogénique empêche, ou du moins retarde, l'induction de la sénescence.

Discussion et Perspectives

Mes travaux de thèse ont permis d'apporter plusieurs éléments pour la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la dynamique nucléaire de cGAS lors de l'induction de la sénescence.

La dynamique nucléaire de cGAS suite à l'induction de dommages à l'ADN

Le décrochage de la chromatine de cGAS et sa dégradation partielle sont requis pour la mise en place de la réponse aux dommages à l'ADN.

Depuis quelques années il ne fait plus aucun doute que cGAS est majoritairement une protéine nucléaire (Orzalli et al. 2015; Gentili et al. 2019; Volkman et al. 2019; Jiang et al. 2019b), liée à la chromatine via le patch acidique des histones (Volkman et al. 2019; Boyer et al. 2020; Cao et al. 2020; Kujirai et al. 2020; Pathare et al. 2020; Michalski et al. 2020; B. Zhao et al. 2020). Nos premières observations de cGAS dans un contexte de cassures de la chromatine nous ont permis d'observer une diminution de la quantité de cGAS accroché à la chromatine. Nous avons constaté que cette diminution n'est pas le résultat d'un export dans le cytoplasme, ni d'une augmentation de cGAS dans la fraction nucléaire soluble, mais bien d'une dégradation de la protéine entraînant une baisse de la quantité totale de cGAS. Lors de la mise en place de la DDR suite à la génération de cassures, la structure de la chromatine est fortement impactée avec une importante décondensation de la zone lésée (Minami, Iida, et Maeshima 2022). Une des premières études concernant la dynamique de cGAS dans un domaine de cassures de l'ADN a décrit un recrutement de cGAS exogène dans le noyau suite à des cassures double-brins de l'ADN (H. Liu et al. 2018). Ce recrutement de cGAS, permet, entre autres, de bloquer la mise en place de la HR en empêchant la formation du complexe PARP1-Timeless (H. Liu et al. 2018). Ces résultats semblent, à première vue, contradictoires avec les nôtres qui démontrent la présence de cGAS accroché à la chromatine avant dommages, et son décrochage consécutif aux dommages. Cette étude se focalise principalement sur une temporalité très courte après les dommages (observation du recrutement de cGAS aux sites de dommages environ 30 secondes après une micro-irradiation laser), ce qui pourrait peut-être expliquer la différence avec nos travaux. De plus, nos données préliminaires suggèrent également que cGAS pourrait être recruté sur les sites de cassures à des temps courts après dommages (figure 5A de l'article). Cependant, nous n'observons ceci qu'en présence d'un inhibiteur de protéasome suggérant que ce recrutement de cGAS aux dommages est très transitoire. De plus, une étude réalisée en 2019 a montré que l'oligomérisation de cGAS bloque l'invasion des brins homologues par les filaments simple brin recouverts par Rad51. On peut donc également supposer que la liaison de cGAS avec les nucléosomes empêche la résection des brins autour du site de cassure, étape nécessaire à la mise en place de la HR. Nos résultats suggèrent que l'éviction de cGAS de la chromatine est une étape précoce importante dans la mise en place de la DDR au site de cassure. Un des marqueurs principaux de la mise en place de la DDR est la phosphorylation de l'histone H2A.X (Rogakou et al. 1998). Nos travaux montrent que

la stabilisation de cGAS dans un contexte de dommages à l'ADN par un traitement MG132 corrèle avec un niveau plus faible de γH2A.X dans les cellules. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de p97, qui empêche le décrochage de cGAS, corrèle entraîne également une baisse de la réponse aux dommages de l'ADN. Cela renforce l'hypothèse évoquée ci-dessus sur la nécessité de décrocher cGAS afin que la DDR se mette efficacement en place. Alors que l'utilisation d'inhibiteurs à large spectre (MG132, CB5083) soulève la question de la relation directe ou indirecte entre la présence de cGAS sur la chromatine et la DDR, des expériences plus ciblées par ancrage de cGAS sur la chromatine grâce au système CATCHFIRE seront réalisées (Bottone et al. 2023). Ces expériences pourront potentiellement permettre d'étudier l'impact direct de la présence de cGAS sur la chromatine sur la DDR. De façon intéressante, le rôle de cGAS sur la stabilité de la chromatine a également été observé dans le contexte de la réplication de l'ADN. La présence de cGAS accroché à la chromatine ralentit la progression des fourches de réplication et permet donc de maintenir l'intégrité du génome (H. Chen et al. 2020). Cette particularité montre bien que la présence de cGAS sur la chromatine est un frein à son remodelage et qu'il est donc essentiel pour la cellule de pouvoir contrôler finement le pool de cGAS accroché à la chromatine. De plus, une étude récente de 2024 montre que le complexe MRN, et plus particulièrement MRE11 est capable d'induire le décrochage de cGAS du nucléosome, ce qui le rend capable d'être activé par de l'ADN cytoplasmique (Cho et al. 2024). Étant donné que cGAS est capable de lier de l'ADN nu y compris dans le noyau, il risquerait de s'activer suite aux cassures de l'ADN qui génèrent des fragments solubles. La dégradation nucléaire de cGAS pourrait donc constituer une régulation du pool de cGAS nucléoplasmique afin d'éviter une réponse inflammatoire aberrante. Ce mécanisme de régulation de cGAS pourrait s'ajouter à celui exercé par BAF afin d'empêcher l'activation de cGAS dans le compartiment nucléaire (Guey et al. 2020). L'ensemble de ces travaux suggère que cGAS joue un rôle de protection et de régulation de la structure de la chromatine, et qu'il est nécessaire de le décrocher afin de mettre en place une DDR rapide et efficace impliquant une accessibilité et un remodelage important de cette structure. Il reste néanmoins à étudier plus précisément à quelle étape de la mise en place de la DDR et suite à quel signal cGAS est décroché de la chromatine.

L'inhibition du protéasome entraine l'accumulation de cGAS non dégradé dans le noyau et sa juxtaposition avec les PML NBs.

D'après nos résultats obtenus avec le MG132, la dégradation de cGAS dans le noyau semble être médiée par le protéasome. L'inhibition de ce dernier permet de conserver une quantité nucléaire importante de la protéine, et induit l'accumulation de cGAS en foyers dans le noyau qui juxtaposent avec les PML NBs. Cette observation soulève plusieurs interrogations. On peut se poser la question de savoir si l'ensemble du cGAS non dégradé se retrouve sous forme de foyers ou si une partie est également diffuse dans le noyau. Ceci semble cependant peu probable car nos expériences de fractionnement ne montrent pas d'augmentation massive du pool de cGAS nucléoplasmique lors d'un traitement à l'étoposide. De plus, nous ne savons pas si cGAS présent au sein des foyers est associé à la chromatine ou libre dans le nucléoplasme. En effet, l'ajout de MG132 en présence d'étoposide

permet de restaurer une partie du cGAS chromatinien mais nous ne savons pas si cette fraction correspond ou non aux foyers visibles en immunofluorescence. Il est possible que l'ajout du MG132 permette de restaurer un pool de cGAS accroché à la chromatine, qui soit différent du pool de cGAS qui s'accumule à côté des PML NBs. Il serait intéressant d'étudier si le cGAS accroché à la chromatine est présent sur des zones spécifiques. Une de nos hypothèses serait qu'il puisse se lier préférentiellement aux centromères comme le suggère l'étude de Gentili et al (Gentili et al. 2019), même si en immunofluorescence nous ne voyons pas d'enrichissement de cGAS au niveau de ces régions. L'anticorps dirigé contre cGAS endogène ne fonctionne malheureusement pas en ChIP. Nous projetons de réaliser du ChIP contre un GFP-cGAS ou du CUT&RUN contre cGAS endogène pour étudier précisément la localisation de cGAS sur la chromatine. Les agrégats de cGAS juxtaposant les PML NBs font penser à de la séparation de phase, une propriété que cGAS possède lorsqu'il se lie avec de l'ADN dans le cytoplasme (Du et Chen 2018; Xie et al. 2019; G. Xu et al. 2021), ou au génome de virus comme HSV1 dans le noyau (Y. Wu et al. 2022). Il n'est donc pas exclu que cGAS dans ces foyers soit lié à des fragments d'ADN. Nous vérifierons l'activité du cGAS nucléoplasmique décroché en effectuant un test ELISA contre cGAMP ce qui nous permettra de voir si le cGAS présent en foyers est potentiellement actif. De façon intéressante, la déplétion de PML semble freiner la dégradation de cGAS lors de cassures de la chromatine suggérant l'implication des PML NBs dans la dégradation de cGAS. L'ajout de MG132 permettrait de "capturer" l'implication de ces corps nucléaires dans la régulation du pool nucléaire de cGAS. Des expériences avec de la cycloheximide sont en cours actuellement pour mesurer plus précisément le turnover de cGAS en absence de PML.

La découverte de cGAS juxtaposé aux PML NBs fut une surprise. Ces organelles sont connus pour s'associer avec les zones de dommages à l'ADN (Carbone et al. 2002; Yeung et al. 2012) et sont le lieu de stockage de nombreux acteurs de la DDR (Dellaire et Bazett-Jones 2004). Nos observations en immunofluorescence nous ont permis de constater que les PML NBs associés aux cassures (foyers γH2A.X) n'étaient pas ceux associés aux foyers cGAS. Cette exclusivité suppose que les PML NBs pourraient avoir deux rôles distincts dans la réponse aux dommages de l'ADN : un rôle dans la mise en place de la HR (Dellaire et al. 2006; Attwood et al. 2020) ainsi qu'un rôle dans la dégradation/séquestration de cGAS non localisé aux cassures.

Des modifications post-traductionnelles différentes interviennent à différents timings lors de la dynamique nucléaire de cGAS.

Les sites de dommages à l'ADN sont rapidement occupés par des enzymes responsables de modifications post-traductionnelles afin de réguler la dynamique des protéines au niveau de la zone lésée. La SUMOylation est une modification importante dans la DDR et les SUMO E2 conjugase UBC9 et SUMO E3 ligases PIAS1 et PIAS4 localisent aux sites de cassures et modifient notamment BRCA1 (Galanty et al. 2009; Morris et al. 2009). Il est donc possible que cGAS subisse une SUMOylation aux sites de cassures, ce qui participerait à son éviction de la chromatine. cGAS possède un site de SUMOylation sur la lysine K285 (Hendriks et al. 2014; Schimmel et al. 2014) et il serait donc intéressant d'observer la dynamique d'un mutant de cGAS dans des conditions de déplétion du cGAS endogène. Nous sommes pour le moment limités par le fait que le plasmide nous permettant

d'exprimer une forme étiquetée de cGAS (GFP-Flag-cGAS) est sensible au MG132 et le GFP-Flag-cGAS ne s'accumule pas à côté des PML NBs en présence de MG132. Cette SUMOylation, ainsi que les SIMs putatifs identifiés par JASSA (résidus 151-154 et 308-311) (Beauclair et al. 2015) pourraient médier des interactions SIM-SUMO requises pour la juxtaposition avec les PML NBs. Nos données utilisant un inhibiteur de SAE confirment l'importance de la SUMOylation pour la juxtaposition de cGAS à côté des PML NBs. De façon intéressante, KAP-1 montre un comportement similaire à cGAS avec une accumulation en foyers juxtaposés aux PML NBs lors d'une inhibition du protéasome (Tessier et al. 2022). Ce répresseur de la transcription recrute un grand nombre de co-facteurs, tels que des HDAC ou des facteurs de remodelage de la chromatine engendrant la compaction et la répression de la chromatine et inhibant la HR (Goodarzi, Kurka, et Jeggo 2011). Lors de l'apparition de dommages, KAP-1 est rapidement phosphorylée par ATM, et sa forme phosphorylée empêche le recrutement du remodeler CHD3, ce qui entraîne la relaxation de la chromatine (Goodarzi, Kurka, et Jeggo 2011). KAP-1 est également capable d'auto-SUMOylation (Fonti et al. 2019), ce qui permet à la STUbL RNF4 de le cibler pour induire sa dégradation par le protéasome en coopération avec p97 (Kuo et al. 2016). Cette dynamique de KAP-1 est très intéressante car elle présente une grande similarité avec celle que nous observons de cGAS. KAP-1 et cGAS sont des protéines liées à la chromatine et participant à la condensation de celle-ci. Cela va dans le sens de notre hypothèse, car tout comme KAP-1, il serait nécessaire de décrocher cGAS afin de rendre la chromatine accessible lors de dommages à l'ADN. De plus, la dynamique de KAP-1 implique sa SUMOylation, suivie d'une ubiquitinylation pour mener à sa dégradation. Même si nous n'avons pas encore pu démontrer biochimiquement les modifications de cGAS, nous pouvons supposer qu'un même axe de SUMOylation-ubiquitination cible cGAS vers le protéasome. Si cGAS est bien affecté par une SUMOylation comme KAP-1 il s'agit désormais de découvrir quel SUMO ligase est responsable de cette modification et si sa déplétion impacte le décrochage de cGAS de la chromatine et sa dégradation.

Ainsi, nos travaux et ceux de Tessier et al montrent que lors de dommages à l'ADN, des protéines telle que cGAS sont décrochées de la chromatine en mettant en jeu des modifications SUMO-Ub, ce qui corrèle avec le remodelage de cette dernière. Nous avons également pu identifier p97 comme un acteur majeur de la dynamique de cGAS, une autre similitude avec KAP-1 (Kuo et al. 2016). Nos expériences avec un inhibiteur de p97 montrent une disparition des foyers de cGAS. Ceci est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle p97 serait impliqué dans le décrochage de cGAS de la chromatine, et son inhibition empêche donc son décrochage et la formation de foyers à côté des PML NBs en cas d'inhibition de sa dégradation. D'autres investigations sont nécessaires afin de savoir si les PIAS, les STUbLs RNF4 ou RNF111 sont impliquées avec p97 dans ce décrochage. Je discuterai plus tard de la potentielle implication de RNF111.

Notre étude nous a également permis d'identifier la NEDDylation comme un acteur important dans la régulation de la dynamique nucléaire de cGAS. En effet, l'inhibition de cette modification par ajout du MLN4924 induit un effet similaire à l'inhibition du protéasome, à savoir l'accumulation de cGAS en foyers juxtaposant les PML NBs dans le noyau. Cela suggère que la NEDDylation joue un rôle dans la dégradation de cGAS, comme démontré par l'équipe du Dr. Ablasser (Xu et al. 2024). Une analyse de fractionnement pourra nous apporter plus de compréhension sur la dynamique de cGAS vis-à-vis

de la chromatine avec et sans ajout d'étoposide lors de l'inhibition de la NEDDylation. De plus, nous observons que l'ajout d'étoposide, qui provoque le décrochage de cGAS de la chromatine, augmente la formation de foyers de cGAS (figure 2A des résultats supplémentaires) suggérant que l'inhibition de la NEDDylation joue également un rôle dans la dégradation de cGAS après son décrochage de la chromatine. L'utilisation de MLN4924 en présence de cassures augmente la résection de l'ADN (Jimeno et al. 2015) ce qui pourrait également expliquer qu'il y ait une plus grande proportion de cGAS détaché de la chromatine, qui s'accumule en foyers à côté des PML NBs dans la condition MLN4924+etoposide.

L'utilisation du MLN4924, qui a de multiples impacts dans la cellule, complique cependant l'interprétation de nos données. Ce composé inhibe principalement la NEDDylation des complexes Cullin-Ring-Ligases (CRL) et donc leur activité d'ubiquitination, ce qui semble être l'effet principal décrit dans le papier du Dr. Ablasser (Xu et al. 2024). Cependant, dans notre cas, le knock-down de CUL5 ou de SPSB3 par siRNA ne permet pas la formation de foyers de cGAS, au contraire du MLN4924 suggérant un rôle distinct du complexe CRL5. Ce composé inhibe également la NEDDylation de substrats qui ne sont pas des Cullin. En effet, un certain nombre d'études montre un rôle de la NEDDylation dans la régulation de la DDR. NEDD8 s'accumule de façon RNF111-dépendante aux sites de dommages de l'ADN et ceci est requis pour le recrutement de protéines de la DDR telles que RNF168 (Ma et al. 2013). Les histones sont des cibles de la NEDDylation lors des dommages. L'histone H4 peut être NEDDylée (Ma et al. 2013) et la NEDDylation de H2A inhibe son ubiquitination, ce qui régule négativement la DDR (Tingting Li et al. 2014). Ainsi, l'utilisation de MLN4924 dans nos travaux pourrait engendrer une modification de H2A sur la chromatine et donc potentiellement altérer la liaison de cGAS au nucléosome car celui-ci est directement lié au patch acidique de H2A-H2B.

La STUbL RNF111 semble être un acteur de la dynamique nucléaire de cGAS

Concernant RNF111, cette enzyme est à la fois une STUbL et une NEDD8 ligase, impliquée dans la mise en place de la DDR (T. Ma et al. 2013; Poulsen et al. 2013). Cette enzyme, comme RNF4 (Galanty et al. 2012; Y. Yin et al. 2012; Vyas et al. 2013), est responsable de l'ubiquitinylation des protéines sur les sites de DSBs et permet la mise en place de la DDR (T. Ma et al. 2013). Nos observations suggèrent que RNF111 est nécessaire à l'accumulation de cGAS à côté des PML NBs lorsque le protéasome est bloqué. Le rôle de RNF111 dans la dynamique de cGAS reste difficile à interpréter et il serait très intéressant de déterminer si son action sur cGAS est liée à son activité de STUbL ou de NEDD8 ligase. A noter que cGAS peut également être une cible directe de la NEDDylation comme démontré notamment dans l'étude de Li et al. Dans leurs travaux, ils montrent que la NEDDylation est requise pour permettre l'activation correcte de la voie cGAS-STING dans le cytoplasme, en augmentant la capacité de cGAS à se lier à l'ADN (Chenhui Li et al. 2021). De plus, leur étude montre que la NEDDylation de cGAS est dépendante de RNF111. Cependant, il est difficile de raccrocher ces travaux à notre étude où la déplétion de RNF111 et l'inhibition de la NEDDylation ont des effets totalement opposés sur la formation des foyers de cGAS lorsque le protéasome est inhibé. Le mécanisme et le lien entre RNF111 et la NEDDylation dans le noyau est donc probablement différent de celui observé dans le cytoplasme par Li et al.

Nos observations suggèrent que le rôle de RNF111 a l'effet inverse de celui de la NEDDylation sur la formation des foyers de cGAS, nous pouvons donc supposer qu'il est impliqué dans l'ubiquitinylation de cGAS. Cependant, nous avons observé que lorsque le protéasome est bloqué, RNF111 est localisé dans les PML NBs et juxtaposés aux foyers de cGAS. Cette observation est en accord avec les travaux de Liu et al qui montrent que RNF111 est une protéine cliente des PML NBs et peut induire la dégradation de protéines via son activité de STUbL dans ces organelles (S. Liu et al. 2023). Nos observations suggèrent que l'inhibition de la SUMOylation impacte peu la localisation de RNF111 qui semble juxtaposer avec les PML NBs mais impacte grandement sa juxtaposition avec les foyers de cGAS. Nos résultats en western-blot montrent que la dégradation de cGAS diminue légèrement quand la SUMOylation est inhibée, ce qui suggère que RNF111 pourrait jouer un rôle plus tardif dans la dynamique nucléaire de cGAS via les PML NBs. De plus, nos observations montrent que la juxtaposition de cGAS avec les PML NBs corrèle également avec un marquage FK2, signe d'une polyubiquitinylation. Il reste à déterminer si le signal FK2 que nous voyons en immunofluorescence dans les PML NBs est liée aux foyers de cGAS et si oui, si cette marque est déposée par RNF111. Il est évident que nos travaux doivent être validés par l'identification des modifications post-traductionnelles, et interacteurs de cGAS en spectrométrie de masse et co-immunoprécipitation, mais nos tentatives dans ce sens n'ont, pour le moment, pas encore apporté de résultats satisfaisants. De nombreux travaux restent donc nécessaires pour étayer mécanistiquement le rôle de la NEDDylation, de RNF111 et des modifications de cGAS dans la régulation de la dynamique nucléaire de cGAS. Néanmoins, nos observations apportent de nouveaux éléments dans la compréhension de la dynamique nucléaire de cGAS.

La dégradation de cGAS dans un contexte de cassures de la chromatine semble différente de celle observée dans un contexte physiologique.

La fin de ma thèse a été marquée par la publication de l'équipe du docteur Ablasser, décrivant un mécanisme de dégradation de la protéine cGAS dans le noyau (P. Xu et al. 2024). Cette étude très intéressante montre que le complexe CRL5 permet l'ubiquitinylation de cGAS, principalement sur les lysines K427 et K428, grâce à la protéine de liaison au substrat SPSB3. L'ubiquitination de cGAS, suivie de sa dégradation est également dépendante de la NEDDylation du complexe CRL5 par UBE2F. Ce mécanisme de dégradation intervient dans des conditions différentes, et complémentaires de notre étude puisqu'il intervient dans des conditions physiologiques et ne cible que la protéine cGAS lorsqu'elle est liée aux nucléosomes. Nous avons donc voulu étudier si ce mécanisme était également impliqué dans la dégradation de cGAS suite à des dommages à l'ADN et au décrochage de cGAS de la chromatine. De façon intéressante nous avons observé que la déplétion de SPSB3 n'empêche pas la formation des foyers de cGAS lorsque le protéasome est inhibé. Ainsi, nous pouvons formuler l'hypothèse que SPSB3-CRL5 n'aurait pas d'impact sur la formation des foyers de cGAS suite à son décrochage de la chromatine en cas de de cassures et d'inhibition du protéasome, du fait de sa dépendance de liaison entre cGAS et le nucléosome. De plus, l'inhibition du complexe SPSB3-CUL5 ne suffit pas à provoquer l'apparition de foyers de cGAS, à l'inverse de ce que nous observons en cas d'inhibition du protéasome seul, démontrant que ce complexe joue un rôle différent dans la régulation du pool de cGAS nucléaire dans des cellules primaires.

La dynamique nucléaire de cGAS et sa dégradation dans le déclenchement de la sénescence

Les étapes précoces de la mise en place de la sénescence sont indépendantes de l'axe cGAS-STING et de la réponse interféron.

L'induction de la sénescence est un processus qui se met en place progressivement suite à des dommages non réversibles dans la cellule. Cet état permet aux cellules de stopper définitivement leur prolifération avant leur élimination potentielle par les cellules du système immunitaire, évitant l'apoptose qui génère une inflammation forte dans les tissus (Childs et al. 2014). Comme mentionné dans l'introduction, la plupart des marqueurs de la sénescence sont observables une fois que cet état est atteint, ce qui peut prendre plusieurs jours suite au stress d'induction. Notre étude portant sur les étapes précoces de la mise en place de cet processus, nous avons utilisé un des seuls marqueurs fiables connus et détectables lors des premières étapes de sénescence : l'accumulation du complexe chaperon HIRA dans les PML NBs (Ye, Zerlanko, Zhang, et al. 2007). Cependant, l'accumulation de HIRA au sein des PML NBs est également observés lors d'une stimulation à l'IFN des cellules (Rai et al. 2017; Kleijwegt et al. 2023; McFarlane et al. 2019). Lors des étapes plus tardives de la mise en place de la sénescence, des fragments de chromatine peuvent se retrouver dans le cytoplasme et induire l'activation de l'axe cGAS-STING menant à une réponse IFN, ce qui pourrait expliquer l'accumulation de HIRA au sein des PML NBs. Nos travaux avec un inhibiteur de JAK/STAT, montrent que lors d'un traitement à l'étoposide de 24h, la voie de l'IFN n'a aucun impact dans l'accumulation du chaperon HIRA aux PML NBs, ce qui montre qu'il peut servir de marqueur précoce pour marquer la sénescence, comme souligné par une étude récente de P. Adams (Dasgupta et al. 2024). Nos travaux montrent également que la déplétion de cGAS, mais pas celle de STING, impacte négativement l'accumulation de HIRA dans les PML NBs. Un sauvetage peut être provoquée par l'expression d'une version de cGAS sauvage ou muté pour son site catalytique. Ceci montre que l'axe cGAS-STING et la production de cGAMP ne sont pas nécessaires pour l'apparition d'un marqueur précoce de sénescence, mais seraient essentiel pour les étapes tardives de la sénescence via l'expression du SASP (Dou et al. 2017; Glück et al. 2017). Cela corrèle également avec le fait que les premières étapes de la mise en place de la sénescence font intervenir des éléments nucléaires de la cellule comme p53 et les éléments de la DDR (Y. Zhou et al. 2023).

L'absence de cGAS empêche la mise en place de la sénescence mais sa dégradation semble essentielle pour son induction.

Notre étude met en avant un paradoxe intrigant à propos du rôle de cGAS lors des étapes précoces d'induction de sénescence. En effet, la déplétion de cGAS, avant un traitement à l'étoposide, montre

que son absence empêche l'apparition du marqueur précoce de sénescence, ce qui est en accord avec les travaux de Yang et al (H. Yang et al. 2017). A ce stade de notre étude nous ne savons pas si la mise en place de la sénescence est abolie ou seulement retardée. Il serait donc intéressant de regarder l'effet de la déplétion de cGAS à plus long terme pour voir si les marqueurs tardifs de sénescence autres que le SASP sont absents également. Néanmoins, nous avons également constaté que l'induction de la sénescence par cassures de la chromatine corrèle avec la dégradation de cGAS dans le noyau, et que l'inhibition du protéasome, qui diminue la dégradation de cGAS impacte fortement l'apparition du marqueur précoce de sénescence. Des études publiées montrent que le décrochage cGAS de la chromatine est essentiel pour la mise en place de la DDR puisque sa présence sur la chromatine empêche la mise en place de la DDR, notamment de la HR (H. Liu et al. 2018; Jiang et al. 2019b) ainsi que la NHEJ au niveau des régions télomériques (Xiaocui Li et al. 2022). Comme discuté précédemment, sa dégradation est sans doute également importante afin de prévenir son activation dans le noyau et déclencher une inflammation importante. De plus, l'étude de Iriki et al montre que le protéasome joue un rôle important dans le processus de sénescence avec la formation de foyers nommés SANPs (pour 'senescence-associated nuclear proteasome foci) (Iriki et al. 2023). De façon intéressante, ces foyers contenant des sous-unités du protéasome juxtaposent les PML NBs (Iriki et al. 2023). Chez les humains, le bon fonctionnement du protéasome est d'ailleurs associé à la longévité (Hegde et al. 2023). Une étude parue en 2020 montre à l'inverse que le traitement avec le MG132 permet d'induire la sénescence. Dans cette étude, les auteurs ont travaillé sur des HeLa et les ont exposé pendant 4 ou 5 jours à l'inhibiteur (En et al. 2020). Cette durée de traitement suggère que bien d'autres mécanismes sont altérés dans leur étude, et que l'accumulation de protéines toxiques est très importante. Nous avions également essayé des traitements plus longs sur les cellules BJ, mais cela a entrainé une toxicité trop importante dès 24h de traitement.

Deux temporalités distinctes expliquent donc sans doute nos résultats contradictoires. A des temps courts après dommages, cGAS serait décroché et dégradé partiellement pour permettre la mise en place de la DDR. Mais un pool de cGAS serait impliqué dans le déclenchement de la sénescence, soit par son décrochage, soit par une activité nucléaire encore à déterminer. Le fait que l'absence de cGAS inhibe la mise en place de la sénescence précoce suggère que la fraction restante de cGAS dans le noyau pourrait jouer un rôle dans cette induction, ou serve de réservoir pour les étapes plus tardives et la production du SASP. De façon intéressante, une étude publiée récemment sur biorxiv souligne un rôle nucléaire de cGAS, indépendant de STING, pour l'induction du SASP dans une forme de sénescence non canonique, étayant cette hypothèse (X. Chen et al. 2024).Une autre hypothèse serait que ce soit le mécanisme de décrochage et de dégradation qui fasse office de signal pour la mise en place de la sénescence. En effet, avec la déplétion de cGAS, ce signal ne serait plus possible, invalidant la mise en place de la sénescence. Nos travaux soulèvent donc des interrogations quant au rôle de cGAS lors de cette transition entre la mise en place de la DDR et l'induction de la sénescence. Nos premiers travaux sur les lignées de cellules primaires exprimant un oncogène inductible (BJ-ER:RasV12) tendent à renforcer ces hypothèses. L'hyperprolifération des cellules conduit à la génération de cassures de la chromatine, provoquant une DDR menant à la sénescence (Roger, Tomas, et Gire 2021). Nous avons observé que dans ces cellules, l'accumulation du chaperon d'histone HIRA

dans les PML NBs et la mise en place des SAHFs corrèle avec une diminution nucléaire de cGAS. De plus, l'inhibition du protéasome dans ces cellules altère de la même façon l'apparition du marqueur précoce de sénescence au moment où celle-ci semble se mettre en place, au bout de 3 jours d'expression oncogénique. De futurs travaux permettront d'observer l'effet de la déplétion de cGAS dans ces lignées afin de vérifier si cela a le même effet que lors de nos expériences avec l'étoposide. De plus, il serait intéressant d'investiguer si la NEDDylation, les PML NBs, RNF111 et p97 ont des impacts similaires dans le cas d'un stress oncogénique.

Cette mise en place de la sénescence dépendante de cGAS est-elle altérée dans certaines cellules cancéreuses ?

La comparaison entre les cellules primaires BJ et cancéreuses HeLa montre que dans ces deux lignées, les dommages à l'ADN induisent un décrochage de cGAS de la chromatine. Cependant la différence entre ces types cellulaires se situe au niveau de la dégradation de cGAS après son décrochage. Dans les cellules HeLa, l'absence de diminution de cGAS total corrèle avec une absence d'accumulation du complexe chaperon HIRA aux PML NBs lors d'un traitement à l'étoposide, suggérant que la dégradation de cGAS pourrait être à l'origine de la mise en place de la sénescence. Il serait intéressant de forcer la dégradation de cGAS dans les HeLa afin de voir si cela permet de restaurer l'induction de sénescence dans cette lignée. Ces travaux de comparaison sont à poursuivre pour investiguer également les rôles de RNF111, PML, p97 et de la NEDDylation dans cette lignée cancéreuse. Dans les cellules primaires, la déplétion de cGAS empêche la mise en place de la sénescence et l'expression de cGAS exogène permet de restaurer cette induction. De plus, l'induction est également restaurée avec l'expression exogène de la protéine déficiente pour son activité catalytique. La mutation de cGAS sur ses sites de SUMOylation et ubiquitinylation nous permettrait d'identifier quelles modifications sont nécessaires pour la mise en place de ce mécanisme. A ce stade nous ne savons pas si l'absence de dégradation de cGAS dans les HeLa est due à une mutation sur cGAS ou au mauvais fonctionnement d'une des protéines impliquées dans ce phénomène. La recherche de mutation sur les sites de SUMOylation (K285) ou d'ubiquitination (K427-428) de cGAS dans les cancers par data mining sur les bases de données COSMIC ou du National Cancer Institute (https://portal.gdc.cancer.gov/) n'a cependant pas de donné de résultat.

Le paradoxe de la sénescence dans les cancers et les pathologies liées au vieillissement

L'étude de la sénescence permet des progrès importants dans les thérapies contre les cancers. En effet l'induction ciblée de sénescence dans les cellules tumorales permet ensuite leur élimination (Ewald et al. 2010; Poliseno et al. 2010; Alimonti et al. 2010; Fine et al. 2009). Cet outil thérapeutique nécessite un contrôle temporel très fin puisqu'il a également été montré que la sénescence, notamment via la sécrétion du SASP engendre un environnement pro-inflammatoire bénéfique pour la tumeur (Coppé et al. 2010; Kuilman et al. 2008; Laberge et al. 2015; Rodier et al. 2009). De plus, cet effet néfaste du SASP est également retrouvé dans les pathologies associées au vieillissement et

participe à la dégradation des tissus et perte de leurs fonctions (Y. Wang et al. 2022). L'étude de cGAS et la compréhension de sa dynamique nucléaire pourraient faire avancer les traitements pro- et anti-sénescence, contribuant ainsi à améliorer la santé des patients. Cela revêt une importance particulière à une époque où le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde et où l'allongement de l'espérance de vie favorise le développement des pathologies liées au vieillissement.

Notre étude propose donc un modèle selon lequel les dommages à l'ADN induisent le décrochage de cGAS de la chromatine de façon dépendante de p97, puis la dégradation de cGAS via les PML NBs afin de déclencher le processus de sénescence et d'éviter toute activation aberrante de son activité catalytique.

Annexes

Annexe 1 : article de recherche

RESEARCH ARTICLE

Interplay between PML NBs and HIRA for H3.3 dynamics following type I interferon stimulus

Constance Kleijwegt[1†], Florent Bressac[1], Coline Seurre[1], Wilhelm Bouchereau[1], Camille Cohen[1‡], Pascale Texier[1], Thomas Simonet[2], Laurent Schaeffer[2], Patrick Lomonte[1]*, Armelle Corpet[1]*

[1]University of Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5261, INSERM U 1315, LabEx DEVweCAN, Institut NeuroMyoGène (INMG), Pathophysiology and Genetics of the Neuron and Muscle (PGNM) laboratory, team Chromatin Dynamics, Nuclear Domains, Virus, Lyon, France; [2]Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS UMR 5310, INSERM U 1217, Institut NeuroMyoGène (INMG), team Nerve-Muscle interactions, Lyon, France

***For correspondence:** patrick.lomonte@univ-lyon1.fr (PL); armelle.corpet@univ-lyon1.fr (AC)

Present address: †Institute of Human Genetics, UMR9002 CNRS-Université de Montpellier, Laboratory of Biology of Repetitive Sequences, Montpellier, France; ‡Univ Montpellier, CNRS UMR 5235, Laboratory of Pathogen Host Interactions, Montpellier, France

Competing interest: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 24

Preprinted: 01 December 2021
Received: 10 May 2022
Accepted: 25 April 2023
Published: 25 May 2023

Reviewing Editor: Yamini Dalal, National Cancer Institute, United States

© Copyright Kleijwegt *et al.* This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Abstract Promyelocytic leukemia Nuclear Bodies (PML NBs) are nuclear membrane-less organelles physically associated with chromatin underscoring their crucial role in genome function. The H3.3 histone chaperone complex HIRA accumulates in PML NBs upon senescence, viral infection or IFN-I treatment in primary cells. Yet, the molecular mechanisms of this partitioning and its function in regulating histone dynamics have remained elusive. By using specific approaches, we identify intermolecular SUMO-SIM interactions as an essential mechanism for HIRA recruitment in PML NBs. Hence, we describe a role of PML NBs as nuclear depot centers to regulate HIRA distribution in the nucleus, dependent both on SP100 and DAXX/H3.3 levels. Upon IFN-I stimulation, PML is required for interferon-stimulated genes (ISGs) transcription and PML NBs become juxtaposed to ISGs loci at late time points of IFN-I treatment. HIRA and PML are necessary for the prolonged H3.3 deposition at the transcriptional end sites of ISGs, well beyond the peak of transcription. Though, HIRA accumulation in PML NBs is dispensable for H3.3 deposition on ISGs. We thus uncover a dual function for PML/PML NBs, as buffering centers modulating the nuclear distribution of HIRA, and as chromosomal hubs regulating ISGs transcription and thus HIRA-mediated H3.3 deposition at ISGs upon inflammatory response.

Editor's evaluation

This study nicely dissects unexpected crosstalk between PML nuclear bodies and the HIRA member of the H3.3 histone chaperone complex upon inflammatory stress. The work raises interesting perspectives on how availability of HIRA could be regulated by PML Nuclear Bodies for histone deposition, and transcriptional regulation of key interferon-stimulated genes. Overall, this is an important step forward in unveiling which epigenetic pathways might regulate immune responses.

Introduction

Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies (PML NBs) are membrane-less organelles (MLOs), also called biomolecular condensates (***Banani et al., 2017***), that concentrate proteins at discrete sites within the nucleoplasm thus participating in the spatio-temporal control of biochemical reactions (***Corpet et al., 2020***; ***Hirose et al., 2022***; ***Lallemand-Breitenbach and de Thé, 2018***; ***Li et al., 2020***). PML

NBs are 0.1–1 µm diameter hollow sphere structures that vary in size and number depending on cell type, cell-cycle phase, or physiological state, highlighting their stress-responsive nature. The tumor-suppressor PML protein is the primary scaffold of PML NBs and forms an outer shell, together with the SP100 nuclear antigen, surrounding an inner core of dozens of proteins that localize constitutively or transiently in PML NBs. PML (also known as TRIM19) is a member of the tripartite motif (TRIM)-containing protein superfamily characterized by a conserved N-terminal RBCC motif essential for PML polymerization. Several isoforms of PML exist, all containing the RBCC motif and three well-characterized small-ubiquitin-related modifier (SUMO) modification sites at lysines K65, K160, and K490 and a SUMO interacting motif (SIM) enabling its interaction with SUMOylated proteins.

PML NBs have been involved in a wide variety of biological processes such as senescence, antiviral response, transcriptional regulation, DNA damage response, or stemness suggesting that they are fully significant structures. The molecular mechanisms through which they exert their broad physiological impact are not fully elucidated yet. However, as MLOs, they potentially have three different mode of actions (for review ***Corpet et al., 2020***; ***Hirose et al., 2022***). First, they can serve as hotspots promoting specific biochemical reactions such as SUMOylation. PML NBs are enriched in the SUMO E2 conjugating enzyme UBC9, which mediates SUMOylation of various proteins including PML thus enforcing PML-PML interactions via intermolecular SUMO-SIM interactions. SUMOylated proteins within PML NBs can drive the multivalent recruitment of inner core protein clients through their SIM, possibly via liquid-liquid phase separation (LLPS) mechanisms (***Corpet et al., 2020***; ***Li et al., 2020***; ***Sahin et al., 2014***). Second, PML NBs may buffer/sequestrate specific factors which could lead to their substantial depletion for the surrounding nuclear space. Third, while PML NBs are in general devoid of DNA, except in specific cases (for review ***Corpet et al., 2020***), they reside in the interchromatin nuclear space (***Boisvert et al., 2000***) and can associate with specific genomic loci thus acting as chromosomal hubs adequately regulating associated genes (***Chang et al., 2013***; ***Ching et al., 2013***; ***Delbarre et al., 2017***; ***Kumar et al., 2007***; ***Kurihara et al., 2020***; ***Shiels et al., 2001***; ***Wang et al., 2004***). PML NBs have been found associated with both transcriptionally-active domains (***Boisvert et al., 2000***; ***Kurihara et al., 2020***; ***Wang et al., 2004***), as well as heterochromatin regions such as telomeres suggesting an important function in chromatin domain organization and regulation of their transcriptional state (for review ***Delbarre and Janicki, 2021***).

Targeted deposition of histones variants is crucial for chromatin homeostasis and the maintenance of cell identity (***Allis and Jenuwein, 2016***). Among histone H3 variants, H3.3 is expressed throughout the cell cycle and is incorporated onto DNA in a DNA-synthesis-independent manner by dedicated histone chaperone complexes (***Martire and Banaszynski, 2020***). Histone cell cycle regulator A (HIRA) chaperone complex, composed of HIRA, ubinuclein 1 or ubinuclein 2 (UBN1 or UBN2) and calcineurin-binding protein CABIN1, is responsible for H3.3 deposition in transcriptionally active regions including enhancers, promoters and gene bodies, as well as in nucleosome-free regions and DNA damage sites (***Goldberg et al., 2010***; ***Ray-Gallet et al., 2011***; ***Ray-Gallet et al., 2002***; ***Zhang et al., 2017***) (for review ***Martire and Banaszynski, 2020***; ***Ricketts and Marmorstein, 2017***). HIRA has also been recently shown to be involved in the transcription-mediated recycling of parental H3.3 by microscopy approaches (***Torné et al., 2020***). Although HIRA complex is diffusively distributed in the nuclei of proliferating somatic cells, it accumulates in PML NBs upon various stresses such as senescence entry (***Banumathy et al., 2009***; ***Jiang et al., 2011***; ***Rai et al., 2011***; ***Zhang et al., 2005***), viral infection (***Cohen et al., 2018***; ***McFarlane et al., 2019***; ***Rai et al., 2017***), or interferon type I (IFN-I) treatment (***McFarlane et al., 2019***; ***Rai et al., 2017***), which encompasses IFNα and IFNβ cytokines. These latter events underscore a role of HIRA in intrinsic anti-viral defense via chromatinization of incoming viral genomes (***Cohen et al., 2018***; ***Rai et al., 2017***) as well as stimulation of innate immune defenses in the case of viral infection (***McFarlane et al., 2019***).

However, the exact significance of HIRA localization in PML NBs upon inflammatory stress response, as well as the role of the PML NBs themselves, remain to be defined. PML NBs may act as concentrating places for enzymatic reactions such as SUMOylation, or as buffering/sequestration structures for various chromatin-related proteins, or be a means to target them to specific chromatin regions juxtaposed to PML NBs. Here, we explored the different functions of PML NBs in response to IFN-I stimulus and focused our investigation on their interplay with the histone chaperone HIRA. We show that PML NBs act as nuclear depot centers for HIRA, depending on PML/SP100 levels, as well as on DAXX/H3.3 histone availability. Mechanistically, HIRA localizes in PML NBs in a SP100 and

SIM-SUMO-dependent manner upon IFN-I treatment. In addition, we provide evidence that PML is required for interferon-stimulated genes (ISGs) expression, and that ISGs loci juxtapose to PML NBs, thus confirming a role of PML NBs as chromosomal hubs implicated in gene regulation. ChIP-Seq analysis reveals a long-lasting H3.3 deposition on the 3' end of ISGs, which is partly dependent on HIRA and PML, but independent of HIRA localization in PML NBs. Together, our results put forward a dual role of PML/PML NBs during the inflammatory response: they act both as buffering centers to modulate HIRA availability in the nucleoplasm, and as chromosomal hubs regulating ISGs transcription, and thus, HIRA-mediated H3.3 deposition at ISGs.

Results

HIRA accumulation in PML NBs correlates with an increase in PML and SP100 concentration

Several stimuli, such as IFN-I treatment (***McFarlane et al., 2019***; ***Rai et al., 2017***), can trigger HIRA accumulation in PML NBs. As a first step towards deciphering the mechanism of HIRA localization in PML NBs, we investigated the stoichiometry-dependent recruitment of HIRA in PML NBs. Treatment of human primary foreskin diploid fibroblast BJ cells with the TLR3 ligand poly(I:C), a strong stimulant of the IFN-I pathway, or with the Tumor necrosis factor α (TNFα) cytokine, triggered a strong accumulation of HIRA in PML NBs (***Figure 1A–B***), similarly to a control IFN-I treatment (***Figure 1—figure supplement 1A***). The accumulation was abrogated by addition of ruxolitinib, an inhibitor of the JAK-STAT pathway downstream of the IFN-I receptor, underscoring the involvement of the IFN-I signaling pathway in primary cells (***Figure 1A–B*** and ***Figure 1—figure supplement 1A***). IFNβ, poly(I:C) and TNFα induced an IFN-I dependent increase of the PML and SP100 proteins and their SUMOylated forms (***Figure 1C–D***), as well as their mRNA levels (***Figure 1—figure supplement 1B***) confirming previous data (***Gao et al., 2008***; ***Guldner et al., 1992***; ***Stadler et al., 1995***). Of note, IFNβ slightly increased HIRA mRNA (1.26 fold) and protein levels (1.34 fold) (***Figure 1—figure supplement 1C***). Treatment with other pro-inflammatory cytokines such as IL-6 or the IL-8 chemokine, did not increase PML protein levels or SUMOylation (***Figure 1—figure supplement 1D***), nor affected HIRA localization that remained pan-nuclear (***Figure 1—figure supplement 1E***). HIRA accumulation in PML NBs was not a consequence of senescence as cells treated with IFNβ continued to replicate as shown by EdU incorporation (***Figure 1—figure supplement 1F***). These results suggest that an IFN-I-dependent increase of PML and SP100 protein levels and SUMOylation, and to a lesser extent of HIRA, is part of the mechanism for HIRA accumulation in PML NBs.

Accumulation of HIRA in PML NBs depends on both SUMO-SIM interactions and SP100

Interaction of a client SIM with SUMOylated lysines on the PML protein is critical for the recruitment of several PML NB clients such as SP100 (***Szostecki et al., 1990***), or the H3.3 histone chaperone DAXX (***Sahin et al., 2014***). The latter localizes constitutively in PML NBs (***Ishov et al., 1999***). Further studies suggest that the partitioning of polySIM chimeras in the condensed PML NB phase is controlled by the availability of SUMOylated lysines on the PML protein (***Banani et al., 2016***). We thus hypothesized that HIRA's partitioning in PML NBs could be regulated by SUMO-SIM interactions. We first investigated whether HIRA and PML/SUMO could interact together in cellulo. Proximity Labelling Assay (PLA) allows the detection of closely interacting protein partners in situ at distances below 40 nm (***Sahin et al., 2016***). Using PLA, we detected interaction foci between PML and SUMO2/3 as expected (***Sahin et al., 2016***), with the number of interaction foci increasing significantly upon IFNβ treatment (***Figure 2A–B***), which is known to stimulate PML SUMOylation (***Stadler et al., 1995***). We then assessed the interactions between HIRA and PML or HIRA and SUMO2/3. We could detect a significant interaction between these proteins in presence of IFNβ (***Figure 2A–B***), accordingly to the accumulation of HIRA in PML NBs. Positive PLA signal between HIRA and SUMO2/3 could either mean that HIRA is SUMOylated or that HIRA interacts with other SUMOylated proteins. The molecular mass of HIRA remained unchanged upon IFNβ treatment of primary cells (***Figure 1—figure supplement 1C***), as previously described (***McFarlane et al., 2019***), which is not in favor of post-translational modification of HIRA with SUMO groups. In addition, ectopic HIRA mutated on K809, identified as a possible SUMOylated lysine in a SUMO screen (***Hendriks et al., 2014***; ***Schimmel et al., 2014***),

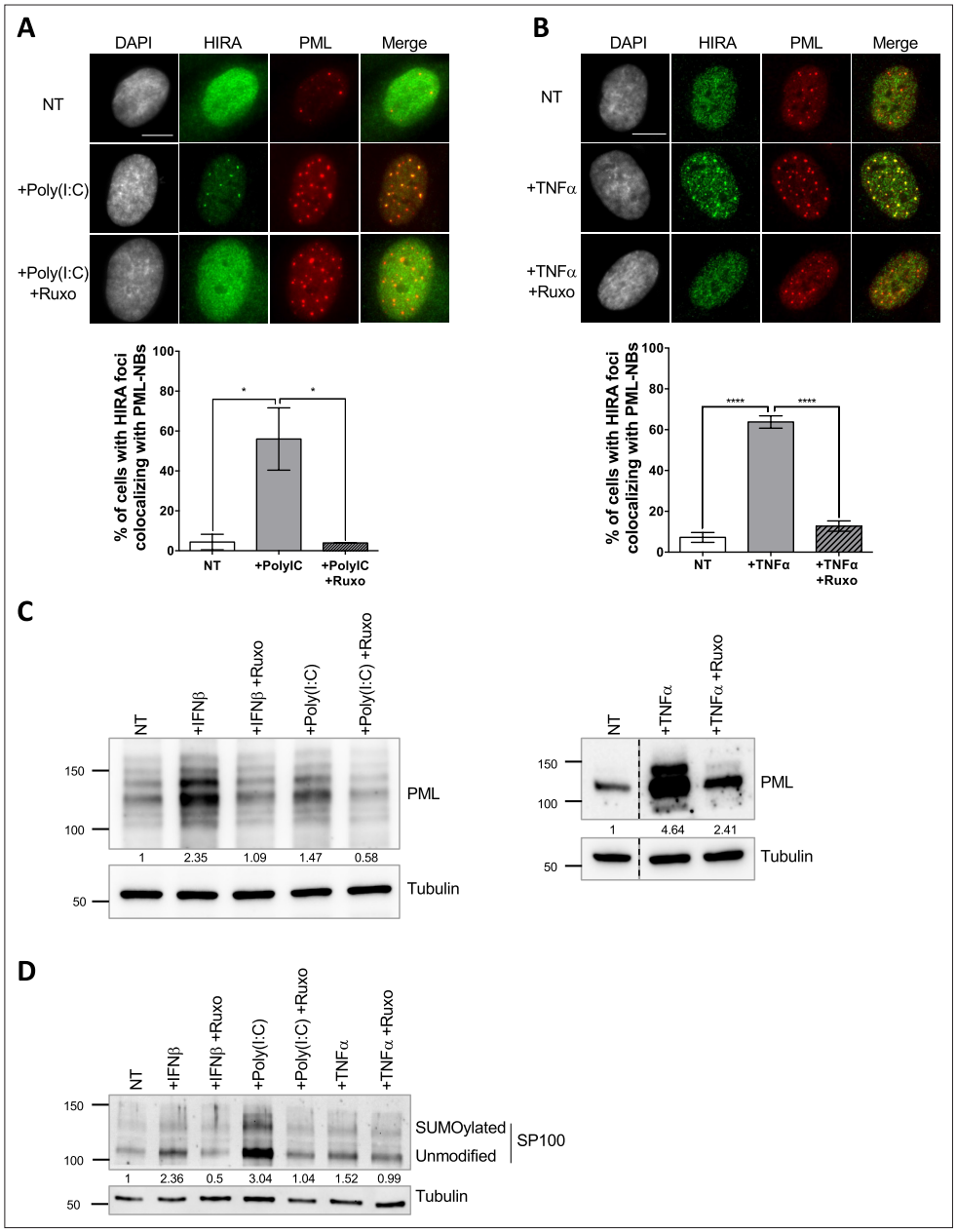


Figure 1. HIRA accumulation in PML NBs correlates with increased PML concentration in primary cells. (**A–B**) (top) Fluorescence microscopy visualization of HIRA (green) and PML (red) in BJ cells treated with Poly(I:C) at 10 µg/mL for 24 hr (left) or with TNFα at 100 ng/mL for 24 hr (right). Ruxolitinib (Ruxo) was added at 2 µM one hour before Poly(I:C) or TNFα treatment and for 25 hr. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bars represent 10 µm. (bottom) Histograms show quantitative analysis of cells with HIRA localization at PML NBs. p-values (Student t-test): *<0.05; ****<0.0001. Numbers on all histograms represent the mean of three independent experiments (± SD). (**C**) (left) Western blot visualization of PML from total cell

Figure 1 continued on next page

Figure 1 continued

extracts of BJ cells treated with IFNβ at 1000 U/mL or Poly(I:C) at 10 µg/mL for 24 hr and with ruxolitinib (Ruxo) at 2 µM 1 hr before treatment and for 25 hr. (right) Western blot visualization of PML from RIPA extracts of BJ cells treated with TNFα at 100 ng/mL for 24 hr and with ruxolitinib (Ruxo) at 2 µM 1 hr before treatment and for 25 hr. Tubulin is a loading control. Quantification of PML levels relative to tubulin are shown below the WB (numbers are representative from three independent experiments) (**D**) Western blot visualization of SP100 from total cell extracts of BJ cells treated as in C. Quantification of SP100 levels relative to tubulin are shown below the WB (numbers are representative from two independent experiments).

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 1:

Source data 1. Raw WB for ***Figure 1C*** (left panel) for PML and tubulin.

Source data 2. Raw WB for ***Figure 1C*** (left panel) for PML and tubulin with labels.

Source data 3. Raw WB for ***Figure 1C*** (right panel) for PML.

Source data 4. Raw WB for ***Figure 1C*** (right panel) for PML with labels.

Source data 5. Raw WB for ***Figure 1C*** (right panel) for tubulin.

Source data 6. Raw WB for ***Figure 1C*** (right panel) for tubulin with labels.

Source data 7. Raw WB for ***Figure 1D*** for SP100.

Source data 8. Raw WB for ***Figure 1D*** for SP100 with labels.

Source data 9. Raw WB for ***Figure 1D*** for tubulin.

Source data 10. Raw WB for ***Figure 1D*** for tubulin with labels.

Figure supplement 1. Impact of various cytokines on HIRA localization in PML NBs.

Figure supplement 1—source data 1. Raw WB for ***Figure 1—figure supplement 1C*** for HIRA.

Figure supplement 1—source data 2. Raw WB for ***Figure 1—figure supplement 1C*** for HIRA with labels.

Figure supplement 1—source data 3. Raw WB for ***Figure 1—figure supplement 1C*** for tubulin.

Figure supplement 1—source data 4. Raw WB for ***Figure 1—figure supplement 1C*** for tubulin with labels.

Figure supplement 1—source data 5. Raw WB for ***Figure 1—figure supplement 1D*** for PML.

Figure supplement 1—source data 6. Raw WB for ***Figure 1—figure supplement 1D*** for PML with labels.

Figure supplement 1—source data 7. Raw WB for ***Figure 1—figure supplement 1D*** for tubulin.

Figure supplement 1—source data 8. Raw WB for ***Figure 1—figure supplement 1D*** for tubulin with labels.

was still recruited in PML NBs similar to the wild-type protein (***Figure 2—figure supplement 1A***), suggesting that at least K809 SUMOylation is dispensable for HIRA recruitment in PML NBs. We thus conclude that HIRA can interact with SUMOylated proteins in situ.

To confirm that SUMOylation of cellular proteins, including PML, is required for HIRA partitioning in PML NBs, we depleted the pool of SUMO1/2/3 by siRNA treatment (***Figure 2C***). Depletion of SUMOs led to a significant decrease of HIRA accumulation in PML NBs upon IFNβ treatment (***Figure 2D***). Of note, in absence of SUMOs, PML NBs appear as large aggregates devoid of DAXX (***Figure 2—figure supplement 1B***), reminiscent of the alternative PML NBs structures observed during mitosis, in human embryonic stem cells or in human sensory neurons (***Corpet et al., 2020***). Thus, presence of SUMO proteins, that can undergo LLPS in vitro (***Banani et al., 2016***), seems key to promote partitioning of HIRA. Increasing the pool of free SUMOs by ectopic expression did not trigger HIRA accumulation in PML NBs (***Figure 2—figure supplement 1C***) suggesting that SUMOs need to be conjugated to specific proteins to trigger HIRA partitioning in PML NBs.

To further substantiate the requirements for non-covalent SUMO-SIM interactions in mediating HIRA accumulation in PML NBs, we used the Affimer technology, previously known as Adhiron. Affimers are artificial protein aptamers consisting of a scaffold with two variable peptide presentation loops that can specifically bind with high affinity and high specificity to their binding partners. A recent screen identified several Affimers that inhibit SUMO-dependent protein-protein interactions mediated by SIM motifs (***Hughes et al., 2017***). We selected the S1S2D5 Affimer that specifically targets both SUMO1 and SUMO2/3-mediated interactions and which possesses a consensus SIM motif (***Hughes et al., 2017***). Inducibly expressed S1S2D5-His Affimer showed a nuclear staining with accumulation of the Affimer in PML NBs (***Figure 3A–B***), as expected for a synthetic peptide that exhibits a SIM domain (***Banani et al., 2016***; ***Hughes et al., 2017***). S1S2D5-His Affimer expression prevented the accumulation of HIRA in PML NBs upon IFNβ treatment (***Figure 3C***), without affecting HIRA nor PML protein levels (***Figure 3—figure supplement 1A***). Collectively, our results demonstrate

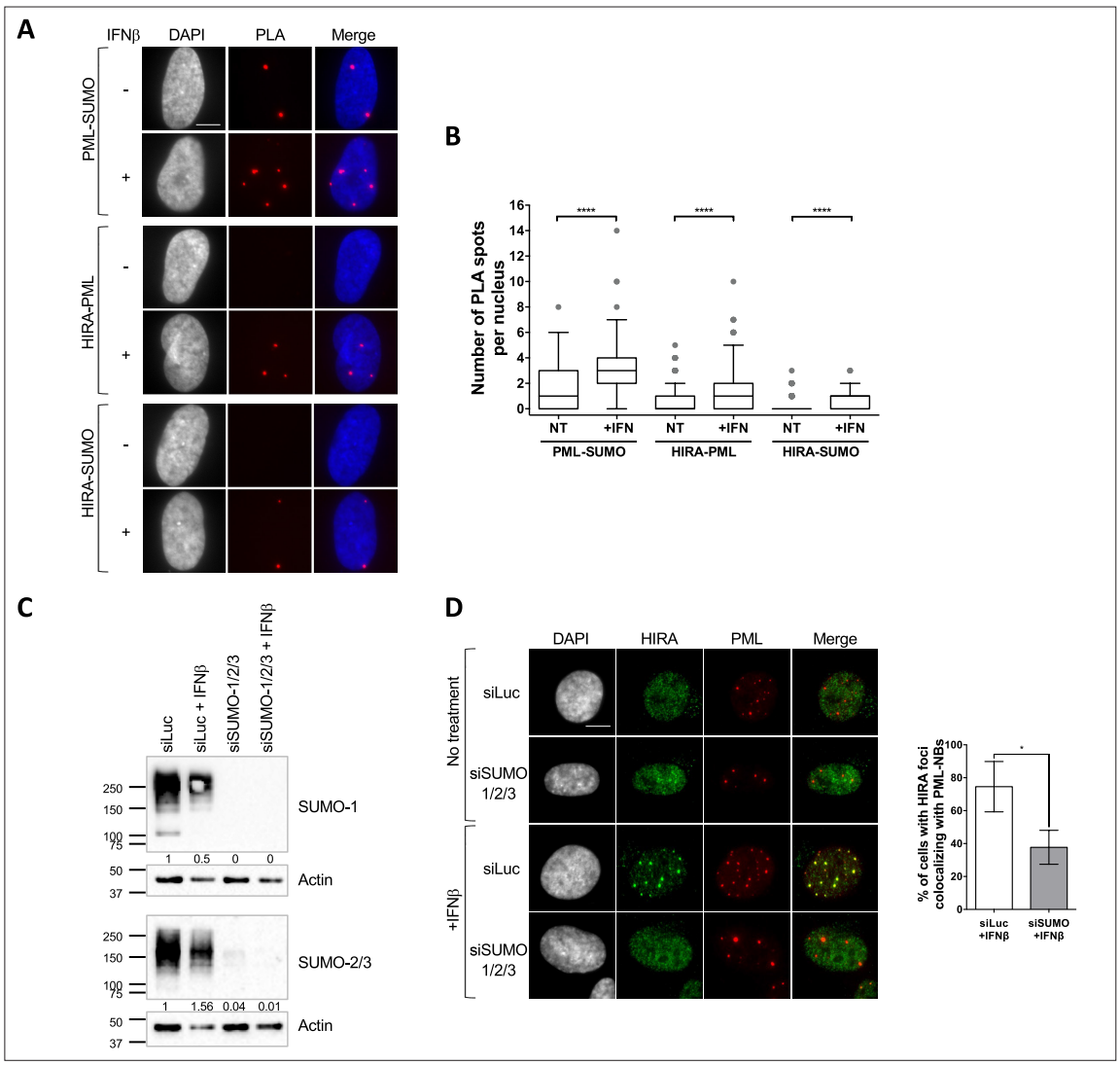


Figure 2. HIRA recruitment to PML NBs is dependent on SUMO proteins. (**A**) Fluorescence microscopy visualization of Proximity Ligation Assays (PLA) signals (red) obtained after incubation of anti-PML +anti SUMO, anti-HIRA +anti PML or anti-HIRA +anti SUMO antibodies on BJ cells treated or not with IFNβ at 1000 U/mL for 24 h. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey or blue on the merge). Scale bar represents 10 µm. (**B**) Box-and-whisker plot shows the number of PLA spots detected in cells described in A. In average, 200 nuclei/condition were analyzed from three independent experiments. The line inside the box represents the median of all observations with interquartile range. p-values (Mann-Whitney u-test): ****<0.0001. (**C**) Western-blot visualization of SUMO-1 and SUMO-2/3 from total cellular extracts of BJ cells treated with the indicated siRNAs for 48 hr and with IFNβ at 1000 U/mL during the last 24 hr. Actin is a loading control. Quantification of SUMO-1 and SUMO-2/3 levels relative to tubulin are shown below the WB (numbers are representative from three independent experiments). (**D**) (left) Fluorescence microscopy visualization of HIRA (green) and PML (red) in BJ cells treated with siRNAs as described in C. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar represents 10 µm. (right) Histograms show quantitative analysis of cells with HIRA localization at PML NBs. Numbers represent the mean of three independent experiments (± SD). p-value (Student t-test): *<0.05.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 2:

Figure 2 continued on next page

Figure 2 continued

Source data 1. Raw WB for ***Figure 2C*** for SUMO1.

Source data 2. Raw WB for ***Figure 2C*** for SUMO1 with labels.

Source data 3. Raw WB for ***Figure 2C*** for Actin.

Source data 4. Raw WB for ***Figure 2C*** for Actin with labels.

Source data 5. Raw WB for ***Figure 2C*** for SUMO2/3.

Source data 6. Raw WB for ***Figure 2C*** for SUMO1 with labels.

Source data 7. Raw WB for ***Figure 2C*** for Actin (bottom panel).

Source data 8. Raw WB for ***Figure 2C*** for Actin (bottom panel) with labels.

Figure supplement 1. HIRA accumulation in PML NBs does not depend on overexpression of SUMO proteins nor on its SUMOylation.

that SUMO-SIM interactions play an important role in the targeting of HIRA in PML NBs in response to IFNβ.

PML is known to be mainly SUMOylated on lysines K65, K160, and K490 (***Kamitani et al., 1998***). Immortalized *Pml*$^{-/-}$ mouse embryonic fibroblasts (MEFs) reconstituted with a doxycyclin-inducible wild-type Myc-tagged version of human PML (Myc-PML WT) or a PML mutated on its three main SUMOylation sites (Myc-PML 3K) were used to investigate the specific requirements for PML SUMOylation in HIRA partitioning (***Figure 3D***). We first verified that HIRA accumulation in PML NBs was conserved in wild-type but not *Pml*$^{-/-}$ MEFs upon activation of the IFN-I pathway (***Figure 3—figure supplement 1B***). Upon doxycyclin induction, Myc-PML WT or its mutated form were expressed at high levels in *Pml*$^{-/-}$ MEFs (***Figure 3D***). Despite a recurrent diminution in the amount of the ectopic PML proteins following addition of mouse IFNα, possibly because of a lower efficiency of the doxycyline induction of ectopic PML transcription in IFN-I treated cells (***Figure 3D***), the wild type PML rescued HIRA accumulation in ectopically formed PML NBs unlike the PML 3K, which showed no colocalization with HIRA (***Figure 3E***). Of note, super resolution microscopy analyses of PML 3K-expressing MEFs reveal that PML 3K form spherical structures exactly like WT PML (***Sahin et al., 2014***). These data demonstrate that PML SUMOylation on K65, K160, and K490 is required for HIRA recruitment in PML NBs.

Multivalent interactions between client SIM motifs and SUMOylated lysines on the PML protein are implicated in client recruitment in PML NBs, as shown for DAXX (***Banani et al., 2016***; ***Sahin et al., 2014***). Using JASSA (***Beauclair et al., 2015***) and GPS-SUMO (***Zhao et al., 2014***), we selected a set of five putative SIM motifs in HIRA protein sequence and tested whether they were involved in HIRA recruitment in PML NBs by mutating them individually (***Figure 3F***). Cells expressing the wild-type (WT) tagged version of HIRA (HIRA-HA WT) displayed ectopic HIRA accumulation in PML NBs upon IFNβ treatment (***Figure 3F***), as well as without IFNβ treatment (***Figure 4A*** and ***Figure 3—figure supplement 1C***). HIRA-HA mSIM1 and mSIM3 mutants did not show sufficient expression in individual cells to analyze their localization. HIRA-HA mSIM4 and mSIM5 mutants showed a normal accumulation in PML NBs (***Figure 3—figure supplement 1D***). Interestingly, the HIRA-HA mSIM2 showed a significant decrease in its accumulation in PML NBs with (***Figure 3F***) or without (***Figure 3—figure supplement 1C***) IFNβ treatment. This data confirms the importance of the SUMO-SIM interaction pathway in general, and at least, the putative SIM2 motif for the recruitment of the overexpressed ectopic HIRA in PML NBs regardless of the presence of IFNβ. Unfortunately, the levels of HIRA-HA mSIM2 expression remained very low at the cell population level compared to HIRA-HA WT (***Figure 3—figure supplement 1E***), preventing any biochemical analyses. Since SP100 is increased upon IFNβ treatment (***Figure 1F***) and is required for HIRA localization in PML NBs (***McFarlane et al., 2019***), we sought to refine further its contribution for HIRA accumulation in PML NBs. Knock-down of SP100 abrogated HIRA partitioning in PML NBs (***Figure 3—figure supplement 2A–B***), confirming previous data (***McFarlane et al., 2019***), without impacting DAXX localization at PML NBs (***Figure 3—figure supplement 2C***). Overexpression of an ectopic EYFP-SP100 protein rescued HIRA accumulation in PML NBs, as well as an ectopic EYFP-SP100 mutated on its main SUMOylation site K297R (***Figure 3—figure supplement 2D–F***). Overall, our data argue for a multistep molecular mechanism, involving PML SUMOylation, a putative SIM motif on HIRA, as well as SP100 regardless of its SUMOylation on K297R, in the accumulation of HIRA in PML NBs following activation of the IFN-I signaling pathway.

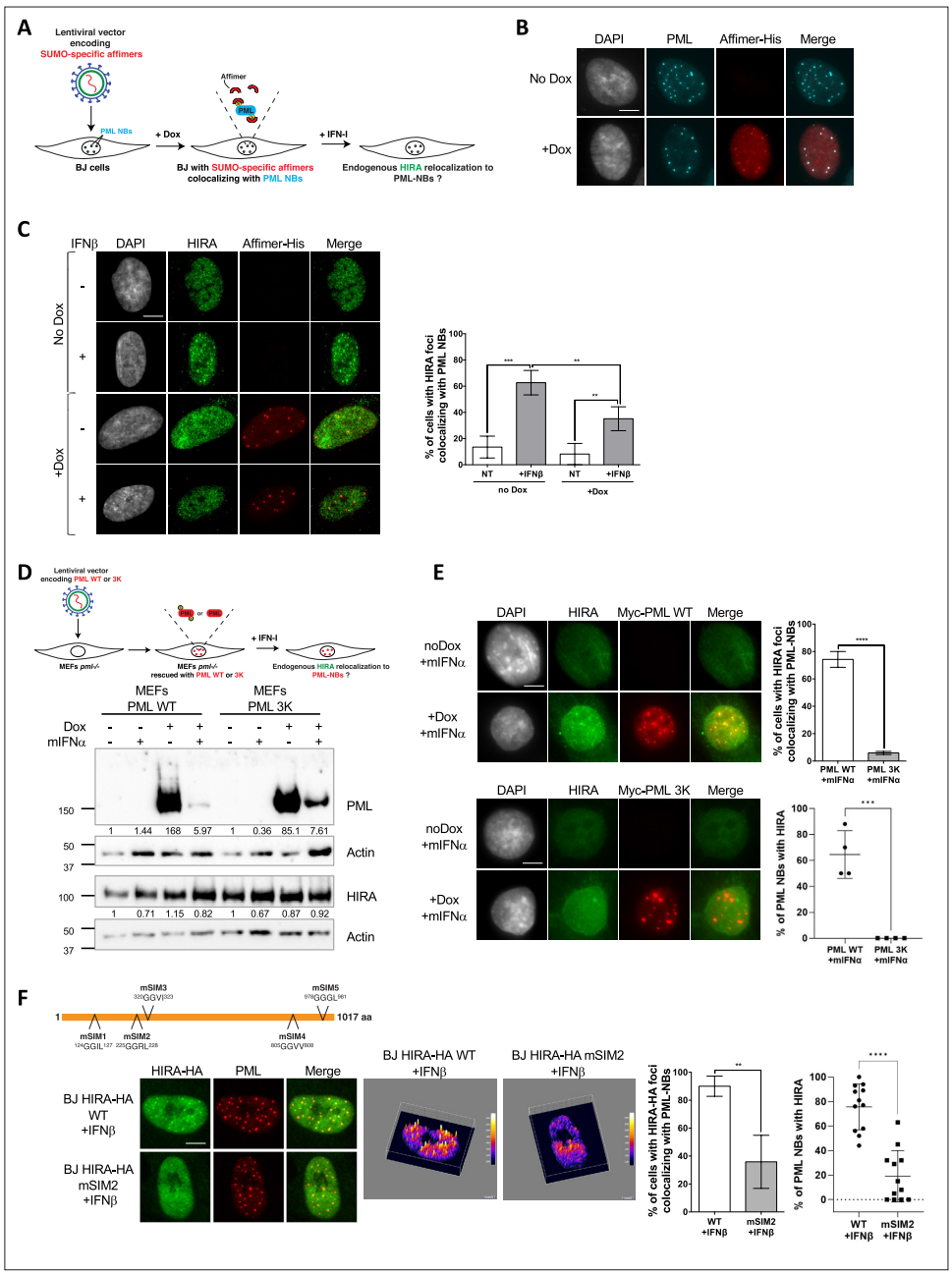


Figure 3. HIRA recruitment to PML NBs relies on SIM-SUMO interactions. (**A**) Experimental design to assess SUMO-specific Affimers impact on HIRA relocalization to PML NBs. BJ cells were transduced with a Dox-inducible lentiviral vector encoding for a 6xHis-tagged SUMO-specific S1S2D5 Affimer. When expressed, S1S2D5-His Affimers localize at PML NBs through their interactions with SUMOylated PML. (**B**) Fluorescence microscopy visualization PML (cyan) and S1S2D5-His Affimer marked with His antibody (red) in transduced BJ cells induced or not with doxycycline at 100 ng/mL for 30 hr.

Figure 3 continued on next page

Figure 3 continued

Colocalization of the S1S2D5-His Affimer (red) and PML NBs (cyan) produces white spots. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar represents 10 µm. (**C**) (left) Fluorescence microscopy visualization HIRA (green) and S1S2D5-His Affimer marked with His antibody (red) in transduced BJ cells induced or not with doxycycline at 100 ng/mL for 30 hr and treated with IFNβ at 1000 U/mL for the last 24 hr. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar represents 10 µm. (right) Histogram shows quantitative analysis of cells with HIRA localization at PML NBs. Numbers represent the mean of four independent experiments (± SD). p-values (Student t-test): **<0.01; ***<0.001. (**D**) (top) Experimental design to assess SUMOylated PML requirement for HIRA accumulation to PML NBs. MEFs *Pml*$^{-/-}$ cells were transduced with Dox-inducible lentiviral vectors encoding for Myc-tagged WT or 3K non-SUMOylable PML proteins. Cells were then treated with murine type I IFNα and HIRA localization was observed by fluorescence microscopy. (bottom) Myc-PML proteins expression was verified by western blot analysis of human PML from total cellular extracts of MEFs cells describe above. HIRA proteins level was also verified. Actin is a loading control. Quantification of PML and HIRA levels relative to Actin are shown below the WB (numbers are representative of three independent experiments). (**E**) (left) Fluorescence microscopy visualization of HIRA (green) and Myc-PML with Myc antibody (red) on MEFs *Pml*$^{-/-}$ cells rescued with Myc-tagged WT (top) or 3K (bottom) PML proteins through doxycycline treatment at 100 ng/mL for 24 hr. Cells were at the same time treated with murine IFNα at 1000 U/mL. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bars represents 10 µm. (right top) Histogram shows quantitative analysis of cells with HIRA localization at ectopic WT or 3K PML NBs in MEFs PML$^{-/-}$ cells treated as on the left panel. Numbers represent the mean of three independent experiments (± SD). (right bottom) Histogram shows quantitative analysis of the percentage of PML NBs per cell showing colocalization with HIRA in MEFs PML$^{-/-}$ cells treated as on the left panel. p-value (Student t-test): ***<0.001; ****<0.0001. (**F**) (top) Schematic representation of the localization of the mutations on putative SIM motifs on HIRA protein. (bottom left) Fluorescence microscopy visualization of HIRA-HA marked by HA antibody (green) and PML (red) in BJ cells stably transduced with HIRA-HA WT or HIRA-HA mSIM2 mutant and treated with IFNβ at 1000 U/mL for 24 hr. Scale bar represents 10 µm. (bottom middle) Graphics show HA signal intensity of each pixel within the nuclei depicted on the left panel in a 3D-surface plot. Higher expression signal appears in yellow to white colors. (bottom right) Histograms show quantitative analysis of cells with HIRA-HA localization in PML NBs (mean of three independent experiments [± SD]) or quantitative analysis of the percentage of PML NBs per cell showing colocalization with HIRA in BJ cells treated as on the bottom left panel. p-value (Student t-test): **<0.01; ****<0.0001.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 3:

Source data 1. Raw WB for ***Figure 3D*** for PML and Actin.

Source data 2. Raw WB for ***Figure 3D*** for PML and Actin with labels.

Source data 3. Raw WB for ***Figure 3D*** for HIRA.

Source data 4. Raw WB for ***Figure 3D*** for HIRA with labels.

Source data 5. Raw WB for ***Figure 3D*** for Actin.

Source data 6. Raw WB for ***Figure 3D*** for Actin with labels.

Figure supplement 1. HIRA accumulation in PML NBs depends on PML and on a putative SIM motif on HIRA.

Figure supplement 1—source data 1. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 1A*** for HIRA.

Figure supplement 1—source data 2. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 1A*** for HIRA with labels.

Figure supplement 1—source data 3. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 1A*** for PML.

Figure supplement 1—source data 4. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 1A*** for PML with labels.

Figure supplement 1—source data 5. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 1A*** for tubulin.

Figure supplement 1—source data 6. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 1A*** for tubulin with labels.

Figure supplement 1—source data 7. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 1E*** for HA.

Figure supplement 1—source data 8. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 1E*** for HA with labels.

Figure supplement 1—source data 9. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 1E*** for tubulin.

Figure supplement 1—source data 10. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 1E*** for tubulin with labels.

Figure supplement 2. HIRA accumulation in PML NBs depends on SP100, independent of its SUMOylation on K297R.

Figure supplement 2—source data 1. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 2B*** (left panel) for SP100 and tubulin.

Figure supplement 2—source data 2. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 2B*** (left panel) for SP100 and tubulin with labels.

Figure supplement 2—source data 3. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 2B*** (right panel) for HIRA.

Figure supplement 2—source data 4. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 2B*** (right panel) for HIRA with labels.

Figure supplement 2—source data 5. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 2B*** (right panel) for H3.3 and tubulin.

Figure supplement 2—source data 6. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 2B*** (right panel) for H3.3 and tubulin with labels.

Figure supplement 2—source data 7. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 2F*** (left panel) for SP100.

Figure supplement 2—source data 8. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 2F*** (left panel) for SP100 with labels.

Figure supplement 2—source data 9. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 2F*** (left panel) for tubulin.

Figure supplement 2—source data 10. Raw WB for ***Figure 3—figure supplement 2F*** (left panel) for tubulin with labels.

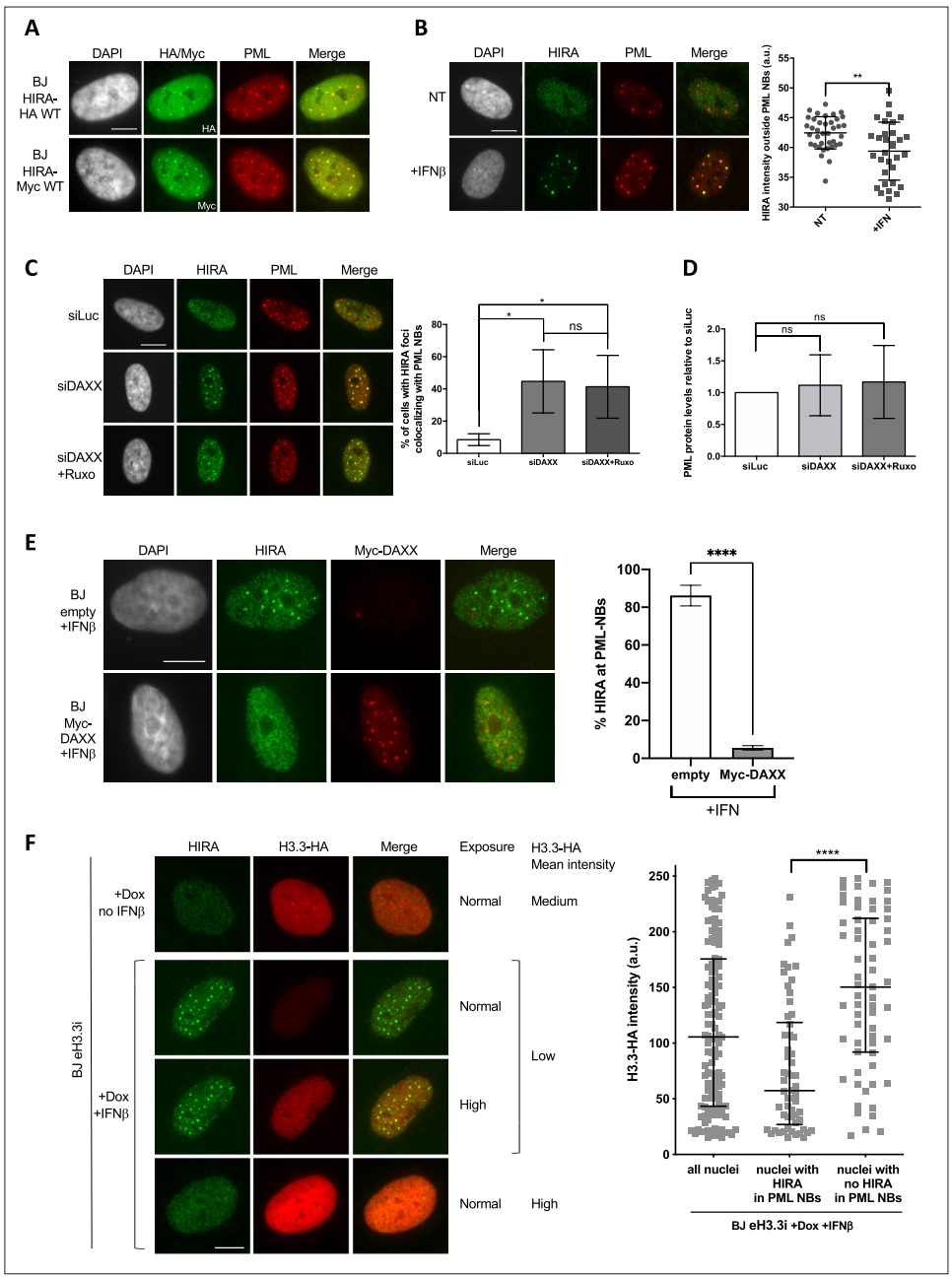


Figure 4. HIRA accumulation in PML NBs depends on DAXX and H3.3 levels. (**A**) Fluorescence microscopy visualization of HIRA-HA or HIRA-Myc marked respectively with HA and Myc antibodies (green) and PML (red) in BJ HIRA-HA WT and BJ HIRA-Myc WT cells. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar represents 10 µm. (**B**) (left) Fluorescence microscopy visualization of HIRA (green) and PML (red) in BJ cells treated with IFNβ at 1000 U/mL for 24 hr (+IFNβ) or left untreated (NT). Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar represents 10 µm. (right) Histogram

Figure 4 continued on next page

Figure 4 continued

shows quantification of HIRA mean nuclear fluorescence intensity outside PML NBs (a.u: arbitrary units) in nuclei from five independent experiments. Bars represent median with interquartile range. p-values (Mann-Whitney u-test): **<0.01 (**C**) (left) Fluorescence microscopy visualization of HIRA (green) and PML (red) in BJ cells treated with the indicated siRNAs for 48 hr. Ruxolitinib (Ruxo) was added at 2 µM in the last 24 hr. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bars represent 10 µm. (right) Histogram shows quantitative analysis of cells with HIRA localization at PML NBs. p-values (Student t-test): *<0,05; ns: non significant. Numbers represent the mean of three independent experiments (± SD). (**D**) Histogram shows quantitative analysis of PML protein levels from western blot analysis presented in ***Figure 4—figure supplement 1A***. p-values (Student t-test): ns: non significant. Numbers represent the mean of three independent experiments (± SD). (**E**) (left) Fluorescence microscopy visualization of HIRA (green) and Myc (red) in BJ cells transduced with a control retrovirus (empty) or with a retrovirus expressing Myc-DAXX for 48 hr. Cells were treated with IFNβ at 1000 U/ml in the last 24 hr. Cell nuclei are visualized by DAPI staining (grey). Scale bar represent 10 µm. (right) Histogram shows quantitative analysis of cells with HIRA localization at PML NBs. Numbers represent the mean of three independent experiments (± SD). p-value (Student t-test): ****<0.0001; ns: non significant. (**F**) (left) Fluorescence microscopy visualization of HIRA (green) and H3.3-HA marked by HA antibody (red) in BJ eH3.3i cells treated with doxycyclin at 100 ng/mL and with or without IFNβ at 1000 U/mL for 24 hr. High exposure indicates a lane where H3.3-HA signal was specifically increased in order to show H3.3-HA localization in PML NBs without saturating the signal in cells with higher expression. Scale bar represents 10 µm. (right) Quantification of nuclear H3.3-HA intensity levels in BJ eH3.3i cells treated as on the left panel. Mean H3.3-HA intensity levels were calculated on a pool of n=121 nuclei from three independent experiments. Nuclei were then separated on basis of accumulation of HIRA in PML NBs (nuclei with HIRA in PML NBs, n=58) or without it (nuclei with no HIRA in PML NBs, n=63) and mean H3.3-HA intensity was plotted for each category. Bars represent median with interquartile range. p-values (Mann-Whitney u-test): ****<0.0001.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 4:

Figure supplement 1. HIRA accumulation in PML NBs upon IFN-I treatment can be modulated by the pool of DAXX in primary cells.

Figure supplement 1—source data 1. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1A*** for PML.

Figure supplement 1—source data 2. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1A*** for PML with labels.

Figure supplement 1—source data 3. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1A*** for DAXX and tubulin.

Figure supplement 1—source data 4. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1A*** for DAXX and tubulin with labels.

Figure supplement 1—source data 5. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1A*** for HIRA.

Figure supplement 1—source data 6. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1A*** for HIRA with labels.

Figure supplement 1—source data 7. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1B*** for DAXX.

Figure supplement 1—source data 8. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1B*** for DAXX with labels.

Figure supplement 1—source data 9. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1B*** for SP100.

Figure supplement 1—source data 10. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1B*** for SP100 with labels.

Figure supplement 1—source data 11. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1B*** for tubulin.

Figure supplement 1—source data 12. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1B*** for tubulin with labels.

Figure supplement 1—source data 13. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1E*** for Myc.

Figure supplement 1—source data 14. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1E*** for Myc with labels.

Figure supplement 1—source data 15. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1E*** for H3.3 and tubulin.

Figure supplement 1—source data 16. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 1E*** for H3.3 and tubulin with labels.

Figure supplement 2. HIRA accumulation in PML NBs upon IFN-I can be modulated by the pool of H3.3 histones in primary cells.

Figure supplement 2—source data 1. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 2B*** for HA and tubulin.

Figure supplement 2—source data 2. Raw WB for ***Figure 4—figure supplement 2B*** for HA and tubulin with labels.

PML NBs serve as buffering sites for HIRA

So far, our data have shown that the accumulation of HIRA in PML NBs is correlated to an increase in PML/SP100 proteins upon IFN-I treatment. Importantly, ectopic expression of HIRA led to its accumulation in PML NBs without the need of IFN-I stimulation (***Ye et al., 2007b***; ***Figure 4A***), suggesting that PML NBs could buffer an excess of HIRA proteins. In addition, quantification of nucleoplasmic levels of HIRA outside PML NBs showed a significant decrease after IFNβ treatment (***Figure 4B***), suggesting that PML NBs could act as sequestration places for HIRA upon IFN-I, leading to its substantial depletion from the surrounding nuclear space. We thus focused our attention on understanding the molecular mechanisms of this putative buffering function. Remarkably, PML NBs have a strong connection with the H3.3 chromatin assembly pathway. Soluble newly synthesized H3.3-H4 dimers localize in PML NBs in a DAXX-dependent manner in human primary cells, before deposition onto chromatin (***Corpet et al., 2014***; ***Delbarre et al., 2013***). We thus reasoned that a modulation of the nucleoplasmic pool

of DAXX or H3.3-H4 could impact on the HIRA accumulation in PML NBs by competing for binding sites within PML NBs or by modulating the chaperone activity of HIRA, respectively. Knockdown of DAXX led to a significant increase of the baseline amounts of cells showing HIRA accumulation in PML NBs in the absence of IFN-I treatment (***Figure 4C***). This HIRA behavior was not affected by ruxolitinib, excluding a contribution of the IFN-I signaling pathway (***Figure 4C***, ***Figure 4—figure supplement 1A***), but was still dependent on SP100 (***Figure 4—figure supplement 1B–C***). No significant increase for PML protein was observed confirming that PML concentration changes is not an absolute prerequisite for the accumulation of HIRA in PML NBs (***Figure 4D*** and ***Figure 4—figure supplement 1A***). The reverse approach consisting in the overexpression of an ectopic Myc-DAXX protein completely abrogates HIRA accumulation in PML NBs upon IFN-I treatment (***Figure 4E*** and ***Figure 4—figure supplement 1D–E***). Thus modulation of DAXX levels regulates HIRA accumulation in PML NBs.

To study the impact of soluble H3.3 levels on HIRA behavior, we used a cell line expressing an inducible HA-tagged form of H3.3 (BJ eH3.3i). Treatment with doxycyclin triggered a strong, yet highly variable, expression of eH3.3 (***Figure 4F***, ***Figure 4—figure supplement 2A, B***), consistent with the polyclonal nature of the cells. As expected, doxycyclin did not impact HIRA localization in PML NBs in absence of IFNβ, and IFNβ triggered a normal accumulation of HIRA in PML NBs in these cells (***Figure 4—figure supplement 2A***). Induced expression of eH3.3 did not significantly impact on HIRA accumulation in PML NBs upon IFNβ at a cell population level (***Figure 4—figure supplement 2A***). However, close examination of individual cells showed an impaired accumulation of HIRA in PML NBs in cells with a strong expression of eH3.3, unlike low eH3.3 expressing cells (***Figure 4F***). Quantification of the mean eH3.3 nuclear fluorescence intensity showed that it was low on average in nuclei with accumulation of HIRA in PML NBs. On the contrary, nuclei with absence of HIRA in PML NBs correspond to those with a significant shift towards higher eH3.3 intensities (***Figure 4F***). Similar results were obtained in human primary lung fibroblasts excluding a cell-type effect (***Figure 4—figure supplement 2C***). These data highlight a strong antagonism between the presence of a H3.3 nucleoplasmic pool above a threshold, and HIRA accumulation in PML NBs upon IFNβ treatment. Thus, while PML NBs do not seem to play a major role as SUMOylation hotspots for HIRA, they function as buffering/sequestration places for HIRA dependent on the physiological state of the cell.

PML depletion but not HIRA impairs ISGs expression

In order to look whether PML NBs could also function as regulatory hubs together with HIRA in the inflammatory response, we first analysed if HIRA and PML participate in ISGs transcriptional regulation. IFN-I is responsible for the upregulation of hundreds of ISGs as part of the innate immune response participating in the inhibition of virus replication (***Shaw et al., 2017***). We analyzed the expression of a selected set of ISGs, *MX1*, *OAS1*, *ISG15,* or *ISG54* (*IFIT2*) in cells treated with IFNβ for 6 or 24 hr. mRNA levels of these ISGs increased strongly after IFNβ treatment, peaking at 6 hr of treatment and slightly decreasing at 24 hr post addition of IFNβ (***Figure 5—figure supplement 1A***). Depletion of HIRA had no significant impact on ISGs expression at 6 and 24 hr of IFNβ stimulation (***Figure 5—figure supplement 1B–C***), consistent with previous reports (***McFarlane et al., 2019***; ***Rai et al., 2017***). Compared to ISGs transcription climax at 6 hr post IFNβ, the peak of accumulation of HIRA in PML NBs at 24 hr post addition of IFNβ (***Figure 5—figure supplement 1D***) suggests that the latter might not be directly involved in ISGs transcriptional upregulation. In contrast, PML depletion led to a significant reduction in ISGs expression both at 6 and 24 hr after IFNβ stimulation (***Figure 5—figure supplement 1C***). *MX1*, *OAS1*, *ISG15,* or *ISG54* mRNA levels were only 27%, 16%, 28%, or 35% of the levels observed in 6 hr IFNβ-treated cells, respectively. Thus, these results suggest an essential role of PML in the IFN-I-dependent transcriptional upregulation of ISGs, which is independent of HIRA.

Interferon-stimulated gene loci are juxtaposed to PML NBs after IFN-I stimulation

PML NBs make direct physical contacts with surrounding chromatin regions and these associations may serve to modulate genome functions and gene expression (***Corpet et al., 2020***). In the context of the IFNγ inflammatory response, genes within the MHCII locus are located in proximity of PML NBs (***Gialitakis et al., 2010***). Given the above results, we thought to examine the spatial connection between PML NBs and specific ISG loci. We performed immunostaining of the PML protein, together with fluorescence in situ hybridization (immuno-FISH) to detect the *PML*, *MX1*, *OAS1* gene loci in cells

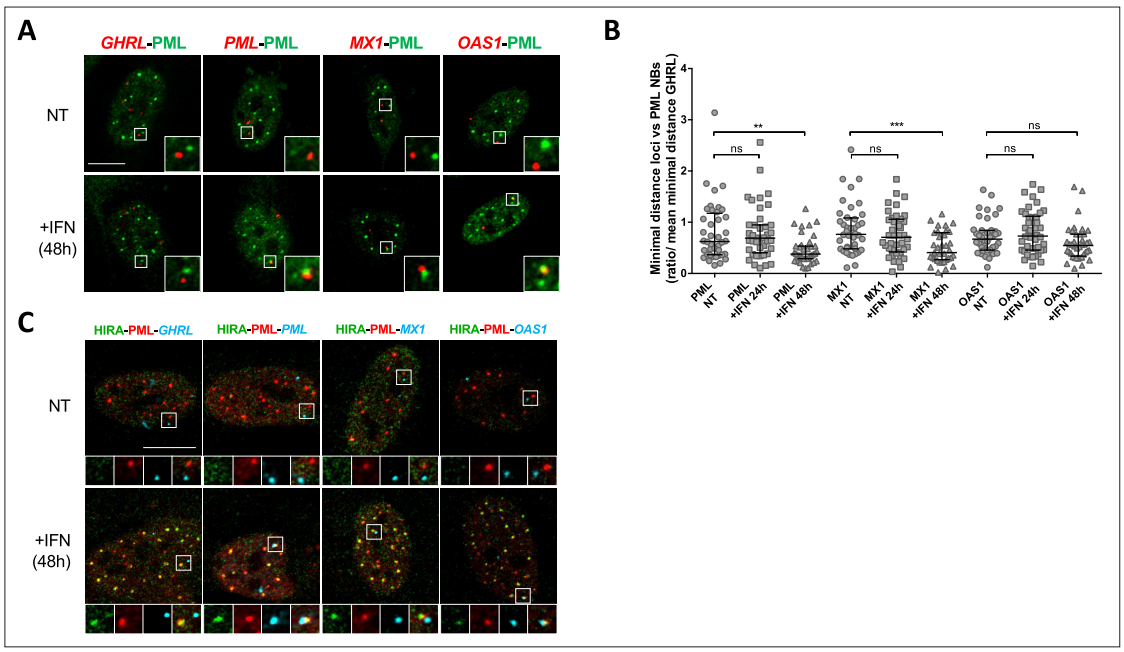


Figure 5. PML NBs become juxtaposed to ISGs loci upon IFN-I treatment. (**A**) Confocal fluorescence microscopy visualization of IF-FISH against PML proteins (green) and *GHRL* control gene locus (red) or *PML*, *MX1* or *OAS1* ISGs loci (red) in BJ cells treated with IFNβ at 1000 U/mL for 48 hr. Insets represent enlarged images (3 X) of selected areas and show the relative distance between one PML NB and one gene locus. Scale bar represents 10 µm. (**B**) Scatter plot shows the ratio of the minimal distance between PML NBs and ISGs loci on the mean minimal distance between PML NBs and *GHRL* control gene locus in nuclei from BJ cells treated or not with IFNβ at 1000 U/mL for the indicated time. The line in the middle represents the median of all observations. Results are from one representative experiment out of two experiments and are calculated on an average of 40 nuclei/condition. p-value (Mann-Whitney u-test): **<0.01; ***<0.001; ns: non significant. (**C**) Confocal fluorescence microscopy visualization of IF-FISH against HIRA (green) and PML proteins (red) and *GHRL* control gene locus (cyan) or *PML*, *MX1*, or *OAS1* ISGs loci (cyan) in BJ cells treated as in B. Insets and scale bar are as in B.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 5:

Figure supplement 1. ISGs are upregulated upon IFN-I treatment in a PML-dependent manner and become juxtaposed to PML NBs.

Figure supplement 1—source data 1. Raw WB for ***Figure 5—figure supplement 1B*** for HIRA.

Figure supplement 1—source data 2. Raw WB for ***Figure 5—figure supplement 1B*** for HIRA with labels.

Figure supplement 1—source data 3. Raw WB for ***Figure 5—figure supplement 1B*** for PML.

Figure supplement 1—source data 4. Raw WB for ***Figure 5—figure supplement 1B*** for PML with labels.

Figure supplement 1—source data 5. Raw WB for ***Figure 5—figure supplement 1B*** for tubulin.

Figure supplement 1—source data 6. Raw WB for ***Figure 5—figure supplement 1B*** for tubulin with labels.

treated or not with IFNβ. PML was used as a positive ISG control since previous immuno-trap analyses found a specific interaction between PML NBs and the *PML* gene locus upon IFNα treatment (***Ching et al., 2013***). To evaluate the specificity of potential spatial changes, we also scored localization of the Grehlin and Obestatin Prepropeptide (*GHRL*) locus, which is not an ISG (***Eggenberger et al., 2019***) and is localized in heterochromatin regions (***Becker et al., 2017***). Visual inspection showed an overall closer locus-to-PML NB proximity of *PML*, *MX1* and *OAS1*, but not *GHRL*, in IFNβ-treated cells relative to untreated cells (***Figure 5A***). To quantify the association of PML NB with ISG loci, we calculated the mean minimal distance (mmd) between each locus and the center of the closest PML NB per nucleus in untreated and treated cells. A decreased distance could be a consequence of the increased number and size of PML NBs upon IFNβ treatment (***Figure 5—figure supplement 1E***). We thus normalized the mmd for the ISGs to the one calculated for the *GHRL* locus. A marked decrease

in the mmd of PML NBs with the three loci was scored at 48 hr, which was significant for *PML* and *MX1* loci, reaching a calculated mmd of 0.67 µm and 0.72 µm, respectively, as compared to 1.06 µm for the *GHRL* locus (***Figure 5B***). We also confirm the presence of HIRA in PML NBs juxtaposed to ISGs by triple labelling (***Figure 5C***). The requirement of PML for the acute peak of transcription of ISGs at 6 hr of IFNβ (***Figure 5—figure supplement 1C***), in comparison to the occurrence of the juxtaposition of PML NBs with the ISGs loci at 48 hr post addition of IFNβ suggests that existing PML NBs are not directly involved in the transcriptional control of ISGs, but rather nucleate at ISGs loci from the PML proteins initially involved in ISGs transcription.

IFN-I stimulation triggers accumulation of endogenous H3.3 in the 3' end region of transcribed ISGs

Using a tagged version of H3.3 in MEF cells, previous studies showed an increased and prolonged deposition of ectopic H3.3 in the transcription end sites (TES) region of ISGs upon IFN-I stimulation (***Sarai et al., 2013***; ***Tamura et al., 2009***). We thus wondered whether PML and HIRA could functionally impact endogenous H3.3 deposition on ISGs using an H3.3-specific antibody previously validated in ChIP (***Lee et al., 2019***). The amount of H3.3 remained unaffected by 24 hr of IFNβ stimulation excluding a putative ISG-like behavior (***Figure 6—figure supplement 1A***). We first investigated H3.3 incorporation on *MX1*, *OAS1*, and *ISG54* (*IFIT2*) by qPCR. Three distinct regions of the selected ISGs were analyzed: the promoter region, located just upstream (–120 pb) of the transcriptional start site (TSS), the middle of the coding region (mid), and a distal site in the coding region near the TES (see map in ***Figure 6A***). A slight decrease of H3.3 occupancy at promoter regions was measured (***Figure 6A***). The reduction following IFN-I stimulation likely reflects transcription-induced nucleosome depletion known to happen for many genes upon stimulation (***Workman, 2006***). Remarkably, IFNβ stimulation induced H3.3 incorporation most noticeably over the distal sites of the coding regions (***Figure 6A***). This was concomitant with an increase in H3K36me3, a histone mark added by the methyltransferase SETD2, which moves with RNA pol II during transcription (***Figure 6—figure supplement 1B***). Use of a control IgG antibody did not lead to any significant amount of immunoprecipitated DNA (% input) in any of the conditions highlighting the specificity of our ChIP experiment (***Figure 6—figure supplement 1C***). In addition, no change in H3.3 occupancy was observed at an enhancer region known to be enriched with H3.3 (***Pchelintsev et al., 2013***), underscoring the specificity of H3.3 accumulation in ISGs (***Figure 6A***). Normalization of H3.3 signal over the total H3 histones signal, which showed no major changes in histone density, confirmed the increased amount of H3.3 at ISGs with a preference for the TES regions (***Figure 6—figure supplement 1D***). This fits with the known replication-independent replacement of canonical H3 histones with H3.3 during transcription (***Ahmad and Henikoff, 2002***; ***Mito et al., 2005***; ***Workman, 2006***). No noticeable H3.3 increase was observed at representative mid or TES regions at 6 or 12 hr of IFNβ treatment (***Figure 6—figure supplement 1E***). Therefore, H3.3 increased deposition most likely takes place after the peak of ISGs transcription at 6 hr of IFNβ (***Figure 5—figure supplement 1A***). Importantly, H3.3 deposition continued to increase for an extended period of time and was even higher at 48 hr of IFNβ, suggesting that it could leave a long-lasting chromatin mark on ISGs (***Figure 6—figure supplement 1E***).

We then performed ChIP-Seq analysis for endogenous H3.3 on cells treated or not with IFNβ for 24 hr. We first examined H3.3 enrichment over the gene bodies of a published panel of equivalent sized ISGs (n=48) or non-ISGs (n=48) (***McFarlane et al., 2019***). The levels of H3.3 significantly increased on ISGs in IFNβ-treated cells with a clear bias towards the TES regions of the genes (***Figure 6B***). In contrast, no significant difference of H3.3 enrichment could be observed across the non-ISGs (***Figure 6C***). We selected genes with the highest difference in H3.3 enrichment at the TES region between IFNβ-treated and non-treated cells, and performed Gene Ontology (GO) analysis. GO analysis showed a clear enrichment in genes involved in IFNα and IFNγ response comforting the specific enrichment of H3.3 on the TES region of ISGs as a prolonged response to an IFN-I stimulus (***Figure 6D***). To evaluate the identity of H3.3-enriched genes in an unbiased manner, we performed an independent GO analysis on all genes found in the ChIP peak calls. This yielded similar results with IFNα and IFNγ responses being the most highly significant GO terms (***Figure 6—figure supplement 1F***). Thus, these findings establish that IFN-I triggers a specific long-lasting H3.3 deposition on ISGs following IFN-I stimulus.

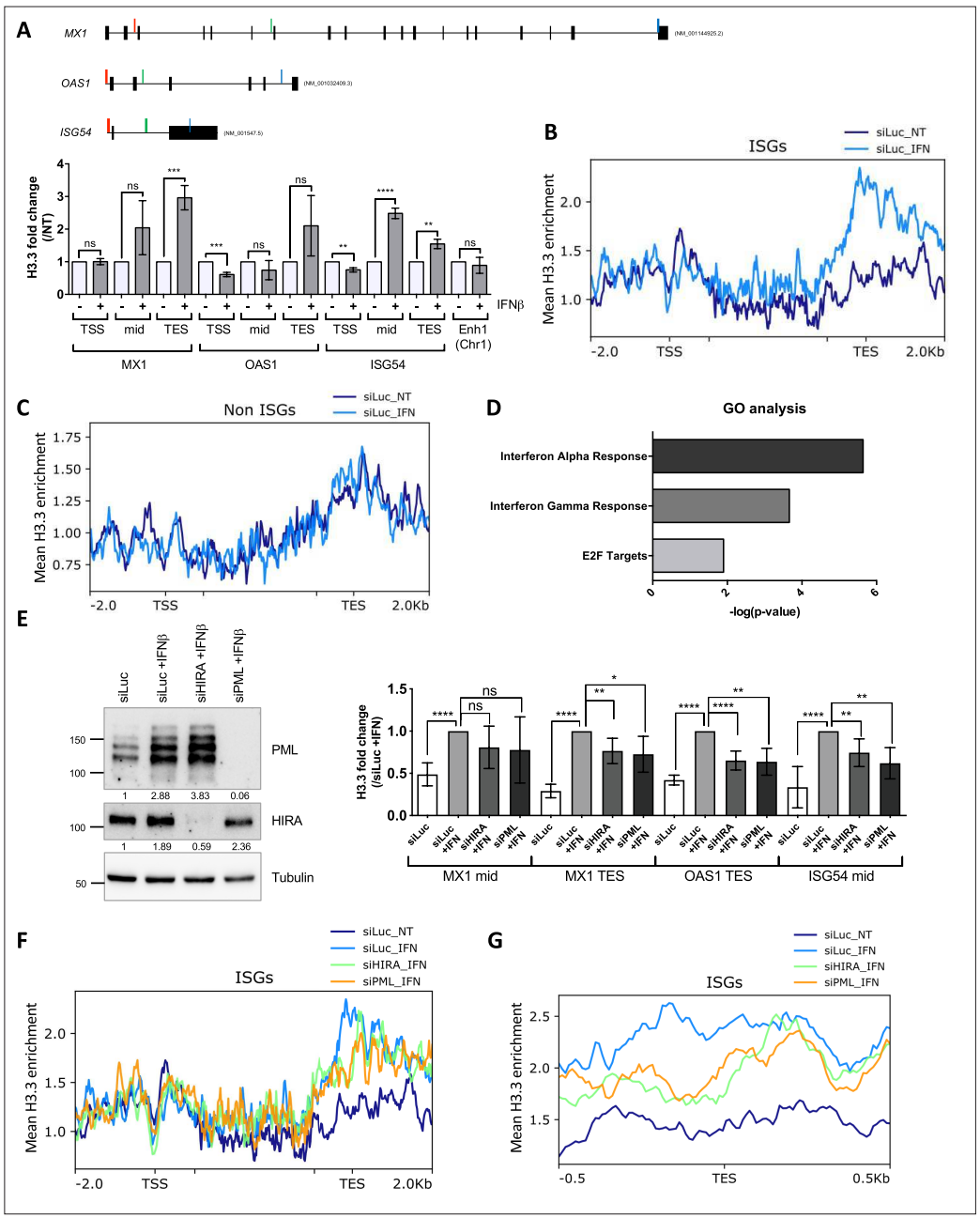


Figure 6. HIRA and PML depletions impair H3.3 enrichment at distal regions of ISGs. (**A**) (top) Schematic representation of *MX1*, *OAS1*, and *ISG54* gene loci. Localization of primers is marked in color: red, green, and blue for primers localized in the Transcription Start Site (TSS), mid or Transcription End Site (TES) region respectively. Black boxes represent exons and lines represent introns. (bottom) Histogram shows H3.3 enrichment fold change obtained through ChIP experiments on BJ cells treated or not with IFNβ at 1000 U/mL for 24 hr. Rationalization was performed on H3.3 enrichment in

Figure 6 continued on next page

Figure 6 continued

untreated cells. qPCR was performed on *MX1*, *OAS1*, and *ISG54* ISGs TSS, mid and TES regions and on one enhancer region on chromosome 1 (Enh1). Numbers represent the mean of three independent experiments (± SD). p-value (Student t-test): **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001; ns: non significant. (**B**) ChIP-Seq profile of H3.3 enrichment over 48 core ISGs (***McFarlane et al., 2019***) ranging from –2.0 kb to 2.0 kb downstream and upstream of the gene bodies in BJ cells with siLuc for 72 hr and treated or not with IFNβ at 1000 U/mL for the last 24 hr of siRNA treatment. (**C**) ChIP-Seq profile of H3.3 enrichment over 48 coding non-ISGs equal in size to core ISGs (***McFarlane et al., 2019***), ranging from –2.0 kb to 2.0 kb downstream and upstream of the gene bodies (regions from TSS to +1000 bp and from –1000 to TES being kept unscaled) in BJ cells treated as in B. (**D**) Gene Ontology analysis on genes showing the highest differential H3.3 enrichment (log2(Fold Change)>5) in the TES +/-0.5 kb region between IFNβ treated and not treated conditions. (**E**) (left) Western blot analysis of HIRA and PML from total cellular extracts of BJ cells treated with the indicated siRNAs for 72 hr and with IFNβ at 1000 U/mL for the last 24 hr of siRNAs treatment. Tubulin is a loading control. Quantification of PML and HIRA levels relative to Tubulin are shown below the WB (numbers are representative of three independent experiments). (right) Histogram shows H3.3 enrichment obtained through ChIP experiments on BJ cells treated as on the left panel. Rationalization was performed on H3.3 enrichment in siLuc +IFN treated cells. qPCR was performed on *MX1* mid and TES regions, *OAS1* TES region and *ISG54* mid region. Numbers represent the mean of four independent experiments (± SD). p-values (Student t-test): *<0.05; **<0.01; ****<0.0001; ns: non significant. (**F**) ChIP-Seq profile of H3.3 enrichment over 48 core ISGs (***McFarlane et al., 2019***) ranging from –2 kb before TSS to 2 kb downstream the TES in BJ cells treated as in E. (**G**) ChIP-Seq profile of H3.3 enrichment over 48 core ISGs (***McFarlane et al., 2019***) ranging from –0.5 kb to 0.5 kb downstream and upstream of the TES in BJ cells treated as in E.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 6:

Source data 1. Raw WB for ***Figure 6E*** for PML.

Source data 2. Raw WB for ***Figure 6E*** for PML with labels.

Source data 3. Raw WB for ***Figure 6E*** for HIRA.

Source data 4. Raw WB for ***Figure 6E*** for HIRA with labels.

Source data 5. Raw WB for ***Figure 6E*** for tubulin.

Source data 6. Raw WB for ***Figure 6E*** for tubulin with labels.

Figure supplement 1. H3.3 and H3K36m3 increase on ISGs upon IFN-I.

Figure supplement 1—source data 1. Raw WB for ***Figure 6—figure supplement 1A*** for H3.3 and tubulin.

Figure supplement 1—source data 2. Raw WB for ***Figure 6—figure supplement 1A*** for H3.3 and tubulin with labels.

Figure supplement 2. Overexpression of HIRA increases H3.3 deposition at ISGs TES region upon IFN-I.

Figure supplement 2—source data 1. Raw WB for ***Figure 6—figure supplement 2B*** for HIRA and tubulin.

Figure supplement 2—source data 2. Raw WB for ***Figure 6—figure supplement 2B*** for HIRA and tubulin with labels.

Figure supplement 2—source data 3. Raw WB for ***Figure 6—figure supplement 2B*** for HIRA (high exposure).

Figure supplement 2—source data 4. Raw WB for ***Figure 6—figure supplement 2B*** for HIRA (high exposure) with labels.

H3.3 deposition on ISGs is impaired upon HIRA or PML depletion

We next wondered whether HIRA and/or PML was essential for H3.3 deposition at ISGs. Cells were depleted of HIRA or PML (***Figure 6E***, left) and treated with IFNβ for 24 hr, before performing ChIP on H3.3. Knock-down of HIRA or PML led to a modest but consistent decrease in H3.3 at mid or TES regions of selected ISGs, suggesting the implication of these two proteins for the long-lasting H3.3 deposition on ISGs (***Figure 6E***, right). ChIP-Seq analysis confirmed a mild, but still significant, decrease in the loading of H3.3 at the TES on the panel of ISGs (*P*-value = 4,76e-03 for HIRA knock-down (KD) or 1.262e-03 for PML KD, as assessed by a paired Student's t-test) (***Figure 6F–G***). Representative *MX1*, *STAT1*, and *GCH1* genes, confirmed the deficit in H3.3 loading at the TES region of ISGs in the absence of HIRA or PML (***Figure 6—figure supplement 1G***). Of note, overexpression of HIRA, which increases the nucleoplasmic pool of HIRA as well as its accumulation in PML NBs (***Figure 4A***), triggered an increase in H3.3 loading upon IFN-I, as compared to cells with endogenous levels of HIRA (***Figure 6—figure supplement 2A–B***). We thus conclude that HIRA and PML both contribute to the increased long-lasting H3.3 deposition at the TES region of ISGs following the transcriptional peak associated to IFN stimulus.

Accumulation of HIRA in PML NBs is not necessary for transcription-coupled H3.3 deposition at ISGs

Given the role of PML NBs in HIRA buffering, and their function as chromosomal hubs regulating transcription of associated ISGs and H3.3 deposition on these genes, we then wanted to investigate if these two functions were interconnected. PML is known to be required for HIRA loading on ISGs

as already published (**McFarlane et al., 2019**), and as confirmed by reanalysis of McFarlane data (**Figure 7—figure supplement 1A**). While proximity of PML NBs with ISGs could be a means to target HIRA on these genes, we hypothesize that HIRA buffering in PML NBs and its role in H3.3 deposition at ISGs upon IFN-I stress might be two independent events. We thus analyzed if the accumulation of HIRA in PML NBs was a prerequisite for the increased deposition of H3.3 on ISGs. We depleted SP100 that strongly impairs HIRA recruitment in PML NBs (**Figure 3—figure supplement 2A–F** and **McFarlane et al., 2019**). SP100 depletion did not prevent H3.3 loading at the ISGs TES upon IFN-β stimulation, but on the contrary increased it (**Figure 7A–B**). Of note, SP100 depletion led to an important increase in ISGs transcription (**Figure 7—figure supplement 1B–C**). This is consistent with its role as a general transcriptional repressor (**Seeler et al., 1998**), and with the higher H3.3 loading on ISGs in these conditions. Simultaneous knock-down of SP100 and HIRA in IFN-I treated cells (**Figure 7B**) reduced H3.3 deposition at the level of the control siRNA (**Figure 7A**). Thus, this demonstrates that the increase in H3.3 loading on ISGs TES upon SP100 knockdown and following IFN-β stimulation is mediated by HIRA independently of its localization in PML NBs.

Discussion

There have been considerable efforts in defining the multiple roles of PML and PML NBs in the recent years including in chromatin dynamics. After having dissected the molecular mechanisms responsible for HIRA accumulation in PML NBs upon IFN-I treatment, we investigated the functional interplay of the PML NBs-HIRA-H3.3 axis in inflammatory response. Our work has revealed two independent roles for PML/PML NBs in (1) acting as buffering centers to modulate HIRA complex nucleoplasmic availability upon inflammatory stress and (2) regulating the transcriptional status of ISGs and the HIRA-mediated incorporation of H3.3 at these loci.

HIRA accumulation in PML NBs upon inflammatory stresses is dependent on functional SUMO-SIM interactions and on SP100

While senescence was the first stress shown to induce accumulation of HIRA complex in PML NBs (**Banumathy et al., 2009**; **Jiang et al., 2011**; **Rai et al., 2011**; **Zhang et al., 2005**), IFN-I signaling pathway was recently shown to be responsible for similar behavior of HIRA upon a viral infection (**Cohen et al., 2018**; **McFarlane et al., 2019**; **Rai et al., 2017**). Here, we extend and corroborate these findings to various inflammatory stresses, including TNFα, or a synthetic dsRNA (Polyl:C) that increase the amount of PML and SP100 proteins. We show that HIRA partitioning in PML NBs is mediated by SUMO-SIM interactions, that can be inhibited by saturating PML/PML NBs SUMO sites with specific Affimers or a SIM-containing client such as DAXX. We identified a putative SIM motif on HIRA sequence that participate in its recruitment in PML NBs. Interestingly, the VLRL SIM motif identified is followed by a Serine in the position 229 (S229). Phosphorylation adjacent to SIM motifs can lead to an increased affinity towards SUMO1 lysine residues (**Cappadocia et al., 2015**). Other post-translational modifications such as phosphorylation could thus be important in regulating HIRA partitioning by changing the affinity between HIRA and SUMOylated PML proteins/partners. Of note, glycogen synthase kinase 3β (GSK-3β) mediated-phosphorylation of HIRA on S697 was suggested to drive HIRA accumulation in PML NBs upon senescence entry (**Ye et al., 2007a**). Our data using *Pml*$^{-/-}$ MEFs reconstituted with PML WT or PML 3K highlight the importance of PML main SUMOylation sites in recruiting HIRA complex. In addition, SP100, a general transcriptional repressor and a resident protein of PML NBs, is also critical for HIRA accumulation in PML NBs, independently of its SUMOylation. Overall, our data demonstrate that SUMO-SIM interactions are essential but not sufficient for HIRA accumulation in PML NBs after IFN-I treatment. Hence, the use of SUMO-specific Affimers opens interesting avenues to interfere with client recruitments in PML NBs including HIRA.

PML NBs as buffering centers to regulate nucleoplasmic HIRA levels

Our study unveils an important aspect of the PML NBs-HIRA interplay, with PML NBs acting as buffering centers to regulate the excess pool of nucleoplasmic HIRA. First, previous studies (**Ye et al., 2007b**) confirmed by the present one, show that overexpression of an ectopic HIRA is sufficient to induce its accumulation in PML NBs in untreated cells. Second, we show that HIRA intensity level in the nucleus, outside PML NBs, decreases upon IFN-I treatment, while HIRA protein amounts slightly increases. Third, overexpression of DAXX totally abrogates HIRA accumulation in PML NBs upon IFN-I

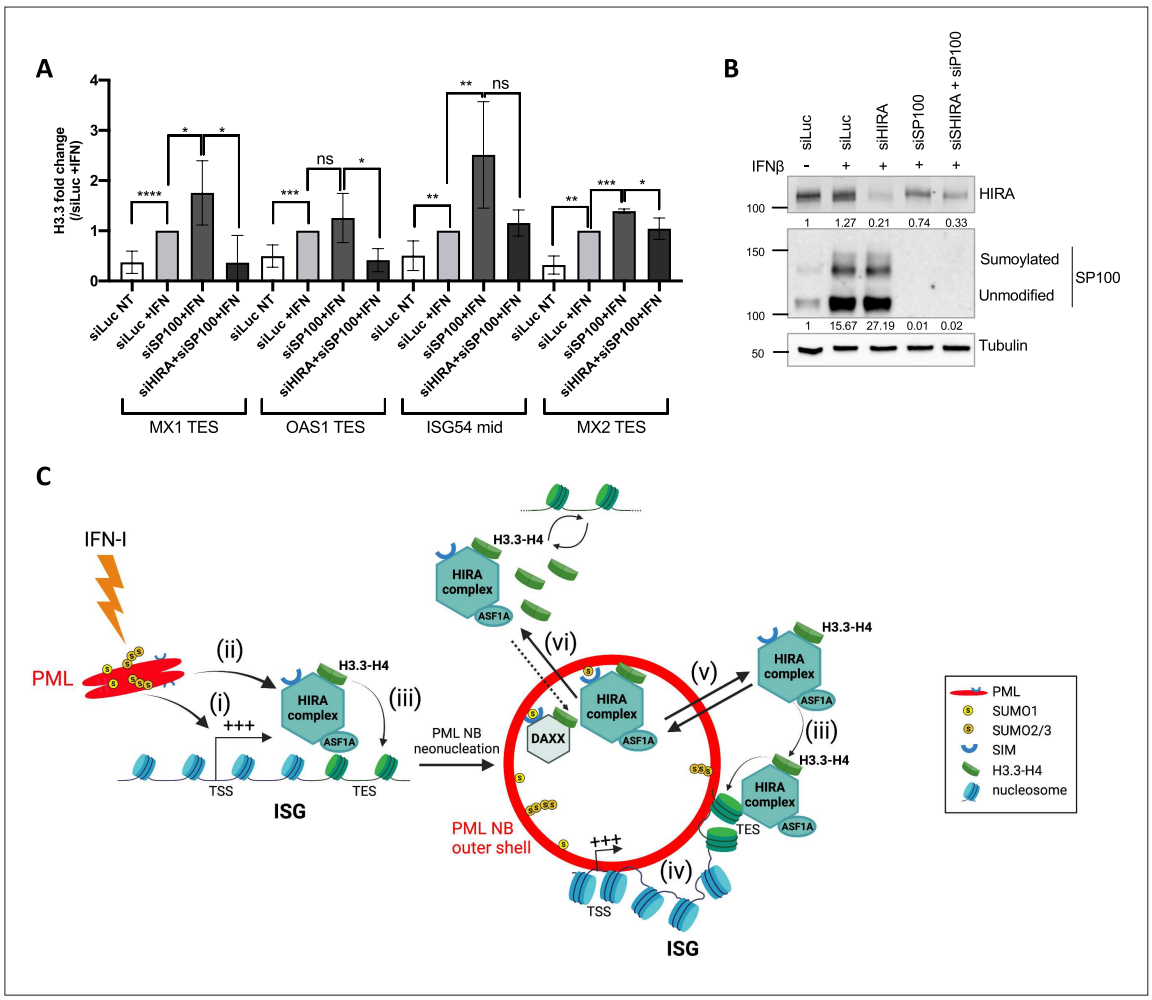


Figure 7. HIRA mediates H3.3 deposition during transcription of ISGs. (**A**) Histogram shows H3.3 enrichment obtained through ChIP experiments on BJ cells treated with the indicated siRNAs for 48 hr and with IFNβ at 1000 U/mL for the last 24 hr of siRNAs treatment. Rationalization was performed on H3.3 enrichment in siLuc +IFN treated cells. qPCR was performed on *MX1*, *OAS1*, and *MX2* TES regions as well as on *ISG54* mid region. Numbers represent the mean of three technical replicates out of two independent experiments (± SD). p-value (Student t-test): *<0.05; **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001; ns: non significant. (**B**) Western blot analysis of HIRA and SP100 from total cellular extracts of BJ cells treated as in A. Tubulin is a loading control. Quantification of HIRA and SP100 levels relative to Tubulin are shown below the WB (numbers are representative of two independent experiments). (**C**) Model for the dual role of PML/PML NBs in inflammatory response. At early time points after an initial IFN-I stimulus, (i) PML is required for ISGs transcription and (ii) this could indirectly help to load HIRA on ISGs participating in H3.3 dynamics. (iii) While HIRA depletion does not affect ISGs transcription per se, it could participate in H3.3 deposition at ISGs, a function which does not seem to require its accumulation in PML NBs. (iv) PML neonucleation would mediate juxtaposition of PML NBs with ISGs at late times after IFN-I treatment which could help to keep a memory of the physiological state of the cell. (v) In addition, PML NBs play a second independent role by buffering the extra pool of HIRA complex available in the nucleus. (vi) Increase of DAXX protein levels could modulate the amount of available binding sites for HIRA within PML NBs or overexpression of the HIRA substrate H3.3 as a pool of free soluble H3.3 in the nucleoplasm could force HIRA out of PML NBs.

The online version of this article includes the following source data and figure supplement(s) for figure 7:

Source data 1. Raw WB for ***Figure 7B*** for HIRA.

Source data 2. Raw WB for ***Figure 7B*** for HIRA with labels.

Figure 7 continued on next page

Figure 7 continued

Source data 3. Raw WB for ***Figure 7B*** for SP100.

Source data 4. Raw WB for ***Figure 7B*** for SP100 with labels.

Source data 5. Raw WB for ***Figure 7B*** for tubulin.

Source data 6. Raw WB for ***Figure 7B*** for tubulin with labels.

Figure supplement 1. SP100 knock-down increases ISGs transcription upon IFN-I treatment.

treatment, suggesting that DAXX could occupy all available binding sites for HIRA partitioning in PML NBs. Fourth, DAXX knock-down induces a significant increase of untreated cells showing HIRA accumulation in PML NBs. These data support the hypothesis that the freeing of binding sites (in siDAXX treated cells) or the increase in binding sites (IFN-I treated cells) for HIRA might trigger its accumulation in PML NBs. Finally, overexpression of the HIRA substrate H3.3 as a pool of free soluble H3.3 in the nucleoplasm impairs HIRA accumulation in PML NBs upon IFN-I treatment.

The functionality of HIRA localization in PML NBs, first demonstrated during senescence (***Zhang et al., 2005***), remains to date elusive. An exciting hypothesis resulting from our data is that some acute stresses could massively retarget chromatin-bound HIRA from steady-state to specific stress-induced loci, leaving an extra pool of unbound HIRA, which then accumulates in PML NBs to be used for future duties. This buffering also depends on the amount of available binding sites for HIRA in PML NBs, as well as on the histone chaperone/cargo pool itself (HIRA/DAXX/H3.3 levels). Whether the sequestration of HIRA in PML NBs could as well impact its histone chaperone function elsewhere in the nucleus remains to be determined.

PML regulates ISGs transcription and PML NBs associate with ISGs loci

A second important functional aspect unveiled in our study is the involvement of PML/PML NBs in the regulation of ISGs transcription, and the HIRA-mediated deposition of H3.3 at IFN-I stimulated ISGs. First, we show the importance of the PML protein for the initial burst of transcription of ISGs at 6 hr of IFNβ treatment. This is consistent with previous studies showing the association of PML NBs with nascent transcripts after IFNβ stimulation (***Fuchsová et al., 2002***), and the role of PML in ISGs induction following viral infection (***Alandijany et al., 2018***). PML proteins could be recruited to transcriptionally active ISGs by a specific, yet to be defined, protein-protein interaction. Previous studies showed that the nuclear DNA helicase II (NDH II), which is essential for gene activation, relocates in PML NBs in a transcription-dependent manner (***Fuchsová et al., 2002***). The authors suggested PML NBs could play a role in the transcriptional regulation of ISGs attached to PML NBs, although this was not investigated. Here, by using immuno-FISH, we demonstrate a juxtaposition of a subset of ISG loci with PML NBs at late time-points of IFNβ stimulation, confirming the potential role of PML NBs as regulatory chromosomal hubs. These data add to the likely importance of PML NBs-gene loci association for the regulation of specific sets of genes in a cell and stimulus-context manners, as exemplified recently for pluripotency-related genes in mESCs (***Sun et al., 2023***). Because PML targeting at specific gene loci is sufficient to induce de novo formation of PML NBs (***Brouwer et al., 2009***; ***Chung et al., 2011***; ***Erdel et al., 2020***; ***Kaiser et al., 2008***; ***Wang et al., 2018***), we hypothesize that chromatin-bound PML proteins involved in ISGs transcription could act as seeds to mediate neo-nucleation of PML NBs at ISG loci (see model in ***Figure 7C***). Alternatively, displacement of ISGs-containing chromatin loops close to preexisting PML NBs could still be at play to explain this closer association upon IFNβ stimulation.

H3.3-induced deposition at TES regions of transcribed ISGs is mediated by both HIRA and PML

Our data also reveal a role of the PML-HIRA axis in the H3.3 deposition on ISGs. Endogenous H3.3 deposition shows a strong preference for the ISGs TES regions, consistent with previous reports obtained in mouse cells overexpressing exogenous H3.3 (***Sarai et al., 2013***; ***Tamura et al., 2009***). Also, our data highlight a long-lasting deposition of H3.3 up to 48 h after IFN-I stimulation, well beyond the peak of transcription of the ISGs. Deposition of endogenous H3.3 was reduced in the absence of PML consistent with the role of PML NBs in targeting H3.3 to chromatin (***Delbarre et al., 2013***), and in line with the role of PML in chromatinization of latent viral genomes (***Cohen et al., 2018***). Because

PML depletion impairs transcription of ISGs (***Figure 5—figure supplement 1C***; ***Alandijany et al., 2018***), it could indirectly affect H3.3 deposition at TES regions, which is linked to the transcriptional activity of ISGs per se (***Sarai et al., 2013***). Thus, the implication of PML in the loading of HIRA on ISGs (***Figure 7—figure supplement 1A***; ***McFarlane et al., 2019***) could be a result of the PML-regulated ISGs transcription, which could consequently impact on the HIRA-mediated H3.3 deposition on these loci. It is not unlikely that other H3.3 chaperones, such as the DAXX/ATRX complex, could compensate the absence of HIRA for H3.3 deposition as already observed for viral genomes chromatinization (***Cohen et al., 2018***). Alternatively, the remodeling protein CHD2, which has been shown to incorporate H3.3 on the promoters of myogenesis genes (***Harada et al., 2012***) could participate in H3.3 deposition at ISGs loci after IFN-I induction. Nonetheless, these data indicate the importance of a PML-HIRA axis to regulate H3.3 deposition on ISGs loci. Whether HIRA also mediates H3.3 recycling during transcription at ISGs via interaction with the RNA pol II (***Torné et al., 2020***; ***Ray-Gallet et al., 2011***) and/or with an H3K36me3 methyltransferase (***Sarai et al., 2013***) should be investigated further. Thus, these data open interesting perspectives to study the maintenance of chromatin states at ISGs during inflammatory responses.

Finally, given the accumulation of HIRA in PML NBs upon IFNβ stimulation, an important question to address was whether this accumulation is required for HIRA-dependent H3.3 deposition at ISGs. The H3.3 ChIP analyses conducted in absence of HIRA accumulation in PML NBs upon IFN-I due to the depletion of SP100 showed an enrichment of H3.3 at ISGs loci, which decreased upon the additional knock-down of HIRA. These data support the importance of HIRA for the H3.3 deposition at ISGs, and favor the absence of correlation between HIRA accumulation in PML NBs and the deposition of H3.3 at ISGs loci, at least upon acute IFN-I stimulus. This further supports a role of PML NBs as nuclear depots for HIRA following an acute stress, possibly for its subsequent use after the acute stress resolution.

The role of the prolonged H3.3 deposition on ISGs can be multiple. First, this long-lasting mark could contribute to the acquisition of a functional IFN response memory. Indeed, H3.3 was shown to mediate memory of an active state upon nuclear transfer in *Xenopus laevis* (***Ng and Gurdon, 2008***). In addition, in MEFs, IFNβ stimulation creates a transcriptional memory of a subset of ISGs, which coincides with acquisition of H3.3 and H3K36me3 on chromatin (***Kamada et al., 2018***). A second stimulation with IFNβ allows a faster and greater transcription of so called "memory ISGs", which is dependent on H3.3 deposition during the first stimulation phase (***Kamada et al., 2018***). In HeLa cells, PML was shown to be required for the stronger re-expression of HLA-DRA after IFNγ restimulation, a locus that remained juxtaposed to PML NBs after transcription shut-off (***Gialitakis et al., 2010***). Second, H3.3 deposition may also serve to directly regulate ISGs expression. In mouse cells, H3.3 was found to be phosphorylated on Serine 31 on macrophages-induced genes following bacterial lipopolysaccharide stimulation, a post-translational mark serving as an ejection switch for the ZMYND11 transcriptional repressor, and allowing the transcriptional amplification of the target genes (***Armache et al., 2020***). Whether H3.3S31P is increased on ISGs upon IFN-I remains to be investigated.

Altogether, we propose a dual role for PML/PML NBs in regulating, on the one hand, HIRA nucleoplasmic pool and on the other hand, ISGs transcription and HIRA-mediated H3.3 deposition (see model in ***Figure 7C***). PML NBs play a role of nuclear buffering centers for HIRA complex, to control its availability in the nucleoplasm, and thus possibly regulating its activity (***Figure 7C***). In addition, PML is required for ISGs transcription promoting H3.3 loading on these genes and could indirectly serve as a platform to load HIRA on ISGs (***Figure 7—figure supplement 1A***; ***McFarlane et al., 2019***). While HIRA depletion does not affect ISGs transcription per se, it could participate in H3.3 deposition at ISGs, a function that is likely uncorrelated to its accumulation in PML NBs during an acute stress. Furthermore, as mentioned above, H3.3 deposition at ISGs after a first stimulus allows faster and greater transcription of ISGs upon restimulation (***Kamada et al., 2018***). Juxtaposition of PML NBs with ISGs at late times after IFN-I treatment could help to keep a memory of the physiological state of the cell. PML would remain in close proximity to ISGs to regulate them upon a second wave of IFN-I stimulation and HIRA accumulation in PML NBs could also be a mean for the cell to make the chaperone complex available much faster in case of a second inflammatory wave.

In conclusion, our study highlights two important functional and independent roles for PML NBs in the inflammatory response, which add to their pivotal involvement in various stress responses.

Methods

Cell lines and retro/lentiviruses production

Human BJ primary foreskin fibroblasts (ATCC, CRL-2522), human IMR90 fetal lung fibroblasts (ATCC, CCL-186), human HEK 293T embryonic kidney cells (Intercell, AG) and mouse MEFs embryonic fibroblasts *Pml*$^{+/+}$ or *Pml*$^{-/-}$ (from Dr. Lallemand-Breitenbach, and whose cell identity was authenticated by STR profiling) were cultivated in DMEM medium (Sigma-Aldrich, D6429) containing 10% of fetal calf serum (FCS) (Sigma-Aldrich, F7524), 1% of penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, P4458), at 37 °C under 5% CO2 and humid atmosphere. All cell lines were tested negative for mycoplasma contamination. Drugs and molecules used for cell treatments are described in the **Key Resources Table** in Appendix (duration is mentioned in the main text). BJ, MEFs or IMR90 cells stably expressing transgenes were obtained by retroviral or lentiviral transduction as in ***Cohen et al., 2018***. Transduced cells were then selected 24 h later by adding the appropriate selective drug (puromycin (Invivogen, ant-pr) at 1 µg/mL or blasticidin (Invivogen, ant-bl) at 5 µg/mL).

Plasmids

Plasmids are described in the **Key Resources Table** in Appendix. Tat-S1S2D5-Flag-His Affimer (Tat: nuclear localization sequence), obtained by PCR using pcDNA5-Tat-S1S2D5-Flag-His as template (graciously sent by Dr. David J. Hughes ***Hughes et al., 2017***), was cloned in puromycin resistant pLVX-TetOne plasmid.

HIRA WT, obtained by RT-PCR from HeLa cells, was cloned in blasticidin resistant pLentiN plasmid with addition of HA or Myc tag in the C-terminus. HIRA-HA mSIM and K809G mutants were obtained by site-directed mutagenesis using QuickChange Lightning Site-directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies, #210518). SIM motifs are characterized by a group of hydrophobic amino acids ((V/I/L)x(V/I/L)(V/I/L) or (V/I/L)(V/I/L)x(V/I/L)). HIRA mSIM mutant sequences are the following: mSIM1: aa ^{124}VSIL^{127} mutated in ^{124}GGIL^{127}, mSIM2: aa ^{225}VLRL^{228} mutated in ^{225}GGRL^{228}, mSIM3: aa ^{320}LLVI^{323} mutated in ^{320}GGVI^{323}, mSIM4: aa ^{805}VVVV^{808} mutated in ^{805}GGVV^{808}, mSIM5: aa ^{978}VVGL^{981} mutated in ^{978}GGGL^{981}.

Myc-PML1 WT and 3K mutant, obtained by PCR using pLNGY-PML1 and pLNGY-PML1.KKK as template (kind gift by Dr. Roger Everett), were cloned in puromycin resistant pLVX-TetOne plasmid. H3.3-SNAP-HA3 obtained by PCR using pBABE-H3.3-SNAP-HA3 as template (kind gift by Dr. Lars Jansen) was cloned into puromycin-resistant pLVX-TetOne plasmid with EcoRI restriction enzyme. Myc-DAXX cloned into pLNCX2 was described in ***Corpet et al., 2014***. EYFP-SP100 isoform A WT and K297R mutant (containing a cDNA that is resistant to the siRNA against SP100), obtained by PCR using pLNGY-EYFP-SP100 WT and K297R (kind gift of Dr Roger Everett), were cloned into puromycin resistant pLVX-TetOne plasmid.

siRNAs

BJ cells were transfected with 40–60 nM of human siRNA for different timings (indicated in the main text for each experiment) using Lipofectamine RNAiMax reagent (Invitrogen, 13778–075) and Opti-MEM medium (Gibco, 31-985-070). siRNAs used and their sequences are summarized in the **Key Resources Table** in Appendix. siSUMO1 and siSUMO-2/3, were co-transfected into BJ cells at 30 nM each. siSP100 targets all SP100 isoforms (***Everett et al., 2008***).

Antibodies

All the primary antibodies used in this study, together with the species, the references and the dilutions for immunofluorescence and western blotting, are summarized in the **Key Resources Table** in Appendix.

Immunofluorescence (IF)

Immunofluorescence was performed as in ***Corpet et al., 2014*** (see the **Key Resources Table** in Appendix for antibodies dilution). Highly cross-absorbed goat anti-mouse or anti-rabbit (H+L) Alexa-488, Alexa-555 or Alexa-647 (Invitrogen) were used as secondary antibodies. Cells were then incubated in DAPI (Invitrogen Life Technologies, D1306) diluted in PBS at 0.1 µg/mL for 5 min at RT°C.

Coverslips were mounted in Fluoromount-G (SouthernBiotech, 0100–01) and stored at 4 °C before observation.

Proximity ligation assay (PLA)

Proximity Ligation Assays were performed with the Duolink In Situ Red Starter Kit Mouse/Rabbit (Sigma-Aldrich, DUO92101). Cells on coverslips were fixed in 2% PFA for 12 min at RT°C and then permeabilized in PBS 0.2% Triton X-100 for 5 min at RT°C. Cells were then treated according to the manufacturer's instructions (see the **Key Resources Table** in Appendix for dilutions of primary antibodies). Coverslips were mounted in Duolink In Situ Mounting Medium with DAPI and stored at 4 °C before observation.

Immunofluorescence - Fluorescence in situ hybridization (IF-FISH)

FISH probes were generated from different BACs: RP11-438J1, RP11-185E17, RP11-120C17 and RP11-134B23 BAC clones for GHRL, PML, MX1 and OAS1, respectively. Briefly, 1 µg of BAC were incubated for nick-translation with 4.3 ng of DNAse I (Roche, 104159), 7 U of DNA polymerase (Promega, M2051), dithiothreitol (DTT) at 10 µM, dATP, dTTP and dGTP at 40 µM each (Thermo Scientific, R0141/R0161/R0171), dCTP at 10 µM (Thermo Scientific, R0151) and Cy3 labelled dCTP at 10 µM (Cytiva, PA53021). Nick-translation was performed for 3 hr at 15 °C and stopped by an incubation at 72 °C for 10 min. Size of generated probes were verified on agarose gel. Probes were then mixed with 20 µg of COT Human DNA (Roche, 11 581 074 001) and 79 µg of Salmon sperm DNA (Invitrogen, 15632–011). Volume was completed with TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA). DNA was precipitated with 300 mM of sodium acetate and 70% of chilled EtOH for 2 hr at –20 °C. DNA pellets were resuspended in formamide at 20 ng/µL final concentration.

After performing classic immunofluorescence as described above (without the DAPI staining step), cells were post-fixed in 2% PFA for 12 min at RT°C and then permeabilized and deproteinized in PBS 0.5% Triton X-100 0.1 M HCl for 10 min at RT°C. Samples were dehydrated in successive EtOH baths (2x70% EtOH, 2x85% EtOH and 2x100% EtOH). After co-denaturation at 80 °C for 5 min, cells' DNA was hybridized with FISH probes diluted at 1/5 O/N at 37 °C in dark and humid chamber. Cells were then washed 5 min in Saline-Sodium Citrate (SSC) 0.5 X at 68 °C, 2 min in SSC 1 X at RT°C and incubated in DAPI diluted in SSC 2 X for 5 min at RT°C. Coverslips were mounted in Fluoromount-G and stored at 4 °C before observation.

Microscopy, imaging, and quantification

Images were acquired with the Axio Observer Z1 inverted wide-field epifluorescence microscope (100 X or 63 X objectives/N.A. 1.46 or 1.4) (Zeiss) and a CoolSnap HQ2 camera from Photometrics. Identical settings and contrast were applied for all images of the same experiment to allow data comparison. Raw images were treated with Fiji software or with Photoshop (Adobe). HIRA complex accumulation in PML NBs was attested by manual counting of a minimum of 100 cells for each condition and per replicate. The percentage of PML-NBs with HIRA localization in individual cells was measured using the CellProfiler Primary Objects Identification and Objects Relation functions. PML-NBs and genes loci proximity was measured using the Fiji RenyiEntropy mask on PML and FISH staining. X and Y coordinates for the center of the spots were recovered and all distances between each PML NBs and gene loci were calculated using the formula $d = \sqrt{(x1 - x2)^2 + (y1 - y2)^2}$ to find the minimal distance in each nucleus. Quantification of nuclear intensities was performed with Fiji. Briefly, DAPI and PML stainings were used to define masks of nuclei and of PML NBs. We quantified mean HA fluorescence intensity within each nucleus with the measure function applied on the red (HA) channel. To quantify HIRA intensity outside PML NBs, we first created a mask of nuclei devoid of PML NBs (Image calculator function of Fiji) and then applied the measure function on HIRA channel.

Western blotting (WB)

Total cellular extracts were obtained by directly lysing the cells in 2 X Laemmli sample buffer (LSB) (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, bromophenol blue) containing 100 mM DTT. RIPA extracts were obtained by lysing the cells in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Na-Deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, 5 mM EDTA) supplemented with 1 X protease inhibitor

cocktail (PIC) for 20 min on ice. After incubation, RIPA extracts were centrifugated for 10 min at 16,000 *g* at 4 °C and supernatants were recovered and diluted with 4 X LSB.

Western Blot was performed as in ***Corpet et al., 2014*** (see the **Key Resources Table** in Appendix for antibodies dilution). Signal was revealed on ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad) by using Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, RPN2236) or Clarity Max Western ECL Blotting Substrate (Bio-Rad, 1705062).

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Cells were crosslinked directly in the culture dishes according to ***Becker et al., 2017***. After the PBS washes, cell pellets were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C before immunoprecipitation. Cells were de-frozen on ice and chromatin was prepared following the TruChIP protocol from Covaris, as described in ***Cohen et al., 2018***. We used the Covaris M220 Focused-ultrasonicator to shear through chromatin (7 min at 140 W, Duty off 10%, Burst cycles 200). After shearing, chromatin immunoprecipitation was performed as in ***Becker et al., 2017***. We used 20 µL of protein A magnetic dynabeads (Invitrogen, 10001D) for immunoprecipitation with 2 µg of the following rabbit primary antibodies: anti-H3.3 (Diagenode, C15210011), anti-panH3 (Abcam, ab1791), rabbit IgG (Diagenode, C15410206). After DNA purification according to ***Becker et al., 2017***, DNA pellets were resuspended in ddH20 and stored at –20 °C before qPCR analysis.

Reverse transcription (RT)

TRIzol reagent protocol (Invitrogen, 15596026) was used to isolate total RNAs, resuspended in ddH2O according to the manufacturer instructions. Contaminant DNA was removed with the DNA-free DNA Removal Kit (Invitrogen, AM1906). We used 1 µg of RNA for reverse transcription (RT). RNAs were annealed with Random Primers (Promega, C118A) and RT was performed with the RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, EP0452) according to the manufacturer instructions. cDNAs were stored at –20 °C before qPCR analysis.

Quantitative PCR (qPCR)

qPCRs were performed using the KAPA SYBR qPCR Master Mix (SYBR Green I dye chemistry) (KAPA BIOSYSTEMS, KK4618). Primers used for qPCR are described in the **Key Resources Table** in Appendix.

ChIP-Seq analysis

After ChIP, libraries were made in BGI and sequenced on a BGISEQ-500 sequencing platform (https://www.bgi.com). An average of 34 Million single-end 50 bp reads was obtained for each library. Reads were trimmed using Trimmomatic and quality assessed with FastQC. Reads were aligned to the human genome hg38 using the BWA alignment software. Duplicate reads were identified using the picard tools script and only non-duplicate reads were retained. Broad peaks calling was performed with MACS2 (***Zhang et al., 2008***) ("`--extsize` 250 -q 0.01 `--broad --broad-cutoff` 0.05"), using input DNA as control. We defined all possible locations of H3.3 by merging broad peaks identified in our four conditions (n=190295), and annotated them with Homer (http://homer.ucsd.edu/homer/download.html). We counted reads extended to 250 bp falling into these possible locations, in the four ChIP and their corresponding inputs, using bedtools-intersect. CPMs were obtained by dividing raw counts by the total number of mapped reads normalized to 1e6, and RPKMs by dividing CPMs by the peak length normalized to 1e3. Input RPKMs, used as background, was substracted from the respective ChIP RPKMs. We focused on 0.5% of the peaks with highest RPKM difference (n=951) between IFNβ treated and not treated conditions, of which 711 were intragenic. These peaks allowed us to defined a set of 654 genes, on which we performed GO analysis, with MsigDB, using enrichR plaform (***Kuleshov et al., 2016***).

As a complementary approach, we measured the ChIP enrichment within the 1000 bp regions spanning the TESs (–500+500), extending all unique reads into 250 bp fragments, and counting those falling within TES using bedtools-intersect. CPMs were obtained similarly, and input DNA CPMs, used as background, was substracted from ChIP CPMs. Genes with the log2 of differential TES enrichment between IFNβ treated and not treated conditions being higher than 5 (log2(Fold Change)>5) were retained for GO analysis, as described above.

PlotProfile were generated using the DeepTools suite, starting from the MACS2 fold enrichment bigwig files, which take into account the read extension, the input DNA background and the library size normalization. The list of 48 core ISGs and 48 non-ISGs equal in size to the core ISGs was taken from ***McFarlane et al., 2019***. In order to reduce the noise on the profiles, we selected for each gene the transcript with the highest H3.3 enrichment at the TES in the IFNβ treated condition. Genome browser snapshots of H3.3 enrichment were generated using Integrative Genomics viewer (IGV: https://software.broadinstitute.org/software/igv/).

We re-analysed the HIRA ChIP-Seq dataset from ***McFarlane et al., 2019***. Rapidly, fastq files were downloaded from GEO databank under the accession number GSE128173 and re-aligned to the human genome 19 (hg19) using Bowtie2 (***Langmead and Salzberg, 2012***). MACS2 fold enrichment bigwig files were then used with the DeepTools suite (***Ramírez et al., 2016***) to create profile-plots of the 48 core ISG used in ***McFarlane et al., 2019***.

Statistical analyses and figures

Histograms and statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6. To perform Student t test, we verified normal distribution of samples using Shapiro test and variance equality with Fisher test. Mann-Whitney u-test was applied in absence of normality for the sample distribution. p-Values are depicted on graphs as follows: *<0.05; **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001. Biorender.com was used to generate figures schemes and model.

Materials availability

All plasmids and cell lines generated in this study can be accessed upon request to the corresponding authors.

Acknowledgements

We thank Dr. Valérie Lallemand-Breitenbach for the *Pml* WT and *Pml-/-* MEFs. We thank Dr. Chris Boutell for the pLVX-His-SUMO1/2/3 plasmids. We thank Dr. Roger Everett for the PML- and SP100-containing plasmids. We thank Dr. David J Hughes for the SUMO-specific Affimers plasmids. We thank Dr. Lars Jansen for the pBABE-H3.3-SNAP-HA3 plasmid. We thank Dr. Caroline Schluth-Bolard for her kind help with the FISH on ISGs and for the GHRL BAC.

PL laboratory is funded by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), University Claude Bernard Lyon 1, French National Agency for Research-ANR [EPIPRO ANR-18-CE15-0014-01, CHROMACoV ANR-20-COV9-0004; IFN-Epi-IM ANR-21-CE17-0018]; LabEX DEVweCAN and DEV2CAN [ANR-10-LABX-61]; AFM-Téléthon Plans stratégiques MyoNeurALP & MyoNeurALP2, the Comité départemental du Rhône de La Ligue contre le Cancer and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (grant number FDT202001010820 to CK). PL is a CNRS Research Director and AC is assistant professor in the University Claude Bernard Lyon 1.

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Centre National de la Recherche Scientifique		Patrick Lomonte
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale		Patrick Lomonte
Université Claude Bernard Lyon 1		Patrick Lomonte
Agence Nationale de la Recherche	EPIPRO ANR-18-CE15-0014-01	Patrick Lomonte

Funder	Grant reference number	Author
Agence Nationale de la Recherche	CHROMACoV ANR-20-COV9-0004	Patrick Lomonte
Agence Nationale de la Recherche	IFN-Epi-IM ANR-21-CE17-0018	Patrick Lomonte Armelle Corpet
LabEx DEvweCAN		Patrick Lomonte
Agence Nationale de la Recherche	ANR-10-LABX-61	Patrick Lomonte
AFM-Telethon	Plans stratégiques MyoNeurALP & MyoNeurALP2	Patrick Lomonte
Comite departemental du Rhone de La Ligue contre le Cancer		Armelle Corpet
Fondation pour la Recherche Médicale	FDT202001010820	Constance Kleijwegt

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Constance Kleijwegt, Conceptualization, Formal analysis, Validation, Investigation, Visualization, Methodology, Writing – original draft, Writing – review and editing; Florent Bressac, Coline Seurre, Validation, Investigation; Wilhelm Bouchereau, Formal analysis; Camille Cohen, Conceptualization, Investigation; Pascale Texier, Investigation; Thomas Simonet, Data curation, Software, Formal analysis, Visualization; Laurent Schaeffer, Supervision; Patrick Lomonte, Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Validation, Methodology, Writing – original draft, Project administration, Writing – review and editing; Armelle Corpet, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Validation, Investigation, Visualization, Methodology, Writing – original draft, Writing – review and editing

Author ORCIDs

Constance Kleijwegt http://orcid.org/0000-0002-9329-0806
Armelle Corpet http://orcid.org/0000-0002-2126-5783

Decision letter and Author response

Decision letter https://doi.org/10.7554/eLife.80156.sa1
Author response https://doi.org/10.7554/eLife.80156.sa2

Additional files

Supplementary files

- MDAR checklist

Data availability

The ChIP-Seq datasets have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO; http://www.ncbi.nlm.nig.gov/geo/) under the accession number GSE233298.

The following previously published dataset was used:

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database and Identifier
Kleijwegt C, Corpet A, Lomonte P, Simonet T	2021	Interplay between PML NBs and HIRA for H3.3 deposition on transcriptionally active interferon-stimulated genes	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE183937	NCBI Gene Expression Omnibus, GSE183937

References

Adam S, Polo SE, Almouzni G. 2013. Transcription recovery after DNA damage requires Chromatin priming by the H3.3 Histone chaperone HIRA. *Cell* **155**:94–106. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.029, PMID: 24074863

Ahmad K, Henikoff S. 2002. The Histone variant H3.3 marks active Chromatin by replication-independent Nucleosome assembly. *Molecular Cell* **9**:1191–1200. DOI: https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00542-7, PMID: 12086617

Alandijany T, Roberts APE, Conn KL, Loney C, McFarlane S, Orr A, Boutell C. 2018. Correction: distinct temporal roles for the promyelocytic leukaemia (PML) protein in the sequential regulation of intracellular host immunity to HSV-1 infection. *PLOS Pathogens* **14**:e1006927. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006927, PMID: 29470515

Allis CD, Jenuwein T. 2016. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews. Genetics* **17**:487–500. DOI: https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59, PMID: 27346641

Armache A, Yang S, Martínez de Paz A, Robbins LE, Durmaz C, Cheong JQ, Ravishankar A, Daman AW, Ahimovic DJ, Klevorn T, Yue Y, Arslan T, Lin S, Panchenko T, Hrit J, Wang M, Thudium S, Garcia BA, Korb E, Armache K-J, et al. 2020. Histone H3.3 Phosphorylation Amplifies stimulation-induced transcription. *Nature* **583**:852–857. DOI: https://doi.org/10.1038/s41586-020-2533-0, PMID: 32699416

Banani SF, Rice AM, Peeples WB, Lin Y, Jain S, Parker R, Rosen MK. 2016. Compositional control of phase-separated cellular bodies. *Cell* **166**:651–663. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.010, PMID: 27374333

Banani SF, Lee HO, Hyman AA, Rosen MK. 2017. Biomolecular condensates: Organizers of cellular Biochemistry. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **18**:285–298. DOI: https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7, PMID: 28225081

Banumathy G, Somaiah N, Zhang R, Tang Y, Hoffmann J, Andrake M, Ceulemans H, Schultz D, Marmorstein R, Adams PD. 2009. Human Ubn1 is an Ortholog of yeast Hpc2P and has an essential role in the HIRA/Asf1A Chromatin-remodeling pathway in Senescent cells. *Molecular and Cellular Biology* **29**:758–770. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.01047-08, PMID: 19029251

Beauclair G, Bridier-Nahmias A, Zagury JF, Saïb A, Zamborlini A. 2015. JASSA: A comprehensive tool for prediction of Sumoylation sites and Sims. *Bioinformatics* **31**:3483–3491. DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv403, PMID: 26142185

Becker JS, McCarthy RL, Sidoli S, Donahue G, Kaeding KE, He Z, Lin S, Garcia BA, Zaret KS. 2017. Genomic and Proteomic resolution of Heterochromatin and its restriction of alternate fate genes. *Molecular Cell* **68**:1023–1037. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.030, PMID: 29272703

Boisvert FM, Hendzel MJ, Bazett-Jones DP. 2000. Promyelocytic leukemia (Pml) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *The Journal of Cell Biology* **148**:283–292. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.148.2.283, PMID: 10648561

Brouwer AK, Schimmel J, Wiegant J, Vertegaal ACO, Tanke HJ, Dirks RW. 2009. Telomeric DNA mediates de novo PML body formation. *Molecular Biology of the Cell* **20**:4804–4815. DOI: https://doi.org/10.1091/mbc.e09-04-0309, PMID: 19793919

Cappadocia L, Mascle XH, Bourdeau V, Tremblay-Belzile S, Chaker-Margot M, Lussier-Price M, Wada J, Sakaguchi K, Aubry M, Ferbeyre G, Omichinski JG. 2015. Structural and functional characterization of the Phosphorylation-dependent interaction between PML and Sumo1. *Structure* **23**:126–138. DOI: https://doi.org/10.1016/j.str.2014.10.015, PMID: 25497731

Chang FTM, McGhie JD, Chan FL, Tang MC, Anderson MA, Mann JR, Andy Choo KH, Wong LH. 2013. PML bodies provide an important platform for the maintenance of telomeric Chromatin integrity in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research* **41**:4447–4458. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkt114

Cheon H, Holvey-Bates EG, Schoggins JW, Forster S, Hertzog P, Imanaka N, Rice CM, Jackson MW, Junk DJ, Stark GR. 2013. IFNβ-dependent increases in Stat1, Stat2, and Irf9 mediate resistance to viruses and DNA damage. *The EMBO Journal* **32**:2751–2763. DOI: https://doi.org/10.1038/emboj.2013.203, PMID: 24065129

Ching RW, Ahmed K, Boutros PC, Penn LZ, Bazett-Jones DP. 2013. Identifying Gene locus associations with promyelocytic leukemia nuclear bodies using Immuno-TRAP. *The Journal of Cell Biology* **201**:325–335. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.201211097, PMID: 23589495

Chung I, Leonhardt H, Rippe K. 2011. De Novo assembly of a PML nuclear Subcompartment occurs through multiple pathways and induces Telomere elongation. *Journal of Cell Science* **124**:3603–3618. DOI: https://doi.org/10.1242/jcs.084681, PMID: 22045732

Cohen C, Corpet A, Roubille S, Maroui MA, Poccardi N, Rousseau A, Kleijwegt C, Binda O, Texier P, Sawtell N, Labetoulle M, Lomonte P, Kalejta RF. 2018. Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies (NBS) induce latent/quiescent HSV-1 Genomes Chromatinization through a PML NB/Histone H3.3/H3.3 chaperone axis. *PLOS Pathogens* **14**:e1007313. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007313, PMID: 30235352

Corpet A, Olbrich T, Gwerder M, Fink D, Stucki M. 2014. Dynamics of Histone H3.3 deposition in proliferating and Senescent cells reveals a DAXX-dependent targeting to PML-NBS important for Pericentromeric Heterochromatin organization. *Cell Cycle* **13**:249–267. DOI: https://doi.org/10.4161/cc.26988, PMID: 24200965

Corpet A, Kleijwegt C, Roubille S, Juillard F, Jacquet K, Texier P, Lomonte P. 2020. PML nuclear bodies and Chromatin Dynamics: Catch me if you can *Nucleic Acids Research* **48**:11890–11912. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkaa828, PMID: 33068409

Cuchet D, Sykes A, Nicolas A, Orr A, Murray J, Sirma H, Heeren J, Bartelt A, Everett RD. 2011. PML Isoforms I and II participate in PML-dependent restriction of HSV-1 replication. *Journal of Cell Science* **124**:280–291. DOI: https://doi.org/10.1242/jcs.075390, PMID: 21172801

Cuchet-Lourenço D, Boutell C, Lukashchuk V, Grant K, Sykes A, Murray J, Orr A, Everett RD. 2011. SUMO pathway dependent recruitment of cellular Repressors to herpes Simplex virus type 1 Genomes. *PLOS Pathogens* **7**:e1002123. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002123, PMID: 21779164

Delbarre E, Ivanauskiene K, Küntziger T, Collas P. 2013. DAXX-dependent supply of soluble (H3.3–H4) dimers to PML bodies pending deposition into Chromatin. *Genome Research* **23**:440–451. DOI: https://doi.org/10.1101/gr.142703.112

Delbarre E, Ivanauskiene K, Spirkoski J, Shah A, Vekterud K, Moskaug JØ, Bøe SO, Wong LH, Küntziger T, Collas P. 2017. PML protein organizes Heterochromatin domains where it regulates Histone H3.3 deposition by ATRX/DAXX. *Genome Research* **27**:913–921. DOI: https://doi.org/10.1101/gr.215830.116, PMID: 28341773

Delbarre E, Janicki SM. 2021. Modulation of H3.3 Chromatin assembly by PML: A way to regulate epigenetic inheritance. *BioEssays* **43**:e2100038. DOI: https://doi.org/10.1002/bies.202100038, PMID: 34423467

Eggenberger J, Blanco-Melo D, Panis M, Brennand KJ, tenOever BR. 2019. Type I interferon response impairs differentiation potential of Pluripotent stem cells. *PNAS* **116**:1384–1393. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1812449116, PMID: 30606801

Erdel F, Rademacher A, Vlijm R, Tünnermann J, Frank L, Weinmann R, Schweigert E, Yserentant K, Hummert J, Bauer C, Schumacher S, Al Alwash A, Normand C, Herten DP, Engelhardt J, Rippe K. 2020. Mouse Heterochromatin ADOPTS Digital Compaction States without showing hallmarks of Hp1-driven liquid-liquid phase separation. *Molecular Cell* **78**:236–249.. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.02.005, PMID: 32101700

Everett RD, Rechter S, Papior P, Tavalai N, Stamminger T, Orr A. 2006. PML contributes to a cellular mechanism of repression of herpes Simplex virus type 1 infection that is Inactivated by Icp0. *Journal of Virology* **80**:7995–8005. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.00734-06

Everett RD, Parada C, Gripon P, Sirma H, Orr A. 2008. Replication of Icp0-null mutant herpes Simplex virus type 1 is restricted by both PML and Sp100. *Journal of Virology* **82**:2661–2672. DOI: https://doi.org/10.1128/JVI.02308-07

Fuchsová B, Novák P, Kafková J, Hozák P. 2002. Nuclear DNA Helicase II is recruited to IFN-Α–activated transcription sites at PML nuclear bodies. *The Journal of Cell Biology* **158**:463–473. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.200202035, PMID: 12163469

Gao C, Ho CC, Reineke E, Lam M, Cheng X, Stanya KJ, Liu Y, Chakraborty S, Shih HM, Kao HY. 2008. Histone Deacetylase 7 promotes PML Sumoylation and is essential for PML nuclear body formation. *Molecular and Cellular Biology* **28**:5658–5667. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.00874-08, PMID: 18625722

Gialitakis M, Arampatzi P, Makatounakis T, Papamatheakis J. 2010. Gamma interferon-dependent transcriptional memory via Relocalization of a Gene locus to PML nuclear bodies. *Molecular and Cellular Biology* **30**:2046–2056. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.00906-09, PMID: 20123968

Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, Lewis PW, Elsaesser SJ, Stadler S, Dewell S, Law M, Guo X, Li X, Wen D, Chapgier A, DeKelver RC, Miller JC, Lee YL, Boydston EA, Holmes MC, Gregory PD, Greally JM, Rafii S, et al. 2010. Distinct factors control Histone variant H3.3 localization at specific Genomic regions. *Cell* **140**:678–691. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.003, PMID: 20211137

Guldner HH, Szostecki C, Grötzinger T, Will H. 1992. IFN enhance expression of Sp100, an Autoantigen in primary biliary cirrhosis. *Journal of Immunology* **149**:4067–4073 PMID: 1281200.

Harada A, Okada S, Konno D, Odawara J, Yoshimi T, Yoshimura S, Kumamaru H, Saiwai H, Tsubota T, Kurumizaka H, Akashi K, Tachibana T, Imbalzano AN, Ohkawa Y. 2012. Chd2 interacts with H3.3 to determine Myogenic cell fate: Chd2 incorporates H3.3 to mark Myogenic genes. *The EMBO Journal* **31**:2994–3007. DOI: https://doi.org/10.1038/emboj.2012.136

Hendriks IA, D'Souza RCJ, Yang B, Verlaan-de Vries M, Mann M, Vertegaal ACO. 2014. Uncovering global Sumoylation signaling networks in a site-specific manner. *Nature Structural & Molecular Biology* **21**:927–936. DOI: https://doi.org/10.1038/nsmb.2890, PMID: 25218447

Hirose T, Ninomiya K, Nakagawa S, Yamazaki T. 2022. A guide to Membraneless organelles and their various roles in Gene regulation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **24**:288–304. DOI: https://doi.org/10.1038/s41580-022-00558-8, PMID: 36424481

Hughes DJ, Tiede C, Penswick N, Tang AAS, Trinh CH, Mandal U, Zajac KZ, Gaule T, Howell G, Edwards TA, Duan J, Feyfant E, McPherson MJ, Tomlinson DC, Whitehouse A. 2017. Generation of specific inhibitors of SUMO-1– and SUMO-2/3–mediated protein-protein interactions using Affimer (Adhiron) technology. *Science Signaling* **10**:eaaj2005. DOI: https://doi.org/10.1126/scisignal.aaj2005, PMID: 29138295

Ishov AM, Sotnikov AG, Negorev D, Vladimirova OV, Neff N, Kamitani T, Yeh ETH, Strauss JF, Maul GG. 1999. Pml is critical for Nd10 formation and recruits the Pml-interacting protein Daxx to this nuclear structure when modified by Sumo-1. *The Journal of Cell Biology* **147**:221–234. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.221, PMID: 10525530

Jiang WQ, Nguyen A, Cao Y, Chang ACM, Reddel RR, Bryk M. 2011. Hp1-mediated formation of alternative lengthening of Telomeres-associated PML bodies requires HIRA but not Asf1A. *PLOS ONE* **6**:e17036. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017036, PMID: 21347226

Kaiser TE, Intine RV, Dundr M. 2008. De Novo formation of a Subnuclear body. *Science* **322**:1713–1717. DOI: https://doi.org/10.1126/science.1165216, PMID: 18948503

Kamada R, Yang W, Zhang Y, Patel MC, Yang Y, Ouda R, Dey A, Wakabayashi Y, Sakaguchi K, Fujita T, Tamura T, Zhu J, Ozato K. 2018. Interferon stimulation creates Chromatin marks and establishes transcriptional memory. *PNAS* **115**:E9162–E9171. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1720930115, PMID: 30201712

Kamitani T, Kito K, Nguyen HP, Wada H, Fukuda-Kamitani T, Yeh ETH. 1998. Identification of three major Sentrinization sites in PML. *Journal of Biological Chemistry* **273**:26675–26682. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26675

Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, Koplev S, Jenkins SL, Jagodnik KM, Lachmann A, McDermott MG, Monteiro CD, Gundersen GW, Ma'ayan A. 2016. Enrichr: A comprehensive Gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research* **44**:W90–W97. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkw377, PMID: 27141961

Kumar PP, Bischof O, Purbey PK, Notani D, Urlaub H, Dejean A, Galande S. 2007. Functional interaction between PML and Satb1 regulates Chromatin-loop architecture and transcription of the MHC class I locus. *Nature Cell Biology* **9**:45–56. DOI: https://doi.org/10.1038/ncb1516, PMID: 17173041

Kurihara M, Kato K, Sanbo C, Shigenobu S, Ohkawa Y, Fuchigami T, Miyanari Y. 2020. Genomic profiling by Alap-Seq reveals transcriptional regulation by PML bodies through Dnmt3A exclusion. *Molecular Cell* **78**:493–505. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.004, PMID: 32353257

Lallemand-Breitenbach V, Jeanne M, Benhenda S, Nasr R, Lei M, Peres L, Zhou J, Zhu J, Raught B, de Thé H. 2008. Arsenic Degrades PML or PML–RARα through a SUMO-triggered Rnf4/Ubiquitin-mediated pathway. *Nature Cell Biology* **10**:547–555. DOI: https://doi.org/10.1038/ncb1717, PMID: 18408733

Lallemand-Breitenbach V, de Thé H. 2018. PML nuclear bodies: From architecture to function. *Current Opinion in Cell Biology* **52**:154–161. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.03.011, PMID: 29723661

Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast Gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* **9**:357–359. DOI: https://doi.org/10.1038/nmeth.1923, PMID: 22388286

Lee JS, Mo Y, Gan H, Burgess RJ, Baker DJ, van Deursen JM, Zhang Z. 2019. Pak2 kinase promotes cellular Senescence and Organismal aging. *PNAS* **116**:13311–13319. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1903847116, PMID: 31209047

Li Y, Ma X, Wu W, Chen Z, Meng G. 2020. PML nuclear body Biogenesis, carcinogenesis, and targeted therapy. *Trends in Cancer* **6**:889–906. DOI: https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.05.005, PMID: 32527650

Martire S, Banaszynski LA. 2020. The roles of Histone variants in fine-tuning Chromatin organization and function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **21**:522–541. DOI: https://doi.org/10.1038/s41580-020-0262-8, PMID: 32665685

McFarlane S, Orr A, Roberts APE, Conn KL, Iliev V, Loney C, da Silva Filipe A, Smollett K, Gu Q, Robertson N, Adams PD, Rai TS, Boutell C, Kalejta RF. 2019. The Histone chaperone HIRA promotes the induction of host innate immune defences in response to HSV-1 infection. *PLOS Pathogens* **15**:e1007667. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007667, PMID: 30901352

Mito Y, Henikoff JG, Henikoff S. 2005. Genome-scale profiling of Histone H3.3 replacement patterns. *Nature Genetics* **37**:1090–1097. DOI: https://doi.org/10.1038/ng1637, PMID: 16155569

Ng RK, Gurdon JB. 2008. Epigenetic memory of an active Gene state depends on Histone H3.3 incorporation into Chromatin in the absence of transcription. *Nature Cell Biology* **10**:102–109. DOI: https://doi.org/10.1038/ncb1674

Pchelintsev NA, McBryan T, Rai TS, van Tuyn J, Ray-Gallet D, Almouzni G, Adams PD. 2013. Placing the HIRA Histone chaperone complex in the Chromatin landscape. *Cell Reports* **3**:1012–1019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.026, PMID: 23602572

Rai TS, Puri A, McBryan T, Hoffman J, Tang Y, Pchelintsev NA, van Tuyn J, Marmorstein R, Schultz DC, Adams PD. 2011. Human Cabin1 is a functional member of the human HIRA/Ubn1/Asf1A Histone H3.3 chaperone complex. *Molecular and Cellular Biology* **31**:4107–4118. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.05546-11, PMID: 21807893

Rai TS, Glass M, Cole JJ, Rather MI, Marsden M, Neilson M, Brock C, Humphreys IR, Everett RD, Adams PD. 2017. Histone chaperone HIRA deposits Histone H3.3 onto foreign viral DNA and contributes to anti-viral intrinsic immunity. *Nucleic Acids Research* **45**:11673–11683. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkx771, PMID: 28981850

Ramírez F, Ryan DP, Grüning B, Bhardwaj V, Kilpert F, Richter AS, Heyne S, Dündar F, Manke T. 2016. Deeptools2: A next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Research* **44**:W160–W165. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkw257, PMID: 27079975

Ray-Gallet D, Quivy JP, Scamps C, Martini EMD, Lipinski M, Almouzni G. 2002. HIRA is critical for a Nucleosome assembly pathway independent of DNA synthesis. *Molecular Cell* **9**:1091–1100. DOI: https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00526-9, PMID: 12049744

Ray-Gallet D, Woolfe A, Vassias I, Pellentz C, Lacoste N, Puri A, Schultz DC, Pchelintsev NA, Adams PD, Jansen LET, Almouzni G. 2011. Dynamics of Histone H3 deposition in vivo reveal a Nucleosome gap-filling mechanism for H3.3 to maintain Chromatin integrity. *Molecular Cell* **44**:928–941. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.006, PMID: 22195966

Ricketts MD, Marmorstein R. 2017. A molecular prospective for HIRA complex assembly and H3.3-specific Histone chaperone function. *Journal of Molecular Biology* **429**:1924–1933. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.010, PMID: 27871933

Sahin U, Ferhi O, Jeanne M, Benhenda S, Berthier C, Jollivet F, Niwa-Kawakita M, Faklaris O, Setterblad N, de Thé H, Lallemand-Breitenbach V. 2014. Oxidative stress–induced assembly of PML nuclear bodies controls

Sumoylation of partner proteins. *The Journal of Cell Biology* **204**:931–945. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.201305148, PMID: 24637324

SahinU, JollivetF, BerthierC, de Thé H, Lallemand-Breitenbach V. 2016. Detection of protein Sumoylation in situ by proximity ligation assays. Rodriguez MS (Ed). *SUMO, Methods in Molecular Biology* New York, NY: Springer. p. 139–150. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6358-4

Sarai N, Nimura K, Tamura T, Kanno T, Patel MC, Heightman TD, Ura K, Ozato K. 2013. Whsc1 links transcription elongation to HIRA-mediated Histone H3.3 deposition. *The EMBO Journal* **32**:2392–2406. DOI: https://doi.org/10.1038/emboj.2013.176, PMID: 23921552

Schimmel J, Eifler K, Sigurðsson JO, Cuijpers SAG, Hendriks IA, Verlaan-de Vries M, Kelstrup CD, Francavilla C, Medema RH, Olsen JV, Vertegaal ACO. 2014. Uncovering Sumoylation Dynamics during cell-cycle progression reveals Foxm1 as a key mitotic SUMO target protein. *Molecular Cell* **53**:1053–1066. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.001, PMID: 24582501

Seeler JS, Marchio A, Sitterlin D, Transy C, Dejean A. 1998. Interaction of Sp100 with Hp1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the Chromatin compartment. *PNAS* **95**:7316–7321. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.95.13.7316, PMID: 9636146

Shaw AE, Hughes J, Gu Q, Behdenna A, Singer JB, Dennis T, Orton RJ, Varela M, Gifford RJ, Wilson SJ, Palmarini M, Malik H. 2017. Fundamental properties of the mammalian innate immune system revealed by Multispecies comparison of type I interferon responses. *PLOS Biology* **15**:e2004086. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004086

Shiels C, Islam SA, Vatcheva R, Sasieni P, Sternberg MJE, Freemont PS, Sheer D. 2001. PML bodies associate specifically with the MHC Gene cluster in Interphase nuclei. *Journal of Cell Science* **114**:3705–3716. DOI: https://doi.org/10.1242/jcs.114.20.3705

Stadler M, Chelbi-Alix MK, Koken MH, Venturini L, Lee C, Saïb A, Quignon F, Pelicano L, Guillemin MC, Schindler C. 1995. Transcriptional induction of the PML growth Suppressor Gene by Interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene* **11**:2565–2573 PMID: 8545113.

Sun H, Chen Y, Yan K, Shao Y, Zhang QC, Lin Y, Xi Q. 2023. Recruitment of Trim33 to Cell-Context specific PML nuclear bodies regulates nodal signaling in mESCs. *The EMBO Journal* **42**:e112058. DOI: https://doi.org/10.15252/embj.2022112058, PMID: 36524443

Szostecki C, Guldner HH, Netter HJ, Will H. 1990. Isolation and characterization of cDNA Encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by Autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis. Journal of Immunology **145**:4338–4347 PMID: 2258622.

Tamura T, Smith M, Kanno T, Dasenbrock H, Nishiyama A, Ozato K. 2009. Inducible deposition of the Histone variant H3.3 in interferon-stimulated genes. *The Journal of Biological Chemistry* **284**:12217–12225. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M805651200, PMID: 19244243

Torné J, Ray-Gallet D, Boyarchuk E, Garnier M, Le Baccon P, Coulon A, Orsi GA, Almouzni G. 2020. Two HIRA-dependent pathways mediate H3.3 de novo deposition and recycling during transcription. *Nature Structural & Molecular Biology* **27**:1057–1068. DOI: https://doi.org/10.1038/s41594-020-0492-7, PMID: 32895554

Wang J, Shiels C, Sasieni P, Wu PJ, Islam SA, Freemont PS, Sheer D. 2004. Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with Transcriptionally active Genomic regions. *Journal of Cell Biology* **164**:515–526. DOI: https://doi.org/10.1083/jcb.200305142

Wang H, Xu X, Nguyen CM, Liu Y, Gao Y, Lin X, Daley T, Kipniss NH, La Russa M, Qi LS. 2018. CRISPR-mediated programmable 3D genome positioning and nuclear organization. *Cell* **175**:1405–1417.. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.013

Workman JL. 2006. Nucleosome displacement in transcription: Figure 1. *Genes & Development* **20**:2009–2017. DOI: https://doi.org/10.1101/gad.1435706, PMID: 16882978

Yao Q, Li H, Liu BQ, Huang XY, Guo L. 2011. Sumoylation-regulated protein Phosphorylation, evidence from quantitative Phosphoproteomics analyses. *The Journal of Biological Chemistry* **286**:27342–27349. DOI: https://doi.org/10.1074/jbc.M111.220848, PMID: 21685386

Ye X, Zerlanko B, Kennedy A, Banumathy G, Zhang R, Adams PD. 2007a. Downregulation of WNT signaling is a trigger for formation of Facultative Heterochromatin and onset of cell Senescence in primary human cells. *Molecular Cell* **27**:183–196. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.034, PMID: 17643369

Ye X, Zerlanko B, Zhang R, Somaiah N, Lipinski M, Salomoni P, Adams PD. 2007b. Definition of pRB- and P53-dependent and -Independent steps in HIRA/Asf1A-mediated formation of Senescence-associated Heterochromatin foci. *Molecular and Cellular Biology* **27**:2452–2465. DOI: https://doi.org/10.1128/MCB.01592-06, PMID: 17242198

Zhang R, Poustovoitov MV, Ye X, Santos HA, Chen W, Daganzo SM, Erzberger JP, Serebriiskii IG, Canutescu AA, Dunbrack RL, Pehrson JR, Berger JM, Kaufman PD, Adams PD. 2005. Formation of Macroh2A-containing Senescence-associated Heterochromatin foci and Senescence driven by Asf1A and HIRA. *Developmental Cell* **8**:19–30. DOI: https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.10.019

Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, Liu XS. 2008. Model-based analysis of chip-Seq (MACS). *Genome Biology* **9**:R137. DOI: https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-9-r137, PMID: 18798982

Zhang H, Gan H, Wang Z, Lee JH, Zhou H, Ordog T, Wold MS, Ljungman M, Zhang Z. 2017. RPA interacts with HIRA and regulates H3.3 deposition at Gene regulatory elements in mammalian cells. *Molecular Cell* **65**:272–284. DOI: https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.11.030

Zhao Q, Xie Y, Zheng Y, Jiang S, Liu W, Mu W, Liu Z, Zhao Y, Xue Y, Ren J. 2014. GPS-SUMO: A tool for the prediction of Sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic Acids Research* **42**:W325–W330. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gku383, PMID: 24880689

Appendix 1

Appendix 1—key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Cell line (*H. sapiens*)	BJ	ATCC	CRL-2522	Human primary foreskin fibroblasts
Cell line (*H. sapiens*)	BJ S1S2D5	This paper		Human primary foreskin fibroblasts transduced with TetOne-Tat-S1S2D5-Flag-His
Cell line (*H. sapiens*)	BJ eH3.3i	This paper		Human primary foreskin fibroblasts transduced with H3.3-SNAP-HA3
Cell line (*H. sapiens*)	BJ HIRA-HA WT/ mSIM(1-5)	This paper		Human primary foreskin fibroblasts transduced with HIRA-HA WT/mSIM(1-5)
Cell line (*H. sapiens*)	BJ EYFP-SP100 isoform A WT or K297R (siRNA resistant)	This paper		Human primary foreskin fibroblasts transduced with EYFP-SP100 isoform A WT or K297R (siRNA resistant)
Cell line (*H. sapiens*)	BJ Myc-DAXX	This paper		Human primary foreskin fibroblasts transduced with Myc-DAXX
Cell line (*H. sapiens*)	IMR90	ATCC	CCL-186	Fetal lung primary fibroblasts
Cell line (*H. sapiens*)	IMR90 eH3.3i	This paper		Fetal lung primary fibroblasts transduced with H3.3-SNAP-HA3
Cell line (*H. sapiens*)	IMR90 HIRA-HA WT/ K809G	This paper		Fetal lung primary fibroblasts transduced with HIRA-HA WT/K809G
Cell line (*H. sapiens*)	HEK 293T	Intercell, AG ***Corpet et al., 2014***		Immortalized embryonic kidney cells
Cell line (*M. musculus*)	MEF PML$^{-/-}$	Gift from Dr. Lallemand-Breitenbach ***Sahin et al., 2014***		Mouse embryonic fibroblasts knocked-out for *PML*
Cell line (*M. musculus*)	MEF PML$^{-/-}$ Myc-PML1 WT/3 K	This paper		Mouse embryonic fibroblasts knocked-out for *PML* and transduced with TetOne-Myc-PML1 WT/3 K
Antibody	Anti-Actin (Rabbit polyclonal)	Sigma-Aldrich	A2066	WB 1:1000
Antibody	Anti-panH3 (Rabbit polyclonal)	Abcam	ab1791	WB 1:5000 ChIP: 2 µg
Antibody	Anti-H3.3 (Rabbit monoclonal)	Diagenode	C15210011	WB 1:1000 ChIP: 2 µg
Antibody	Anti-HA (Rabbit polyclonal)	Abcam	ab9110	IF 1:1000 WB 1:1000
Antibody	Anti-HIRA #01 (Mouse monoclonal, clone WC119)	Active Motif	3558	IF 1:500 WB 1:1000
Antibody	Anti-HIRA #02 (Mouse monoclonal, clone WC119)	Millipore	04–1488	IF 1:500 WB 1:1000
Antibody	Anti-HIRA #03 (Rabbit polyclonal)	Abcam	ab20655	For mouse IF 1:100
Antibody	Anti-6xHis #01 (Mouse monoclonal, clone 3D5)	Clontech	631212	IF 1:1000
Antibody	Anti-6xHis #02 (Rabbit polyclonal)	Bethyl	A190-114A	IF 1:10000

Appendix 1 Continued on next page

Appendix 1 Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Antibody	Anti-c-Myc #01 (Mouse monoclonal, clone 9E10)	Santa Cruz	sc-40	WB 1:1000
Antibody	Anti-c-Myc #02 (Rabbit polyclonal)	Abcam	ab9106	IF 1:1000
Antibody	Anti-PML #01 (Mouse monoclonal, clone PG-M3)	Santa Cruz	sc-966	IF 1:200
Antibody	Anti-PML #02 (Rabbit polyclonal)	Santa Cruz	sc-5621	IF 1:200 WB 1:1000
Antibody	Anti-PML #03 (Rabbit polyclonal)	Sigma	PLA0172	IF 1:5000 WB 1:1000
Antibody	Anti-PML #04 (Mouse monoclonal, clone 36.1–104)	Millipore	MAB3738	For mouse IF 1:100
Antibody	Anti-SP100 (Rabbit polyclonal antiserum)	Kind gift from Dr. Thomas M. Sternsdorf	GH3	IF: 1:100 WB: 1:1000
Antibody	Anti-SUMO-1 (Rabbit monoclonal, clone Y299)	Abcam	ab32058	WB 1:1000
Antibody	Anti-SUMO-2/3 (Rabbit polyclonal)	Abcam	ab3742	WB 1:1000
Antibody	Anti-αTubulin (Mouse monoclonal, clone DM1A)	Sigma	T6199	WB 1:10000
Recombinant DNA reagent	pLentiN (plasmid)	Addgene	#37444	Lentiviral plasmid
Recombinant DNA reagent	pLVX-TetOne (plasmid)	Clontech	631849	Doxycyclin inducible lentiviral plasmid
Recombinant DNA reagent	pcDNA5-Tat-S1S2D5-Flag-His (plasmid)	Gift from Dr. Hughes ***Hughes et al., 2017***		
Recombinant DNA reagent	pLVX-TetOne-Tat-S1S2D5-Flag-His (plasmid)	This paper		PCR on pcDNA5-Tat-S1S2D5-Flag-His and cloning in lentiviral pLVX-TetOne plasmid
Recombinant DNA reagent	pLentiN-HIRA-HA WT (plasmid)	This paper		RT-PCR on HeLa cells and cloning in lentiviral pLentiN plasmid
Recombinant DNA reagent	pLentiN-HIRA-HA WT (plasmid)	This paper		RT-PCR on HeLa cells and cloning in lentiviral pLentiN plasmid
Recombinant DNA reagent	pLentiN-HIRA-HA mSIM(1-5) (plasmid)	This paper		Site-directed mutagenesis on pLentiN-HIRA-HA WT plasmid. Mutations: mSIM1=V124 G/S125G; mSIM2=V225 G/L226G; mSIM3=L320 G/L321G; mSIM4=V805 G/V806G; mSIM5=V978 G/V979G
Recombinant DNA reagent	pLentiN-HIRA-HA K809G (plasmid)	This paper		Site-directed mutagenesis K809G on pLentiN HIRA-HA WT plasmid
Recombinant DNA reagent	pLNGY-PML1 WT (plasmid)	Gift from Dr. Everett ***Cuchet et al., 2011***		
Recombinant DNA reagent	pLNGY-PML1.KKK (plasmid)	Gift from Dr. Everett ***Cuchet et al., 2011***		3 main SUMOylation sites mutated PML1

Appendix 1 Continued on next page

Appendix 1 Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Recombinant DNA reagent	pLVX-PML1 WT (plasmid)	This paper		PCR on pLNGY-PML1 WT and cloning in lentiviral pLVX-TetOne plasmid
Recombinant DNA reagent	pLVX-PML1.KKK (plasmid)	This paper		PCR on pLNGY-PML1.KKK and cloning in lentiviral pLVX-TetOne plasmid
Recombinant DNA reagent	pLNGY-EYFP-S100 isoform A WT (plasmid)	Gift from Dr. Everett ***Cuchet-Lourenço et al., 2011***		
Recombinant DNA reagent	pLNGY-EYFP-S100 isoform A K297R (plasmid)	Gift from Dr. Everett ***Cuchet-Lourenço et al., 2011***		Main SUMOylation site K297 mutated on SP100
Recombinant DNA reagent	pLVX-EYFP-SP100 isoform A WT (plasmid)	This paper		PCR on pLNGY-EYFP-S100 isoform A WT and cloning in lentiviral pLVX-TetOne plasmid
Recombinant DNA reagent	pLVX-EYFP-SP100 isoform A K297R (plasmid)	This paper		PCR on pLNGY-EYFP-S100 isoform A K297R and cloning in lentiviral pLVX-TetOne plasmid
Recombinant DNA reagent	pBABE-H3.3-SNAP-HA3 (plasmid)	Gift from Dr. Jansen		
Recombinant DNA reagent	pLVX-TetOne-H3.3-SNAP-HA3 (plasmid)	This paper		PCR on pBABE-H3.3-SNAP-HA3 and cloning in lentiviral pLVX-TetOne plasmid
Recombinant DNA reagent	RP11-438J1 (BAC)	Gift from Dr. Schluth-Bolard		BAC used for FISH probe against *GHRL*
Recombinant DNA reagent	RP11-185E17 (BAC)	RP11-185E17	https://bacpacresources.org/	BAC used for FISH probe against *PML*
Recombinant DNA reagent	RP11-120C17 (BAC)	RP11-120C17	https://bacpacresources.org/	BAC used for FISH probe against *MX1*
Recombinant DNA reagent	RP11-134B23 (BAC)	RP11-134B23	https://bacpacresources.org/	BAC used for FISH probe against *OAS1*
Sequence-based reagent	siHIRA	***Ray-Gallet et al., 2011***	siRNA	sequence 5'GGAUAACACUGUCGUCAUCdTdT
Sequence-based reagent	siLuc	***Adam et al., 2013***	siRNA	sequence 5'CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT
Sequence-based reagent	siPML	***Everett et al., 2006***	siRNA	sequence 5'AGATGCAGCTGTATCCAAGdTdT
Sequence-based reagent	siSP100	***Everett et al., 2008***	siRNA	sequence 5'GUGAGCCUGUGAUCAAUAAdTdT
Sequence-based reagent	siSUMO-1	***Lallemand-Breitenbach et al., 2008***	siRNA	sequence 5'GGACAGGAUAGCAGUGAGAdTdT
Sequence-based reagent	siSUMO-2/3	***Yao et al., 2011***	siRNA	sequence 5'GUCAAUGAGGCAGAUCAGAdTdT
Sequence-based reagent	H3.3-ChIP-cluster3-Chr1-F (Enh1)	***Pchelintsev et al., 2013***	CHIP qPCR primer	5'GCCACTTGCCAATGTTTCTC
Sequence-based reagent	H3.3-ChIP-cluster3-Chr1-R (Enh1)	***Pchelintsev et al., 2013***	CHIP qPCR primer	5'TGGCCCCATGTAGTGAAAAG
Sequence-based reagent	ChIP-GCH1-TES-F	this paper	CHIP qPCR primer	5'TCTGGTCCCGGTTTCCTTTG
Sequence-based reagent	ChIP-GCH1-TES-R	this paper	CHIP qPCR primer	5'TTTAATTTGGCCCACGCTGC

Appendix 1 Continued on next page

Appendix 1 Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Sequence-based reagent	ChIP-ISG54-TSS-F	This paper	CHIP qPCR primer	5'GCAGGAAGTGGGGTTTGCTA
Sequence-based reagent	ChIP-ISG54-TSS-R	This paper	CHIP qPCR primer	5'GAGGGATGTTTCATCGGCCT
Sequence-based reagent	ChIP-ISG54-mid-F	This paper	CHIP qPCR primer	5'ATGTAACTAACCCCAGGTGCG
Sequence-based reagent	ChIP-ISG54-mid-R	This paper	CHIP qPCR primer	5'TGCTTCCCACTCCCATTTTGA
Sequence-based reagent	ChIP-ISG54-TES-F	This paper	CHIP qPCR primer	5'AGTCTGGAAGCCTCATCCCT
Sequence-based reagent	ChIP-ISG54-TES-R	This paper	CHIP qPCR primer	5'CCTAGTGGGCACCACATCTC
Sequence-based reagent	ChIP-MX1-TSS-F	***Cheon et al., 2013***	CHIP qPCR primer	5'GCCCTCTCTTCTTCCAGGCAAC
Sequence-based reagent	ChIP-MX1-TSS-R	***Cheon et al., 2013***	CHIP qPCR primer	5'GGGACAGGCATCAACAAAGC
Sequence-based reagent	ChIP-MX1-mid-F	This paper	CHIP qPCR primer	5'TCTACGCTCTGGGGACATCA
Sequence-based reagent	ChIP-MX1-mid-R	This paper	CHIP qPCR primer	5'GAACCAAACCCACCACCAGA
Sequence-based reagent	ChIP-MX1-TES-F	This paper	CHIP qPCR primer	5'CTCCCGTGAACTGTTCTTTCCT
Sequence-based reagent	ChIP-MX1-TES-R	This paper	CHIP qPCR primer	5'GCTGTAGGTGTCCTTGTCCT
Sequence-based reagent	ChIP-MX2-TES-F	This paper	CHIP qPCR primer	5'ACCACTCCAGCAAACCCTTC
Sequence-based reagent	ChIP-MX2-TES-R	This paper	CHIP qPCR primer	5'AATGGGATCTGGTTGGCGAG
Sequence-based reagent	ChIP-OAS1-TSS-F	This paper	CHIP qPCR primer	5'ACCACAGACAACTGTGAAAGG
Sequence-based reagent	ChIP-OAS1-TSS-R	This paper	CHIP qPCR primer	5'GTCCTTTAGCCAGCAACAAGC
Sequence-based reagent	ChIP-OAS1-mid-F	This paper	CHIP qPCR primer	5'GCAGCACGTTGGGAGATAGA
Sequence-based reagent	ChIP-OAS1-mid-R	This paper	CHIP qPCR primer	5'TTCTCCTGATGTGGCAAGGG
Sequence-based reagent	ChIP-OAS1-TES-F	This paper	CHIP qPCR primer	5'CTTGTCACATCCCCACCTCTC
Sequence-based reagent	ChIP-OAS1-TES-R	This paper	CHIP qPCR primer	5'GTCCTTTGCCCCTGTTTAGC
Sequence-based reagent	GAPDH-F	This paper	RT qPCR primer	5'GAGTCAACGGATTTGGTCG
Sequence-based reagent	GAPDH-R	This paper	RT qPCR primer	5'TTGATTTTGGAGGGATCTCG
Sequence-based reagent	H3F3A-F	This paper	RT qPCR primer	5'CCAGGAAGCAACTGGCTACA
Sequence-based reagent	H3F3A-R	This paper	RT qPCR primer	5'ACCAGGCCTGTAACGATGAG

Appendix 1 Continued on next page

Appendix 1 Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Sequence-based reagent	HIRA-F	This paper	RT qPCR primer	5'AGGACTCTCGTCTCATGCCT
Sequence-based reagent	HIRA-R	This paper	RT qPCR primer	5'CAGCTTCAGTGCAAGTGCT
Sequence-based reagent	ISG15-F	This paper	RT qPCR primer	5'GGTGGACAAATGCGACGAAC
Sequence-based reagent	ISG15-R	This paper	RT qPCR primer	5'TCGAAGGTCAGCCAGAACAG
Sequence-based reagent	ISG54-F	This paper	RT qPCR primer	5'TGAAAGAGCGAAGGTGTGCT
Sequence-based reagent	ISG54-R	This paper	RT qPCR primer	5'CTCAGAGGGTCAATGGCGTT
Sequence-based reagent	MX1-F	This paper	RT qPCR primer	5'GGAGGCACTGTCAGGAGTTG
Sequence-based reagent	MX1-R	This paper	RT qPCR primer	5'TCCTGGTAACTGACCTTGCC
Sequence-based reagent	OAS1-F	This paper	RT qPCR primer	5'AGCTGGAAGCCTGTCAAAGA
Sequence-based reagent	OAS1-R	This paper	RT qPCR primer	5'AGGTTTATAGCCGCCAGTCA
Sequence-based reagent	PML-F	This paper	RT qPCR primer	5'CAGGGACCCTATTGACGTTG
Sequence-based reagent	PML-R	This paper	RT qPCR primer	5'ATGGAGAAGGCGTACACTGG
Sequence-based reagent	SP100-F	This paper	RT qPCR primer	5'CACTGACGTTGATGAGCCCT
Sequence-based reagent	SP100-R	This paper	RT qPCR primer	5'AATCTGGGGTCGTGAGCAAG
Peptide, recombinant protein	IFNβ	Peprotech	300-02BC	Human Final concentration: 100 or 1000 U/mL
Peptide, recombinant protein	IFNα	PBL assay science	12105–1	Mouse Final concentration: 1000 U/mL
Peptide, recombinant protein	IL-6	Peprotech	200–06	Human Final concentration: 200 ng/mL
Peptide, recombinant protein	IL-8	Peprotech	200–08	Human Final concentration: 200 ng/mL
Peptide, recombinant protein	TNF-α	Invivogen	rcyc-htnfa	Human Final concentration: 100 ng/mL
Chemical compound, drug	Blasticidin	Invivogen	ant-bl	Final concentration: 5 µg/mL
Chemical compound, drug	Doxycycline	Sigma Aldrich	D9891	Final concentration: 100 ng/mL
Chemical compound, drug	EdU	Invitrogen	C10338	Final concentration: 10 µM
Chemical compound, drug	PolyI:C	Invivogen	trlr-pic	Final concentration: 10 µg/mL
Chemical compound, drug	Puromycin	Invivogen	ant-pr	Final concentration: 1 µg/mL

Appendix 1 Continued on next page

Appendix 1 Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Chemical compound, drug	Ruxolitinib	Invivogen	trlr-rux	Final concentration: 2 µM
Commercial assay or kit	Duolink In Situ Red Starter Kit Mouse/ Rabbit	Sigma Aldrich	DUO092101	For PLA
Software, algorithm	Homer	http://homer.ucsd.edu/homer/download.html		ChIP seq analysis
Software, algorithm	MACS2	***Zhang et al., 2008***		ChIP seq analysis
Software, algorithm	Bowtie2	***Langmead and Salzberg, 2012***		ChIP seq analysis
Software, algorithm	DeepTools suite	https://deeptools.readthedocs.io/en/develop/		ChIP seq visualization
Software, algorithm	enrichR	***Kuleshov et al., 2016***		GO analysis
Software, algorithm	IGV	https://software.broadinstitute.org/software/igv/		Genome browser
Software, algorithm	Fiji	https://imagej.net/imagej-wiki-static/Fiji/Downloads		Image analysis
Software, algorithm	Photoshop	https://www.adobe.com/products/photoshop.html		Image analysis
Software, algorithm	GraphPad Prism 6	https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/		Statistical analysis and graphics
Software, algorithm	Biorender	biorender.com		figure creation

Annexe 2 : Contributions scientifiques et encadrements

Article publié

Kleijwegt C, Bressac F, Seurre C, Bouchereau W, Cohen C, Texier P, Simonet T, Schaeffer L, Lomonte P*, **Corpet A***. 2023. Interplay between PML NBs and HIRA for H3.3 dynamics following type I interferon stimulus. *eLife* 12:e80156. doi:10.7554/eLife.80156 *[IF 8.713]*

Article en cours de préparation

Bressac F, Kleijwegt C, Bouchereau W, Bargain T, Lomonte P* and Corpet A*. Nuclear cGAS degradation depends on a p97-PML NBs axis upon senescence-prone DNA damage.

Article en préparation

Participation à des Congrès scientifiques

- **Présentations affichées (posters) :**
  - Congrès international EMBO à Montpellier (9 Octobre – 13 Octobre 2022) : cGAS implication in senescence induction
  - Congrès international CRCL à Lyon (2 Novembre – 4 Novembre 2022) : cGAS implication in senescence induction (Prix du meilleur poster)
  - Congrès BMIC à Lyon (14-15 Novembre 2022) : cGAS implication in senescence induction
  - Colloque I3M à Lyon (2 Février 2024) : cGAS nuclear dynamic during senescence induction following DNA damages.
- **Présentations orales**
  - Congrès BMIC (18 Décembre – 19 Décembre 2023) : cGAS nuclear dynamic during senescence induction following DNA damages (prix de la meilleure présentation)
  - Congrès YRIN (25 Avril 2024) : cGAS nuclear dynamic during senescence induction following DNA damages

Encadrement d'étudiants :

- Jonathan Troncy : Master 1 ; 3 Janvier – 18 Février 2022
- Romance Tissot : Lycéenne de première ; 19 Avril 2022 – 22 Avril 2022
- Marthe Delay : Bachelor SupBiotech ; 30 Mai – 21 Juillet 2023
- Marie-Léa Boulage : Master 1 ; 2 Janvier – 16 Février 2024

Vulgarisation scientifique :

- Journées portes ouvertes PGNM
- Accueil d'un lycéen avec l'association "Un peu de bon science"
- Intervention auprès de l'association "meeting for minds"
- Intervention dans 2 lycées Lyonnais pour des rencontres entre lycéens et chercheurs

Bibliographie

A, Peng, et Stephanie C. Weber. 2019. « Evidence for and against Liquid-Liquid Phase Separation in the Nucleus ». *Non-Coding RNA* 5 (4): 50. https://doi.org/10.3390/ncrna5040050.

Aarreberg, Lauren D., Katharina Esser-Nobis, Connor Driscoll, Andrey Shuvarikov, Justin A. Roby, et Michael Gale. 2019. « Interleukin-1β Induces mtDNA Release to Activate Innate Immune Signaling via cGAS-STING ». *Molecular Cell* 74 (4): 801-815.e6. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.038.

Abbas, Tarek, et Anindya Dutta. 2009. « P21 in Cancer: Intricate Networks and Multiple Activities ». *Nature Reviews. Cancer* 9 (6): 400-414. https://doi.org/10.1038/nrc2657.

Abbotts, Rachel, et David M. Wilson. 2017. « Coordination of DNA Single Strand Break Repair ». *Free radical biology & medicine* 107 (juin):228-44. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.039.

Ablasser, Andrea, Marion Goldeck, Taner Cavlar, Tobias Deimling, Gregor Witte, Ingo Röhl, Karl-Peter Hopfner, Janos Ludwig, et Veit Hornung. 2013. « cGAS Produces a 2′-5′-Linked Cyclic Dinucleotide Second Messenger That Activates STING ». *Nature* 498 (7454): 380-84. https://doi.org/10.1038/nature12306.

Ablasser, Andrea, Jonathan L. Schmid-Burgk, Inga Hemmerling, Gabor L. Horvath, Tobias Schmidt, Eicke Latz, et Veit Hornung. 2013. « Cell Intrinsic Immunity Spreads to Bystander Cells via the Intercellular Transfer of cGAMP ». *Nature* 503 (7477): 530-34. https://doi.org/10.1038/nature12640.

Abou-Ghali, Majdouline, et Valérie Lallemand-Breitenbach. 2024. « PML Nuclear Bodies: The Cancer Connection and Beyond ». *Nucleus (Austin, Tex.)* 15 (1): 2321265. https://doi.org/10.1080/19491034.2024.2321265.

Acosta, Juan C., Ana O'Loghlen, Ana Banito, Maria V. Guijarro, Arnaud Augert, Selina Raguz, Marzia Fumagalli, et al. 2008. « Chemokine Signaling via the CXCR2 Receptor Reinforces Senescence ». *Cell* 133 (6): 1006-18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.038.

Adam, M., F. Robert, M. Larochelle, et L. Gaudreau. 2001. « H2A.Z Is Required for Global Chromatin Integrity and for Recruitment of RNA Polymerase II under Specific Conditions ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (18): 6270-79. https://doi.org/10.1128/MCB.21.18.6270-6279.2001.

Adam, Salomé, Juliette Dabin, et Sophie E. Polo. 2015. « Chromatin Plasticity in Response to DNA Damage: The Shape of Things to Come ». *DNA Repair* 32 (août):120-26. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.04.022.

Aguirre, Sebastian, et Ana Fernandez-Sesma. 2017. « Collateral Damage during Dengue Virus Infection: Making Sense of DNA by cGAS ». *Journal of Virology* 91 (14): e01081-16.

https://doi.org/10.1128/JVI.01081-16.

Ahlers, Laura R. H., Reginaldo G. Bastos, Aoi Hiroyasu, et Alan G. Goodman. 2016. « Invertebrate Iridescent Virus 6, a DNA Virus, Stimulates a Mammalian Innate Immune Response through RIG-I-Like Receptors ». *PLoS ONE* 11 (11): e0166088. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166088.

Ahmad, Kami, et Steven Henikoff. 2002. « Histone H3 Variants Specify Modes of Chromatin Assembly ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 Suppl 4 (Suppl 4): 16477-84. https://doi.org/10.1073/pnas.172403699.

Ahnesorg, Peter, Philippa Smith, et Stephen P. Jackson. 2006. « XLF Interacts with the XRCC4-DNA Ligase IV Complex to Promote DNA Nonhomologous End-Joining ». *Cell* 124 (2): 301-13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.031.

Alabert, Constance, Teresa K. Barth, Nazaret Reverón-Gómez, Simone Sidoli, Andreas Schmidt, Ole N. Jensen, Axel Imhof, et Anja Groth. 2015. « Two Distinct Modes for Propagation of Histone PTMs across the Cell Cycle ». *Genes & Development* 29 (6): 585-90. https://doi.org/10.1101/gad.256354.114.

Alabert, Constance, et Anja Groth. 2012. « Chromatin Replication and Epigenome Maintenance ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13 (3): 153-67. https://doi.org/10.1038/nrm3288.

Alimonti, Andrea, Arkaitz Carracedo, John G. Clohessy, Lloyd C. Trotman, Caterina Nardella, Ainara Egia, Leonardo Salmena, et al. 2010. « Subtle Variations in Pten Dose Determine Cancer Susceptibility ». *Nature Genetics* 42 (5): 454-58. https://doi.org/10.1038/ng.556.

Allis, C. David, et Thomas Jenuwein. 2016. « The Molecular Hallmarks of Epigenetic Control ». *Nature Reviews. Genetics* 17 (8): 487-500. https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59.

Althaus, F. R. 1992. « Poly ADP-Ribosylation: A Histone Shuttle Mechanism in DNA Excision Repair ». *Journal of Cell Science* 102 (Pt 4) (août):663-70. https://doi.org/10.1242/jcs.102.4.663.

Alvarez, Francisca, Francisca Muñoz, Pierre Schilcher, Axel Imhof, Geneviève Almouzni, et Alejandra Loyola. 2011. « Sequential Establishment of Marks on Soluble Histones H3 and H4 ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (20): 17714-21. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.223453.

Andrade, Warrison A., Sarika Agarwal, Shunyan Mo, Scott A. Shaffer, Joseph P. Dillard, Tobias Schmidt, Veit Hornung, Katherine A. Fitzgerald, Evelyn A. Kurt-Jones, et Douglas T. Golenbock. 2016. « Type I Interferon Induction by Neisseria Gonorrhoeae: Dual Requirement of Cyclic GMP-AMP Synthase and Toll-like Receptor 4 ». *Cell Reports* 15 (11): 2438-48. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.05.030.

Andreeva, Liudmila, Björn Hiller, Dirk Kostrewa, Charlotte Lässig, Carina C. de Oliveira Mann, David Jan Drexler, Andreas Maiser, et al. 2017. « cGAS Senses Long and HMGB/TFAM-Bound U-Turn DNA by Forming Protein-DNA Ladders ». *Nature* 549 (7672): 394-98. https://doi.org/10.1038/nature23890.

Andrew, Deborah, et Richard Aspinall. 2002. « Age-Associated Thymic Atrophy Is Linked to a Decline in IL-7 Production ». *Experimental Gerontology* 37 (2-3): 455-63.

https://doi.org/10.1016/s0531-5565(01)00213-3.

Annunziato, Anthony T. 2013. « Assembling Chromatin: The Long and Winding Road ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1819 (3-4): 196-210. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.07.005.

Armstrong, J. A., et B. M. Emerson. 1998. « Transcription of Chromatin: These Are Complex Times ». *Current Opinion in Genetics & Development* 8 (2): 165-72. https://doi.org/10.1016/s0959-437x(98)80137-8.

Arnould, Coline, Vincent Rocher, Anne-Laure Finoux, Thomas Clouaire, Kevin Li, Felix Zhou, Pierre Caron, et al. 2021. « Loop Extrusion as a Mechanism for Formation of DNA Damage Repair Foci ». *Nature*, février, 1-6. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03193-z.

Atanassov, Boyko, Aneliya Velkova, Emil Mladenov, Boyka Anachkova, et George Russev. 2004. « Comparison of the Global Genomic and Transcription-Coupled Repair Rates of Different Lesions in Human Cells ». *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences* 59 (5-6): 445-53. https://doi.org/10.1515/znc-2004-5-628.

Attwood, Kathleen M., Jayme Salsman, Dudley Chung, Sabateeshan Mathavarajah, Carter Van Iderstine, et Graham Dellaire. 2020. « PML Isoform Expression and DNA Break Location Relative to PML Nuclear Bodies Impacts the Efficiency of Homologous Recombination ». *Biochemistry and Cell Biology* 98 (3): 314-26. https://doi.org/10.1139/bcb-2019-0115.

Aymard, François, Beatrix Bugler, Christine K Schmidt, Emmanuelle Guillou, Pierre Caron, Sébastien Briois, Jason S Iacovoni, et al. 2014. « Transcriptionally Active Chromatin Recruits Homologous Recombination at DNA Double-Strand Breaks ». *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (4): 366-74. https://doi.org/10.1038/nsmb.2796.

Bai, Juli, et Feng Liu. 2021. « Nuclear cGAS: Sequestration and Beyond ». *Protein & Cell*, août. https://doi.org/10.1007/s13238-021-00869-0.

Baker, Darren J., Bennett G. Childs, Matej Durik, Melinde E. Wijers, Cynthia J. Sieben, Jian Zhong, Rachel A. Saltness, et al. 2016. « Naturally Occurring P16(Ink4a)-Positive Cells Shorten Healthy Lifespan ». *Nature* 530 (7589): 184-89. https://doi.org/10.1038/nature16932.

Baker, Darren J., Karthik B. Jeganathan, J. Douglas Cameron, Michael Thompson, Subhash Juneja, Alena Kopecka, Rajiv Kumar, et al. 2004. « BubR1 Insufficiency Causes Early Onset of Aging-Associated Phenotypes and Infertility in Mice ». *Nature Genetics* 36 (7): 744-49. https://doi.org/10.1038/ng1382.

Baker, Darren J., Tobias Wijshake, Tamar Tchkonia, Nathan K. LeBrasseur, Bennett G. Childs, Bart van de Sluis, James L. Kirkland, et Jan M. van Deursen. 2011. « Clearance of p16Ink4a-Positive Senescent Cells Delays Ageing-Associated Disorders ». *Nature* 479 (7372): 232-36. https://doi.org/10.1038/nature10600.

Banani, Salman F., Hyun O. Lee, Anthony A. Hyman, et Michael K. Rosen. 2017. « Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 18 (5): 285-98. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.7.

Banigan, Edward J., et Leonid A. Mirny. 2020. « Loop Extrusion: Theory Meets Single-Molecule Experiments ». *Current Opinion in Cell Biology* 64 (juin):124-38. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.04.011.

Banumathy, Gowrishankar, Neeta Somaiah, Rugang Zhang, Yong Tang, Jason Hoffmann, Mark Andrake, Hugo Ceulemans, David Schultz, Ronen Marmorstein, et Peter D. Adams. 2009. « Human UBN1 Is an Ortholog of Yeast Hpc2p and Has an Essential Role in the HIRA/ASF1a Chromatin-Remodeling Pathway in Senescent Cells ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (3): 758-70. https://doi.org/10.1128/MCB.01047-08.

Barnes, Jessica L., Maria Zubair, Kaarthik John, Miriam C. Poirier, et Francis L. Martin. 2018. « Carcinogens and DNA Damage ». *Biochemical Society Transactions* 46 (5): 1213-24. https://doi.org/10.1042/BST20180519.

Barnett, Katherine C., Julia M. Coronas-Serna, Wen Zhou, Michael J. Ernandes, Anh Cao, Philip J. Kranzusch, et Jonathan C. Kagan. 2019. « Phosphoinositide Interactions Position cGAS at the Plasma Membrane to Ensure Efficient Distinction between Self- and Viral DNA ». *Cell* 176 (6): 1432-1446.e11. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.049.

Barr, Sharon M., Cindy G. Leung, Elbert E. Chang, et Karlene A. Cimprich. 2003. « ATR Kinase Activity Regulates the Intranuclear Translocation of ATR and RPA Following Ionizing Radiation ». *Current Biology: CB* 13 (12): 1047-51. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00376-2.

Barrat, Franck J., Mary K. Crow, et Lionel B. Ivashkiv. 2019. « Interferon Target-Gene Expression and Epigenomic Signatures in Health and Disease ». *Nature Immunology* 20 (12): 1574-83. https://doi.org/10.1038/s41590-019-0466-2.

Bartkova, Jirina, Nousin Rezaei, Michalis Liontos, Panagiotis Karakaidos, Dimitris Kletsas, Natalia Issaeva, Leandros-Vassilios F. Vassiliou, et al. 2006. « Oncogene-Induced Senescence Is Part of the Tumorigenesis Barrier Imposed by DNA Damage Checkpoints ». *Nature* 444 (7119): 633-37. https://doi.org/10.1038/nature05268.

Basisty, Nathan, Abhijit Kale, Ok Hee Jeon, Chisaka Kuehnemann, Therese Payne, Chirag Rao, Anja Holtz, et al. 2020. « A Proteomic Atlas of Senescence-Associated Secretomes for Aging Biomarker Development ». *PLoS Biology* 18 (1): e3000599. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000599.

Bass, Thomas E., Jessica W. Luzwick, Gina Kavanaugh, Clinton Carroll, Huzefa Dungrawala, Gloria G. Glick, Michael D. Feldkamp, Reid Putney, Walter J. Chazin, et David Cortez. 2016. « ETAA1 Acts at Stalled Replication Forks to Maintain Genome Integrity ». *Nature Cell Biology* 18 (11): 1185-95. https://doi.org/10.1038/ncb3415.

Bates, S., A. C. Phillips, P. A. Clark, F. Stott, G. Peters, R. L. Ludwig, et K. H. Vousden. 1998. « p14ARF Links the Tumour Suppressors RB and P53 ». *Nature* 395 (6698): 124-25. https://doi.org/10.1038/25867.

Bauwens, Emilie, Tom Parée, Sébastien Meurant, Inès Bouriez, Clotilde Hannart, Anne-Catherine Wéra, Alexis Khelfi, et al. 2023. « Senescence Induced by UVB in Keratinocytes Impairs Amino

Acids Balance ». *The Journal of Investigative Dermatology* 143 (4): 554-565.e9. https://doi.org/10.1016/j.jid.2022.11.017.

Beauclair, Guillaume, Antoine Bridier-Nahmias, Jean-François Zagury, Ali Saïb, et Alessia Zamborlini. 2015. « JASSA: A Comprehensive Tool for Prediction of SUMOylation Sites and SIMs ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 31 (21): 3483-91. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv403.

Beauséjour, Christian M., Ana Krtolica, Francesco Galimi, Masashi Narita, Scott W. Lowe, Paul Yaswen, et Judith Campisi. 2003. « Reversal of Human Cellular Senescence: Roles of the P53 and P16 Pathways ». *The EMBO Journal* 22 (16): 4212-22. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg417.

Bekker-Jensen, Simon, Claudia Lukas, Risa Kitagawa, Fredrik Melander, Michael B. Kastan, Jiri Bartek, et Jiri Lukas. 2006. « Spatial Organization of the Mammalian Genome Surveillance Machinery in Response to DNA Strand Breaks ». *Journal of Cell Biology* 173 (2): 195-206. https://doi.org/10.1083/jcb.200510130.

Bell, Jason C., et Stephen C. Kowalczykowski. 2016. « Mechanics and Single-Molecule Interrogation of DNA Recombination ». *Annual Review of Biochemistry* 85 (juin):193-226. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034352.

Benetos, Athanase, Jeremy D. Kark, Ezra Susser, Masayuki Kimura, Ronit Sinnreich, Wei Chen, Troels Steenstrup, et al. 2013. « Tracking and Fixed Ranking of Leukocyte Telomere Length across the Adult Life Course ». *Aging Cell* 12 (4): 615-21. https://doi.org/10.1111/acel.12086.

Benjamin, R. C., et D. M. Gill. 1980. « Poly(ADP-Ribose) Synthesis in Vitro Programmed by Damaged DNA. A Comparison of DNA Molecules Containing Different Types of Strand Breaks ». *The Journal of Biological Chemistry* 255 (21): 10502-8.

Berger, Frédéric. 2023. « Histone Variants: The Architects of Chromatin ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 135 (février):1-2. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2022.06.015.

Bernard, P., J. F. Maure, J. F. Partridge, S. Genier, J. P. Javerzat, et R. C. Allshire. 2001. « Requirement of Heterochromatin for Cohesion at Centromeres ». *Science (New York, N.Y.)* 294 (5551): 2539-42. https://doi.org/10.1126/science.1064027.

Bernardi, Rosa, et Pier Paolo Pandolfi. 2007. « Structure, Dynamics and Functions of Promyelocytic Leukaemia Nuclear Bodies ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (12): 1006-16. https://doi.org/10.1038/nrm2277.

Bétermier, Mireille, Pascale Bertrand, et Bernard S. Lopez. 2014. « Is Non-Homologous End-Joining Really an Inherently Error-Prone Process? » *PLOS Genetics* 10 (1): e1004086. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004086.

Beucher, Andrea, Julie Birraux, Leopoldine Tchouandong, Olivia Barton, Atsushi Shibata, Sandro Conrad, Aaron A Goodarzi, Andrea Krempler, Penny A Jeggo, et Markus Löbrich. 2009. « ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2 ». *The EMBO Journal* 28 (21): 3413-27. https://doi.org/10.1038/emboj.2009.276.

Bhargava, Ragini, David O. Onyango, et Jeremy M. Stark. 2016. « Regulation of Single-Strand Annealing and Its Role in Genome Maintenance ». *Trends in Genetics: TIG* 32 (9): 566-75. https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.06.007.

Billinghurst, R. C., L. Dahlberg, M. Ionescu, A. Reiner, R. Bourne, C. Rorabeck, P. Mitchell, et al. 1997. « Enhanced Cleavage of Type II Collagen by Collagenases in Osteoarthritic Articular Cartilage ». *The Journal of Clinical Investigation* 99 (7): 1534-45. https://doi.org/10.1172/JCI119316.

Birnbaum, Ramon Y., E. Josephine Clowney, Orly Agamy, Mee J. Kim, Jingjing Zhao, Takayuki Yamanaka, Zachary Pappalardo, et al. 2012. « Coding Exons Function as Tissue-Specific Enhancers of Nearby Genes ». *Genome Research* 22 (6): 1059-68. https://doi.org/10.1101/gr.133546.111.

Bischof, O., S. H. Kim, J. Irving, S. Beresten, N. A. Ellis, et J. Campisi. 2001. « Regulation and Localization of the Bloom Syndrome Protein in Response to DNA Damage ». *The Journal of Cell Biology* 153 (2): 367-80. https://doi.org/10.1083/jcb.153.2.367.

Bischof, Oliver, Olivier Kirsh, Mark Pearson, Koji Itahana, Pier Giuseppe Pelicci, et Anne Dejean. 2002. « Deconstructing PML-Induced Premature Senescence ». *The EMBO Journal* 21 (13): 3358-69. https://doi.org/10.1093/emboj/cdf341.

Biterge, Burcu, et Robert Schneider. 2014. « Histone Variants: Key Players of Chromatin ». *Cell and Tissue Research* 356 (3): 457-66. https://doi.org/10.1007/s00441-014-1862-4.

Bjørkøy, Geir, Trond Lamark, Serhiy Pankiv, Aud Øvervatn, Andreas Brech, et Terje Johansen. 2009. « Monitoring Autophagic Degradation of P62/SQSTM1 ». *Methods in Enzymology* 452:181-97. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03612-4.

Blackburn, E. H. 1992. « Telomerases ». *Annual Review of Biochemistry* 61:113-29. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.000553.

Blackford, Andrew N., et Stephen P. Jackson. 2017. « ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response ». *Molecular Cell* 66 (6): 801-17. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015.

Blier, P. R., A. J. Griffith, J. Craft, et J. A. Hardin. 1993. « Binding of Ku Protein to DNA. Measurement of Affinity for Ends and Demonstration of Binding to Nicks ». *The Journal of Biological Chemistry* 268 (10): 7594-7601.

Boddy, M. N., K. Howe, L. D. Etkin, E. Solomon, et P. S. Freemont. 1996. « PIC 1, a Novel Ubiquitin-like Protein Which Interacts with the PML Component of a Multiprotein Complex That Is Disrupted in Acute Promyelocytic Leukaemia ». *Oncogene* 13 (5): 971-82.

Bohgaki, Miyuki, Toshiyuki Bohgaki, Samah El Ghamrasni, Tharan Srikumar, Georges Maire, Stephanie Panier, Amélie Fradet-Turcotte, et al. 2013. « RNF168 Ubiquitylates 53BP1 and Controls Its Response to DNA Double-Strand Breaks ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (52): 20982-87. https://doi.org/10.1073/pnas.1320302111.

Boichuk, Sergei, Liang Hu, Kathleen Makielski, Pier Paolo Pandolfi, et Ole V. Gjoerup. 2011.

« Functional Connection between Rad51 and PML in Homology-Directed Repair ». *PloS One* 6 (10): e25814. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025814.

Bombarde, Oriane, Céline Boby, Dennis Gomez, Philippe Frit, Marie-Josèphe Giraud-Panis, Eric Gilson, Bernard Salles, et Patrick Calsou. 2010. « TRF2/RAP1 and DNA-PK Mediate a Double Protection against Joining at Telomeric Ends ». *The EMBO Journal* 29 (9): 1573-84. https://doi.org/10.1038/emboj.2010.49.

Bonnefoy, Emilie, Guillermo A. Orsi, Pierre Couble, et Benjamin Loppin. 2007. « The Essential Role of Drosophila HIRA for de Novo Assembly of Paternal Chromatin at Fertilization ». *PLoS Genetics* 3 (10): 1991-2006. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030182.

Boom, Johannes van den, et Hemmo Meyer. 2018. « VCP/P97-Mediated Unfolding as a Principle in Protein Homeostasis and Signaling ». *Molecular Cell* 69 (2): 182-94. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.028.

Borden, K. L. 1998. « RING Fingers and B-Boxes: Zinc-Binding Protein-Protein Interaction Domains ». *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 76 (2-3): 351-58. https://doi.org/10.1139/bcb-76-2-3-351.

Bottone, Sara, Octave Joliot, Zeyneb Vildan Cakil, Lina El Hajji, Louise-Marie Rakotoarison, Gaelle Boncompain, Franck Perez, et Arnaud Gautier. 2023. « A Fluorogenic Chemically Induced Dimerization Technology for Controlling, Imaging and Sensing Protein Proximity ». *Nature Methods* 20 (10): 1553-62. https://doi.org/10.1038/s41592-023-01988-8.

Bower, Kylie, Christine E. Napier, Sara L. Cole, Rebecca A. Dagg, Loretta M. S. Lau, Emma L. Duncan, Elsa L. Moy, et Roger R. Reddel. 2012. « Loss of Wild-Type ATRX Expression in Somatic Cell Hybrids Segregates with Activation of Alternative Lengthening of Telomeres ». *PloS One* 7 (11): e50062. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050062.

Boyer, Joshua A., Cathy J. Spangler, Joshua D. Strauss, Andrew P. Cesmat, Pengda Liu, Robert K. McGinty, et Qi Zhang. 2020. « Structural Basis of Nucleosome-Dependent cGAS Inhibition ». *Science* 370 (6515): 450-54. https://doi.org/10.1126/science.abd0609.

Briard, Benoit, David E. Place, et Thirumala-Devi Kanneganti. 2020. « DNA Sensing in the Innate Immune Response ». *Physiology (Bethesda, Md.)* 35 (2): 112-24. https://doi.org/10.1152/physiol.00022.2019.

Brockers, Kevin, et Robert Schneider. 2019. « Histone H1, the Forgotten Histone ». *Epigenomics* 11 (4): 363-66. https://doi.org/10.2217/epi-2019-0018.

Broussard, Grant, Guoxin Ni, Zhigang Zhang, Qian Li, Patricio Cano, Dirk P. Dittmer, et Blossom Damania. 2023. « Barrier-to-Autointegration Factor 1 Promotes Gammaherpesvirus Reactivation from Latency ». *Nature Communications* 14 (1): 434. https://doi.org/10.1038/s41467-023-35898-2.

Brown, Eric J., et David Baltimore. 2000. « ATR Disruption Leads to Chromosomal Fragmentation and Early Embryonic Lethality ». *Genes & Development* 14 (4): 397-402. https://doi.org/10.1101/gad.14.4.397.

Bunting, Samuel F., Elsa Callén, Nancy Wong, Hua-Tang Chen, Federica Polato, Amanda Gunn, Anne Bothmer, et al. 2010. « 53BP1 Inhibits Homologous Recombination in Brca1-Deficient Cells by Blocking Resection of DNA Breaks ». *Cell* 141 (2): 243-54. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.012.

Burdette, Dara L., Kathryn M. Monroe, Katia Sotelo-Troha, Jeff S. Iwig, Barbara Eckert, Mamoru Hyodo, Yoshihiro Hayakawa, et Russell E. Vance. 2011. « STING Is a Direct Innate Immune Sensor of Cyclic Di-GMP ». *Nature* 478 (7370): 515-18. https://doi.org/10.1038/nature10429.

Burton, Dominick G. A., et Valery Krizhanovsky. 2014. « Physiological and Pathological Consequences of Cellular Senescence ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 71 (22): 4373-86. https://doi.org/10.1007/s00018-014-1691-3.

Cadet, J., M. Berger, T. Douki, et J. L. Ravanat. 1997. « Oxidative Damage to DNA: Formation, Measurement, and Biological Significance ». *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 131:1-87. https://doi.org/10.1007/3-540-61992-5_5.

Calcinotto, Arianna, Jaskaren Kohli, Elena Zagato, Laura Pellegrini, Marco Demaria, et Andrea Alimonti. 2019. « Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury ». *Physiological Reviews* 99 (2): 1047-78. https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2018.

Caldecott, Keith W. 2014. « DNA Single-Strand Break Repair ». *Experimental Cell Research* 329 (1): 2-8. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.027.

Campisi, Judith, et Fabrizio d'Adda di Fagagna. 2007. « Cellular Senescence: When Bad Things Happen to Good Cells ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (9): 729-40. https://doi.org/10.1038/nrm2233.

Cao, Duanfang, Xiaonan Han, Xiaoyi Fan, Rui-Ming Xu, et Xinzheng Zhang. 2020. « Structural Basis for Nucleosome-Mediated Inhibition of cGAS Activity ». *Cell Research* 30 (12): 1088-97. https://doi.org/10.1038/s41422-020-00422-4.

Carbone, Roberta, Mark Pearson, Saverio Minucci, et Pier Giuseppe Pelicci. 2002. « PML NBs Associate with the hMre11 Complex and P53 at Sites of Irradiation Induced DNA Damage ». *Oncogene* 21 (11): 1633-40. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205227.

Carney, James P, Richard S Maser, Heidi Olivares, Elizabeth M Davis, Michelle Le Beau, John R Yates, Lara Hays, William F Morgan, et John H. J Petrini. 1998. « The hMre11/hRad50 Protein Complex and Nijmegen Breakage Syndrome: Linkage of Double-Strand Break Repair to the Cellular DNA Damage Response ». *Cell* 93 (3): 477-86. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81175-7.

Carson, Christian T., Rachel A. Schwartz, Travis H. Stracker, Caroline E. Lilley, Darwin V. Lee, et Matthew D. Weitzman. 2003. « The Mre11 Complex Is Required for ATM Activation and the G2/M Checkpoint ». *The EMBO Journal* 22 (24): 6610-20. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg630.

Carty, Michael, Coralie Guy, et Andrew G. Bowie. 2021. « Detection of Viral Infections by Innate Immunity ». *Biochemical Pharmacology* 183 (janvier):114316. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114316.

Castello, Alfredo, Bernd Fischer, Katrin Eichelbaum, Rastislav Horos, Benedikt M. Beckmann, Claudia Strein, Norman E. Davey, et al. 2012. « Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins ». *Cell* 149 (6): 1393-1406. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.031.

Castillo-Aguilera, Omar, Patrick Depreux, Ludovic Halby, Paola B. Arimondo, et Laurence Goossens. 2017. « DNA Methylation Targeting: The DNMT/HMT Crosstalk Challenge ». *Biomolecules* 7 (1): 3. https://doi.org/10.3390/biom7010003.

Cavalli, Giacomo, et Edith Heard. 2019. « Advances in Epigenetics Link Genetics to the Environment and Disease ». *Nature* 571 (7766): 489-99. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1411-0.

Cerutti, P. A. 1974. « Excision Repair of DNA Base Damage ». *Life Sciences* 15 (9): 1567-75. https://doi.org/10.1016/0024-3205(74)90322-1.

Chandeck, Charlotte, et Wolter J. Mooi. 2010. « Oncogene-Induced Cellular Senescence ». *Advances in Anatomic Pathology* 17 (1): 42-48. https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3181c66f4e.

Chandra, Tamir, Kristina Kirschner, Jean-Yves Thuret, Benjamin D. Pope, Tyrone Ryba, Scott Newman, Kashif Ahmed, et al. 2012. « Independence of Repressive Histone Marks and Chromatin Compaction during Senescent Heterochromatic Layer Formation ». *Molecular Cell* 47 (2): 203-14. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.010.

Chang, Howard H. Y., Nicholas R. Pannunzio, Noritaka Adachi, et Michael R. Lieber. 2017. « Non-Homologous DNA End Joining and Alternative Pathways to Double-Strand Break Repair ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18 (8): 495-506. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48.

Chang, Hui-Ming, et Edward T. H. Yeh. 2020. « SUMO: From Bench to Bedside ». *Physiological Reviews* 100 (4): 1599-1619. https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2019.

Chang, Ya-Chu, Marissa K. Oram, et Anja-Katrin Bielinsky. 2021. « SUMO-Targeted Ubiquitin Ligases and Their Functions in Maintaining Genome Stability ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (10): 5391. https://doi.org/10.3390/ijms22105391.

Chatterjee, Nimrat, et Graham C. Walker. 2017. « Mechanisms of DNA Damage, Repair, and Mutagenesis ». *Environmental and Molecular Mutagenesis* 58 (5): 235-63. https://doi.org/10.1002/em.22087.

Chaturvedi, P., W. K. Eng, Y. Zhu, M. R. Mattern, R. Mishra, M. R. Hurle, X. Zhang, et al. 1999. « Mammalian Chk2 Is a Downstream Effector of the ATM-Dependent DNA Damage Checkpoint Pathway ». *Oncogene* 18 (28): 4047-54. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202925.

Chelbi-Alix, M. K., L. Pelicano, F. Quignon, M. H. Koken, L. Venturini, M. Stadler, J. Pavlovic, L. Degos, et H. de Thé. 1995. « Induction of the PML Protein by Interferons in Normal and APL Cells ». *Leukemia* 9 (12): 2027-33.

Chen, Hao, Hao Chen, Jiamin Zhang, Yumin Wang, Antoine Simoneau, Hui Yang, Arthur S. Levine, Lee Zou, Zhijian Chen, et Li Lan. 2020. « cGAS Suppresses Genomic Instability as a Decelerator of Replication Forks ». *Science Advances* 6 (42): eabb8941. https://doi.org/10.1126/sciadv.abb8941.

Chen, Jie, Feng Zhu, Regina L. Weaks, Anup K. Biswas, Ruifeng Guo, Yanjie Li, et David G. Johnson. 2011. « E2F1 Promotes the Recruitment of DNA Repair Factors to Sites of DNA Double-Strand Breaks ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (8): 1287-94. https://doi.org/10.4161/cc.10.8.15341.

Chen, Kun, Juan Liu, et Xuetao Cao. 2017. « Regulation of Type I Interferon Signaling in Immunity and Inflammation: A Comprehensive Review ». *Journal of Autoimmunity* 83 (septembre):1-11. https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.03.008.

Chen, Meixin, Qingcai Meng, Yunfei Qin, Puping Liang, Peng Tan, Lian He, Yubin Zhou, et al. 2016. « TRIM14 Inhibits cGAS Degradation Mediated by Selective Autophagy Receptor P62 to Promote Innate Immune Responses ». *Molecular Cell* 64 (1): 105-19. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.08.025.

Chen, Ping, Jicheng Zhao, Yan Wang, Min Wang, Haizhen Long, Dan Liang, Li Huang, et al. 2013. « H3.3 Actively Marks Enhancers and Primes Gene Transcription via Opening Higher-Ordered Chromatin ». *Genes & Development* 27 (19): 2109-24. https://doi.org/10.1101/gad.222174.113.

Chen, Qi, Lijun Sun, et Zhijian J. Chen. 2016. « Regulation and Function of the cGAS–STING Pathway of Cytosolic DNA Sensing ». *Nature Immunology* 17 (10): 1142-49. https://doi.org/10.1038/ni.3558.

Chen, Xiaoying, Kosuke Yamaguchi, Brianna Rodgers, Delphine Goerhig, David Vindrieux, Xavier Lahaye, Matthieu Nolot, et al. 2024. « DNA Methylation Protects Cancer Cells against Non-Canonical Senescence ». bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2024.08.23.609297.

Chen, Yi-Chun M., Constantin Kappel, Joel Beaudouin, Roland Eils, et David L. Spector. 2008. « Live Cell Dynamics of Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies upon Entry into and Exit from Mitosis ». *Molecular Biology of the Cell* 19 (7): 3147-62. https://doi.org/10.1091/mbc.e08-01-0035.

Cheng, Xiwen, Yu Liu, Hao Chu, et Hung-Ying Kao. 2012. « Promyelocytic Leukemia Protein (PML) Regulates Endothelial Cell Network Formation and Migration in Response to Tumor Necrosis Factor α (TNFα) and Interferon α (IFNα) ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (28): 23356-67. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.340505.

Childs, Bennett G, Darren J Baker, James L Kirkland, Judith Campisi, et Jan M van Deursen. 2014. « Senescence and apoptosis: dueling or complementary cell fates? » *EMBO reports* 15 (11): 1139-53. https://doi.org/10.15252/embr.201439245.

Childs, Bennett G., Darren J. Baker, Tobias Wijshake, Cheryl A. Conover, Judith Campisi, et Jan M. van Deursen. 2016. « Senescent Intimal Foam Cells Are Deleterious at All Stages of Atherosclerosis ». *Science (New York, N.Y.)* 354 (6311): 472-77. https://doi.org/10.1126/science.aaf6659.

Chinta, Shankar J., Georgia Woods, Marco Demaria, Anand Rane, Ying Zou, Amanda McQuade, Subramanian Rajagopalan, et al. 2018. « Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease ». *Cell Reports* 22 (4): 930-40. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.092.

Cho, Min-Guk, Rashmi J. Kumar, Chien-Chu Lin, Joshua A. Boyer, Jamshaid A. Shahir, Katerina Fagan-Solis, Dennis A. Simpson, et al. 2024. « MRE11 Liberates cGAS from Nucleosome Sequestration during Tumorigenesis ». *Nature*, janvier, 1-8. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06889-6.

Chow, Cheok-Man, Andrew Georgiou, Henrietta Szutorisz, Alexandra Maia e Silva, Ana Pombo, Isabel Barahona, Elise Dargelos, Claudia Canzonetta, et Niall Dillon. 2005. « Variant Histone H3.3 Marks Promoters of Transcriptionally Active Genes during Mammalian Cell Division ». *EMBO Reports* 6 (4): 354-60. https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400366.

Chow, J. C., et C. J. Brown. 2003. « Forming Facultative Heterochromatin: Silencing of an X Chromosome in Mammalian Females ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 60 (12): 2586-2603. https://doi.org/10.1007/s00018-003-3121-9.

Christophorou, M. A., I. Ringshausen, A. J. Finch, L. Brown Swigart, et G. I. Evan. 2006. « The Pathological Response to DNA Damage Does Not Contribute to P53-Mediated Tumour Suppression ». *Nature* 443 (7108): 214-17. https://doi.org/10.1038/nature05077.

Ciccia, Alberto, et Stephen J. Elledge. 2010. « The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives ». *Molecular Cell* 40 (2): 179-204. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.019.

Civril, Filiz, Tobias Deimling, Carina C. de Oliveira Mann, Andrea Ablasser, Manuela Moldt, Gregor Witte, Veit Hornung, et Karl-Peter Hopfner. 2013. « Structural Mechanism of Cytosolic DNA Sensing by cGAS ». *Nature* 498 (7454): 332-37. https://doi.org/10.1038/nature12305.

Clatterbuck Soper, Sarah F., et Paul S. Meltzer. 2023. « ATRX/DAXX: Guarding the Genome against the Hazards of ALT ». *Genes* 14 (4): 790. https://doi.org/10.3390/genes14040790.

Cobb, Andrew M., Shanelle A. De Silva, Robert Hayward, Karolina Sek, Svenja Ulferts, Robert Grosse, et Catherine M. Shanahan. 2022. « Filamentous nuclear actin regulation of PML NBs during the DNA damage response is deregulated by prelamin A ». *Cell Death & Disease* 13 (12): 1042. https://doi.org/10.1038/s41419-022-05491-4.

Cohen, Camille, Armelle Corpet, Simon Roubille, Mohamed Ali Maroui, Nolwenn Poccardi, Antoine Rousseau, Constance Kleijwegt, et al. 2018. « Promyelocytic Leukemia (PML) Nuclear Bodies (NBs) Induce Latent/Quiescent HSV-1 Genomes Chromatinization through a PML NB/Histone H3.3/H3.3 Chaperone Axis ». *PLoS Pathogens* 14 (9): e1007313. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007313.

Cohen, Daniel, Sarah Melamed, Adi Millman, Gabriela Shulman, Yaara Oppenheimer-Shaanan, Assaf Kacen, Shany Doron, Gil Amitai, et Rotem Sorek. 2019. « Cyclic GMP-AMP Signalling Protects Bacteria against Viral Infection ». *Nature* 574 (7780): 691-95. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1605-5.

Cohen, Justin, et Claudio Torres. 2019. « Astrocyte Senescence: Evidence and Significance ». *Aging Cell* 18 (3): e12937. https://doi.org/10.1111/acel.12937.

Coin, F., E. Bergmann, A. Tremeau-Bravard, et J. M. Egly. 1999. « Mutations in XPB and XPD Helicases Found in Xeroderma Pigmentosum Patients Impair the Transcription Function of TFIIH ».

The EMBO Journal 18 (5): 1357-66. https://doi.org/10.1093/emboj/18.5.1357.

Coin, Frédéric, Valentyn Oksenych, et Jean-Marc Egly. 2007. « Distinct Roles for the XPB/P52 and XPD/P44 Subcomplexes of TFIIH in Damaged DNA Opening during Nucleotide Excision Repair ». *Molecular Cell* 26 (2): 245-56. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.009.

Collins, Angela C., Haocheng Cai, Tuo Li, Luis H. Franco, Xiao-Dong Li, Vidhya R. Nair, Caitlyn R. Scharn, et al. 2015. « Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune DNA Sensor for Mycobacterium Tuberculosis ». *Cell Host & Microbe* 17 (6): 820-28. https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.05.005.

Collins, Galen Andrew, et Alfred L. Goldberg. 2017. « The Logic of the 26S Proteasome ». *Cell* 169 (5): 792-806. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.023.

Condemine, Wilfried, Yuki Takahashi, Jun Zhu, Francine Puvion-Dutilleul, Sarah Guegan, Anne Janin, et Hugues de Thé. 2006. « Characterization of Endogenous Human Promyelocytic Leukemia Isoforms ». *Cancer Research* 66 (12): 6192-98. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3792.

Coppé, Jean-Philippe, Pierre-Yves Desprez, Ana Krtolica, et Judith Campisi. 2010. « The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression ». *Annual Review of Pathology* 5:99-118. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102144.

Coppé, Jean-Philippe, Katalin Kauser, Judith Campisi, et Christian M. Beauséjour. 2006. « Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor by Primary Human Fibroblasts at Senescence ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (40): 29568-74. https://doi.org/10.1074/jbc.M603307200.

Coppé, Jean-Philippe, Christopher K. Patil, Francis Rodier, Yu Sun, Denise P. Muñoz, Joshua Goldstein, Peter S. Nelson, Pierre-Yves Desprez, et Judith Campisi. 2008. « Senescence-Associated Secretory Phenotypes Reveal Cell-Nonautonomous Functions of Oncogenic RAS and the P53 Tumor Suppressor ». *PLoS Biology* 6 (12): 2853-68. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060301.

Corpet, Armelle, Constance Kleijwegt, Simon Roubille, Franceline Juillard, Karine Jacquet, Pascale Texier, et Patrick Lomonte. 2020. « PML Nuclear Bodies and Chromatin Dynamics: Catch Me If You Can! » *Nucleic Acids Research* 48 (21): 11890-912. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa828.

Corpet, Armelle, Teresa Olbrich, Myriam Gwerder, Daniel Fink, et Manuel Stucki. 2014. « Dynamics of histone H3.3 deposition in proliferating and senescent cells reveals a DAXX-dependent targeting to PML-NBs important for pericentromeric heterochromatin organization ». *Cell Cycle* 13 (2): 249-67. https://doi.org/10.4161/cc.26988.

Cui, Ye, Huansha Yu, Xin Zheng, Rui Peng, Qiang Wang, Yi Zhou, Rui Wang, et al. 2017. « SENP7 Potentiates cGAS Activation by Relieving SUMO-Mediated Inhibition of Cytosolic DNA Sensing ». *PLoS Pathogens* 13 (1): e1006156. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006156.

Cuijk, Loes van, Gijsbert J. van Belle, Yasemin Turkyilmaz, Sara L. Poulsen, Roel C. Janssens, Arjan F. Theil, Mariangela Sabatella, et al. 2015. « SUMO and Ubiquitin-Dependent XPC Exchange Drives Nucleotide Excision Repair ». *Nature Communications* 6 (1): 7499. https://doi.org/10.1038/ncomms8499.

Cutter, Amber R., et Jeffrey J. Hayes. 2017. « Linker Histones: Novel Insights into Structure-Specific Recognition of the Nucleosome ». *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie Et Biologie Cellulaire* 95 (2): 171-78. https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0097.

Dabin, Juliette, Anna Fortuny, et Sophie E. Polo. 2016. « Epigenome Maintenance in Response to DNA Damage ». *Molecular Cell* 62 (5): 712-27. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.006.

Dai, Jiang, Yi-Jiao Huang, Xinhua He, Ming Zhao, Xinzheng Wang, Zhao-Shan Liu, Wen Xue, et al. 2019. « Acetylation Blocks cGAS Activity and Inhibits Self-DNA-Induced Autoimmunity ». *Cell* 176 (6): 1447-1460.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.016.

Daley, James M., et Patrick Sung. 2014. « 53BP1, BRCA1, and the Choice between Recombination and End Joining at DNA Double-Strand Breaks ». *Molecular and Cellular Biology* 34 (8): 1380-88. https://doi.org/10.1128/MCB.01639-13.

Dang, Chi V. 2012. « MYC on the Path to Cancer ». *Cell* 149 (1): 22-35. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.003.

D'Arcangelo, Daniela, Lavinia Tinaburri, et Elena Dellambra. 2017. « The Role of p16INK4a Pathway in Human Epidermal Stem Cell Self-Renewal, Aging and Cancer ». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (7): 1591. https://doi.org/10.3390/ijms18071591.

Dasgupta, Nirmalya, Xue Lei, Christina Huan Shi, Rouven Arnold, Marcos G. Teneche, Karl N. Miller, Adarsh Rajesh, et al. 2024. « Histone Chaperone HIRA, Promyelocytic Leukemia Protein, and P62/SQSTM1 Coordinate to Regulate Inflammation during Cell Senescence ». *Molecular Cell* 84 (17): 3271-3287.e8. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2024.08.006.

De Cecco, Marco, Takahiro Ito, Anna P. Petrashen, Amy E. Elias, Nicholas J. Skvir, Steven W. Criscione, Alberto Caligiana, et al. 2019. « L1 Drives IFN in Senescent Cells and Promotes Age-Associated Inflammation ». *Nature* 566 (7742): 73-78. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0784-9.

Dechat, Thomas, Katrin Pfleghaar, Kaushik Sengupta, Takeshi Shimi, Dale K. Shumaker, Liliana Solimando, et Robert D. Goldman. 2008. « Nuclear Lamins: Major Factors in the Structural Organization and Function of the Nucleus and Chromatin ». *Genes & Development* 22 (7): 832-53. https://doi.org/10.1101/gad.1652708.

Delbarre, Erwan, Kristina Ivanauskiene, Thomas Küntziger, et Philippe Collas. 2013. « DAXX-dependent supply of soluble (H3.3–H4) dimers to PML bodies pending deposition into chromatin ». *Genome Research* 23 (3): 440-51. https://doi.org/10.1101/gr.142703.112.

Dellaire, Graham, et David P. Bazett-Jones. 2004. « PML Nuclear Bodies: Dynamic Sensors of DNA Damage and Cellular Stress ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 26 (9): 963-77. https://doi.org/10.1002/bies.20089.

Dellaire, Graham, Reagan W. Ching, Kashif Ahmed, Farid Jalali, Kenneth C.K. Tse, Robert G. Bristow, et David P. Bazett-Jones. 2006. « Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies Behave as DNA Damage Sensors Whose Response to DNA Double-Strand Breaks Is Regulated by NBS1 and the Kinases ATM, Chk2, and ATR ». *Journal of Cell Biology* 175 (1): 55-66. https://doi.org/10.1083/jcb.200604009.

Demaria, Marco, Naoko Ohtani, Sameh A. Youssef, Francis Rodier, Wendy Toussaint, James R. Mitchell, Remi-Martin Laberge, et al. 2014. « An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA ». *Developmental Cell* 31 (6): 722-33. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.11.012.

Demin, Annie A., Kouji Hirota, Masataka Tsuda, Marek Adamowicz, Richard Hailstone, Jan Brazina, William Gittens, et al. 2021. « XRCC1 Prevents Toxic PARP1 Trapping during DNA Base Excision Repair ». *Molecular Cell* 81 (14): 3018-3030.e5. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.05.009.

Denais, Celine M., Rachel M. Gilbert, Philipp Isermann, Alexandra L. McGregor, Mariska te Lindert, Bettina Weigelin, Patricia M. Davidson, Peter Friedl, Katarina Wolf, et Jan Lammerding. 2016. « Nuclear Envelope Rupture and Repair during Cancer Cell Migration ». *Science* 352 (6283): 353-58. https://doi.org/10.1126/science.aad7297.

Deng, Liufu, Hua Liang, Meng Xu, Xuanming Yang, Byron Burnette, Ainhoa Arina, Xiao-Dong Li, et al. 2014. « STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors ». *Immunity* 41 (5): 843-52. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.019.

Desdín-Micó, Gabriela, Gonzalo Soto-Heredero, Juan Francisco Aranda, Jorge Oller, Elisa Carrasco, Enrique Gabandé-Rodríguez, Eva Maria Blanco, et al. 2020. « T Cells with Dysfunctional Mitochondria Induce Multimorbidity and Premature Senescence ». *Science (New York, N.Y.)* 368 (6497): 1371-76. https://doi.org/10.1126/science.aax0860.

Di Micco, Raffaella, Marzia Fumagalli, Angelo Cicalese, Sara Piccinin, Patrizia Gasparini, Chiara Luise, Catherine Schurra, et al. 2006. « Oncogene-Induced Senescence Is a DNA Damage Response Triggered by DNA Hyper-Replication ». *Nature* 444 (7119): 638-42. https://doi.org/10.1038/nature05327.

Di Micco, Raffaella, Valery Krizhanovsky, Darren Baker, et Fabrizio d'Adda di Fagagna. 2021. « Cellular Senescence in Ageing: From Mechanisms to Therapeutic Opportunities ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 22 (2): 75-95. https://doi.org/10.1038/s41580-020-00314-w.

Di Micco, Raffaella, Gabriele Sulli, Miryana Dobreva, Michalis Liontos, Oronza A. Botrugno, Gaetano Gargiulo, Roberto dal Zuffo, et al. 2011. « Interplay between Oncogene-Induced DNA Damage Response and Heterochromatin in Senescence and Cancer ». *Nature Cell Biology* 13 (3): 292-302. https://doi.org/10.1038/ncb2170.

Di Mitri, Diletta, et Andrea Alimonti. 2016. « Non-Cell-Autonomous Regulation of Cellular Senescence in Cancer ». *Trends in Cell Biology* 26 (3): 215-26. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.005.

Diamond, Julie M., Claire Vanpouille-Box, Sheila Spada, Nils-Petter Rudqvist, Jessica R. Chapman, Beatrix M. Ueberheide, Karsten A. Pilones, Yasmeen Sarfraz, Silvia C. Formenti, et Sandra Demaria. 2018. « Exosomes Shuttle TREX1-Sensitive IFN-Stimulatory dsDNA from Irradiated Cancer Cells to DCs ». *Cancer Immunology Research* 6 (8): 910-20. https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-17-0581.

Dimri, G. P., et J. Campisi. 1994. « Molecular and Cell Biology of Replicative Senescence ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 59 (janvier):67-73. https://doi.org/10.1101/SQB.1994.059.01.010.

Dimri, G P, X Lee, G Basile, M Acosta, G Scott, C Roskelley, E E Medrano, M Linskens, I Rubelj, et O Pereira-Smith. 1995. « A Biomarker That Identifies Senescent Human Cells in Culture and in Aging Skin in Vivo. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (20): 9363-67. https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363.

Dimri, G. P., A. Testori, M. Acosta, et J. Campisi. 1996. « Replicative Senescence, Aging and Growth-Regulatory Transcription Factors ». *Biological Signals* 5 (3): 154-62. https://doi.org/10.1159/000109185.

Ding, Dongbo, Thi Thuy Nguyen, Matthew Y.H. Pang, et Toyotaka Ishibashi. 2021. « Primate-specific histone variants ». *Genome* 64 (4): 337-46. https://doi.org/10.1139/gen-2020-0094.

D'Mello, Matthew J. J., Stephanie A. Ross, Matthias Briel, Sonia S. Anand, Hertzel Gerstein, et Guillaume Paré. 2015. « Association between Shortened Leukocyte Telomere Length and Cardiometabolic Outcomes: Systematic Review and Meta-Analysis ». *Circulation. Cardiovascular Genetics* 8 (1): 82-90. https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000485.

Dou, Zhixun, Kanad Ghosh, Maria Grazia Vizioli, Jiajun Zhu, Payel Sen, Kirk J. Wangensteen, Johayra Simithy, et al. 2017. « Cytoplasmic Chromatin Triggers Inflammation in Senescence and Cancer ». *Nature* 550 (7676): 402-6. https://doi.org/10.1038/nature24050.

Douse, Christopher H., Iva A. Tchasovnikarova, Richard T. Timms, Anna V. Protasio, Marta Seczynska, Daniil M. Prigozhin, Anna Albecka, et al. 2020. « TASOR Is a Pseudo-PARP That Directs HUSH Complex Assembly and Epigenetic Transposon Control ». *Nature Communications* 11 (1): 4940. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18761-6.

Drané, Pascal, Khalid Ouararhni, Arnaud Depaux, Muhammad Shuaib, et Ali Hamiche. 2010. « The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3 ». *Genes & Development* 24 (12): 1253-65. https://doi.org/10.1101/gad.566910.

Du, Mingjian, et Zhijian J. Chen. 2018. « DNA-Induced Liquid Phase Condensation of cGAS Activates Innate Immune Signaling ». *Science (New York, N.Y.)* 361 (6403): 704-9. https://doi.org/10.1126/science.aat1022.

Dunphy, Gillian, Sinéad M. Flannery, Jessica F. Almine, Dympna J. Connolly, Christina Paulus, Kasper L. Jønsson, Martin R. Jakobsen, Michael M. Nevels, Andrew G. Bowie, et Leonie Unterholzner. 2018. « Non-Canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF-κB Signaling after Nuclear DNA Damage ». *Molecular Cell* 71 (5): 745-760.e5. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.034.

Edlich, Frank. 2015. « The great migration of Bax and Bak ». *Molecular & Cellular Oncology* 2 (3): e995029. https://doi.org/10.4161/23723556.2014.995029.

Efeyan, Alejo, Isabel Garcia-Cao, Daniel Herranz, Susana Velasco-Miguel, et Manuel Serrano. 2006. « Tumour Biology: Policing of Oncogene Activity by P53 ». *Nature* 443 (7108): 159.

https://doi.org/10.1038/443159a.

Eggert, Tobias, Katharina Wolter, Juling Ji, Chi Ma, Tetyana Yevsa, Sabrina Klotz, José Medina-Echeverz, et al. 2016. « Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression ». *Cancer Cell* 30 (4): 533-47. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.003.

En, Atsuki, Yuki Takauji, Kensuke Miki, Dai Ayusawa, et Michihiko Fujii. 2020. « Lamin B receptor plays a key role in cellular senescence induced by inhibition of the proteasome ». *FEBS Open Bio* 10 (2): 237-50. https://doi.org/10.1002/2211-5463.12775.

Enchev, Radoslav I., Brenda A. Schulman, et Matthias Peter. 2015. « Protein Neddylation: Beyond Cullin-RING Ligases ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16 (1): 30-44. https://doi.org/10.1038/nrm3919.

Ergun, Sabrina L., Daniel Fernandez, Thomas M. Weiss, et Lingyin Li. 2019. « STING Polymer Structure Reveals Mechanisms for Activation, Hyperactivation, and Inhibition ». *Cell* 178 (2): 290-301.e10. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.036.

Erker, Yigit, Helene Neyret-Kahn, Jacob S. Seeler, Anne Dejean, Azeddine Atfi, et Laurence Levy. 2013. « Arkadia, a Novel SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase Involved in PML Degradation ». *Molecular and Cellular Biology* 33 (11): 2163-77. https://doi.org/10.1128/MCB.01019-12.

Eskiw, Christopher H., Graham Dellaire, Joe S. Mymryk, et David P. Bazett-Jones. 2003. « Size, Position and Dynamic Behavior of PML Nuclear Bodies Following Cell Stress as a Paradigm for Supramolecular Trafficking and Assembly ». *Journal of Cell Science* 116 (Pt 21): 4455-66. https://doi.org/10.1242/jcs.00758.

Everett, R. D., P. Lomonte, T. Sternsdorf, R. van Driel, et A. Orr. 1999. « Cell Cycle Regulation of PML Modification and ND10 Composition ». *Journal of Cell Science* 112 (Pt 24) (décembre):4581-88. https://doi.org/10.1242/jcs.112.24.4581.

Ewald, Jonathan A., Joshua A. Desotelle, George Wilding, et David F. Jarrard. 2010. « Therapy-Induced Senescence in Cancer ». *Journal of the National Cancer Institute* 102 (20): 1536-46. https://doi.org/10.1093/jnci/djq364.

Fabbri, Elisa, Yang An, Marco Zoli, Eleanor M. Simonsick, Jack M. Guralnik, Stefania Bandinelli, Cynthia M. Boyd, et Luigi Ferrucci. 2015. « Aging and the Burden of Multimorbidity: Associations with Inflammatory and Anabolic Hormonal Biomarkers ». *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 70 (1): 63-70. https://doi.org/10.1093/gerona/glu127.

Fagagna, Fabrizio d'Adda di. 2008. « Living on a Break: Cellular Senescence as a DNA-Damage Response ». *Nature Reviews. Cancer* 8 (7): 512-22. https://doi.org/10.1038/nrc2440.

Fagagna, Fabrizio d'Adda di, Philip M. Reaper, Lorena Clay-Farrace, Heike Fiegler, Philippa Carr, Thomas Von Zglinicki, Gabriele Saretzki, Nigel P. Carter, et Stephen P. Jackson. 2003. « A DNA Damage Checkpoint Response in Telomere-Initiated Senescence ». *Nature* 426 (6963): 194-98. https://doi.org/10.1038/nature02118.

Faget, Douglas V., Qihao Ren, et Sheila A. Stewart. 2019. « Unmasking Senescence: Context-Dependent Effects of SASP in Cancer ». *Nature Reviews Cancer* 19 (8): 439-53. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0156-2.

Falck, Jacob, Julia Coates, et Stephen P. Jackson. 2005. « Conserved Modes of Recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to Sites of DNA Damage ». *Nature* 434 (7033): 605-11. https://doi.org/10.1038/nature03442.

Fan, Yizeng, Yang Gao, Li Nie, Tao Hou, Weichao Dan, Zixi Wang, Tianjie Liu, et al. 2023. « Targeting LYPLAL1-Mediated cGAS Depalmitoylation Enhances the Response to Anti-Tumor Immunotherapy ». *Molecular Cell* 83 (19): 3520-3532.e7. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.09.007.

Fane, Mitchell, et Ashani T. Weeraratna. 2020. « How the Ageing Microenvironment Influences Tumour Progression ». *Nature Reviews. Cancer* 20 (2): 89-106. https://doi.org/10.1038/s41568-019-0222-9.

Fang, Lan, Yun Hao, Haihong Yu, Xuemei Gu, Qiao Peng, Huimin Zhuo, Yaxu Li, et al. 2023. « Methionine Restriction Promotes cGAS Activation and Chromatin Untethering through Demethylation to Enhance Antitumor Immunity ». *Cancer Cell* 41 (6): 1118-1133.e12. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.05.005.

Farr, Joshua N., Ming Xu, Megan M. Weivoda, David G. Monroe, Daniel G. Fraser, Jennifer L. Onken, Brittany A. Negley, et al. 2017. « Targeting Cellular Senescence Prevents Age-Related Bone Loss in Mice ». *Nature Medicine* 23 (9): 1072-79. https://doi.org/10.1038/nm.4385.

Ferbeyre, G., E. de Stanchina, E. Querido, N. Baptiste, C. Prives, et S. W. Lowe. 2000. « PML Is Induced by Oncogenic Ras and Promotes Premature Senescence ». *Genes & Development* 14 (16): 2015-27.

Fine, Barry, Cindy Hodakoski, Susan Koujak, Tao Su, Lao H. Saal, Matthew Maurer, Benjamin Hopkins, et al. 2009. « Activation of the PI3K Pathway in Cancer through Inhibition of PTEN by Exchange Factor P-REX2a ». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5945): 1261-65. https://doi.org/10.1126/science.1173569.

Fitzgerald, Katherine A., Sarah M. McWhirter, Kerrie L. Faia, Daniel C. Rowe, Eicke Latz, Douglas T. Golenbock, Anthony J. Coyle, Sha-Mei Liao, et Tom Maniatis. 2003. « IKKepsilon and TBK1 Are Essential Components of the IRF3 Signaling Pathway ». *Nature Immunology* 4 (5): 491-96. https://doi.org/10.1038/ni921.

Flowers, Laurice, et Elizabeth A. Grice. 2020. « The Skin Microbiota: Balancing Risk and Reward ». *Cell Host & Microbe* 28 (2): 190-200. https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.017.

Fonti, Giulia, Maria J. Marcaida, Louise C. Bryan, Sylvain Träger, Alexandra S. Kalantzi, Pierre-Yves Jl Helleboid, Davide Demurtas, et al. 2019. « KAP1 Is an Antiparallel Dimer with a Functional Asymmetry ». *Life Science Alliance* 2 (4): e201900349. https://doi.org/10.26508/lsa.201900349.

Franceschi, C., M. Bonafè, S. Valensin, F. Olivieri, M. De Luca, E. Ottaviani, et G. De Benedictis. 2000. « Inflamm-Aging. An Evolutionary Perspective on Immunosenescence ». *Annals of the New*

York Academy of Sciences 908 (juin):244-54. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x.

Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert, et T. P. Dryja. 1986. « A Human DNA Segment with Properties of the Gene That Predisposes to Retinoblastoma and Osteosarcoma ». *Nature* 323 (6089): 643-46. https://doi.org/10.1038/323643a0.

Fuentes, L., K. Wouters, S. A. Hannou, C. Cudejko, E. Rigamonti, T. H. Mayi, B. Derudas, et al. 2011. « Downregulation of the Tumour Suppressor p16INK4A Contributes to the Polarisation of Human Macrophages toward an Adipose Tissue Macrophage (ATM)-like Phenotype ». *Diabetologia* 54 (12): 3150-56. https://doi.org/10.1007/s00125-011-2324-0.

Galanos, Panagiotis, Konstantinos Vougas, David Walter, Alexander Polyzos, Apolinar Maya-Mendoza, Emma J. Haagensen, Antonis Kokkalis, et al. 2016. « Chronic P53-Independent P21 Expression Causes Genomic Instability by Deregulating Replication Licensing ». *Nature Cell Biology* 18 (7): 777-89. https://doi.org/10.1038/ncb3378.

Galanty, Yaron, Rimma Belotserkovskaya, Julia Coates, et Stephen P. Jackson. 2012. « RNF4, a SUMO-Targeted Ubiquitin E3 Ligase, Promotes DNA Double-Strand Break Repair ». *Genes & Development* 26 (11): 1179-95. https://doi.org/10.1101/gad.188284.112.

Galanty, Yaron, Rimma Belotserkovskaya, Julia Coates, Sophie Polo, Kyle M. Miller, et Stephen P. Jackson. 2009. « Mammalian SUMO E3-Ligases PIAS1 and PIAS4 Promote Responses to DNA Double-Strand Breaks ». *Nature* 462 (7275): 935-39. https://doi.org/10.1038/nature08657.

Gao, Chengzhuo, Chun-Chen Ho, Erin Reineke, Minh Lam, Xiwen Cheng, Kristopher J. Stanya, Yu Liu, Sharmistha Chakraborty, Hsiu-Ming Shih, et Hung-Ying Kao. 2008. « Histone Deacetylase 7 Promotes PML Sumoylation and Is Essential for PML Nuclear Body Formation ». *Molecular and Cellular Biology* 28 (18): 5658-67. https://doi.org/10.1128/MCB.00874-08.

Gao, Daxing, Tuo Li, Xiao-Dong Li, Xiang Chen, Quan-Zhen Li, Mary Wight-Carter, et Zhijian J. Chen. 2015. « Activation of cyclic GMP-AMP synthase by self-DNA causes autoimmune diseases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (42): E5699-5705. https://doi.org/10.1073/pnas.1516465112.

Gao, Daxing, Jiaxi Wu, You-Tong Wu, Fenghe Du, Chukwuemika Aroh, Nan Yan, Lijun Sun, et Zhijian J. Chen. 2013. « Cyclic GMP-AMP Synthase Is an Innate Immune Sensor of HIV and Other Retroviruses ». *Science (New York, N.Y.)* 341 (6148): 903-6. https://doi.org/10.1126/science.1240933.

Gao, Pu, Manuel Ascano, Yang Wu, Winfried Barchet, Barbara L. Gaffney, Thomas Zillinger, Artem A. Serganov, et al. 2013. « Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] Is the Metazoan Second Messenger Produced by DNA-Activated Cyclic GMP-AMP Synthase ». *Cell* 153 (5): 1094-1107. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.046.

Gardner, Sarah E., Melanie Humphry, Martin R. Bennett, et Murray C. H. Clarke. 2015. « Senescent Vascular Smooth Muscle Cells Drive Inflammation Through an Interleukin-1α-Dependent Senescence-Associated Secretory Phenotype ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 35 (9): 1963-74. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.115.305896.

Gayoso, Inmaculada, Beatriz Sanchez-Correa, Carmen Campos, Corona Alonso, Alejandra Pera, Javier G. Casado, Sara Morgado, Raquel Tarazona, et Rafael Solana. 2011. « Immunosenescence of Human Natural Killer Cells ». *Journal of Innate Immunity* 3 (4): 337-43. https://doi.org/10.1159/000328005.

Gell, D., et S. P. Jackson. 1999. « Mapping of Protein-Protein Interactions within the DNA-Dependent Protein Kinase Complex ». *Nucleic Acids Research* 27 (17): 3494-3502. https://doi.org/10.1093/nar/27.17.3494.

Gent, D. C. van, K. Hiom, T. T. Paull, et M. Gellert. 1997. « Stimulation of V(D)J Cleavage by High Mobility Group Proteins ». *The EMBO Journal* 16 (10): 2665-70. https://doi.org/10.1093/emboj/16.10.2665.

Gentili, Matteo, Xavier Lahaye, Francesca Nadalin, Guilherme P.F. Nader, Emilia Puig Lombardi, Solène Herve, Nilushi S. De Silva, et al. 2019. « The N-Terminal Domain of cGAS Determines Preferential Association with Centromeric DNA and Innate Immune Activation in the Nucleus ». *Cell Reports* 26 (9): 2377-2393.e13. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.105.

Getts, R. C., et T. D. Stamato. 1994. « Absence of a Ku-like DNA End Binding Activity in the Xrs Double-Strand DNA Repair-Deficient Mutant ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (23): 15981-84.

Ghosh, Rajarshi P., et Barbara J. Meyer. 2021. « Spatial Organization of Chromatin: Emergence of Chromatin Structure During Development ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 37 (octobre):199-232. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-032321-035734.

Gibcus, Johan H., Kumiko Samejima, Anton Goloborodko, Itaru Samejima, Natalia Naumova, Johannes Nuebler, Masato T. Kanemaki, et al. 2018. « A Pathway for Mitotic Chromosome Formation ». *Science (New York, N.Y.)* 359 (6376): eaao6135. https://doi.org/10.1126/science.aao6135.

Gillyard, Taneisha, et Jamaine Davis. 2021. « DNA Double-Strand Break Repair in Cancer: A Path to Achieving Precision Medicine ». *International Review of Cell and Molecular Biology* 364:111-37. https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.06.003.

Gire, Véronique, et Vjekoslav Dulic. 2015. « Senescence from G2 Arrest, Revisited ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 14 (3): 297-304. https://doi.org/10.1080/15384101.2014.1000134.

Gire, Véronique, Pierre Roux, David Wynford-Thomas, Jean-Marc Brondello, et Vjekoslav Dulic. 2004. « DNA Damage Checkpoint Kinase Chk2 Triggers Replicative Senescence ». *The EMBO Journal* 23 (13): 2554-63. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600259.

Giroud, Joëlle, Inès Bouriez, Hugo Paulus, Albin Pourtier, Florence Debacq-Chainiaux, et Olivier Pluquet. 2023. « Exploring the Communication of the SASP: Dynamic, Interactive, and Adaptive Effects on the Microenvironment ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (13): 10788. https://doi.org/10.3390/ijms241310788.

Glück, Selene, Baptiste Guey, Muhammet Fatih Gulen, Katharina Wolter, Tae-Won Kang, Niklas Arndt Schmacke, Anne Bridgeman, Jan Rehwinkel, Lars Zender, et Andrea Ablasser. 2017. « Innate

Immune Sensing of Cytosolic Chromatin Fragments through cGAS Promotes Senescence » 19 (9): 12.

Gohil, Dhara, Altaf H. Sarker, et Rabindra Roy. 2023. « Base Excision Repair: Mechanisms and Impact in Biology, Disease, and Medicine ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (18): 14186. https://doi.org/10.3390/ijms241814186.

Goldberg, Aaron D., Laura A. Banaszynski, Kyung-Min Noh, Peter W. Lewis, Simon J. Elsaesser, Sonja Stadler, Scott Dewell, et al. 2010. « Distinct Factors Control Histone Variant H3.3 Localization at Specific Genomic Regions ». *Cell* 140 (5): 678-91. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.003.

González-Gualda, Estela, Andrew G. Baker, Ljiljana Fruk, et Daniel Muñoz-Espín. 2021. « A Guide to Assessing Cellular Senescence in Vitro and in Vivo ». *The FEBS Journal* 288 (1): 56-80. https://doi.org/10.1111/febs.15570.

Goodarzi, Aaron A., Thomas Kurka, et Penelope A. Jeggo. 2011. « KAP-1 Phosphorylation Regulates CHD3 Nucleosome Remodeling during the DNA Double-Strand Break Response ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (7): 831-39. https://doi.org/10.1038/nsmb.2077.

Goodarzi, Aaron A., Yaping Yu, Enriqueta Riballo, Pauline Douglas, Sarah A. Walker, Ruiqiong Ye, Christine Härer, et al. 2006. « DNA-PK Autophosphorylation Facilitates Artemis Endonuclease Activity ». *The EMBO Journal* 25 (16): 3880-89. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601255.

Gorgoulis, Vassilis, Peter D. Adams, Andrea Alimonti, Dorothy C. Bennett, Oliver Bischof, Cleo Bishop, Judith Campisi, et al. 2019. « Cellular Senescence: Defining a Path Forward ». *Cell* 179 (4): 813-27. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005.

Grewal, Shiv I. S. 2023. « The Molecular Basis of Heterochromatin Assembly and Epigenetic Inheritance ». *Molecular Cell* 83 (11): 1767-85. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.04.020.

Grimaud, Charlotte, Frédéric Bantignies, Manika Pal-Bhadra, Pallavi Ghana, Utpal Bhadra, et Giacomo Cavalli. 2006. « RNAi Components Are Required for Nuclear Clustering of Polycomb Group Response Elements ». *Cell* 124 (5): 957-71. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.036.

Guey, Baptiste, Marilena Wischnewski, Alexiane Decout, Kristina Makasheva, Murat Kaynak, Mahmut S. Sakar, Beat Fierz, et Andrea Ablasser. 2020. « BAF Restricts cGAS on Nuclear DNA to Prevent Innate Immune Activation ». *Science* 369 (6505): 823-28. https://doi.org/10.1126/science.aaw6421.

Gulen, Muhammet F., Natasha Samson, Alexander Keller, Marius Schwabenland, Chong Liu, Selene Glück, Vivek V. Thacker, et al. 2023. « cGAS-STING Drives Ageing-Related Inflammation and Neurodegeneration ». *Nature* 620 (7973): 374-80. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06373-1.

Guo, Yunyun, Fei Jiang, Lingli Kong, Bingqing Li, Yinlong Yang, Lei Zhang, Bingyu Liu, Yi Zheng, et Chengjiang Gao. 2019. « Cutting Edge: USP27X Deubiquitinates and Stabilizes the DNA Sensor cGAS to Regulate Cytosolic DNA-Mediated Signaling ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 203 (8): 2049-54. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900514.

Guo, Zijian, Akiko Kumagai, Sophie X. Wang, et William G. Dunphy. 2000. « Requirement for Atr in Phosphorylation of Chk1 and Cell Cycle Regulation in Response to DNA Replication Blocks and UV-Damaged DNA in Xenopus Egg Extracts ». *Genes & Development* 14 (21): 2745-56. https://doi.org/10.1101/gad.842500.

Gurard-Levin, Zachary A., Jean-Pierre Quivy, et Geneviève Almouzni. 2014. « Histone Chaperones: Assisting Histone Traffic and Nucleosome Dynamics ». *Annual Review of Biochemistry* 83:487-517. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035536.

Hahn, William O., Noah S. Butler, Scott E. Lindner, Holly M. Akilesh, D. Noah Sather, Stefan Hi Kappe, Jessica A. Hamerman, Michael Gale, W. Conrad Liles, et Marion Pepper. 2018. « cGAS-Mediated Control of Blood-Stage Malaria Promotes Plasmodium-Specific Germinal Center Responses ». *JCI Insight* 3 (2): e94142, 94142. https://doi.org/10.1172/jci.insight.94142.

Halkoum, Rym, Virginie Salnot, Christophe Capallere, Christelle Plaza, Aurore L'honoré, Karl Pays, Bertrand Friguet, Carine Nizard, et Isabelle Petropoulos. 2022. « Glyoxal Induces Senescence in Human Keratinocytes through Oxidative Stress and Activation of the Protein Kinase B/FOXO3a/p27KIP1 Pathway ». *The Journal of Investigative Dermatology* 142 (8): 2068-2078.e7. https://doi.org/10.1016/j.jid.2021.12.022.

Hall, Justin, Erik C. Ralph, Suman Shanker, Hong Wang, Laura J. Byrnes, Reto Horst, Jimson Wong, et al. 2017. « The Catalytic Mechanism of Cyclic GMP-AMP Synthase (cGAS) and Implications for Innate Immunity and Inhibition ». *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 26 (12): 2367-80. https://doi.org/10.1002/pro.3304.

Hammond, Colin M., Caroline B. Strømme, Hongda Huang, Dinshaw J. Patel, et Anja Groth. 2017. « Histone Chaperone Networks Shaping Chromatin Function ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (3): 141-58. https://doi.org/10.1038/nrm.2016.159.

Hansen, Kathrine, Thaneas Prabakaran, Anders Laustsen, Sofie E Jørgensen, Stine H Rahbæk, Søren B Jensen, Rikke Nielsen, et al. 2014. « Listeria monocytogenes induces IFNβ expression through an IFI16-, cGAS- and STING-dependent pathway ». *The EMBO Journal* 33 (15): 1654-66. https://doi.org/10.15252/embj.201488029.

Hao, Wenzhuo, Wenjun Li, Lingyan Wang, et Shitao Li. 2023. « The Odyssey of cGAS: From Cytosol to Nucleus ». *Cytokine & Growth Factor Reviews*, septembre, S1359610123000692. https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2023.09.004.

Hao, Xue, Chen Wang, et Rugang Zhang. 2022. « Chromatin Basis of the Senescence-Associated Secretory Phenotype ». *Trends in Cell Biology* 32 (6): 513-26. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.12.003.

Haraguchi, T., T. Koujin, M. Segura-Totten, K. K. Lee, Y. Matsuoka, Y. Yoneda, K. L. Wilson, et Y. Hiraoka. 2001. « BAF Is Required for Emerin Assembly into the Reforming Nuclear Envelope ». *Journal of Cell Science* 114 (Pt 24): 4575-85. https://doi.org/10.1242/jcs.114.24.4575.

Haraguchi, Tokuko, Tomoko Kojidani, Takako Koujin, Takeshi Shimi, Hiroko Osakada, Chie Mori, Akitsugu Yamamoto, et Yasushi Hiraoka. 2008. « Live Cell Imaging and Electron Microscopy

Reveal Dynamic Processes of BAF-Directed Nuclear Envelope Assembly ». *Journal of Cell Science* 121 (Pt 15): 2540-54. https://doi.org/10.1242/jcs.033597.

Harding, Shane M., Joseph L. Benci, Jerome Irianto, Dennis E. Discher, Andy J. Minn, et Roger A. Greenberg. 2017. « Mitotic Progression Following DNA Damage Enables Pattern Recognition within Micronuclei ». *Nature* 548 (7668): 466-70. https://doi.org/10.1038/nature23470.

Harman, D. 1956. « Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry ». *Journal of Gerontology* 11 (3): 298-300. https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298.

Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, et S. J. Elledge. 1993. « The P21 Cdk-Interacting Protein Cip1 Is a Potent Inhibitor of G1 Cyclin-Dependent Kinases ». *Cell* 75 (4): 805-16. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90499-g.

Hatch, Emily M., Andrew H. Fischer, Thomas J. Deerinck, et Martin W. Hetzer. 2013. « Catastrophic Nuclear Envelope Collapse in Cancer Cell Micronuclei ». *Cell* 154 (1): 47-60. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.007.

Haws, Spencer A., Zoltan Simandi, R. Jordan Barnett, et Jennifer E. Phillips-Cremins. 2022. « 3D Genome, on Repeat: Higher-Order Folding Principles of the Heterochromatinized Repetitive Genome ». *Cell* 185 (15): 2690-2707. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.052.

Hayaishi, O., et K. Ueda. 1977. « Poly(ADP-Ribose) and ADP-Ribosylation of Proteins ». *Annual Review of Biochemistry* 46:95-116. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.46.070177.000523.

Hayflick, L. 1965. « THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS ». *Experimental Cell Research* 37 (mars):614-36. https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9.

Hayflick, L., et P. S. Moorhead. 1961. « The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains ». *Experimental Cell Research* 25 (décembre):585-621. https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6.

Heaphy, Christopher M., Roeland F. de Wilde, Yuchen Jiao, Alison P. Klein, Barish H. Edil, Chanjuan Shi, Chetan Bettegowda, et al. 2011. « Altered Telomeres in Tumors with ATRX and DAXX Mutations ». *Science (New York, N.Y.)* 333 (6041): 425. https://doi.org/10.1126/science.1207313.

Hegde, Ashok N., Lindsey M. Duke, Logan E. Timm, et Hannah Nobles. 2023. « The Proteasome and Ageing ». *Sub-Cellular Biochemistry* 102:99-112. https://doi.org/10.1007/978-3-031-21410-3_5.

Hekmat-Nejad, M., Z. You, M. C. Yee, J. W. Newport, et K. A. Cimprich. 2000. « Xenopus ATR Is a Replication-Dependent Chromatin-Binding Protein Required for the DNA Replication Checkpoint ». *Current Biology: CB* 10 (24): 1565-73. https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00855-1.

Hendriks, Ivo A, Rochelle C J D'Souza, Bing Yang, Matty Verlaan-de Vries, Matthias Mann, et Alfred C O Vertegaal. 2014. « Uncovering Global SUMOylation Signaling Networks in a Site-Specific Manner ». *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (10): 927-36. https://doi.org/10.1038/nsmb.2890.

Herbig, Utz, Wendy A. Jobling, Benjamin P. C. Chen, David J. Chen, et John M. Sedivy. 2004. « Telomere Shortening Triggers Senescence of Human Cells through a Pathway Involving ATM, P53, and P21(CIP1), but Not P16(INK4a) ». *Molecular Cell* 14 (4): 501-13. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(04)00256-4.

Hernandez-Segura, Alejandra, Jamil Nehme, et Marco Demaria. 2018. « Hallmarks of Cellular Senescence ». *Trends in Cell Biology* 28 (6): 436-53. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.02.001.

Herzner, Anna-Maria, Cristina Amparo Hagmann, Marion Goldeck, Steven Wolter, Kirsten Kübler, Sabine Wittmann, Thomas Gramberg, et al. 2015. « Sequence-Specific Activation of the DNA Sensor cGAS by Y-Form DNA Structures as Found in Primary HIV-1 cDNA ». *Nature Immunology* 16 (10): 1025-33. https://doi.org/10.1038/ni.3267.

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.

Heuser, M., H. van der Kuip, B. Falini, C. Peschel, C. Huber, et T. Fischer. 1998. « Induction of the Pro-Myelocytic Leukaemia Gene by Type I and Type II Interferons ». *Mediators of Inflammation* 7 (5): 319-25. https://doi.org/10.1080/09629359890839.

Hinkal, George, Neha Parikh, et Lawrence A. Donehower. 2009. « Timed Somatic Deletion of P53 in Mice Reveals Age-Associated Differences in Tumor Progression ». *PloS One* 4 (8): e6654. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006654.

Hockemeyer, Dirk, et Kathleen Collins. 2015. « Control of Telomerase Action at Human Telomeres ». *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (11): 848-52. https://doi.org/10.1038/nsmb.3083.

Hoelper, Dominik, Hongda Huang, Aayushi Y. Jain, Dinshaw J. Patel, et Peter W. Lewis. 2017. « Structural and Mechanistic Insights into ATRX-Dependent and -Independent Functions of the Histone Chaperone DAXX ». *Nature Communications* 8 (1): 1193. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01206-y.

Hoencamp, Claire, et Benjamin D. Rowland. 2023. « Genome Control by SMC Complexes ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 24 (9): 633-50. https://doi.org/10.1038/s41580-023-00609-8.

Hooy, Richard M., Guido Massaccesi, Kimberly E. Rousseau, Michael A. Chattergoon, et Jungsan Sohn. 2020. « Allosteric Coupling between Mn2+ and dsDNA Controls the Catalytic Efficiency and Fidelity of cGAS ». *Nucleic Acids Research* 48 (8): 4435-47. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa084.

Hopfner, Karl-Peter, et Veit Hornung. 2020. « Molecular Mechanisms and Cellular Functions of cGAS–STING Signalling ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (9): 501-21. https://doi.org/10.1038/s41580-020-0244-x.

Hozumi, N., et S. Tonegawa. 2004. « Evidence for Somatic Rearrangement of Immunoglobulin Genes Coding for Variable and Constant Regions. 1976 [Classical Article] ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (7): 4260-64.

Hu, Ming-Ming, Qing Yang, Xue-Qin Xie, Chen-Yang Liao, Heng Lin, Tian-Tian Liu, Lei Yin, et Hong-Bing Shu. 2016. « Sumoylation Promotes the Stability of the DNA Sensor cGAS and the Adaptor STING to Regulate the Kinetics of Response to DNA Virus ». *Immunity* 45 (3): 555-69. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.014.

Hu, Siqi, Hong Sun, Lijuan Yin, Jian Li, Shan Mei, Fengwen Xu, Chao Wu, et al. 2019. « PKR-Dependent Cytosolic cGAS Foci Are Necessary for Intracellular DNA Sensing ». *Science Signaling* 12 (609): eaav7934. https://doi.org/10.1126/scisignal.aav7934.

Huang, Yaping, Liya Gu, et Guo-Min Li. 2018. « H3K36me3-Mediated Mismatch Repair Preferentially Protects Actively Transcribed Genes from Mutation ». *The Journal of Biological Chemistry* 293 (20): 7811-23. https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002839.

Huang, Yaping, et Guo-Min Li. 2020. « DNA Mismatch Repair in the Chromatin Context: Mechanisms and Therapeutic Potential ». *DNA Repair* 93 (septembre):102918. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102918.

Huang, Yi-He, Xiang-Yu Liu, Xiao-Xia Du, Zheng-Fan Jiang, et Xiao-Dong Su. 2012. « The Structural Basis for the Sensing and Binding of Cyclic Di-GMP by STING ». *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (7): 728-30. https://doi.org/10.1038/nsmb.2333.

Hubackova, Sona, Katerina Krejcikova, Jiri Bartek, et Zdenek Hodny. 2012. « Interleukin 6 Signaling Regulates Promyelocytic Leukemia Protein Gene Expression in Human Normal and Cancer Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (32): 26702-14. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.316869.

Huen, Michael S. Y., Robert Grant, Isaac Manke, Kay Minn, Xiaochun Yu, Michael B. Yaffe, et Junjie Chen. 2007. « RNF8 Transduces the DNA-Damage Signal via Histone Ubiquitylation and Checkpoint Protein Assembly ». *Cell* 131 (5): 901-14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.041.

Hussain, Behzad, Yufeng Xie, Uzma Jabeen, Defen Lu, Bo Yang, Changxin Wu, et Guijun Shang. 2022. « Activation of STING Based on Its Structural Features ». *Frontiers in Immunology* 13:808607. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.808607.

I, Gibbs-Seymour, Oka Y, Rajendra E, Weinert Bt, Passmore La, Patel Kj, Olsen Jv, Choudhary C, Bekker-Jensen S, et Mailand N. 2015. « Ubiquitin-SUMO Circuitry Controls Activated Fanconi Anemia ID Complex Dosage in Response to DNA Damage ». *Molecular Cell* 57 (1). https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.12.001.

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. « Finishing the Euchromatic Sequence of the Human Genome ». *Nature* 431 (7011): 931-45. https://doi.org/10.1038/nature03001.

Iriki, Tomohiro, Hiroaki Iio, Shu Yasuda, Shun Masuta, Masakazu Kato, Hidetaka Kosako, Shoshiro Hirayama, et al. 2023. « Senescent Cells Form Nuclear Foci That Contain the 26S Proteasome ». *Cell Reports* 42 (8). https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112880.

Ishikawa, Hiroki, et Glen N. Barber. 2008. « STING Is an Endoplasmic Reticulum Adaptor That Facilitates Innate Immune Signalling ». *Nature* 455 (7213): 674-78. https://doi.org/10.1038/nature07317.

Ishikawa, Hiroki, Zhe Ma, et Glen N. Barber. 2009. « STING Regulates Intracellular DNA-Mediated, Type I Interferon-Dependent Innate Immunity ». *Nature* 461 (7265): 788-92. https://doi.org/10.1038/nature08476.

Ishov, A. M., A. G. Sotnikov, D. Negorev, O. V. Vladimirova, N. Neff, T. Kamitani, E. T. Yeh, J. F. Strauss, et G. G. Maul. 1999. « PML Is Critical for ND10 Formation and Recruits the PML-Interacting Protein Daxx to This Nuclear Structure When Modified by SUMO-1 ». *The Journal of Cell Biology* 147 (2): 221-34. https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.221.

Ivanov, Andre, Jeff Pawlikowski, Indrani Manoharan, John van Tuyn, David M. Nelson, Taranjit Singh Rai, Parisha P. Shah, et al. 2013. « Lysosome-Mediated Processing of Chromatin in Senescence ». *The Journal of Cell Biology* 202 (1): 129-43. https://doi.org/10.1083/jcb.201212110.

Ivanschitz, Lisa, Yuki Takahashi, Florence Jollivet, Olivier Ayrault, Morgane Le Bras, et Hugues de Thé. 2015. « PML IV/ARF Interaction Enhances P53 SUMO-1 Conjugation, Activation, and Senescence ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (46): 14278-83. https://doi.org/10.1073/pnas.1507540112.

Ivashkiv, Lionel B. 2018. « IFNγ: Signalling, Epigenetics and Roles in Immunity, Metabolism, Disease and Cancer Immunotherapy ». *Nature Reviews. Immunology* 18 (9): 545-58. https://doi.org/10.1038/s41577-018-0029-z.

Iwase, Shigeki, Bin Xiang, Sharmistha Ghosh, Ting Ren, Peter W. Lewis, Jesse C. Cochrane, C. David Allis, et al. 2011. « ATRX ADD Domain Links an Atypical Histone Methylation Recognition Mechanism to Human Mental-Retardation Syndrome ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (7): 769-76. https://doi.org/10.1038/nsmb.2062.

J, Meyne, Ratliff Rl, et Moyzis Rk. 1989. « Conservation of the Human Telomere Sequence (TTAGGG)n among Vertebrates ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (18). https://doi.org/10.1073/pnas.86.18.7049.

Jackson, James G., Vinod Pant, Qin Li, Leslie L. Chang, Alfonso Quintás-Cardama, Daniel Garza, Omid Tavana, et al. 2012. « P53-Mediated Senescence Impairs the Apoptotic Response to Chemotherapy and Clinical Outcome in Breast Cancer ». *Cancer Cell* 21 (6): 793-806. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.027.

Jaffray, Ellis G., Michael H. Tatham, Barbara Mojsa, Magda Liczmanska, Alejandro Rojas-Fernandez, Yili Yin, Graeme Ball, et Ronald T. Hay. 2023. « The p97/VCP segregase is essential for arsenic-induced degradation of PML and PML-RARA ». *The Journal of Cell Biology* 222 (4): e202201027. https://doi.org/10.1083/jcb.202201027.

Jain, Anil K., Komal Raina, et Rajesh Agarwal. 2013. « Deletion of P21/Cdkn1a Confers Protective Effect against Prostate Tumorigenesis in Transgenic Adenocarcinoma of the Mouse Prostate Model ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 12 (10): 1598-1604. https://doi.org/10.4161/cc.24741.

Jasencakova, Zuzana, et Anja Groth. 2010. « Restoring Chromatin after Replication: How New and Old Histone Marks Come Together ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 21 (2): 231-37. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.09.018.

Jeck, William R., Alex P. Siebold, et Norman E. Sharpless. 2012. « Review: A Meta-Analysis of GWAS and Age-Associated Diseases ». *Aging Cell* 11 (5): 727-31. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00871.x.

Jensen, K., C. Shiels, et P. S. Freemont. 2001. « PML Protein Isoforms and the RBCC/TRIM Motif ». *Oncogene* 20 (49): 7223-33. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204765.

Jensen, Ryan B., Aura Carreira, et Stephen C. Kowalczykowski. 2010. « Purified Human BRCA2 Stimulates RAD51-Mediated Recombination ». *Nature* 467 (7316): 678-83. https://doi.org/10.1038/nature09399.

Jiang, Hui, Xiaoyu Xue, Swarupa Panda, Ajinkya Kawale, Richard M Hooy, Fengshan Liang, Jungsan Sohn, Patrick Sung, et Nelson O Gekara. 2019a. « Chromatin-bound cGAS Is an Inhibitor of DNA Repair and Hence Accelerates Genome Destabilization and Cell Death ». *The EMBO Journal* 38 (21). https://doi.org/10.15252/embj.2019102718.

———. 2019b. « Chromatin-bound cGAS is an inhibitor of DNA repair and hence accelerates genome destabilization and cell death ». *The EMBO Journal* 38 (21): e102718. https://doi.org/10.15252/embj.2019102718.

Jimeno, Sonia, María Jesús Fernández-Ávila, Andrés Cruz-García, Cristina Cepeda-García, Daniel Gómez-Cabello, et Pablo Huertas. 2015. « Neddylation Inhibits CtIP-Mediated Resection and Regulates DNA Double Strand Break Repair Pathway Choice ». *Nucleic Acids Research* 43 (2): 987-99. https://doi.org/10.1093/nar/gku1384.

Jin, Chunyuan, Chongzhi Zang, Gang Wei, Kairong Cui, Weiqun Peng, Keji Zhao, et Gary Felsenfeld. 2009. « H3.3/H2A.Z Double Variant-Containing Nucleosomes Mark "nucleosome-Free Regions" of Active Promoters and Other Regulatory Regions ». *Nature Genetics* 41 (8): 941-45. https://doi.org/10.1038/ng.409.

Johnson, Simon C., Xiao Dong, Jan Vijg, et Yousin Suh. 2015. « Genetic Evidence for Common Pathways in Human Age-Related Diseases ». *Aging Cell* 14 (5): 809-17. https://doi.org/10.1111/acel.12362.

Jung, Seung Hee, Hyun Jung Hwang, Donghee Kang, Hyun A. Park, Hyung Chul Lee, Daecheol Jeong, Keunwook Lee, Heon Joo Park, Young-Gyu Ko, et Jae-Seon Lee. 2019. « mTOR Kinase Leads to PTEN-Loss-Induced Cellular Senescence by Phosphorylating P53 ». *Oncogene* 38 (10): 1639-50. https://doi.org/10.1038/s41388-018-0521-8.

Jung, Yong-Sam, Yingjuan Qian, et Xinbin Chen. 2010. « Examination of the Expanding Pathways for the Regulation of P21 Expression and Activity ». *Cellular Signalling* 22 (7): 1003-12. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.01.013.

Kamada, Rui, Wenjing Yang, Yubo Zhang, Mira C. Patel, Yanqin Yang, Ryota Ouda, Anup Dey, et al. 2018. « Interferon Stimulation Creates Chromatin Marks and Establishes Transcriptional Memory ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (39): E9162-71. https://doi.org/10.1073/pnas.1720930115.

Kamitani, T., K. Kito, H. P. Nguyen, T. Fukuda-Kamitani, et E. T. Yeh. 1998. « Characterization of

a Second Member of the Sentrin Family of Ubiquitin-like Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (18): 11349-53. https://doi.org/10.1074/jbc.273.18.11349.

Kang, Tae-Won, Tetyana Yevsa, Norman Woller, Lisa Hoenicke, Torsten Wuestefeld, Daniel Dauch, Anja Hohmeyer, et al. 2011. « Senescence Surveillance of Pre-Malignant Hepatocytes Limits Liver Cancer Development ». *Nature* 479 (7374): 547-51. https://doi.org/10.1038/nature10599.

Karimian, Ansar, Yasin Ahmadi, et Bahman Yousefi. 2016. « Multiple Functions of P21 in Cell Cycle, Apoptosis and Transcriptional Regulation after DNA Damage ». *DNA Repair* 42 (juin):63-71. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.04.008.

Kemp, Michael G. 2019. « Damage Removal and Gap Filling in Nucleotide Excision Repair ». *The Enzymes* 45:59-97. https://doi.org/10.1016/bs.enz.2019.06.001.

Khan, Farhaan A., et Syed O. Ali. 2017. « Physiological Roles of DNA Double-Strand Breaks ». *Journal of Nucleic Acids* 2017:6439169. https://doi.org/10.1155/2017/6439169.

Kleijwegt, Constance, Florent Bressac, Coline Seurre, Wilhelm Bouchereau, Camille Cohen, Pascale Texier, Thomas Simonet, Laurent Schaeffer, Patrick Lomonte, et Armelle Corpet. 2023. « Interplay between PML NBs and HIRA for H3.3 Dynamics Following Type I Interferon Stimulus ». *eLife* 12 (mai):e80156. https://doi.org/10.7554/eLife.80156.

Klemm, Sandy L., Zohar Shipony, et William J. Greenleaf. 2019. « Chromatin Accessibility and the Regulatory Epigenome ». *Nature Reviews. Genetics* 20 (4): 207-20. https://doi.org/10.1038/s41576-018-0089-8.

Knudson, A. G. 1971. « Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (4): 820-23. https://doi.org/10.1073/pnas.68.4.820.

Kono, Yohei, Stephen A. Adam, Yuko Sato, Karen L. Reddy, Yixian Zheng, Ohad Medalia, Robert D. Goldman, Hiroshi Kimura, et Takeshi Shimi. 2022. « Nucleoplasmic Lamin C Rapidly Accumulates at Sites of Nuclear Envelope Rupture with BAF and cGAS ». *Journal of Cell Biology* 221 (12): e202201024. https://doi.org/10.1083/jcb.202201024.

Kornberg, R. D. 1974. « Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA ». *Science (New York, N.Y.)* 184 (4139): 868-71. https://doi.org/10.1126/science.184.4139.868.

Kosar, Martin, Jirina Bartkova, Sona Hubackova, Zdenek Hodny, Jiri Lukas, et Jiri Bartek. 2011. « Senescence-associated heterochromatin foci are dispensable for cellular senescence, occur in a cell type- and insult-dependent manner and follow expression of p16ink4a ». *Cell Cycle* 10 (3): 457-68. https://doi.org/10.4161/cc.10.3.14707.

Kranzusch, Philip J., Amy S. Y. Lee, Stephen C. Wilson, Mikhail S. Solovykh, Russell E. Vance, James M. Berger, et Jennifer A. Doudna. 2014. « Structure-Guided Reprogramming of Human cGAS Dinucleotide Linkage Specificity ». *Cell* 158 (5): 1011-21. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.028.

Kranzusch, Philip J., Amy Si-Ying Lee, James M. Berger, et Jennifer A. Doudna. 2013. « Structure

of Human cGAS Reveals a Conserved Family of Second-Messenger Enzymes in Innate Immunity ». *Cell Reports* 3 (5): 1362-68. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.008.

Kuilman, Thomas, Chrysiis Michaloglou, Liesbeth C. W. Vredeveld, Sirith Douma, Remco van Doorn, Christophe J. Desmet, Lucien A. Aarden, Wolter J. Mooi, et Daniel S. Peeper. 2008. « Oncogene-Induced Senescence Relayed by an Interleukin-Dependent Inflammatory Network ». *Cell* 133 (6): 1019-31. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.039.

Kujirai, Tomoya, Christian Zierhut, Yoshimasa Takizawa, Ryan Kim, Lumi Negishi, Nobuki Uruma, Seiya Hirai, Hironori Funabiki, et Hitoshi Kurumizaka. 2020. « Structural Basis for the Inhibition of cGAS by Nucleosomes ». *Science* 370 (6515): 455-58. https://doi.org/10.1126/science.abd0237.

Kumagai, Akiko, Joon Lee, Hae Yong Yoo, et William G. Dunphy. 2006. « TopBP1 Activates the ATR-ATRIP Complex ». *Cell* 124 (5): 943-55. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.12.041.

Kumar, Ramesh, Román González-Prieto, Zhenyu Xiao, Matty Verlaan-de Vries, et Alfred C. O. Vertegaal. 2017. « The STUbL RNF4 Regulates Protein Group SUMOylation by Targeting the SUMO Conjugation Machinery ». *Nature Communications* 8 (1): 1809. https://doi.org/10.1038/s41467-017-01900-x.

Kuo, Ching-Ying, Xu Li, Jeremy M. Stark, Hsiu-Ming Shih, et David K. Ann. 2016. « RNF4 Regulates DNA Double-Strand Break Repair in a Cell Cycle-Dependent Manner ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 15 (6): 787-98. https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1138184.

Kyoizumi, Seishi, Yoshiko Kubo, Junko Kajimura, Kengo Yoshida, Kazue Imai, Tomonori Hayashi, Kei Nakachi, et al. 2013. « Age-Associated Changes in the Differentiation Potentials of Human Circulating Hematopoietic Progenitors to T- or NK-Lineage Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 190 (12): 6164-72. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203189.

Laberge, Remi-Martin, Yu Sun, Arturo V. Orjalo, Christopher K. Patil, Adam Freund, Lili Zhou, Samuel C. Curran, et al. 2015. « MTOR Regulates the Pro-Tumorigenic Senescence-Associated Secretory Phenotype by Promoting IL1A Translation ». *Nature Cell Biology* 17 (8): 1049-61. https://doi.org/10.1038/ncb3195.

Lacoste, Nicolas, Adam Woolfe, Hiroaki Tachiwana, Ana Villar Garea, Teresa Barth, Sylvain Cantaloube, Hitoshi Kurumizaka, Axel Imhof, et Geneviève Almouzni. 2014. « Mislocalization of the Centromeric Histone Variant CenH3/CENP-A in Human Cells Depends on the Chaperone DAXX ». *Molecular Cell* 53 (4): 631-44. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.01.018.

Lahaye, Xavier, Matteo Gentili, Aymeric Silvin, Cécile Conrad, Léa Picard, Mabel Jouve, Elina Zueva, et al. 2018. « NONO Detects the Nuclear HIV Capsid to Promote cGAS-Mediated Innate Immune Activation ». *Cell* 175 (2): 488-501.e22. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.062.

Lai, Fan, Ulf A. Orom, Matteo Cesaroni, Malte Beringer, Dylan J. Taatjes, Gerd A. Blobel, et Ramin Shiekhattar. 2013. « Activating RNAs Associate with Mediator to Enhance Chromatin Architecture and Transcription ». *Nature* 494 (7438): 497-501. https://doi.org/10.1038/nature11884.

Lallemand-Breitenbach, V., J. Zhu, F. Puvion, M. Koken, N. Honoré, A. Doubeikovsky, E. Duprez, et al. 2001. « Role of Promyelocytic Leukemia (PML) Sumolation in Nuclear Body Formation, 11S

Proteasome Recruitment, and As2O3-Induced PML or PML/Retinoic Acid Receptor Alpha Degradation ». *The Journal of Experimental Medicine* 193 (12): 1361-71. https://doi.org/10.1084/jem.193.12.1361.

Lallemand-Breitenbach, Valérie, Marion Jeanne, Shirine Benhenda, Rihab Nasr, Ming Lei, Laurent Peres, Jun Zhou, Jun Zhu, Brian Raught, et Hugues de Thé. 2008. « Arsenic Degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-Triggered RNF4/Ubiquitin-Mediated Pathway ». *Nature Cell Biology* 10 (5): 547-55. https://doi.org/10.1038/ncb1717.

Lallemand-Breitenbach, Valérie, et Hugues de Thé. 2010. « PML Nuclear Bodies ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (5): a000661. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000661.

Lan, Li, Satoshi Nakajima, Leizhen Wei, Luxi Sun, Ching-Lung Hsieh, Robert W. Sobol, Marcel Bruchez, Bennett Van Houten, Akira Yasui, et Arthur S. Levine. 2014. « Novel Method for Site-Specific Induction of Oxidative DNA Damage Reveals Differences in Recruitment of Repair Proteins to Heterochromatin and Euchromatin ». *Nucleic Acids Research* 42 (4): 2330-45. https://doi.org/10.1093/nar/gkt1233.

Lans, Hannes, et Jan H. J. Hoeijmakers. 2006. « Cell Biology: Ageing Nucleus Gets out of Shape ». *Nature* 440 (7080): 32-34. https://doi.org/10.1038/440032a.

Lavau, C., A. Marchio, M. Fagioli, J. Jansen, B. Falini, P. Lebon, F. Grosveld, P. P. Pandolfi, P. G. Pelicci, et A. Dejean. 1995. « The Acute Promyelocytic Leukaemia-Associated PML Gene Is Induced by Interferon ». *Oncogene* 11 (5): 871-76.

Law, Martin J., Karen M. Lower, Hsiao P. J. Voon, Jim R. Hughes, David Garrick, Vip Viprakasit, Matthew Mitson, et al. 2010. « ATR-X Syndrome Protein Targets Tandem Repeats and Influences Allele-Specific Expression in a Size-Dependent Manner ». *Cell* 143 (3): 367-78. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.023.

Lee, Bo Yun, Jung A. Han, Jun Sub Im, Amelia Morrone, Kimberly Johung, Edward C. Goodwin, Wim J. Kleijer, Daniel DiMaio, et Eun Seong Hwang. 2006. « Senescence-Associated Beta-Galactosidase Is Lysosomal Beta-Galactosidase ». *Aging Cell* 5 (2): 187-95. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x.

Lee, Kenneth K., et Jerry L. Workman. 2007. « Histone Acetyltransferase Complexes: One Size Doesn't Fit All ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (4): 284-95. https://doi.org/10.1038/nrm2145.

Lees-Miller, S P, M C Long, M A Kilvert, V Lam, S A Rice, et C A Spencer. 1996. « Attenuation of DNA-dependent protein kinase activity and its catalytic subunit by the herpes simplex virus type 1 transactivator ICP0 ». *Journal of Virology* 70 (11): 7471-77. https://doi.org/10.1128/jvi.70.11.7471-7477.1996.

Levy, M. Z., R. C. Allsopp, A. B. Futcher, C. W. Greider, et C. B. Harley. 1992. « Telomere End-Replication Problem and Cell Aging ». *Journal of Molecular Biology* 225 (4): 951-60. https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90096-3.

Lewis, Peter W., Simon J. Elsaesser, Kyung-Min Noh, Sonja C. Stadler, et C. David Allis. 2010.

« Daxx Is an H3.3-Specific Histone Chaperone and Cooperates with ATRX in Replication-Independent Chromatin Assembly at Telomeres ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (32): 14075-80. https://doi.org/10.1073/pnas.1008850107.

Li, Chenhui, Lele Zhang, Dong Qian, Mingxing Cheng, Haiyang Hu, Ze Hong, Ye Cui, et al. 2021. « RNF111-Facilitated Neddylation Potentiates cGAS-Mediated Antiviral Innate Immune Response ». *PLoS Pathogens* 17 (3): e1009401. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009401.

Li, Chuang, Qiongfang Peng, Xiao Wan, Haili Sun, et Jun Tang. 2017. « C-Terminal Motifs in Promyelocytic Leukemia Protein Isoforms Critically Regulate PML Nuclear Body Formation ». *Journal of Cell Science* 130 (20): 3496-3506. https://doi.org/10.1242/jcs.202879.

Li, Feng, Lei Tian, Liya Gu, et Guo-Min Li. 2009. « Evidence That Nucleosomes Inhibit Mismatch Repair in Eukaryotic Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (48): 33056-61. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.049874.

Li, Guo-Min. 2008. « Mechanisms and Functions of DNA Mismatch Repair ». *Cell Research* 18 (1): 85-98. https://doi.org/10.1038/cr.2007.115.

Li, Mi, et Hong-Bing Shu. 2020. « Dephosphorylation of cGAS by PPP6C Impairs Its Substrate Binding Activity and Innate Antiviral Response ». *Protein & Cell* 11 (8): 584-99. https://doi.org/10.1007/s13238-020-00729-3.

Li, Tingting, Junhong Guan, Ziji Huang, Xiang Hu, et Xiaofeng Zheng. 2014. « RNF168-Mediated H2A Neddylation Antagonizes Ubiquitylation of H2A and Regulates DNA Damage Repair ». *Journal of Cell Science* 127 (Pt 10): 2238-48. https://doi.org/10.1242/jcs.138891.

Li, Tuo, Tuozhi Huang, Mingjian Du, Xiang Chen, Fenghe Du, Junyao Ren, et Zhijian J. Chen. 2021. « Phosphorylation and Chromatin Tethering Prevent cGAS Activation during Mitosis ». *Science* 371 (6535): eabc5386. https://doi.org/10.1126/science.abc5386.

Li, Xiaocui, Xiaojuan Li, Chen Xie, Sihui Cai, Mengqiu Li, Heping Jin, Shu Wu, Jun Cui, Haiying Liu, et Yong Zhao. 2022. « cGAS guards against chromosome end-to-end fusions during mitosis and facilitates replicative senescence ». *Protein & Cell* 13 (1): 47-64. https://doi.org/10.1007/s13238-021-00879-y.

Li, Xiao-Dong, Jiaxi Wu, Daxing Gao, Hua Wang, Lijun Sun, et Zhijian J. Chen. 2013. « Pivotal Roles of cGAS-cGAMP Signaling in Antiviral Defense and Immune Adjuvant Effects ». *Science (New York, N.Y.)* 341 (6152): 1390-94. https://doi.org/10.1126/science.1244040.

Li, Xin, Chang Shu, Guanghui Yi, Catherine T. Chaton, Catherine L. Shelton, Jiasheng Diao, Xiaobing Zuo, C. Cheng Kao, Andrew B. Herr, et Pingwei Li. 2013. « Cyclic GMP-AMP Synthase Is Activated by Double-Stranded DNA-Induced Oligomerization ». *Immunity* 39 (6): 1019-31. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.10.019.

Li, Yinglu, Xiao Chen, et Chao Lu. 2021. « The Interplay between DNA and Histone Methylation: Molecular Mechanisms and Disease Implications ». *EMBO Reports* 22 (5): e51803. https://doi.org/10.15252/embr.202051803.

Lian, Huan, Jin Wei, Ru Zang, Wen Ye, Qing Yang, Xia-Nan Zhang, Yun-Da Chen, et al. 2018. « ZCCHC3 Is a Co-Sensor of cGAS for dsDNA Recognition in Innate Immune Response ». *Nature Communications* 9 (1): 3349. https://doi.org/10.1038/s41467-018-05559-w.

Liang, Li, Yijie Chai, Fei Chai, Haijing Liu, Ningning Ma, Hong Zhang, Shuang Zhang, Lin Nong, Ting Li, et Bo Zhang. 2022. « Expression of SASP, DNA Damage Response, and Cell Proliferation Factors in Early Gastric Neoplastic Lesions: Correlations and Clinical Significance ». *Oncology Research* 28:13.

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 (New York, N.Y.)* 326 (5950): 289-93. https://doi.org/10.1126/science.1181369.

Lin, Ding-Yen, Yen-Sung Huang, Jen-Chong Jeng, Hong-Yi Kuo, Che-Chang Chang, Ting-Ting Chao, Chun-Chen Ho, et al. 2006. « Role of SUMO-Interacting Motif in Daxx SUMO Modification, Subnuclear Localization, and Repression of Sumoylated Transcription Factors ». *Molecular Cell* 24 (3): 341-54. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.10.019.

Lin, Jue, et Elissa Epel. 2022. « Stress and telomere shortening: Insights from cellular mechanisms ». *Ageing Research Reviews* 73 (janvier):101507. https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101507.

Lindahl, T. 1993. « Instability and Decay of the Primary Structure of DNA ». *Nature* 362 (6422): 709-15. https://doi.org/10.1038/362709a0.

Lindsey-Boltz, Laura A., Michael G. Kemp, Joyce T. Reardon, Vanessa DeRocco, Ravi R. Iyer, Paul Modrich, et Aziz Sancar. 2014. « Coupling of Human DNA Excision Repair and the DNA Damage Checkpoint in a Defined in Vitro System ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (8): 5074-82. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.542787.

Lio, Chan-Wang J., Bryan McDonald, Mariko Takahashi, Rekha Dhanwani, Nikita Sharma, Jenny Huang, Elise Pham, Chris A. Benedict, et Sonia Sharma. 2016. « cGAS-STING Signaling Regulates Initial Innate Control of Cytomegalovirus Infection ». *Journal of Virology* 90 (17): 7789-97. https://doi.org/10.1128/JVI.01040-16.

Liu, Haipeng, Fei Wang, Yajuan Cao, Yifang Dang, et Baoxue Ge. 2022. « The Multifaceted Functions of cGAS ». *Journal of Molecular Cell Biology* 14 (5): mjac031. https://doi.org/10.1093/jmcb/mjac031.

Liu, Haipeng, Haiping Zhang, Xiangyang Wu, Dapeng Ma, Juehui Wu, Lin Wang, Yan Jiang, et al. 2018. « Nuclear cGAS Suppresses DNA Repair and Promotes Tumorigenesis ». *Nature* 563 (7729): 131-36. https://doi.org/10.1038/s41586-018-0629-6.

Liu, Jie, Christopher Ede, William D. Wright, Steven K. Gore, Shirin S. Jenkins, Bret D. Freudenthal, M. Todd Washington, Xavier Veaute, et Wolf-Dietrich Heyer. 2017. « Srs2 Promotes Synthesis-Dependent Strand Annealing by Disrupting DNA Polymerase δ-Extending D-Loops ». *eLife* 6 (mai):e22195. https://doi.org/10.7554/eLife.22195.

Liu, Shichang, Erin Atkinson, Adriana Paulucci-Holthauzen, et Bin Wang. 2023. « A CK2 and

SUMO-Dependent, PML NB-Involved Regulatory Mechanism Controlling BLM Ubiquitination and G-Quadruplex Resolution ». *Nature Communications* 14 (1): 6111. https://doi.org/10.1038/s41467-023-41705-9.

Liu, Zhao-Shan, Hong Cai, Wen Xue, Miao Wang, Tian Xia, Wan-Jin Li, Jia-Qing Xing, et al. 2019. « G3BP1 Promotes DNA Binding and Activation of cGAS ». *Nature Immunology* 20 (1): 18-28. https://doi.org/10.1038/s41590-018-0262-4.

Liu, Zhao-Shan, Zi-Yu Zhang, Hong Cai, Ming Zhao, Jie Mao, Jiang Dai, Tian Xia, Xue-Min Zhang, et Tao Li. 2018. « RINCK-Mediated Monoubiquitination of cGAS Promotes Antiviral Innate Immune Responses ». *Cell & Bioscience* 8:35. https://doi.org/10.1186/s13578-018-0233-3.

Llanos, S., P. A. Clark, J. Rowe, et G. Peters. 2001. « Stabilization of P53 by p14ARF without Relocation of MDM2 to the Nucleolus ». *Nature Cell Biology* 3 (5): 445-52. https://doi.org/10.1038/35074506.

Lovejoy, Courtney A., Wendi Li, Steven Reisenweber, Supawat Thongthip, Joanne Bruno, Titia de Lange, Saurav De, et al. 2012. « Loss of ATRX, Genome Instability, and an Altered DNA Damage Response Are Hallmarks of the Alternative Lengthening of Telomeres Pathway ». *PLoS Genetics* 8 (7): e1002772. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002772.

Lu, Yikai, Mengmeng Zhao, Li Chen, Yan Wang, Tianhao Liu, et Haipeng Liu. 2024. « cGAS: action in the nucleus ». *Frontiers in Immunology* 15 (mars):1380517. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1380517.

Luecke, Stefanie, Andreas Holleufer, Maria H. Christensen, Kasper L. Jønsson, Gerardo A. Boni, Lambert K. Sørensen, Mogens Johannsen, Martin R. Jakobsen, Rune Hartmann, et Søren R. Paludan. 2017. « cGAS Is Activated by DNA in a Length-Dependent Manner ». *EMBO Reports* 18 (10): 1707-15. https://doi.org/10.15252/embr.201744017.

Lugano, Roberta, Mohanraj Ramachandran, et Anna Dimberg. 2020. « Tumor Angiogenesis: Causes, Consequences, Challenges and Opportunities ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 77 (9): 1745-70. https://doi.org/10.1007/s00018-019-03351-7.

Luger, K., A. W. Mäder, R. K. Richmond, D. F. Sargent, et T. J. Richmond. 1997. « Crystal Structure of the Nucleosome Core Particle at 2.8 A Resolution ». *Nature* 389 (6648): 251-60. https://doi.org/10.1038/38444.

Luger, K., et T. J. Richmond. 1998a. « DNA Binding within the Nucleosome Core ». *Current Opinion in Structural Biology* 8 (1): 33-40. https://doi.org/10.1016/s0959-440x(98)80007-9.

———. 1998b. « The Histone Tails of the Nucleosome ». *Current Opinion in Genetics & Development* 8 (2): 140-46. https://doi.org/10.1016/s0959-437x(98)80134-2.

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.

Luijsterburg, Martijn S., Michael Lindh, Klara Acs, Mischa G. Vrouwe, Alex Pines, Haico

van Attikum, Leon H. Mullenders, et Nico P. Dantuma. 2012. « DDB2 Promotes Chromatin Decondensation at UV-Induced DNA Damage ». *The Journal of Cell Biology* 197 (2): 267-81. https://doi.org/10.1083/jcb.201106074.

Lujambio, Amaia, Leila Akkari, Janelle Simon, Danielle Grace, Darjus F. Tschaharganeh, Jessica E. Bolden, Zhen Zhao, et al. 2013. « Non-Cell-Autonomous Tumor Suppression by P53 ». *Cell* 153 (2): 449-60. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.020.

Luo, Juanjuan, Chunjiao Lu, Yang Chen, Xuewei Wu, Chenchen Zhu, Wei Cui, Shicang Yu, et al. 2023. « Nuclear Translocation of cGAS Orchestrates VEGF-A-Mediated Angiogenesis ». *Cell Reports* 42 (4). https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112328.

Lyu, Heng, Le Sun, Zhenyu Guan, Jinxin Li, Changsong Yin, Yaoyang Zhang, et Hong Jiang. 2023. « Proximity Labeling Reveals OTUD3 as a DNA-Binding Deubiquitinase of cGAS ». *Cell Reports* 42 (4): 112309. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112309.

Ma, Teng, Yibin Chen, Feng Zhang, Chao-Yie Yang, Shaomeng Wang, et Xiaochun Yu. 2013. « RNF111-Dependent Neddylation Activates DNA Damage-Induced Ubiquitination ». *Molecular Cell* 49 (5): 897-907. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.01.006.

Ma, Xiaoyu, Yingyi Zhang, Yuanyuan Zhang, Xu Zhang, Yan Huang, Kai He, Chuan Chen, et al. 2023. « A Stress-Induced Cilium-to-PML-NB Route Drives Senescence Initiation ». *Nature Communications* 14 (1): 1840. https://doi.org/10.1038/s41467-023-37362-7.

Ma, Yunmei, Haihui Lu, Brigette Tippin, Myron F. Goodman, Noriko Shimazaki, Osamu Koiwai, Chih-Lin Hsieh, Klaus Schwarz, et Michael R. Lieber. 2004. « A Biochemically Defined System for Mammalian Nonhomologous DNA End Joining ». *Molecular Cell* 16 (5): 701-13. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.017.

Ma, Yunmei, Ulrich Pannicke, Klaus Schwarz, et Michael R. Lieber. 2002. « Hairpin Opening and Overhang Processing by an Artemis/DNA-Dependent Protein Kinase Complex in Nonhomologous End Joining and V(D)J Recombination ». *Cell* 108 (6): 781-94. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00671-2.

Mackenzie, Karen J., Paula Carroll, Carol-Anne Martin, Olga Murina, Adeline Fluteau, Daniel J. Simpson, Nelly Olova, et al. 2017. « cGAS Surveillance of Micronuclei Links Genome Instability to Innate Immunity ». *Nature* 548 (7668): 461-65. https://doi.org/10.1038/nature23449.

Macleod, K. F., N. Sherry, G. Hannon, D. Beach, T. Tokino, K. Kinzler, B. Vogelstein, et T. Jacks. 1995. « P53-Dependent and Independent Expression of P21 during Cell Growth, Differentiation, and DNA Damage ». *Genes & Development* 9 (8): 935-44. https://doi.org/10.1101/gad.9.8.935.

Malu, Shruti, Pablo De Ioannes, Mikhail Kozlov, Marsha Greene, Dailia Francis, Mary Hanna, Jesse Pena, et al. 2012. « Artemis C-terminal region facilitates V(D)J recombination through its interactions with DNA Ligase IV and DNA-PKcs ». *Journal of Experimental Medicine* 209 (5): 955-63. https://doi.org/10.1084/jem.20111437.

Margalit, Ayelet, Miriam Segura-Totten, Yosef Gruenbaum, et Katherine L. Wilson. 2005. « Barrier-to-Autointegration Factor Is Required to Segregate and Enclose Chromosomes within the Nuclear

Envelope and Assemble the Nuclear Lamina ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (9): 3290-95. https://doi.org/10.1073/pnas.0408364102.

Margolis, Shally R., Stephen C. Wilson, et Russell E. Vance. 2017. « Evolutionary Origins of cGAS-STING Signaling ». *Trends in Immunology* 38 (10): 733-43. https://doi.org/10.1016/j.it.2017.03.004.

Margueron, Raphaël, et Danny Reinberg. 2011. « The Polycomb Complex PRC2 and Its Mark in Life ». *Nature* 469 (7330): 343-49. https://doi.org/10.1038/nature09784.

Marintchev, A., M. A. Mullen, M. W. Maciejewski, B. Pan, M. R. Gryk, et G. P. Mullen. 1999. « Solution Structure of the Single-Strand Break Repair Protein XRCC1 N-Terminal Domain ». *Nature Structural Biology* 6 (9): 884-93. https://doi.org/10.1038/12347.

Maroui, Mohamed Ali, Aleth Callé, Camille Cohen, Nathalie Streichenberger, Pascale Texier, Julie Takissian, Antoine Rousseau, et al. 2016. « Latency Entry of Herpes Simplex Virus 1 Is Determined by the Interaction of Its Genome with the Nuclear Environment ». *PLoS Pathogens* 12 (9): e1005834. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005834.

Marsano, René Massimiliano, et Patrizio Dimitri. 2022. « Constitutive Heterochromatin in Eukaryotic Genomes: A Mine of Transposable Elements ». *Cells* 11 (5): 761. https://doi.org/10.3390/cells11050761.

Martire, Sara, et Laura A. Banaszynski. 2020. « The Roles of Histone Variants in Fine-Tuning Chromatin Organization and Function ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (9): 522-41. https://doi.org/10.1038/s41580-020-0262-8.

Mas-Bargues, Cristina, Consuelo Borrás, et Jose Viña. 2021. « Bcl-xL as a Modulator of Senescence and Aging ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (4): 1527. https://doi.org/10.3390/ijms22041527.

Masi, A. di, D. Cilli, F. Berardinelli, A. Talarico, I. Pallavicini, R. Pennisi, S. Leone, et al. 2016. « PML Nuclear Body Disruption Impairs DNA Double-Strand Break Sensing and Repair in APL ». *Cell Death & Disease* 7 (7): e2308. https://doi.org/10.1038/cddis.2016.115.

Matsuoka, S., M. Huang, et S. J. Elledge. 1998. « Linkage of ATM to Cell Cycle Regulation by the Chk2 Protein Kinase ». *Science (New York, N.Y.)* 282 (5395): 1893-97. https://doi.org/10.1126/science.282.5395.1893.

Matsuoka, Shuhei, Bryan A. Ballif, Agata Smogorzewska, E. Robert McDonald, Kristen E. Hurov, Ji Luo, Corey E. Bakalarski, et al. 2007. « ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage ». *Science* 316 (5828): 1160-66. https://doi.org/10.1126/science.1140321.

Mattiroli, Francesca, Joseph H. A. Vissers, Willem J. van Dijk, Pauline Ikpa, Elisabetta Citterio, Wim Vermeulen, Jurgen A. Marteijn, et Titia K. Sixma. 2012. « RNF168 Ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to Drive DNA Damage Signaling ». *Cell* 150 (6): 1182-95. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.08.005.

Matunis, M. J., E. Coutavas, et G. Blobel. 1996. « A Novel Ubiquitin-like Modification Modulates

the Partitioning of the Ran-GTPase-Activating Protein RanGAP1 between the Cytosol and the Nuclear Pore Complex ». *The Journal of Cell Biology* 135 (6 Pt 1): 1457-70. https://doi.org/10.1083/jcb.135.6.1457.

Maze, Ian, Kyung-Min Noh, Alexey A. Soshnev, et C. David Allis. 2014. « Every Amino Acid Matters: Essential Contributions of Histone Variants to Mammalian Development and Disease ». *Nature Reviews. Genetics* 15 (4): 259-71. https://doi.org/10.1038/nrg3673.

McCarthy, Donald A., Ryan R. Clark, Toni R. Bartling, Mohamed Trebak, et J. Andres Melendez. 2013. « Redox Control of the Senescence Regulator Interleukin-1α and the Secretory Phenotype ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (45): 32149-59. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.493841.

McCarthy, Ryan L., Jingchao Zhang, et Kenneth S. Zaret. 2023. « Diverse Heterochromatin States Restricting Cell Identity and Reprogramming ». *Trends in Biochemical Sciences* 48 (6): 513-26. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2023.02.007.

McCulloch, Kendal, Gary J. Litherland, et Taranjit Singh Rai. 2017. « Cellular Senescence in Osteoarthritis Pathology ». *Aging Cell* 16 (2): 210-18. https://doi.org/10.1111/acel.12562.

McCulloch, Scott D., et Thomas A. Kunkel. 2008. « The Fidelity of DNA Synthesis by Eukaryotic Replicative and Translesion Synthesis Polymerases ». *Cell Research* 18 (1): 148-61. https://doi.org/10.1038/cr.2008.4.

McFarlane, Steven, Anne Orr, Ashley P. E. Roberts, Kristen L. Conn, Victor Iliev, Colin Loney, Ana da Silva Filipe, et al. 2019. « The histone chaperone HIRA promotes the induction of host innate immune defences in response to HSV-1 infection ». *PLoS Pathogens* 15 (3). https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007667.

McHugh, Domhnall, et Jesús Gil. 2017. « Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues ». *Journal of Cell Biology* 217 (1): 65-77. https://doi.org/10.1083/jcb.201708092.

McSwiggen, David T., Mustafa Mir, Xavier Darzacq, et Robert Tjian. 2019. « Evaluating Phase Separation in Live Cells: Diagnosis, Caveats, and Functional Consequences ». *Genes & Development* 33 (23-24): 1619-34. https://doi.org/10.1101/gad.331520.119.

Meeks-Wagner, D., et L. H. Hartwell. 1986. « Normal Stoichiometry of Histone Dimer Sets Is Necessary for High Fidelity of Mitotic Chromosome Transmission ». *Cell* 44 (1): 43-52. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90483-6.

Mejlvang, Jakob, Yunpeng Feng, Constance Alabert, Kai J. Neelsen, Zuzana Jasencakova, Xiaobei Zhao, Michael Lees, et al. 2014. « New Histone Supply Regulates Replication Fork Speed and PCNA Unloading ». *The Journal of Cell Biology* 204 (1): 29-43. https://doi.org/10.1083/jcb.201305017.

Melzer, David. 2008. « Genetic Polymorphisms and Human Aging: Association Studies Deliver ». *Rejuvenation Research* 11 (2): 523-26. https://doi.org/10.1089/rej.2008.0684.

Melzer, David, Timothy M. Frayling, Anna Murray, Alison J. Hurst, Lorna W. Harries, Honglin

Song, Kaytee Khaw, et al. 2007. « A Common Variant of the P16(INK4a) Genetic Region Is Associated with Physical Function in Older People ». *Mechanisms of Ageing and Development* 128 (5-6): 370-77. https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.03.005.

Meng, Yuru, Elena V. Efimova, Khaled W. Hamzeh, Thomas E. Darga, Helena J. Mauceri, Yang-Xin Fu, Stephen J. Kron, et Ralph R. Weichselbaum. 2012. « Radiation-Inducible Immunotherapy for Cancer: Senescent Tumor Cells as a Cancer Vaccine ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (5): 1046-55. https://doi.org/10.1038/mt.2012.19.

Mermoud, Jacqueline E., Samuel P. Rowbotham, et Patrick D. Varga-Weisz. 2011. « Keeping Chromatin Quiet: How Nucleosome Remodeling Restores Heterochromatin after Replication ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (23): 4017-25. https://doi.org/10.4161/cc.10.23.18558.

Michalski, Sebastian, Carina C. de Oliveira Mann, Che A. Stafford, Gregor Witte, Joseph Bartho, Katja Lammens, Veit Hornung, et Karl-Peter Hopfner. 2020. « Structural Basis for Sequestration and Autoinhibition of cGAS by Chromatin ». *Nature* 587 (7835): 678-82. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2748-0.

Midgley, C. A., J. M. Desterro, M. K. Saville, S. Howard, A. Sparks, R. T. Hay, et D. P. Lane. 2000. « An N-Terminal p14ARF Peptide Blocks Mdm2-Dependent Ubiquitination in Vitro and Can Activate P53 in Vivo ». *Oncogene* 19 (19): 2312-23. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203593.

Midgley, C. A., et D. P. Lane. 1997. « P53 Protein Stability in Tumour Cells Is Not Determined by Mutation but Is Dependent on Mdm2 Binding ». *Oncogene* 15 (10): 1179-89. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201459.

Mijit, Mahmut, Valentina Caracciolo, Antonio Melillo, Fernanda Amicarelli, et Antonio Giordano. 2020. « Role of P53 in the Regulation of Cellular Senescence ». *Biomolecules* 10 (3): 420. https://doi.org/10.3390/biom10030420.

Miki, Yoshio, Jeff Swensen, Donna Shattuck-Eidens, P. Andrew Futreal, Keith Harshman, Sean Tavtigian, Qingyun Liu, et al. 1994. « A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1 ». *Science* 266 (5182): 66-71. https://doi.org/10.1126/science.7545954.

Milanovic, Maja, Dorothy N. Y. Fan, Dimitri Belenki, J. Henry M. Däbritz, Zhen Zhao, Yong Yu, Jan R. Dörr, et al. 2018. « Senescence-Associated Reprogramming Promotes Cancer Stemness ». *Nature* 553 (7686): 96-100. https://doi.org/10.1038/nature25167.

Minami, Katsuhiko, Shiori Iida, et Kazuhiro Maeshima. 2022. « Chromatin Organization and DNA Damage ». *The Enzymes* 51:29-51. https://doi.org/10.1016/bs.enz.2022.08.003.

Mirzoeva, O. K., et J. H. Petrini. 2001. « DNA Damage-Dependent Nuclear Dynamics of the Mre11 Complex ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (1): 281-88. https://doi.org/10.1128/MCB.21.1.281-288.2001.

Miyashita, T., et J. C. Reed. 1995. « Tumor Suppressor P53 Is a Direct Transcriptional Activator of the Human Bax Gene ». *Cell* 80 (2): 293-99. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90412-3.

Mizuguchi, Gaku, Xuetong Shen, Joe Landry, Wei-Hua Wu, Subhojit Sen, et Carl Wu. 2004. « ATP-

Driven Exchange of Histone H2AZ Variant Catalyzed by SWR1 Chromatin Remodeling Complex ». *Science (New York, N.Y.)* 303 (5656): 343-48. https://doi.org/10.1126/science.1090701.

Momand, J., G. P. Zambetti, D. C. Olson, D. George, et A. J. Levine. 1992. « The Mdm-2 Oncogene Product Forms a Complex with the P53 Protein and Inhibits P53-Mediated Transactivation ». *Cell* 69 (7): 1237-45. https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90644-r.

Morris, Joanna R., Chris Boutell, Melanie Keppler, Ruth Densham, Daniel Weekes, Amin Alamshah, Laura Butler, et al. 2009. « The SUMO Modification Pathway Is Involved in the BRCA1 Response to Genotoxic Stress ». *Nature* 462 (7275): 886-90. https://doi.org/10.1038/nature08593.

Morrison, Olivia, et Jitendra Thakur. 2021. « Molecular Complexes at Euchromatin, Heterochromatin and Centromeric Chromatin ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (13): 6922. https://doi.org/10.3390/ijms22136922.

Mosammaparast, Nima, Courtney S. Ewart, et Lucy F. Pemberton. 2002. « A Role for Nucleosome Assembly Protein 1 in the Nuclear Transport of Histones H2A and H2B ». *The EMBO Journal* 21 (23): 6527-38. https://doi.org/10.1093/emboj/cdf647.

Moshous, D., I. Callebaut, R. de Chasseval, B. Corneo, M. Cavazzana-Calvo, F. Le Deist, I. Tezcan, et al. 2001. « Artemis, a Novel DNA Double-Strand Break Repair/V(D)J Recombination Protein, Is Mutated in Human Severe Combined Immune Deficiency ». *Cell* 105 (2): 177-86. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00309-9.

Mousson, Florence, Aurélie Lautrette, Jean-Yves Thuret, Morgane Agez, Régis Courbeyrette, Béatrice Amigues, Emmanuelle Becker, et al. 2005. « Structural Basis for the Interaction of Asf1 with Histone H3 and Its Functional Implications ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (17): 5975-80. https://doi.org/10.1073/pnas.0500149102.

Mu, D., D. S. Hsu, et A. Sancar. 1996. « Reaction Mechanism of Human DNA Repair Excision Nuclease ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (14): 8285-94. https://doi.org/10.1074/jbc.271.14.8285.

Mukhopadhyay, Debaditya, et Mary Dasso. 2007. « Modification in Reverse: The SUMO Proteases ». *Trends in Biochemical Sciences* 32 (6): 286-95. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.05.002.

Muller, Florian L., Michael S. Lustgarten, Youngmok Jang, Arlan Richardson, et Holly Van Remmen. 2007. « Trends in Oxidative Aging Theories ». *Free Radical Biology & Medicine* 43 (4): 477-503. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.034.

Müller, Sebastian, et Geneviève Almouzni. 2014. « A Network of Players in H3 Histone Variant Deposition and Maintenance at Centromeres ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1839 (3): 241-50. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2013.11.008.

Muñoz-Espín, Daniel, Marta Cañamero, Antonio Maraver, Gonzalo Gómez-López, Julio Contreras, Silvia Murillo-Cuesta, Alfonso Rodríguez-Baeza, et al. 2013. « Programmed Cell Senescence during Mammalian Embryonic Development ». *Cell* 155 (5): 1104-18. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.019.

Murnane, John P. 2012. « Telomere Dysfunction and Chromosome Instability ». *Mutation Research* 730 (1-2): 28-36. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.04.008.

Murphy, Michael P. 2009. « How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species ». *The Biochemical Journal* 417 (1): 1-13. https://doi.org/10.1042/BJ20081386.

Napoles, Mariana de, Jacqueline E. Mermoud, Rika Wakao, Y. Amy Tang, Mitusuhiro Endoh, Ruth Appanah, Tatyana B. Nesterova, et al. 2004. « Polycomb Group Proteins Ring1A/B Link Ubiquitylation of Histone H2A to Heritable Gene Silencing and X Inactivation ». *Developmental Cell* 7 (5): 663-76. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.10.005.

Nardella, Caterina, John G. Clohessy, Andrea Alimonti, et Pier Paolo Pandolfi. 2011. « Pro-Senescence Therapy for Cancer Treatment ». *Nature Reviews. Cancer* 11 (7): 503-11. https://doi.org/10.1038/nrc3057.

Narita, Masashi, Sabrina Nũnez, Edith Heard, Masako Narita, Athena W. Lin, Stephen A. Hearn, David L. Spector, Gregory J. Hannon, et Scott W. Lowe. 2003. « Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence ». *Cell* 113 (6): 703-16. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00401-x.

Nielsen, S. J., R. Schneider, U. M. Bauer, A. J. Bannister, A. Morrison, D. O'Carroll, R. Firestein, et al. 2001. « Rb Targets Histone H3 Methylation and HP1 to Promoters ». *Nature* 412 (6846): 561-65. https://doi.org/10.1038/35087620.

Obri, Arnaud, Khalid Ouararhni, Christophe Papin, Marie-Laure Diebold, Kiran Padmanabhan, Martin Marek, Isabelle Stoll, et al. 2014. « ANP32E Is a Histone Chaperone That Removes H2A.Z from Chromatin ». *Nature* 505 (7485): 648-53. https://doi.org/10.1038/nature12922.

Ohtani, N., Z. Zebedee, T. J. Huot, J. A. Stinson, M. Sugimoto, Y. Ohashi, A. D. Sharrocks, G. Peters, et E. Hara. 2001. « Opposing Effects of Ets and Id Proteins on p16INK4a Expression during Cellular Senescence ». *Nature* 409 (6823): 1067-70. https://doi.org/10.1038/35059131.

Ohtani, Naoko. 2022. « The roles and mechanisms of senescence-associated secretory phenotype (SASP): can it be controlled by senolysis? » *Inflammation and Regeneration* 42 (1): 11. https://doi.org/10.1186/s41232-022-00197-8.

Okura, T., L. Gong, T. Kamitani, T. Wada, I. Okura, C. F. Wei, H. M. Chang, et E. T. Yeh. 1996. « Protection against Fas/APO-1- and Tumor Necrosis Factor-Mediated Cell Death by a Novel Protein, Sentrin ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 157 (10): 4277-81.

Olan, Ioana, Tetsuya Handa, et Masashi Narita. 2023. « Beyond SAHF: An integrative view of chromatin compartmentalization during senescence ». *Current Opinion in Cell Biology* 83 (août):102206. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2023.102206.

Oliner, J. D., J. A. Pietenpol, S. Thiagalingam, J. Gyuris, K. W. Kinzler, et B. Vogelstein. 1993. « Oncoprotein MDM2 Conceals the Activation Domain of Tumour Suppressor P53 ». *Nature* 362 (6423): 857-60. https://doi.org/10.1038/362857a0.

Oliveira Mann, Carina C, et Karl-Peter Hopfner. 2021. « Nuclear cGAS: Guard or Prisoner? » *The*

EMBO Journal 40 (16). https://doi.org/10.15252/embj.2021108293.

Ong, Chin-Tong, et Victor G. Corces. 2014. « CTCF: An Architectural Protein Bridging Genome Topology and Function ». *Nature Reviews. Genetics* 15 (4): 234-46. https://doi.org/10.1038/nrg3663.

Orphanides, G., G. LeRoy, C. H. Chang, D. S. Luse, et D. Reinberg. 1998. « FACT, a Factor That Facilitates Transcript Elongation through Nucleosomes ». *Cell* 92 (1): 105-16. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80903-4.

Orzalli, Megan H., Nicole M. Broekema, Benjamin A. Diner, Dustin C. Hancks, Nels C. Elde, Ileana M. Cristea, et David M. Knipe. 2015. « cGAS-Mediated Stabilization of IFI16 Promotes Innate Signaling during Herpes Simplex Virus Infection ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (14). https://doi.org/10.1073/pnas.1424637112.

O'Sullivan, Roderick J., Nausica Arnoult, Daniel H. Lackner, Liana Oganesian, Candy Haggblom, Armelle Corpet, Genevieve Almouzni, et Jan Karlseder. 2014. « Rapid Induction of Alternative Lengthening of Telomeres by Depletion of the Histone Chaperone ASF1 ». *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (2): 167-74. https://doi.org/10.1038/nsmb.2754.

Ou, Hui-Ling, et Björn Schumacher. 2018. « DNA damage responses and p53 in the aging process ». *Blood* 131 (5): 488-95. https://doi.org/10.1182/blood-2017-07-746396.

Ouyang, Songying, Xianqiang Song, Yaya Wang, Heng Ru, Neil Shaw, Yan Jiang, Fengfeng Niu, et al. 2012. « Structural Analysis of the STING Adaptor Protein Reveals a Hydrophobic Dimer Interface and Mode of Cyclic Di-GMP Binding ». *Immunity* 36 (6): 1073-86. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.019.

Ovadya, Yossi, Tomer Landsberger, Hanna Leins, Ezra Vadai, Hilah Gal, Anat Biran, Reut Yosef, et al. 2018. « Impaired Immune Surveillance Accelerates Accumulation of Senescent Cells and Aging ». *Nature Communications* 9 (1): 5435. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07825-3.

Özcan, Servet, Nicola Alessio, Mustafa B. Acar, Eda Mert, Fatih Omerli, Gianfranco Peluso, et Umberto Galderisi. 2016. « Unbiased Analysis of Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP) to Identify Common Components Following Different Genotoxic Stresses ». *Aging* 8 (7): 1316-29. https://doi.org/10.18632/aging.100971.

Padeken, Jan, Stephen P. Methot, et Susan M. Gasser. 2022. « Establishment of H3K9-Methylated Heterochromatin and Its Functions in Tissue Differentiation and Maintenance ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 23 (9): 623-40. https://doi.org/10.1038/s41580-022-00483-w.

Paijo, Jennifer, Marius Döring, Julia Spanier, Elena Grabski, Mohammed Nooruzzaman, Tobias Schmidt, Gregor Witte, et al. 2016. « cGAS Senses Human Cytomegalovirus and Induces Type I Interferon Responses in Human Monocyte-Derived Cells ». *PLoS Pathogens* 12 (4): e1005546. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005546.

Palm, Wilhelm, et Titia de Lange. 2008. « How Shelterin Protects Mammalian Telomeres ». *Annual Review of Genetics* 42:301-34. https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130350.

Pan, Jing, Chen-Jie Fei, Yang Hu, Xiang-Yu Wu, Li Nie, et Jiong Chen. 2023. « Current

Understanding of the cGAS-STING Signaling Pathway: Structure, Regulatory Mechanisms, and Related Diseases ». *Zoological Research* 44 (1): 183-218. https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2022.464.

Pankiv, Serhiy, Trond Lamark, Jack-Ansgar Bruun, Aud Øvervatn, Geir Bjørkøy, et Terje Johansen. 2010. « Nucleocytoplasmic Shuttling of P62/SQSTM1 and Its Role in Recruitment of Nuclear Polyubiquitinated Proteins to Promyelocytic Leukemia Bodies ». *The Journal of Biological Chemistry* 285 (8): 5941-53. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.039925.

Pannunzio, Nicholas R., Go Watanabe, et Michael R. Lieber. 2018. « Nonhomologous DNA End-Joining for Repair of DNA Double-Strand Breaks ». *Journal of Biological Chemistry* 293 (27): 10512-23. https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000374.

Passarge, E. 1979. « Emil Heitz and the Concept of Heterochromatin: Longitudinal Chromosome Differentiation Was Recognized Fifty Years Ago ». *American Journal of Human Genetics* 31 (2): 106-15.

Patel, Priyanka L., Anitha Suram, Neena Mirani, Oliver Bischof, et Utz Herbig. 2016. « Derepression of hTERT Gene Expression Promotes Escape from Oncogene-Induced Cellular Senescence ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (34): E5024-5033. https://doi.org/10.1073/pnas.1602379113.

Pathare, Ganesh R., Alexiane Decout, Selene Glück, Simone Cavadini, Kristina Makasheva, Ruud Hovius, Georg Kempf, et al. 2020. « Structural Mechanism of cGAS Inhibition by the Nucleosome ». *Nature* 587 (7835): 668-72. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2750-6.

Pearson, M., R. Carbone, C. Sebastiani, M. Cioce, M. Fagioli, S. Saito, Y. Higashimoto, et al. 2000. « PML Regulates P53 Acetylation and Premature Senescence Induced by Oncogenic Ras ». *Nature* 406 (6792): 207-10. https://doi.org/10.1038/35018127.

Petrova, Nadezhda V., Artem K. Velichko, Sergey V. Razin, et Omar L. Kantidze. 2016. « Small Molecule Compounds That Induce Cellular Senescence ». *Aging Cell* 15 (6): 999-1017. https://doi.org/10.1111/acel.12518.

Petukhova, G., S. Van Komen, S. Vergano, H. Klein, et P. Sung. 1999. « Yeast Rad54 Promotes Rad51-Dependent Homologous DNA Pairing via ATP Hydrolysis-Driven Change in DNA Double Helix Conformation ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (41): 29453-62. https://doi.org/10.1074/jbc.274.41.29453.

Pleschke, J. M., H. E. Kleczkowska, M. Strohm, et F. R. Althaus. 2000. « Poly(ADP-Ribose) Binds to Specific Domains in DNA Damage Checkpoint Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (52): 40974-80. https://doi.org/10.1074/jbc.M006520200.

Poliseno, Laura, Leonardo Salmena, Luisa Riccardi, Alessandro Fornari, Min Sup Song, Robin M. Hobbs, Paolo Sportoletti, et al. 2010. « Identification of the miR-106b~25 microRNA Cluster as a Proto-Oncogenic PTEN-Targeting Intron That Cooperates with Its Host Gene MCM7 in Transformation ». *Science Signaling* 3 (117): ra29. https://doi.org/10.1126/scisignal.2000594.

Poulsen, Sara L., Rebecca K. Hansen, Sebastian A. Wagner, Loes van Cuijk, Gijsbert J. van Belle,

Werner Streicher, Mats Wikström, et al. 2013. « RNF111/Arkadia Is a SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase That Facilitates the DNA Damage Response ». *The Journal of Cell Biology* 201 (6): 797-807. https://doi.org/10.1083/jcb.201212075.

Price, Jo S., Jasmine G. Waters, Clare Darrah, Caroline Pennington, Dylan R. Edwards, Simon T. Donell, et Ian M. Clark. 2002. « The Role of Chondrocyte Senescence in Osteoarthritis ». *Aging Cell* 1 (1): 57-65. https://doi.org/10.1046/j.1474-9728.2002.00008.x.

Prigozhin, Daniil M., Christopher H. Douse, Laura E. Farleigh, Anna Albecka, Iva A. Tchasovnikarova, Richard T. Timms, Shun-Ichiro Oda, et al. 2020. « Periphilin Self-Association Underpins Epigenetic Silencing by the HUSH Complex ». *Nucleic Acids Research* 48 (18): 10313-28. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa785.

Probst, Aline V., Elaine Dunleavy, et Geneviève Almouzni. 2009. « Epigenetic Inheritance during the Cell Cycle ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (3): 192-206. https://doi.org/10.1038/nrm2640.

Protter, David S. W., et Roy Parker. 2016. « Principles and Properties of Stress Granules ». *Trends in Cell Biology* 26 (9): 668-79. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.004.

Qi, Zhi, Sy Redding, Ja Yil Lee, Bryan Gibb, YoungHo Kwon, Hengyao Niu, William A. Gaines, Patrick Sung, et Eric C. Greene. 2015. « DNA Sequence Alignment by Microhomology Sampling during Homologous Recombination ». *Cell* 160 (5): 856-69. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.029.

Raab, Matthew, Matteo Gentili, Henry de Belly, Hawa-Racine Thiam, Pablo Vargas, Ana Joaquina Jimenez, Franziska Lautenschlaeger, et al. 2016. « ESCRT III Repairs Nuclear Envelope Ruptures during Cell Migration to Limit DNA Damage and Cell Death ». *Science* 352 (6283): 359-62. https://doi.org/10.1126/science.aad7611.

Radman-Livaja, Marta, et Oliver J. Rando. 2010. « Nucleosome Positioning: How Is It Established, and Why Does It Matter? » *Developmental Biology* 339 (2): 258-66. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.06.012.

Rai, Taranjit Singh, et Peter D. Adams. 2012. « Lessons from Senescence: Chromatin Maintenance in Non-Proliferating Cells ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1819 (3-4): 322-31. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.07.014.

Rai, Taranjit Singh, Mandy Glass, John J. Cole, Mohammad I. Rather, Morgan Marsden, Matthew Neilson, Claire Brock, Ian R. Humphreys, Roger D. Everett, et Peter D. Adams. 2017. « Histone Chaperone HIRA Deposits Histone H3.3 onto Foreign Viral DNA and Contributes to Anti-Viral Intrinsic Immunity ». *Nucleic Acids Research* 45 (20): 11673-83. https://doi.org/10.1093/nar/gkx771.

Rai, Taranjit Singh, Aastha Puri, Tony McBryan, Jason Hoffman, Yong Tang, Nikolay A. Pchelintsev, John van Tuyn, Ronen Marmorstein, David C. Schultz, et Peter D. Adams. 2011. « Human CABIN1 Is a Functional Member of the Human HIRA/UBN1/ASF1a Histone H3.3 Chaperone Complex ». *Molecular and Cellular Biology* 31 (19): 4107-18. https://doi.org/10.1128/MCB.05546-11.

Ramakrishnan, V. 1997. « Histone H1 and Chromatin Higher-Order Structure ». *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 7 (3): 215-30. https://doi.org/10.1615/critreveukargeneexpr.v7.i3.20.

Rathmell, W K, et G Chu. 1994. « Involvement of the Ku autoantigen in the cellular response to DNA double-strand breaks. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (16): 7623-27. https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7623.

Rayess, Hani, Marilene B. Wang, et Eri S. Srivatsan. 2012. « Cellular senescence and tumor suppressor gene p16 ». *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer* 130 (8): 1715-25. https://doi.org/10.1002/ijc.27316.

Ray-Gallet, Dominique, Jean-Pierre Quivy, Christine Scamps, Emmanuelle M.-D. Martini, Marc Lipinski, et Geneviève Almouzni. 2002. « HIRA Is Critical for a Nucleosome Assembly Pathway Independent of DNA Synthesis ». *Molecular Cell* 9 (5): 1091-1100. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00526-9.

Ray-Gallet, Dominique, Jean-Pierre Quivy, Herman W. W. Silljé, Erich A. Nigg, et Geneviève Almouzni. 2007. « The Histone Chaperone Asf1 Is Dispensable for Direct de Novo Histone Deposition in Xenopus Egg Extracts ». *Chromosoma* 116 (5): 487-96. https://doi.org/10.1007/s00412-007-0112-x.

Ray-Gallet, Dominique, Adam Woolfe, Isabelle Vassias, Céline Pellentz, Nicolas Lacoste, Aastha Puri, David C. Schultz, et al. 2011. « Dynamics of Histone H3 Deposition in Vivo Reveal a Nucleosome Gap-Filling Mechanism for H3.3 to Maintain Chromatin Integrity ». *Molecular Cell* 44 (6): 928-41. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.006.

Revandkar, Ajinkya, Maria Luna Perciato, Alberto Toso, Abdullah Alajati, Jingjing Chen, Hermeto Gerber, Mitko Dimitrov, et al. 2016. « Inhibition of Notch Pathway Arrests PTEN-Deficient Advanced Prostate Cancer by Triggering P27-Driven Cellular Senescence ». *Nature Communications* 7 (décembre):13719. https://doi.org/10.1038/ncomms13719.

Ricketts, M. Daniel, Nirmalya Dasgupta, Jiayi Fan, Joseph Han, Morgan Gerace, Yong Tang, Ben E. Black, Peter D. Adams, et Ronen Marmorstein. 2019. « The HIRA Histone Chaperone Complex Subunit UBN1 Harbors H3/H4- and DNA-Binding Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 294 (23): 9239-59. https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007480.

Ricketts, M. Daniel, Brian Frederick, Henry Hoff, Yong Tang, David C. Schultz, Taranjit Singh Rai, Maria Grazia Vizioli, Peter D. Adams, et Ronen Marmorstein. 2015. « Ubinuclein-1 Confers Histone H3.3-Specific-Binding by the HIRA Histone Chaperone Complex ». *Nature Communications* 6 (juillet):7711. https://doi.org/10.1038/ncomms8711.

Ricketts, M. Daniel, et Ronen Marmorstein. 2017. « A Molecular Prospective for HIRA Complex Assembly and H3.3-Specific Histone Chaperone Function ». *Journal of Molecular Biology* 429 (13): 1924-33. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.010.

Rk, Moyzis, Buckingham Jm, Cram Ls, Dani M, Deaven Ll, Jones Md, Meyne J, Ratliff Rl, et Wu Jr. 1988. « A Highly Conserved Repetitive DNA Sequence, (TTAGGG)n, Present at the Telomeres of Human Chromosomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

America 85 (18). https://doi.org/10.1073/pnas.85.18.6622.

Rochette, Patrick J., et Douglas E. Brash. 2008. « Progressive Apoptosis Resistance Prior to Senescence and Control by the Anti-Apoptotic Protein BCL-xL ». *Mechanisms of Ageing and Development* 129 (4): 207-14. https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.12.007.

Rodier, Francis, Jean-Philippe Coppé, Christopher K. Patil, Wieteke A. M. Hoeijmakers, Denise P. Muñoz, Saba R. Raza, Adam Freund, Eric Campeau, Albert R. Davalos, et Judith Campisi. 2009. « Persistent DNA Damage Signalling Triggers Senescence-Associated Inflammatory Cytokine Secretion ». *Nature Cell Biology* 11 (8): 973-79. https://doi.org/10.1038/ncb1909.

Rodier, Francis, Denise P. Muñoz, Robert Teachenor, Victoria Chu, Oanh Le, Dipa Bhaumik, Jean-Philippe Coppé, et al. 2011. « DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion ». *Journal of Cell Science* 124 (1): 68-81. https://doi.org/10.1242/jcs.071340.

Rogakou, Emmy P., Duane R. Pilch, Ann H. Orr, Vessela S. Ivanova, et William M. Bonner. 1998. « DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139* ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (10): 5858-68. https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858.

Roger, Lauréline, Fanny Tomas, et Véronique Gire. 2021. « Mechanisms and Regulation of Cellular Senescence ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (23): 13173. https://doi.org/10.3390/ijms222313173.

Rongvaux, Anthony, Ruaidhrí Jackson, Christian C. D. Harman, Tuo Li, A. Phillip West, Marcel R. de Zoete, Youtong Wu, et al. 2014. « Apoptotic Caspases Prevent the Induction of Type I Interferons by Mitochondrial DNA ». *Cell* 159 (7): 1563-77. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.037.

Rossiello, Francesca, Utz Herbig, Maria Pia Longhese, Marzia Fumagalli, et Fabrizio d'Adda di Fagagna. 2014. « Irreparable Telomeric DNA Damage and Persistent DDR Signalling as a Shared Causative Mechanism of Cellular Senescence and Ageing ». *Current Opinion in Genetics & Development* 26 (juin):89-95. https://doi.org/10.1016/j.gde.2014.06.009.

Roth, David B. 2014. « V(D)J Recombination: Mechanism, Errors, and Fidelity ». *Microbiology Spectrum* 2 (6): 10.1128/microbiolspec.mdna3-0041-2014. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mdna3-0041-2014.

Roubille, Simon, Tristan Escure, Franceline Juillard, Armelle Corpet, Rémi Néplaz, Olivier Binda, Coline Seurre, et al. 2024. « The HUSH Epigenetic Repressor Complex Silences PML Nuclear Bodies-Associated HSV-1 Quiescent Genomes ». bioRxiv. https://doi.org/10.1101/2024.06.18.599571.

Roy, Rabindra. 2023. « Simultaneous Short- and Long-Patch Base Excision Repair (BER) Assay in Live Mammalian Cells ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2701:3-19. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3373-1_1.

Ruscetti, Marcus, John P. Morris, Riccardo Mezzadra, James Russell, Josef Leibold, Paul B. Romesser, Janelle Simon, et al. 2020. « Senescence-Induced Vascular Remodeling Creates Therapeutic Vulnerabilities in Pancreas Cancer ». *Cell* 181 (2): 424-441.e21.

https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.008.

Sachdeva, Uma M., et Joan M. O'Brien. 2012. « Understanding pRb: Toward the Necessary Development of Targeted Treatments for Retinoblastoma ». *The Journal of Clinical Investigation* 122 (2): 425-34. https://doi.org/10.1172/JCI57114.

Sadasivam, Subhashini, et James A. DeCaprio. 2013. « The DREAM Complex: Master Coordinator of Cell Cycle-Dependent Gene Expression ». *Nature Reviews. Cancer* 13 (8): 585-95. https://doi.org/10.1038/nrc3556.

Safwan-Zaiter, Hasan, Nicole Wagner, et Kay-Dietrich Wagner. 2022. « P16INK4A—More Than a Senescence Marker ». *Life* 12 (9): 1332. https://doi.org/10.3390/life12091332.

Sagiv, A., A. Biran, M. Yon, J. Simon, S. W. Lowe, et V. Krizhanovsky. 2013. « Granule Exocytosis Mediates Immune Surveillance of Senescent Cells ». *Oncogene* 32 (15): 1971-77. https://doi.org/10.1038/onc.2012.206.

Sagiv, Adi, Dominick G. A. Burton, Zhana Moshayev, Ezra Vadai, Felix Wensveen, Shifra Ben-Dor, Ofra Golani, Bojan Polic, et Valery Krizhanovsky. 2016. « NKG2D Ligands Mediate Immunosurveillance of Senescent Cells ». *Aging* 8 (2): 328-44. https://doi.org/10.18632/aging.100897.

Sagiv, Adi, et Valery Krizhanovsky. 2013. « Immunosurveillance of Senescent Cells: The Bright Side of the Senescence Program ». *Biogerontology* 14 (6): 617-28. https://doi.org/10.1007/s10522-013-9473-0.

Saitoh, H., et J. Hinchey. 2000. « Functional Heterogeneity of Small Ubiquitin-Related Protein Modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3 ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (9): 6252-58. https://doi.org/10.1074/jbc.275.9.6252.

Saleh, Tareq, Liliya Tyutyunyk-Massey, Graeme F. Murray, Moureq R. Alotaibi, Ajinkya S. Kawale, Zeinab Elsayed, Scott C. Henderson, et al. 2019. « Tumor Cell Escape from Therapy-Induced Senescence ». *Biochemical Pharmacology* 162 (avril):202-12. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.12.013.

Samwer, Matthias, Maximilian W. G. Schneider, Rudolf Hoefler, Philipp S. Schmalhorst, Julian G. Jude, Johannes Zuber, et Daniel W. Gerlich. 2017. « DNA Cross-Bridging Shapes a Single Nucleus from a Set of Mitotic Chromosomes ». *Cell* 170 (5): 956-972.e23. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.038.

Sancar, Aziz. 2016. « Mechanisms of DNA Repair by Photolyase and Excision Nuclease (Nobel Lecture) ». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 55 (30): 8502-27. https://doi.org/10.1002/anie.201601524.

Santiago, Aleixo, Adam C. Godsey, Jamil Hossain, Lisa Y. Zhao, et Daiqing Liao. 2009. « Identification of Two Independent SUMO-Interacting Motifs in Daxx: Evolutionary Conservation from Drosophila to Humans and Their Biochemical Functions ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (1): 76-87. https://doi.org/10.4161/cc.8.1.7493.

Sarthy, Jay, Nancy S. Bae, Jonathan Scrafford, et Peter Baumann. 2009. « Human RAP1 Inhibits Non-Homologous End Joining at Telomeres ». *The EMBO Journal* 28 (21): 3390-99. https://doi.org/10.1038/emboj.2009.275.

Sartori, Alessandro A., Claudia Lukas, Julia Coates, Martin Mistrik, Shuang Fu, Jiri Bartek, Richard Baer, Jiri Lukas, et Stephen P. Jackson. 2007. « Human CtIP Promotes DNA End Resection ». *Nature* 450 (7169): 509-14. https://doi.org/10.1038/nature06337.

Sati, Satish, Boyan Bonev, Quentin Szabo, Daniel Jost, Paul Bensadoun, Francois Serra, Vincent Loubiere, et al. 2020. « 4D Genome Rewiring during Oncogene-Induced and Replicative Senescence ». *Molecular Cell* 78 (3): 522-538.e9. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.007.

Saurin, A. J., K. L. Borden, M. N. Boddy, et P. S. Freemont. 1996. « Does This Have a Familiar RING? » *Trends in Biochemical Sciences* 21 (6): 208-14.

Savitsky, Kinneret, Anat Bar-Shira, Shlomit Gilad, Galit Rotman, Yael Ziv, Lina Vanagaite, Danilo A. Tagle, et al. 1995. « A Single Ataxia Telangiectasia Gene with a Product Similar to PI-3 Kinase ». *Science* 268 (5218): 1749-53. https://doi.org/10.1126/science.7792600.

Schalch, Thomas, et Florian A. Steiner. 2017. « Structure of Centromere Chromatin: From Nucleosome to Chromosomal Architecture ». *Chromosoma* 126 (4): 443-55. https://doi.org/10.1007/s00412-016-0620-7.

Schimmel, Joost, Karolin Eifler, Jón Otti Sigurðsson, Sabine A.G. Cuijpers, Ivo A. Hendriks, Matty Verlaan-de Vries, Christian D. Kelstrup, et al. 2014. « Uncovering SUMOylation Dynamics during Cell-Cycle Progression Reveals FoxM1 as a Key Mitotic SUMO Target Protein ». *Molecular Cell* 53 (6): 1053-66. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.001.

Sebesta, Marek, Peter Burkovics, Lajos Haracska, et Lumir Krejci. 2011. « Reconstitution of DNA Repair Synthesis in Vitro and the Role of Polymerase and Helicase Activities ». *DNA Repair* 10 (6): 567-76. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2011.03.003.

Seo, Gil Ju, Charlotte Kim, Woo-Jin Shin, Ella H. Sklan, Hyungjin Eoh, et Jae U. Jung. 2018. « TRIM56-Mediated Monoubiquitination of cGAS for Cytosolic DNA Sensing ». *Nature Communications* 9 (1): 613. https://doi.org/10.1038/s41467-018-02936-3.

Seo, Gil Ju, Aerin Yang, Brandon Tan, Sungyoon Kim, Qiming Liang, Younho Choi, Weiming Yuan, Pinghui Feng, Hee-Sung Park, et Jae U. Jung. 2015. « Akt Kinase-Mediated Checkpoint of cGAS DNA Sensing Pathway ». *Cell Reports* 13 (2): 440-49. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.007.

Seoane, Joan, Hong-Van Le, et Joan Massagué. 2002. « Myc Suppression of the P21(Cip1) Cdk Inhibitor Influences the Outcome of the P53 Response to DNA Damage ». *Nature* 419 (6908): 729-34. https://doi.org/10.1038/nature01119.

Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach, et S. W. Lowe. 1997. « Oncogenic Ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of P53 and p16INK4a ». *Cell* 88 (5): 593-602. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81902-9.

Shang, Guijun, Conggang Zhang, Zhijian J. Chen, Xiao-Chen Bai, et Xuewu Zhang. 2019. « Cryo-EM Structures of STING Reveal Its Mechanism of Activation by Cyclic GMP-AMP ». *Nature* 567 (7748): 389-93. https://doi.org/10.1038/s41586-019-0998-5.

Shang, Guijun, Deyu Zhu, Ning Li, Junbing Zhang, Chunyuan Zhu, Defen Lu, Cuilan Liu, et al. 2012. « Crystal Structures of STING Protein Reveal Basis for Recognition of Cyclic Di-GMP ». *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (7): 725-27. https://doi.org/10.1038/nsmb.2332.

Shawi, May, et Chantal Autexier. 2008. « Telomerase, Senescence and Ageing ». *Mechanisms of Ageing and Development* 129 (1-2): 3-10. https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.11.007.

Shen, Z., P. E. Pardington-Purtymun, J. C. Comeaux, R. K. Moyzis, et D. J. Chen. 1996. « UBL1, a Human Ubiquitin-like Protein Associating with Human RAD51/RAD52 Proteins ». *Genomics* 36 (2): 271-79. https://doi.org/10.1006/geno.1996.0462.

Sherr, C. J. 1996. « Cancer Cell Cycles ». *Science (New York, N.Y.)* 274 (5293): 1672-77. https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1672.

Sherr, Charles J., et Frank McCormick. 2002. « The RB and P53 Pathways in Cancer ». *Cancer Cell* 2 (2): 103-12. https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00102-2.

Shi, Chengrui, Xikang Yang, Yanfei Hou, Xue Jin, Lerui Guo, Yi Zhou, Conggang Zhang, et Hang Yin. 2022. « USP15 Promotes cGAS Activation through Deubiquitylation and Liquid Condensation ». *Nucleic Acids Research* 50 (19): 11093-108. https://doi.org/10.1093/nar/gkac823.

Shi, Chengrui, Xikang Yang, Ye Liu, Hongpeng Li, Huiying Chu, Guohui Li, et Hang Yin. 2022. « ZDHHC18 Negatively Regulates cGAS-Mediated Innate Immunity through Palmitoylation ». *The EMBO Journal* 41 (11): e109272. https://doi.org/10.15252/embj.2021109272.

Shieh, Sheau-Yann, Masako Ikeda, Yoichi Taya, et Carol Prives. 1997. « DNA Damage-Induced Phosphorylation of p53 Alleviates Inhibition by MDM2 ». *Cell* 91 (3): 325-34. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80416-X.

Shivaswamy, Sushma, Akshay Bhinge, Yongjun Zhao, Steven Jones, Martin Hirst, et Vishwanath R. Iyer. 2008. « Dynamic Remodeling of Individual Nucleosomes across a Eukaryotic Genome in Response to Transcriptional Perturbation ». *PLoS Biology* 6 (3): e65. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060065.

Sies, Helmut. 2015. « Oxidative Stress: A Concept in Redox Biology and Medicine ». *Redox Biology* 4:180-83. https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002.

Silonov, Sergey A., Eugene Y. Smirnov, Irina M. Kuznetsova, Konstantin K. Turoverov, et Alexander V. Fonin. 2023. « PML Body Biogenesis: A Delicate Balance of Interactions ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (23): 16702. https://doi.org/10.3390/ijms242316702.

Simon, Matthew, Michael Van Meter, Julia Ablaeva, Zhonghe Ke, Raul S. Gonzalez, Taketo Taguchi, Marco De Cecco, et al. 2019. « LINE1 Derepression in Aged Wild-Type and SIRT6-Deficient Mice Drives Inflammation ». *Cell Metabolism* 29 (4): 871-885.e5. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.02.014.

Simpson, R. T. 1978. « Structure of the Chromatosome, a Chromatin Particle Containing 160 Base Pairs of DNA and All the Histones ». *Biochemistry* 17 (25): 5524-31. https://doi.org/10.1021/bi00618a030.

Singleton, B. K., M. I. Torres-Arzayus, S. T. Rottinghaus, G. E. Taccioli, et P. A. Jeggo. 1999. « The C Terminus of Ku80 Activates the DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (5): 3267-77. https://doi.org/10.1128/MCB.19.5.3267.

Slavoff, Sarah A., Jinho Heo, Bogdan A. Budnik, Leslyn A. Hanakahi, et Alan Saghatelian. 2014. « A Human Short Open Reading Frame (sORF)-Encoded Polypeptide That Stimulates DNA End Joining ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (16): 10950-57. https://doi.org/10.1074/jbc.C113.533968.

Smeenk, Leonie, Simon J. van Heeringen, Max Koeppel, Bianca Gilbert, Eva Janssen-Megens, Hendrik G. Stunnenberg, et Marion Lohrum. 2011. « Role of P53 Serine 46 in P53 Target Gene Regulation ». *PloS One* 6 (3): e17574. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017574.

Smider, Vaughn, W. Kimryn Rathmell, Michael R. Lieber, et Gilbert Chu. 1994. « Restoration of X-ray Resistance and V(D)J Recombination in Mutant Cells by Ku cDNA ». *Science* 266 (5183): 288-91. https://doi.org/10.1126/science.7939667.

Smith, S., et B. Stillman. 1989. « Purification and Characterization of CAF-I, a Human Cell Factor Required for Chromatin Assembly during DNA Replication in Vitro ». *Cell* 58 (1): 15-25. https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90398-x.

Snoeck, Hans-Willem. 2013. « Aging of the Hematopoietic System ». *Current Opinion in Hematology* 20 (4): 355-61. https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283623c77.

Sommer, Thomas, et Dieter H. Wolf. 2014. « The Ubiquitin-Proteasome-System ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1843 (1): 1. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.09.009.

Song, Bokai, Todd M. Greco, Krystal K. Lum, Caroline E. Taber, et Ileana M. Cristea. 2020. « The DNA Sensor cGAS Is Decorated by Acetylation and Phosphorylation Modifications in the Context of Immune Signaling ». *Molecular & Cellular Proteomics* 19 (7): 1193-1208. https://doi.org/10.1074/mcp.RA120.001981.

Song, Jia-Xian, Deana Villagomes, Hongchang Zhao, et Min Zhu. 2022. « cGAS in nucleus: The link between immune response and DNA damage repair ». *Frontiers in Immunology* 13 (décembre):1076784. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1076784.

Song, Ze-Min, Heng Lin, Xue-Mei Yi, Wei Guo, Ming-Ming Hu, et Hong-Bing Shu. 2020. « KAT5 Acetylates cGAS to Promote Innate Immune Response to DNA Virus ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (35): 21568-75. https://doi.org/10.1073/pnas.1922330117.

Soto-Gamez, Abel, et Marco Demaria. 2017. « Therapeutic Interventions for Aging: The Case of Cellular Senescence ». *Drug Discovery Today* 22 (5): 786-95. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.01.004.

Sousa-Victor, Pedro, Laura García-Prat, Antonio L. Serrano, Eusebio Perdiguero, et Pura Muñoz-

Cánoves. 2015. « Muscle Stem Cell Aging: Regulation and Rejuvenation ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 26 (6): 287-96. https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.03.006.

Stadler, M., M. K. Chelbi-Alix, M. H. Koken, L. Venturini, C. Lee, A. Saïb, F. Quignon, L. Pelicano, M. C. Guillemin, et C. Schindler. 1995. « Transcriptional Induction of the PML Growth Suppressor Gene by Interferons Is Mediated through an ISRE and a GAS Element ». *Oncogene* 11 (12): 2565-73.

Stambolic, V., D. MacPherson, D. Sas, Y. Lin, B. Snow, Y. Jang, S. Benchimol, et T. W. Mak. 2001. « Regulation of PTEN Transcription by P53 ». *Molecular Cell* 8 (2): 317-25. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00323-9.

Stamidis, Nikolaos, et Jan Jakub Żylicz. 2023. « RNA -mediated Heterochromatin Formation at Repetitive Elements in Mammals ». *The EMBO Journal* 42 (8): e111717. https://doi.org/10.15252/embj.2022111717.

Stanchina, Elisa de, Emmanuelle Querido, Masako Narita, Ramana V. Davuluri, Pier Paolo Pandolfi, Gerardo Ferbeyre, et Scott W. Lowe. 2004. « PML Is a Direct P53 Target That Modulates P53 Effector Functions ». *Molecular Cell* 13 (4): 523-35. https://doi.org/10.1016/s1097-2765(04)00062-0.

Stetson, Daniel B., et Ruslan Medzhitov. 2006. « Recognition of Cytosolic DNA Activates an IRF3-Dependent Innate Immune Response ». *Immunity* 24 (1): 93-103. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.12.003.

Storek, Kelly M., Nina A. Gertsvolf, Maikke B. Ohlson, et Denise M. Monack. 2015. « cGAS and Ifi204 Cooperate to Produce Type I IFNs in Response to Francisella Infection ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 194 (7): 3236-45. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402764.

Storer, Mekayla, Alba Mas, Alexandre Robert-Moreno, Matteo Pecoraro, M. Carmen Ortells, Valeria Di Giacomo, Reut Yosef, et al. 2013. « Senescence Is a Developmental Mechanism That Contributes to Embryonic Growth and Patterning ». *Cell* 155 (5): 1119-30. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.041.

Sugeedha, Jeyapal, Jyoti Gautam, et Shweta Tyagi. 2021. « SET1/MLL Family of Proteins: Functions beyond Histone Methylation ». *Epigenetics* 16 (5): 469-87. https://doi.org/10.1080/15592294.2020.1809873.

Sun, Bo, Karin B. Sundström, Jun Jie Chew, Pradeep Bist, Esther S. Gan, Hwee Cheng Tan, Kenneth C. Goh, Tanu Chawla, Choon Kit Tang, et Eng Eong Ooi. 2017. « Dengue Virus Activates cGAS through the Release of Mitochondrial DNA ». *Scientific Reports* 7 (1): 3594. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03932-1.

Sun, Hong, Yu Huang, Shan Mei, Fengwen Xu, Xiaoman Liu, Fei Zhao, Lijuan Yin, et al. 2021. « A Nuclear Export Signal Is Required for cGAS to Sense Cytosolic DNA ». *Cell Reports* 34 (1): 108586. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108586.

Sun, L., J. Wu, F. Du, X. Chen, et Z. J. Chen. 2013. « Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway ». *Science* 339 (6121): 786-91.

https://doi.org/10.1126/science.1232458.

Sun, Xiaona, Ting Liu, Jun Zhao, Hansong Xia, Jun Xie, Yu Guo, Li Zhong, et al. 2020. « DNA-PK Deficiency Potentiates cGAS-Mediated Antiviral Innate Immunity ». *Nature Communications* 11 (1): 6182. https://doi.org/10.1038/s41467-020-19941-0.

Sun, Yingli, Xiaofeng Jiang, Shujuan Chen, Norvin Fernandes, et Brendan D. Price. 2005. « A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (37): 13182-87. https://doi.org/10.1073/pnas.0504211102.

Syed, Aleem, et John A. Tainer. 2018. « The MRE11–RAD50–NBS1 Complex Conducts the Orchestration of Damage Signaling and Outcomes to Stress in DNA Replication and Repair ». *Annual review of biochemistry* 87 (juin):263-94. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012415.

Symington, Lorraine S. 2014. « End Resection at Double-Strand Breaks: Mechanism and Regulation ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6 (8): a016436. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016436.

Szenker, Emmanuelle, Dominique Ray-Gallet, et Geneviève Almouzni. 2011. « The Double Face of the Histone Variant H3.3 ». *Cell Research* 21 (3): 421-34. https://doi.org/10.1038/cr.2011.14.

Taccioli, G. E., T. M. Gottlieb, T. Blunt, A. Priestley, J. Demengeot, R. Mizuta, A. R. Lehmann, F. W. Alt, S. P. Jackson, et P. A. Jeggo. 1994. « Ku80: Product of the XRCC5 Gene and Its Role in DNA Repair and V(D)J Recombination ». *Science (New York, N.Y.)* 265 (5177): 1442-45. https://doi.org/10.1126/science.8073286.

Tagami, Hideaki, Dominique Ray-Gallet, Geneviève Almouzni, et Yoshihiro Nakatani. 2004. « Histone H3.1 and H3.3 Complexes Mediate Nucleosome Assembly Pathways Dependent or Independent of DNA Synthesis ». *Cell* 116 (1): 51-61. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01064-X.

Takahashi, Akiko, Tze Mun Loo, Ryo Okada, Fumitaka Kamachi, Yoshihiro Watanabe, Masahiro Wakita, Sugiko Watanabe, et al. 2018. « Downregulation of Cytoplasmic DNases Is Implicated in Cytoplasmic DNA Accumulation and SASP in Senescent Cells ». *Nature Communications* 9 (1): 1249. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03555-8.

Takasugi, Masaki. 2018. « Emerging Roles of Extracellular Vesicles in Cellular Senescence and Aging ». *Aging Cell* 17 (2): e12734. https://doi.org/10.1111/acel.12734.

Talluri, Srikanth, et Frederick A. Dick. 2014. « The Retinoblastoma Protein and PML Collaborate to Organize Heterochromatin and Silence E2F-Responsive Genes during Senescence ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 13 (4): 641-51. https://doi.org/10.4161/cc.27527.

Tamura, Tomohiko, Hideyuki Yanai, David Savitsky, et Tadatsugu Taniguchi. 2008. « The IRF Family Transcription Factors in Immunity and Oncogenesis ». *Annual Review of Immunology* 26:535-84. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400.

Tanaka, Yasuo, et Zhijian J. Chen. 2012. « STING Specifies IRF3 Phosphorylation by TBK1 in the

Cytosolic DNA Signaling Pathway ». *Science Signaling* 5 (214): ra20. https://doi.org/10.1126/scisignal.2002521.

Tang, Jun, Shaobo Wu, Hongtu Liu, Rachael Stratt, Orr G. Barak, Ramin Shiekhattar, David J. Picketts, et Xiaolu Yang. 2004. « A Novel Transcription Regulatory Complex Containing Death Domain-Associated Protein and the ATR-X Syndrome Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (19): 20369-77. https://doi.org/10.1074/jbc.M401321200.

Tantin, D., A. Kansal, et M. Carey. 1997. « Recruitment of the Putative Transcription-Repair Coupling Factor CSB/ERCC6 to RNA Polymerase II Elongation Complexes ». *Molecular and Cellular Biology* 17 (12): 6803-14. https://doi.org/10.1128/MCB.17.12.6803.

Tatham, M. H., E. Jaffray, O. A. Vaughan, J. M. Desterro, C. H. Botting, J. H. Naismith, et R. T. Hay. 2001. « Polymeric Chains of SUMO-2 and SUMO-3 Are Conjugated to Protein Substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9 ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (38): 35368-74. https://doi.org/10.1074/jbc.M104214200.

Tchasovnikarova, Iva A., Richard T. Timms, Nicholas J. Matheson, Kim Wals, Robin Antrobus, Berthold Göttgens, Gordon Dougan, Mark A. Dawson, et Paul J. Lehner. 2015. « GENE SILENCING. Epigenetic Silencing by the HUSH Complex Mediates Position-Effect Variegation in Human Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 348 (6242): 1481-85. https://doi.org/10.1126/science.aaa7227.

Tessier, Sarah, Omar Ferhi, Marie-Claude Geoffroy, Román González-Prieto, Antoine Canat, Samuel Quentin, Marika Pla, et al. 2022. « Exploration of Nuclear Body-Enhanced Sumoylation Reveals That PML Represses 2-Cell Features of Embryonic Stem Cells ». *Nature Communications* 13 (1): 5726. https://doi.org/10.1038/s41467-022-33147-6.

Thé, H. de, C. Chomienne, M. Lanotte, L. Degos, et A. Dejean. 1990. « The t(15;17) Translocation of Acute Promyelocytic Leukaemia Fuses the Retinoic Acid Receptor Alpha Gene to a Novel Transcribed Locus ». *Nature* 347 (6293): 558-61. https://doi.org/10.1038/347558a0.

Thé, Hugues de, Morgane Le Bras, et Valérie Lallemand-Breitenbach. 2012. « The Cell Biology of Disease: Acute Promyelocytic Leukemia, Arsenic, and PML Bodies ». *The Journal of Cell Biology* 198 (1): 11-21. https://doi.org/10.1083/jcb.201112044.

Thomassin, H., L. Ménard, C. Hengartner, J. B. Kirkland, et G. G. Poirier. 1992. « Poly(ADP-Ribosyl)Ation of Chromatin in an in-Vitro Poly(ADP-Ribose)-Turnover System ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1137 (2): 171-81. https://doi.org/10.1016/0167-4889(92)90199-l.

Thompson, Larry H. 2012. « Recognition, Signaling, and Repair of DNA Double-Strand Breaks Produced by Ionizing Radiation in Mammalian Cells: The Molecular Choreography ». *Mutation Research* 751 (2): 158-246. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2012.06.002.

Thorslund, Tina, Anita Ripplinger, Saskia Hoffmann, Thomas Wild, Michael Uckelmann, Bine Villumsen, Takeo Narita, et al. 2015. « Histone H1 Couples Initiation and Amplification of Ubiquitin Signalling after DNA Damage ». *Nature* 527 (7578): 389-93. https://doi.org/10.1038/nature15401.

Tibbetts, Randal S., Kathryn M. Brumbaugh, Josie M. Williams, Jann N. Sarkaria, William A. Cliby,

Sheau-Yann Shieh, Yoichi Taya, Carol Prives, et Robert T. Abraham. 1999. « A Role for ATR in the DNA Damage-Induced Phosphorylation of P53 ». *Genes & Development* 13 (2): 152-57.

Timms, Richard T., Iva A. Tchasovnikarova, Robin Antrobus, Gordon Dougan, et Paul J. Lehner. 2016. « ATF7IP-Mediated Stabilization of the Histone Methyltransferase SETDB1 Is Essential for Heterochromatin Formation by the HUSH Complex ». *Cell Reports* 17 (3): 653-59. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.050.

Timucin, Ahmet Can, Huveyda Basaga, et Ozgur Kutuk. 2019. « Selective Targeting of Antiapoptotic BCL-2 Proteins in Cancer ». *Medicinal Research Reviews* 39 (1): 146-75. https://doi.org/10.1002/med.21516.

Torné, Júlia, Dominique Ray-Gallet, Ekaterina Boyarchuk, Mickaël Garnier, Patricia Le Baccon, Antoine Coulon, Guillermo A. Orsi, et Geneviève Almouzni. 2020. « Two HIRA-Dependent Pathways Mediate H3.3 de Novo Deposition and Recycling during Transcription ». *Nature Structural & Molecular Biology* 27 (11): 1057-68. https://doi.org/10.1038/s41594-020-0492-7.

Tresini, Maria, Daniël O. Warmerdam, Petros Kolovos, Loes Snijder, Mischa G. Vrouwe, Jeroen A. A. Demmers, Wilfred F. J. van IJcken, et al. 2015. « The Core Spliceosome as Target and Effector of Non-Canonical ATM Signalling ». *Nature* 523 (7558): 53-58. https://doi.org/10.1038/nature14512.

Trojer, Patrick, et Danny Reinberg. 2007. « Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? » *Molecular Cell* 28 (1): 1-13. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.011.

Tserel, Liina, Raivo Kolde, Ana Rebane, Kai Kisand, Tõnis Org, Hedi Peterson, Jaak Vilo, et Pärt Peterson. 2010. « Genome-Wide Promoter Analysis of Histone Modifications in Human Monocyte-Derived Antigen Presenting Cells ». *BMC Genomics* 11 (novembre):642. https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-642.

Tsuchida, Tetsuo, Jian Zou, Tatsuya Saitoh, Himanshu Kumar, Takayuki Abe, Yoshiharu Matsuura, Taro Kawai, et Shizuo Akira. 2010. « The Ubiquitin Ligase TRIM56 Regulates Innate Immune Responses to Intracellular Double-Stranded DNA ». *Immunity* 33 (5): 765-76. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.013.

Tyagi, Monica, Nasir Imam, Kirtika Verma, et Ashok K. Patel. 2016. « Chromatin Remodelers: We Are the Drivers!! » *Nucleus (Austin, Tex.)* 7 (4): 388-404. https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1211217.

Usluer, Sinem, Markus Galhuber, Yukti Khanna, Benjamin Bourgeois, Emil Spreitzer, Helene Michenthaler, Andreas Prokesch, et Tobias Madl. 2024. « Disordered Regions Mediate the Interaction of P53 and MRE11 ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1871 (2): 119654. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2023.119654.

Uziel, Tamar, Yaniv Lerenthal, Lilach Moyal, Yair Andegeko, Leonid Mittelman, et Yosef Shiloh. 2003. « Requirement of the MRN Complex for ATM Activation by DNA Damage ». *The EMBO Journal* 22 (20): 5612-21. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg541.

Valerio, Hellen Paula, Felipe Gustavo Ravagnani, Graziella Eliza Ronsein, et Paolo Di Mascio. 2021. « A Single Dose of Ultraviolet-A Induces Proteome Remodeling and Senescence in Primary

Human Keratinocytes ». *Scientific Reports* 11 (1): 23355. https://doi.org/10.1038/s41598-021-02658-5.

Vancurova, Marketa, Hana Hanzlikova, Lucie Knoblochova, Jan Kosla, Dusana Majera, Martin Mistrik, Kamila Burdova, Zdenek Hodny, et Jiri Bartek. 2019. « PML Nuclear Bodies Are Recruited to Persistent DNA Damage Lesions in an RNF168-53BP1 Dependent Manner and Contribute to DNA Repair ». *DNA Repair* 78 (juin):114-27. https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.04.001.

Vargas, Jose Norberto S., Maho Hamasaki, Tsuyoshi Kawabata, Richard J. Youle, et Tamotsu Yoshimori. 2023. « The Mechanisms and Roles of Selective Autophagy in Mammals ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 24 (3): 167-85. https://doi.org/10.1038/s41580-022-00542-2.

Vélez-Cruz, Renier, Swarnalatha Manickavinayaham, Anup K. Biswas, Regina Weaks Clary, Tolkappiyan Premkumar, Francesca Cole, et David G. Johnson. 2016. « RB Localizes to DNA Double-Strand Breaks and Promotes DNA End Resection and Homologous Recombination through the Recruitment of BRG1 ». *Genes & Development* 30 (22): 2500-2512. https://doi.org/10.1101/gad.288282.116.

Venkatesh, Swaminathan, et Jerry L. Workman. 2015. « Histone Exchange, Chromatin Structure and the Regulation of Transcription ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16 (3): 178-89. https://doi.org/10.1038/nrm3941.

Viale, Andrea, Francesca De Franco, Annette Orleth, Valeria Cambiaghi, Virginia Giuliani, Daniela Bossi, Chiara Ronchini, et al. 2009. « Cell-Cycle Restriction Limits DNA Damage and Maintains Self-Renewal of Leukaemia Stem Cells ». *Nature* 457 (7225): 51-56. https://doi.org/10.1038/nature07618.

Vicente, Rita, Anne-Laure Mausset-Bonnefont, Christian Jorgensen, Pascale Louis-Plence, et Jean-Marc Brondello. 2016. « Cellular Senescence Impact on Immune Cell Fate and Function ». *Aging Cell* 15 (3): 400-406. https://doi.org/10.1111/acel.12455.

Villeponteau, B. 1997. « The Heterochromatin Loss Model of Aging ». *Experimental Gerontology* 32 (4-5): 383-94. https://doi.org/10.1016/s0531-5565(96)00155-6.

Volkman, Hannah E, Stephanie Cambier, Elizabeth E Gray, et Daniel B Stetson. 2019. « Tight Nuclear Tethering of cGAS Is Essential for Preventing Autoreactivity ». *eLife* 8 (décembre):e47491. https://doi.org/10.7554/eLife.47491.

Vousden, Karen H., et Carol Prives. 2009. « Blinded by the Light: The Growing Complexity of P53 ». *Cell* 137 (3): 413-31. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.037.

Vyas, R., R. Kumar, F. Clermont, A. Helfricht, P. Kalev, P. Sotiropoulou, I. A. Hendriks, et al. 2013. « RNF4 Is Required for DNA Double-Strand Break Repair in Vivo ». *Cell Death and Differentiation* 20 (3): 490-502. https://doi.org/10.1038/cdd.2012.145.

Wakasugi, M., et A. Sancar. 1998. « Assembly, Subunit Composition, and Footprint of Human DNA Repair Excision Nuclease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (12): 6669-74. https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6669.

Walford, R. L. 1964. « THE IMMUNOLOGIC THEORY OF AGING ». *The Gerontologist* 4 (décembre):195-97. https://doi.org/10.1093/geront/4.4.195.

Walker, A.i., T. Hunt, R.j. Jackson, et C.w. Anderson. 1985. « Double-stranded DNA induces the phosphorylation of several proteins including the 90 000 mol. wt. heat-shock protein in animal cell extracts. » *The EMBO Journal* 4 (1): 139-45. https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1985.tb02328.x.

Walker, J. R., R. A. Corpina, et J. Goldberg. 2001. « Structure of the Ku Heterodimer Bound to DNA and Its Implications for Double-Strand Break Repair ». *Nature* 412 (6847): 607-14. https://doi.org/10.1038/35088000.

Wan, Li, Szymon Juszkiewicz, Daniel Blears, Prashanth Kumar Bajpe, Zhong Han, Peter Faull, Richard Mitter, et al. 2021. « Translation Stress and Collided Ribosomes Are Co-Activators of cGAS ». *Molecular Cell* 81 (13): 2808-2822.e10. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.05.018.

Wang, C. Q., K. B. Udupa, H. Xiao, et D. A. Lipschitz. 1995. « Effect of Age on Marrow Macrophage Number and Function ». *Aging (Milan, Italy)* 7 (5): 379-84. https://doi.org/10.1007/BF03324349.

Wang, Chenguang, Yukun Guan, Mengze Lv, Rui Zhang, Zhaoying Guo, Xiaoming Wei, Xiaoxia Du, et al. 2018. « Manganese Increases the Sensitivity of the cGAS-STING Pathway for Double-Stranded DNA and Is Required for the Host Defense against DNA Viruses ». *Immunity* 48 (4): 675-687.e7. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.03.017.

Wang, Fei, Mengmeng Zhao, Boran Chang, Yilong Zhou, Xiangyang Wu, Mingtong Ma, Siyu Liu, et al. 2022. « Cytoplasmic PARP1 Links the Genome Instability to the Inhibition of Antiviral Immunity through PARylating cGAS ». *Molecular Cell* 82 (11): 2032-2049.e7. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.03.034.

Wang, Hengbin, Liangjun Wang, Hediye Erdjument-Bromage, Miguel Vidal, Paul Tempst, Richard S. Jones, et Yi Zhang. 2004. « Role of Histone H2A Ubiquitination in Polycomb Silencing ». *Nature* 431 (7010): 873-78. https://doi.org/10.1038/nature02985.

Wang, James C. 2002. « Cellular Roles of DNA Topoisomerases: A Molecular Perspective ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3 (6): 430-40. https://doi.org/10.1038/nrm831.

Wang, Julie, Anna K. Uryga, Johannes Reinhold, Nichola Figg, Lauren Baker, Alison Finigan, Kelly Gray, Sheetal Kumar, Murray Clarke, et Martin Bennett. 2015. « Vascular Smooth Muscle Cell Senescence Promotes Atherosclerosis and Features of Plaque Vulnerability ». *Circulation* 132 (20): 1909-19. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016457.

Wang, Pengran, Shirine Benhenda, Haiyan Wu, Valérie Lallemand-Breitenbach, Tao Zhen, Florence Jollivet, Laurent Peres, et al. 2018. « RING Tetramerization Is Required for Nuclear Body Biogenesis and PML Sumoylation ». *Nature Communications* 9 (1): 1277. https://doi.org/10.1038/s41467-018-03498-0.

Wang, Qiang, Liyuan Huang, Ze Hong, Zhongshi Lv, Zhaomin Mao, Yijun Tang, Xiufang Kong, et al. 2017. « The E3 Ubiquitin Ligase RNF185 Facilitates the cGAS-Mediated Innate Immune Response ». *PLoS Pathogens* 13 (3): e1006264. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006264.

Wang, Qinhong, Michael Goldstein, Peter Alexander, Timothy P Wakeman, Tao Sun, Junjie Feng, Zhenkun Lou, Michael B Kastan, et Xiao-Fan Wang. 2014. « Rad17 recruits the MRE11-RAD50-NBS1 complex to regulate the cellular response to DNA double-strand breaks ». *The EMBO Journal* 33 (8): 862-77. https://doi.org/10.1002/embj.201386064.

Wang, X. W., A. Tseng, N. A. Ellis, E. A. Spillare, S. P. Linke, A. I. Robles, H. Seker, et al. 2001. « Functional Interaction of P53 and BLM DNA Helicase in Apoptosis ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (35): 32948-55. https://doi.org/10.1074/jbc.M103298200.

Wang, X. W., Q. Zhan, J. D. Coursen, M. A. Khan, H. U. Kontny, L. Yu, M. C. Hollander, P. M. O'Connor, A. J. Fornace, et C. C. Harris. 1999. « GADD45 Induction of a G2/M Cell Cycle Checkpoint ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (7): 3706-11. https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3706.

Wang, Yunan, Chen Dong, Yudian Han, Zhifeng Gu, et Chi Sun. 2022. « Immunosenescence, Aging and Successful Aging ». *Frontiers in Immunology* 13 (août). https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.942796.

Wassermann, Ruth, Muhammet F. Gulen, Claudia Sala, Sonia Garcia Perin, Ye Lou, Jan Rybniker, Jonathan L. Schmid-Burgk, et al. 2015. « *Mycobacterium tuberculosis* Differentially Activates cGAS- and Inflammasome-Dependent Intracellular Immune Responses through ESX-1 ». *Cell Host & Microbe* 17 (6): 799-810. https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.05.003.

Watson, Robert O., Samantha L. Bell, Donna A. MacDuff, Jacqueline M. Kimmey, Elie J. Diner, Joanna Olivas, Russell E. Vance, Christina L. Stallings, Herbert W. Virgin, et Jeffery S. Cox. 2015. « The Cytosolic Sensor cGAS Detects Mycobacterium Tuberculosis DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy ». *Cell Host & Microbe* 17 (6): 811-19. https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.05.004.

Weinberg, R. A. 1995. « The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control ». *Cell* 81 (3): 323-30. https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90385-2.

West, A. Phillip, William Khoury-Hanold, Matthew Staron, Michal C. Tal, Cristiana M. Pineda, Sabine M. Lang, Megan Bestwick, et al. 2015. « Mitochondrial DNA Stress Primes the Antiviral Innate Immune Response ». *Nature* 520 (7548): 553-57. https://doi.org/10.1038/nature14156.

White, Michael J., Kate McArthur, Donald Metcalf, Rachael M. Lane, John C. Cambier, Marco J. Herold, Mark F. van Delft, et al. 2014. « Apoptotic Caspases Suppress mtDNA-Induced STING-Mediated Type I IFN Production ». *Cell* 159 (7): 1549-62. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.036.

Whitehouse, C. J., R. M. Taylor, A. Thistlethwaite, H. Zhang, F. Karimi-Busheri, D. D. Lasko, M. Weinfeld, et K. W. Caldecott. 2001. « XRCC1 Stimulates Human Polynucleotide Kinase Activity at Damaged DNA Termini and Accelerates DNA Single-Strand Break Repair ». *Cell* 104 (1): 107-17. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00195-7.

Wijgerde, M., F. Grosveld, et P. Fraser. 1995. « Transcription Complex Stability and Chromatin Dynamics in Vivo ». *Nature* 377 (6546): 209-13. https://doi.org/10.1038/377209a0.

Wilkinson, Kevin A., et Jeremy M. Henley. 2010. « Mechanisms, Regulation and Consequences of

Protein SUMOylation ». *The Biochemical Journal* 428 (2): 133-45. https://doi.org/10.1042/BJ20100158.

Wilson, Van G. 2017. « Introduction to Sumoylation ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 963:1-12. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50044-7_1.

Wong, Xianrong, Ashley J. Melendez-Perez, et Karen L. Reddy. 2022. « The Nuclear Lamina ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 14 (2): a040113. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040113.

Wright, Joshua D., Peter D. Mace, et Catherine L. Day. 2016. « Secondary Ubiquitin-RING Docking Enhances Arkadia and Ark2C E3 Ligase Activity ». *Nature Structural & Molecular Biology* 23 (1): 45-52. https://doi.org/10.1038/nsmb.3142.

Wright, William Douglass, Shanaya Shital Shah, et Wolf-Dietrich Heyer. 2018. « Homologous Recombination and the Repair of DNA Double-Strand Breaks ». *Journal of Biological Chemistry* 293 (27): 10524-35. https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.000372.

Wu, Jiaxi, Lijun Sun, Xiang Chen, Fenghe Du, Heping Shi, Chuo Chen, et Zhijian J. Chen. 2013. « Cyclic GMP-AMP Is an Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA ». *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121): 826-30. https://doi.org/10.1126/science.1229963.

Wu, Xiaomei, Fei-Hua Wu, Xiaoqiang Wang, Lilin Wang, James N. Siedow, Weiguo Zhang, et Zhen-Ming Pei. 2014. « Molecular evolutionary and structural analysis of the cytosolic DNA sensor cGAS and STING ». *Nucleic Acids Research* 42 (13): 8243-57. https://doi.org/10.1093/nar/gku569.

Wu, Yakun, Kun Song, Wenzhuo Hao, Jack Li, Lingyan Wang, et Shitao Li. 2022. « Nuclear Soluble cGAS Senses Double-Stranded DNA Virus Infection ». *Communications Biology* 5 (1): 433. https://doi.org/10.1038/s42003-022-03400-1.

Xia, Pengyan, Buqing Ye, Shuo Wang, Xiaoxiao Zhu, Ying Du, Zhen Xiong, Yong Tian, et Zusen Fan. 2016. « Glutamylation of the DNA Sensor cGAS Regulates Its Binding and Synthase Activity in Antiviral Immunity ». *Nature Immunology* 17 (4): 369-78. https://doi.org/10.1038/ni.3356.

Xiao, Yanxuan, Jingyi Li, Xiaoyu Liao, Yumin He, Tao He, Cuiping Yang, Lu Jiang, et al. 2022. « RIOX1-Demethylated cGAS Regulates Ionizing Radiation-Elicited DNA Repair ». *Bone Research* 10 (1): 19. https://doi.org/10.1038/s41413-022-00194-0.

Xie, Wei, Lodoe Lama, Carolina Adura, Daisuke Tomita, J. Fraser Glickman, Thomas Tuschl, et Dinshaw J. Patel. 2019. « Human cGAS Catalytic Domain Has an Additional DNA-Binding Interface That Enhances Enzymatic Activity and Liquid-Phase Condensation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (24): 11946-55. https://doi.org/10.1073/pnas.1905013116.

Xirodimas, Dimitris P., Mark K. Saville, Jean-Christophe Bourdon, Ronald T. Hay, et David P. Lane. 2004. « Mdm2-Mediated NEDD8 Conjugation of P53 Inhibits Its Transcriptional Activity ». *Cell* 118 (1): 83-97. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.016.

Xu, Guangjun, Chong Liu, Sheng Zhou, Quanjin Li, Yun Feng, Panpan Sun, Han Feng, et al. 2021.

« Viral Tegument Proteins Restrict cGAS-DNA Phase Separation to Mediate Immune Evasion ». *Molecular Cell* 81 (13): 2823-2837.e9. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.05.002.

Xu, Meng Michelle, Yang Pu, Dali Han, Yaoyao Shi, Xuezhi Cao, Hua Liang, Xiang Chen, et al. 2017. « Dendritic Cells but Not Macrophages Sense Tumor Mitochondrial DNA for Cross-Priming through Signal Regulatory Protein α Signaling ». *Immunity* 47 (2): 363-373.e5. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.07.016.

Xu, Ming, Tamar Pirtskhalava, Joshua N. Farr, Bettina M. Weigand, Allyson K. Palmer, Megan M. Weivoda, Christina L. Inman, et al. 2018. « Senolytics Improve Physical Function and Increase Lifespan in Old Age ». *Nature Medicine* 24 (8): 1246-56. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0092-9.

Xu, Pengbiao, Ying Liu, Chong Liu, Baptiste Guey, Lingyun Li, Pauline Melenec, Jonathan Ricci, et Andrea Ablasser. 2024. « The CRL5-SPSB3 Ubiquitin Ligase Targets Nuclear cGAS for Degradation ». *Nature* 627 (8005): 873-79. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07112-w.

Xu, Xiuhua, J. Julie Kim, Yinuo Li, Jia Xie, Changshun Shao, et Jian-Jun Wei. 2018. « Oxidative Stress-Induced miRNAs Modulate AKT Signaling and Promote Cellular Senescence in Uterine Leiomyoma ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 96 (10): 1095-1106. https://doi.org/10.1007/s00109-018-1682-1.

Xu, Zhi-Xiang, Anna Timanova-Atanasova, Rui-Xun Zhao, et Kun-Sang Chang. 2003. « PML Colocalizes with and Stabilizes the DNA Damage Response Protein TopBP1 ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (12): 4247-56. https://doi.org/10.1128/MCB.23.12.4247-4256.2003.

Xue, Yutong, Richard Gibbons, Zhijiang Yan, Dafeng Yang, Tarra L. McDowell, Salvatore Sechi, Jun Qin, Sharleen Zhou, Doug Higgs, et Weidong Wang. 2003. « The ATRX Syndrome Protein Forms a Chromatin-Remodeling Complex with Daxx and Localizes in Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (19): 10635-40. https://doi.org/10.1073/pnas.1937626100.

Yang, Hui, Hanze Wang, Junyao Ren, Qi Chen, et Zhijian J. Chen. 2017. « cGAS Is Essential for Cellular Senescence ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (23): E4612-20. https://doi.org/10.1073/pnas.1705499114.

Yang, Jing, Aiwen Jin, Jing Han, Xin Chen, Junnian Zheng, et Yanping Zhang. 2021. « MDMX Recruits UbcH5c to Facilitate MDM2 E3 Ligase Activity and Subsequent P53 Degradation In Vivo ». *Cancer Research* 81 (4): 898-909. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0790.

Yang, Xikang, Chengrui Shi, Hongpeng Li, Siqi Shen, Chaofei Su, et Hang Yin. 2022. « MARCH8 Attenuates cGAS-Mediated Innate Immune Responses through Ubiquitylation ». *Science Signaling* 15 (732): eabk3067. https://doi.org/10.1126/scisignal.abk3067.

Yau, Tak-Yu, William Sander, Christian Eidson, et Albert J. Courey. 2021. « SUMO Interacting Motifs: Structure and Function ». *Cells* 10 (11): 2825. https://doi.org/10.3390/cells10112825.

Ye, Xiaofen, Brad Zerlanko, Alyssa Kennedy, Gowrishankar Banumathy, Rugang Zhang, et Peter D. Adams. 2007. « Downregulation of Wnt Signaling Is a Trigger for Formation of Facultative

Heterochromatin and Onset of Cell Senescence in Primary Human Cells ». *Molecular Cell* 27 (2): 183-96. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.034.

Ye, Xiaofen, Brad Zerlanko, Rugang Zhang, Neeta Somaiah, Marc Lipinski, Paolo Salomoni, et Peter D. Adams. 2007. « Definition of pRB- and p53-Dependent and -Independent Steps in HIRA/ASF1a-Mediated Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (7): 2452-65. https://doi.org/10.1128/MCB.01592-06.

Yeung, Percy Luk, Natalia G. Denissova, Cara Nasello, Zhanna Hakhverdyan, J. Don Chen, et Mark A. Brenneman. 2012. « Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies Support a Late Step in DNA Double-Strand Break Repair by Homologous Recombination ». *Journal of Cellular Biochemistry* 113 (5): 1787-99. https://doi.org/10.1002/jcb.24050.

Yin, Qian, Yuan Tian, Venkataraman Kabaleeswaran, Xiaomo Jiang, Daqi Tu, Michael J. Eck, Zhijian J. Chen, et Hao Wu. 2012. « Cyclic Di-GMP Sensing via the Innate Immune Signaling Protein STING ». *Molecular Cell* 46 (6): 735-45. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.029.

Yin, Yili, Anne Seifert, Joy Shijia Chua, Jean-François Maure, Filip Golebiowski, et Ronald T. Hay. 2012. « SUMO-Targeted Ubiquitin E3 Ligase RNF4 Is Required for the Response of Human Cells to DNA Damage ». *Genes & Development* 26 (11): 1196-1208. https://doi.org/10.1101/gad.189274.112.

Yoh, Sunnie M., Monika Schneider, Janna Seifried, Stephen Soonthornvacharin, Rana E. Akleh, Kevin C. Olivieri, Paul D. De Jesus, et al. 2015. « PQBP1 is a Proximal Sensor of the cGAS-dependent Innate Response to HIV-1 ». *Cell* 161 (6): 1293-1305. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.050.

Yosef, Reut, Noam Pilpel, Ronit Tokarsky-Amiel, Anat Biran, Yossi Ovadya, Snir Cohen, Ezra Vadai, et al. 2016. « Directed Elimination of Senescent Cells by Inhibition of BCL-W and BCL-XL ». *Nature Communications* 7 (avril):11190. https://doi.org/10.1038/ncomms11190.

Yousefzadeh, Matt, Chathurika Henpita, Rajesh Vyas, Carolina Soto-Palma, Paul Robbins, et Laura Niedernhofer. 2021. « DNA Damage-How and Why We Age? » *eLife* 10 (janvier):e62852. https://doi.org/10.7554/eLife.62852.

Yousefzadeh, Matthew J., Rafael R. Flores, Yi Zhu, Zoe C. Schmiechen, Robert W. Brooks, Christy E. Trussoni, Yuxiang Cui, et al. 2021. « An Aged Immune System Drives Senescence and Ageing of Solid Organs ». *Nature* 594 (7861): 100-105. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03547-7.

Zahradka, P., et K. Ebisuzaki. 1982. « A Shuttle Mechanism for DNA-Protein Interactions. The Regulation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase ». *European Journal of Biochemistry* 127 (3): 579-85.

Zglinicki, Thomas von, Joanne Petrie, et Thomas B. L. Kirkwood. 2003. « Telomere-Driven Replicative Senescence Is a Stress Response ». *Nature Biotechnology* 21 (3): 229-30. https://doi.org/10.1038/nbt0303-229b.

Zhang, Conggang, Guijun Shang, Xiang Gui, Xuewu Zhang, Xiao-Chen Bai, et Zhijian J. Chen. 2019. « Structural Basis of STING Binding with and Phosphorylation by TBK1 ». *Nature* 567 (7748): 394-98. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1000-2.

Zhang, Qiang, Zhen Tang, Ran An, Liya Ye, et Bo Zhong. 2020. « USP29 Maintains the Stability of cGAS and Promotes Cellular Antiviral Responses and Autoimmunity ». *Cell Research* 30 (10): 914-27. https://doi.org/10.1038/s41422-020-0341-6.

Zhang, Rugang, Maxim V. Poustovoitov, Xiaofen Ye, Hidelita A. Santos, Wei Chen, Sally M. Daganzo, Jan P. Erzberger, et al. 2005. « Formation of MacroH2A-Containing Senescence-Associated Heterochromatin Foci and Senescence Driven by ASF1a and HIRA ». *Developmental Cell* 8 (1): 19-30. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.10.019.

Zhang, Shizhen, Qing Yu, Zhijian Li, Yongchao Zhao, et Yi Sun. 2024. « Protein Neddylation and Its Role in Health and Diseases ». *Signal Transduction and Targeted Therapy* 9 (1): 85. https://doi.org/10.1038/s41392-024-01800-9.

Zhang, Xu, Jiaxi Wu, Fenghe Du, Hui Xu, Lijun Sun, Zhe Chen, Chad A. Brautigam, Xuewu Zhang, et Zhijian J. Chen. 2014. « The Cytosolic DNA Sensor cGAS Forms an Oligomeric Complex with DNA and Undergoes Switch-like Conformational Changes in the Activation Loop ». *Cell Reports* 6 (3): 421-30. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.003.

Zhang, Xuejing, Lulu Han, Jinxiu Hou, Huiyu Yang, Haiyan Xu, Guosheng Li, Qiang Shu, Deyu Zhu, Yi Zheng, et Chengjiang Gao. 2024. « Stress Granule-Localized USP8 Potentiates cGAS-Mediated Type I Interferonopathies through Deubiquitination of DDX3X ». *Cell Reports* 43 (6). https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114248.

Zhang, Xuewu, Xiao-Chen Bai, et Zhijian J. Chen. 2020. « Structures and Mechanisms in the cGAS-STING Innate Immunity Pathway ». *Immunity* 53 (1): 43-53. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.05.013.

Zhang, Yu, Yanyan Gao, Guoping Zhang, Shuyan Huang, Zhixiong Dong, Chenfei Kong, Dongmei Su, et al. 2011. « DNMT3a Plays a Role in Switches between Doxorubicin-Induced Senescence and Apoptosis of Colorectal Cancer Cells ». *International Journal of Cancer* 128 (3): 551-61. https://doi.org/10.1002/ijc.25365.

Zhao, Baoyu, Fenglei Du, Pengbiao Xu, Chang Shu, Banumathi Sankaran, Samantha L. Bell, Mengmeng Liu, et al. 2019. « A Conserved PLPLRT/SD Motif of STING Mediates the Recruitment and Activation of TBK1 ». *Nature* 569 (7758): 718-22. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1228-x.

Zhao, Baoyu, Pengbiao Xu, Chesley M. Rowlett, Tao Jing, Omkar Shinde, Yuanjiu Lei, A. Phillip West, Wenshe Ray Liu, et Pingwei Li. 2020. « The Molecular Basis of Tight Nuclear Tethering and Inactivation of cGAS ». *Nature* 587 (7835): 673-77. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2749-z.

Zhao, H., et H. Piwnica-Worms. 2001. « ATR-Mediated Checkpoint Pathways Regulate Phosphorylation and Activation of Human Chk1 ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (13): 4129-39. https://doi.org/10.1128/MCB.21.13.4129-4139.2001.

Zhao, Mengmeng, Fei Wang, Juehui Wu, Yuanna Cheng, Yajuan Cao, Xiangyang Wu, Mingtong Ma, et al. 2021. « CGAS Is a Micronucleophagy Receptor for the Clearance of Micronuclei ». *Autophagy* 17 (12): 3976-91. https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1899440.

Zhao, Ming, Tian Xia, Jia-Qing Xing, Le-Hua Yin, Xiao-Wei Li, Jie Pan, Jia-Yu Liu, et al. 2022.

« The stress granule protein G3BP1 promotes pre-condensation of cGAS to allow rapid responses to DNA ». *EMBO reports* 23 (1): e53166. https://doi.org/10.15252/embr.202153166.

Zhao, Rongwei, Meng Xu, Anne R. Wondisford, Rachel M. Lackner, Jayme Salsman, Graham Dellaire, David M. Chenoweth, Roderick J. O'Sullivan, Xiaolan Zhao, et Huaiying Zhang. 2024. « SUMO Promotes DNA Repair Protein Collaboration to Support Alterative Telomere Lengthening in the Absence of PML ». *bioRxiv: The Preprint Server for Biology*, février, 2024.02.29.582813. https://doi.org/10.1101/2024.02.29.582813.

Zharkov, Dmitry O., et Arthur P. Grollman. 2005. « The DNA Trackwalkers: Principles of Lesion Search and Recognition by DNA Glycosylases ». *Mutation Research* 577 (1-2): 24-54. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.03.011.

Zhen, Zhengyi, Yu Chen, Haiyan Wang, Huanyin Tang, Haiping Zhang, Haipeng Liu, Ying Jiang, et Zhiyong Mao. 2023. « Nuclear cGAS Restricts L1 Retrotransposition by Promoting TRIM41-Mediated ORF2p Ubiquitination and Degradation ». *Nature Communications* 14 (1): 8217. https://doi.org/10.1038/s41467-023-43001-y.

Zheng, Hongwu, Han You, Xiao Zhen Zhou, Stephen A. Murray, Takafumi Uchida, Gerburg Wulf, Ling Gu, Xiaoren Tang, Kun Ping Lu, et Zhi-Xiong Jim Xiao. 2002. « The Prolyl Isomerase Pin1 Is a Regulator of P53 in Genotoxic Response ». *Nature* 419 (6909): 849-53. https://doi.org/10.1038/nature01116.

Zhong, Bo, Yan Yang, Shu Li, Yan-Yi Wang, Ying Li, Feici Diao, Caoqi Lei, et al. 2008. « The Adaptor Protein MITA Links Virus-Sensing Receptors to IRF3 Transcription Factor Activation ». *Immunity* 29 (4): 538-50. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.003.

Zhong, Li, Ming-Ming Hu, Li-Jun Bian, Ying Liu, Qiang Chen, et Hong-Bing Shu. 2020. « Phosphorylation of cGAS by CDK1 Impairs Self-DNA Sensing in Mitosis ». *Cell Discovery* 6 (1): 1-12. https://doi.org/10.1038/s41421-020-0162-2.

Zhong, S., P. Hu, T. Z. Ye, R. Stan, N. A. Ellis, et P. P. Pandolfi. 1999. « A Role for PML and the Nuclear Body in Genomic Stability ». *Oncogene* 18 (56): 7941-47. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203367.

Zhou, Wen, Aaron T. Whiteley, Carina C. de Oliveira Mann, Benjamin R. Morehouse, Radosław P. Nowak, Eric S. Fischer, Nathanael S. Gray, John J. Mekalanos, et Philip J. Kranzusch. 2018. « Structure of the Human cGAS-DNA Complex Reveals Enhanced Control of Immune Surveillance ». *Cell* 174 (2): 300-311.e11. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.026.

Zhou, Yaxuan, Rinka Nakajima, Mashiro Shirasawa, Mariana Fikriyanti, Lin Zhao, Ritsuko Iwanaga, Andrew P. Bradford, Kenta Kurayoshi, Keigo Araki, et Kiyoshi Ohtani. 2023. « Expanding Roles of the E2F-RB-P53 Pathway in Tumor Suppression ». *Biology* 12 (12): 1511. https://doi.org/10.3390/biology12121511.

Zhu, Haoran, Shaun Blake, Frances K. Kusuma, Richard B. Pearson, Jian Kang, et Keefe T. Chan. 2020. « Oncogene-Induced Senescence: From Biology to Therapy ». *Mechanisms of Ageing and Development* 187 (avril):111229. https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111229.

Zierhut, Christian, Norihiro Yamaguchi, Maria Paredes, Ji-Dung Luo, Thomas Carroll, et Hironori Funabiki. 2019. « The Cytoplasmic DNA Sensor cGAS Promotes Mitotic Cell Death ». *Cell* 178 (2): 302-315.e23. https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.035.

Zou, Lee, et Stephen J. Elledge. 2003. « Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes ». *Science* 300 (5625): 1542-48. https://doi.org/10.1126/science.1083430.