

Université de Montréal

Différenciation des cellules souches et intégrité des télomères

Par Mélanie Criqui

Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae Doctor (Ph. D.)
En biologie moléculaire, option biologie des systèmes

Aout, 2021

© Mélanie Criqui, 2021

Résumé

Le raccourcissement progressif des télomères, en grande partie dû à la réplication incomplète des télomères, est l'une des caractéristiques principales du vieillissement. De façon encore plus frappante, une attrition trop marquée ou rapide des télomères est l'une des causes majeures d'un vieillissement prématuré. Les patients diagnostiqués avec un tel syndrome présentent généralement des mutations délétères dans un gène de maintien de l'homéostasie des télomères. Parmi les symptômes physiologiques, on remarque chez ces patients, des dégénérescences dans les tissus hautement prolifératifs, dus à l'épuisement des cellules souches.

Les cellules souches adultes, spécialisées et présentes dans nos tissus, permettent normalement la régénération des organes grâce à leur potentiel prolifératif et de différenciation. Afin de maintenir leur intégrité génomique, les cellules souches expriment une enzyme, la télomérase, capable de rallonger les extrémités terminales des chromosomes, et ainsi de maintenir intègre les télomères de ces cellules subissant des divisions cellulaires et subsistant dans l'organisme durant la vie de l'individu. En revanche, l'expression de la télomérase s'amenuise au cours du temps, les télomères se raccourcissent et les fonctions des cellules souches sont altérées. Nous étudions ce phénomène en utilisant comme modèle cellulaire, les cellules souches embryonnaires de souris, dont le gène de la télomérase reverse transcriptase a été anéanti génétiquement (mESC *Tert* ^{-/-}). Notamment, ces cellules, qui possèdent des télomères extrêmement courts n'arrivent pas à se différencier correctement. D'une étude précédente, mon laboratoire avait montré que ces cellules ne réussissaient pas à réprimer l'expression des gènes de pluripotence, comme *Pou5F1/Oct4* et *Nanog*, et donc montraient des difficultés à sortir de l'état indifférencié. Au cours de mes recherches, nous avons montré que ce défaut était en fait dû à une altération en profondeur de l'épigénétique de ces cellules.

Après avoir observé une déméthylation globale de l'ADN, nous avons constaté une augmentation de la marque d'histone H3K27me3 à travers le génome. De plus, moduler la présence de H3K27me3 via des petits inhibiteurs du complexe PRC2, ou par une approche génétique, modifie également le potentiel de différenciation des cellules souches. À la suite de cette étude, nous avons voulu en savoir davantage sur le signal liant attrition des télomères et défaut de différenciation. Lorsque les télomères sont très courts, la voie de réparation de l'ADN les reconnaît comme une cassure double-brin. Parmi les acteurs de la réparation de l'ADN, la protéine p53 joue un rôle central puisqu'elle influence le destin cellulaire. Candidat idéal, nous avons cherché à savoir si p53 influençait la différenciation des mESC *Tert*^{-/-} en utilisant une approche génétique. Nous avons été surpris de constater que l'absence de p53 restaurait le potentiel de différenciation des mESC *Tert*^{-/-}. Ainsi et pour la première fois, nous avons montré que le raccourcissement des télomères pouvait avoir un effet très global sur les cellules. Nos recherches permettront de mieux appréhender certaines problématiques, notamment en matière de vieillissement.

Mots clefs : Cellules souches, Épigenétique, PRC2, p53, Vieillissement, Télomères, H3K27me3.

Abstract

The progressive decline of telomere length, mainly due to incomplete DNA replication at telomeres, is one of the main features of aging. Even more strikingly, excessive or rapid telomere attrition is one of the major causes of premature aging. Patients diagnosed with such syndromes have deleterious mutations in genes that maintain telomere homeostasis. For these patients, physiological manifestations include degeneration in highly proliferative tissues due to stem cell exhaustion.

Adult stem cells, present in our tissues, typically allow the regeneration of organs due to their proliferative and differentiation potential. To maintain their replicative potential, stem cells express an enzyme, called telomerase, that is capable of lengthening the terminal ends of chromosomes. The maintenance of telomere length and, consequently favoring genomic stability, is crucial for stem cells that undergo cell division and remain in the organism throughout the individual's life. However, in stem cells, telomerase expression decreases over time, leading to telomere attrition and defects in stem cell functions.

We studied this phenomenon using mouse embryonic stem cells disrupted for telomerase reverse transcriptase (mESC *Tert*^{-/-}) as a model. In particular, these cells, which have extremely short telomeres, are unable to differentiate appropriately. Previously, my colleagues had shown that these cells failed to repress the expression of pluripotency genes, such as *Pou5f1/Oct4* and *Nanog*, and therefore were refractory to differentiation. Here, we uncovered that profound epigenetic alterations influenced mESC *Tert*^{-/-} cell fate. In addition to global DNA demethylation, we found an increase in H3K27me3 throughout the genome.

Furthermore, modulating the levels of H3K27me3 via small inhibitors of the PRC2 complex or by a genetic approach also altered the differentiation potential of stem cells. Following this study, we wanted to learn more about the signals linking telomere attrition and

differentiation failure. When telomeres are very short, the DNA repair pathway recognizes them as a double-strand break. Among the actors in DNA repair, the p53 protein plays a central role in influencing cell fate. As an ideal candidate, we investigated whether p53 influenced the differentiation of *Tert*^{-/-} mESCs using a genetic approach. We were surprised to find that the absence of p53 restored the differentiation potential of *Tert*^{-/-} mESCs.

Thus, for the first time, we have shown that telomere shortening can have a very global effect on stem cells. Our research will allow us to better understand specific problems, particularly in the field of aging.

Keywords : Aging, Epigenetic, PRC2, p53, Stem cells, Telomeres, H3K27me3

Table des matières

Résumé	I
Abstract	III
Table des matières	V
Liste des figures	IX
Listes des figures supplémentaires	X
Liste des abréviations	XI
Remerciement	XIV
Préface	1
Chapitre 1. Introduction	3
1.1. Vieillesse cellulaire – généralités	3
Facteurs environnementaux	4
Facteurs intrinsèques	5
1.2. Perte d'intégrité génomique	7
Dommages à l'ADN	7
Voies de réparations des dommages à l'ADN.....	8
Rôle de p53 dans le destin cellulaire.....	10
Effets néfastes d'une suractivation de la réponse aux dommages à l'ADN.....	12
1.3. Télomères et télomérase	13
Définitions	13
Historique.....	14
Structure des télomères	14
Réplication des télomères et sénescence réplivative.....	18

Raccourcissement des télomères et événements stochastiques	22
Perte d'intégrité des télomères et réponses aux dommages de l'ADN	23
Téломérase et allongement des télomères	26
Mécanismes alternatifs d'allongement des télomères.....	27
Téломères, téломérase et maladies associées	28
1.4. Dérèglements épigénétiques.....	29
Épigénétique : brèves définitions.....	29
Vieillessement, méthylation de l'ADN et horloge d'Horvath	30
Vieillessement et modifications post-traductionnelles des histones	31
Vieillessement et altération des nucléosomes.....	32
Dérégulations épigénétiques causées par le raccourcissement des télomères	33
1.5. Cellules souches et vieillissement.....	35
Les cellules souches, en quoi sont-elles si spéciales ?	35
Maintien de la longueur des télomères pendant l'embryogenèse et à l'âge adulte dans les cellules souches	37
Raccourcissement des télomères, vieillissement et cellules souches	38
Dommage à l'ADN et destin cellulaire	39
Altération de la niche	40
Altérations épigénétiques dans les cellules souches	40
1.6. Les cellules souches embryonnaires murines, un bon modèle	42
Origine et conditions de culture	42
Maintien d'un état indifférencié et facteurs de pluripotence	44
Régulation épigénétique	45
Les complexes Polycomb	46
Les ADN méthyltransférases <i>de novo</i>	47
1.7. Problématique de recherche	48
Résultats préliminaires à l'étude.....	48

Chapitre 2. L'altération de la longueur des télomères perturbe la différenciation des cellules souches à travers des modifications épigénétiques..... 52

2.1. Auteurs, contributions et conflits d'intérêts 52

2.2. Référence de publication..... 53

2.3. Résumé traduit en français 54

2.4. Article..... 54

 Authors and Affiliations 55

 Abstract..... 56

 Introduction 56

 Results 60

 Discussion 77

 Materials and Methods 84

 Acknowledgments..... 105

 Figures supplémentaires du chapitre 2 108

Chapitre 3. Implication du facteur p53 dans l'échec de différenciation observé dans les cellules Tert -/- possédant des télomères courts..... 119

3.1. Auteurs et contributions..... 119

3.2. Références de publications..... 119

3.3. Résumé traduit en français 119

3.4. Article..... 121

 Authors and Affiliations 121

 Abstract..... 121

 Introduction 121

Results and discussion	125
Conclusion	134
Materials and Methods	138
Acknowledgments.....	142
Chapitre 4. Discussion.....	143
4.1. Récapitulatif	143
4.2. Discussion du chapitre 2, altérations épigénétiques	144
4.3. Discussion du chapitre 3, p53 et destin cellulaire	149
4.4. Perspectives.....	153
4.5. Remarques et conclusions.....	155
Bibliographie.....	157

Liste des figures

FIGURE 1-1. FACTEURS INFLUENÇANT LE VIEILLISSEMENT CELLULAIRE.....	6
FIGURE 1-2. BOUCLE TÉLOMÉRIQUE.....	17
FIGURE 1-3. RÉPLICATION DES TÉLOMÈRES.....	20
FIGURE 1-4. LE PROBLÈME DE RÉPLICATION DES EXTRÉMITÉS CHROMOSOMIQUES...	21
FIGURE 1-5. LA PERTE D'INTÉGRITÉ DES TÉLOMÈRES COMPROMET L'INTÉGRITÉ GÉNOMIQUE DES CELLULES.....	25
FIGURE 1-6 . EFFET DE LA POSITION DES TÉLOMÈRES « TPE ».....	35
FIGURE 1-7. EXPRESSION DE LA TÉLOMÉRASE ET ÉLONGATION DES TÉLOMÈRES AU COURS DU DÉVELOPPEMENT ET DANS LES CELLULES SOUCHES. ADAPTÉ DE (OZTURK ET AL., 2014).	38
FIGURE 1-8. DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE ET CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES.....	43
FIGURE 1.1-9. ESSAI DE DIFFERENCIATION	50
FIGURE 2-1 MURINE ESCS WITH SHORT TELOMERES FAIL TO COMPLETE DIFFERENTIATION COMMITMENT AND TO SUPPRESS PLURIPOTENCY GENE EXPRESSION.....	63
FIGURE 2-2. MURINE ESCS WITH SHORT TELOMERES EXHIBIT ALTERED H3K27ME3 LEVELS AND INCOMPLETE DIFFERENTIATION THAT IS EXACERBATED BY PRC2 INHIBITION.....	68
FIGURE 2-3. INHIBITION OF JMJD3/UTX DEMETHYLASE ACTIVITY PARTIALLY RESCUES CELL FATE COMMITMENT.....	72
FIGURE 2-4. TELOMERE DYSFUNCTION AFFECTS THE CHROMATIN ACCESSIBILITY LANDSCAPE DURING MESC DIFFERENTIATION.....	76
FIGURE 2-5. THE UNSTABLE DIFFERENTIATION OF MESC WITH SHORT TELOMERES IS EXACERBATED BY EPIGENETIC REMODELING.....	83
FIGURE 3-1. GENERATION OF <i>TRP53</i> -DISRUPTED <i>TERT</i> WT AND <i>TERT</i> <i>-/-</i> MURINE EMBRYONIC STEM CELLS	128

FIGURE 3-2. THE UNSTABLE DIFFERENTIATION COMMITMENT OF <i>TERT</i> ^{-/-} MESCS IS P53-DEPENDENT	133
FIGURE 3-3. TELOMERE SHORTENING TRIGGERS ACTIVATION OF THE DNA DAMAGE RESPONSE AND PREVENTS MESC DIFFERENTIATION IN A P53-DEPENDENT MANNER	137

Listes des figures supplémentaires

FIGURE 2.1—FIGURE SUPPLEMENT 1.....	113
FIGURE 2.2—FIGURE SUPPLEMENT 1.....	116
FIGURE 2.3—FIGURE SUPPLEMENT 1.....	119
FIGURE 2.4—FIGURE SUPPLEMENT 1.....	122

Liste des abréviations

53BP1 : p53-binding protein
A-NHEJ : Alternative pathways of non-homologous end joining
ADN : Acide désoxyribonucléique
ALT : Alternative lengthening of telomeres
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique
ATM : Ataxia telangiectasia mutated
ATR : Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BER : Base excision repair
ATRA : All trans retinoic acid
ATRX : Alpha thalassemia mental retardation, X-linked
BML : Bloom syndrom protein
BMP : Bone morphogenetic protein
BRCA1 : Breast cancer 1
Caf1 : Chromatin assembly factor I
CDB : cassure double-brin
ChIp : Chromatin Immunoprecipitation
CpG : Cytosine-phosphate-guanine
CST : CTC1, STN1 et TEN1
CTC1 : Telomere Replication Complex Component 1
CtIp : C terminal binding protein 1 (CtBP1) interacting protein
DAXX : Death Domain Associated Protein
DNA PK : DNA-dependent protein kinase
Dnmt3b : DNA methyltransferase 3 b
EROS : Espèce réactive de l'oxygène
ES : « cellule » embryonnaire Souche
EXO1 : Exonucléase 1
Ezh2 : Enhancer of zeste homolog 2
FANCC : Fanconi anemia complementation group C
GFP : Green fluorescent protein
GSK3 : Glycogen synthase kinase 3
H2O2 : peroxyde d'hydrogène

H : Histone
HJR : Holiday junction resolvase
hMSH2 : Human MutS Homolog 2
HP1 : Hétérochromatin protein 1
INSPQ : Institut national de santé publique du Québec
kb : Kilo base
Klf4 : Kruppel-like factor 4
KO : Knock-out
LIF : Leukemia inhibitory factor
LIG IV : Ligase quatre
mdm2 : murine double minute 2
MEK1/2 : Mitogen-activated protein kinase
mESC : Murine Embryonic stem cell
mi-ARN : Micro ARN
MPT : Modification post traductionnelle
MRE11 : Meiotic recombination 11
MRN : Mre11, Rad51, NBS1 complex
MRX : Mre11-Rad50-Xrs2 complex
NBS1 : Nibrin
NER : Nucleotide excision repair
NHEJ : Non-homologous end joining
NurD : Nucleosome Remodeling and Deacetylase
O₂ : Oxygène
Oct4 : octamer-binding transcription factor 4
OH— : hydroxyde
OMS : Organisation mondiale de la santé
p21 : cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p53 ou Tp 53 : tumor protein 53
Phase M : Phase de mitose
Phase S : phase de synthèse
POT1 : Protection Of Telomeres 1
Pou5f1 : POU class 5 Homeobox 1
PRC1: Polycomb repressive complex 1
PRC2 : Polycomb repressive complex 2

RAP1 : repressor activator protein 1
Rev7 : Revertibility protein 7
RIF1: Replication Timing Regulatory Factor 1
SHLD1/2/3 : Shieldin complex subunit 1/2/3
Sir2/3/4 : Sirtuine 2/3/4
Sox2 : SRY-Box Transcription Factor 2)
Suz12 : Suppressor-of-Zeste 12
SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermentable
Terc : Telomerase RNA Component
TERRA : Telomeric Repeat-containing RNA
Tert : Telomerase Reverse Transcriptase
TIN2 : TRF1-interacting nuclear protein 2
TPE : Telomere position effect
TPP1 : TIN2- and POT1-organizing protein
TRD : transcriptional repression domain
TRF1 : telomere repeat-binding factor 1
TRF2 : telomere repeat-binding factor 2
UV : Ultra-violet
WRN : Werner syndrome helicase
XPC : Xeroderma pigmentosum complementation group C

Remerciement

Lorsqu'on me demande comment je décrirais le doctorat, le seul mot qui me vient à l'esprit est un marathon. De longues années, avec des défis, des succès, des joies, des rencontres, des discussions passionnantes...mais aussi des périodes de doutes, de remise en question et d'échec. Mais c'est aussi ça la science. Rien n'est évident, rien n'est acquis et tout est à découvrir. En revanche, c'est un marathon que je n'aurais pas pu accomplir sans l'aide de tout mon entourage.

La première personne que je remercie infiniment est ma directrice de recherche, Lea Harrington qui m'a accompagnée et soutenue sans relâche tout au long de mon parcours. Au travers de nos discussions, j'ai appris à développer mon esprit scientifique, à mener mes projets, et surtout, j'ai appris à développer mon indépendance, ce qui est pour moi l'une des choses les plus importantes que j'ai acquises.

Je remercie également tous mes collègues de laboratoire qui ont partagé avec moi tant de moments, tant de discussion, tant de soirées tardives au laboratoire. Josephine, Yahya, Maria, Gustavo, Danielle. Merci d'avoir été aussi géniaux et merci d'être mes amis en plus d'avoir été mes collègues. Merci aussi au labo Tyers. C'était si facile de monter au 4^e étage vous voir pour avoir vos conseils et votre aide. Mention spéciale à Manon pour son aide avec la logistique qui nous a tellement facilité le quotidien !

Enfin l'IRIC est un centre de recherche collaboratif où j'ai fait tellement de belles rencontres. À mes amis, Nandita, Rébecca, Lara, Jack, Thomas, Eugénie, Deanna, Roger, Audrey H., Audrey C., Margaux, Ben, Camille ... et tous les autres. La liste est longue. Ensemble, nous avons fait tellement de choses. En disant cela, je pense à l'association étudiante, l'organisation de l'évènement « Dans les coulisses de la

recherche », et tous les autres évènements qui se sont organisés.

J'aimerais remercier tout particulièrement l'équipe des affaires académiques. Déjà, car sans eux je ne serais pas là : c'est grâce au recrutement, année 2015, que j'ai connu l'IRIC. Votre dévouement pour les étudiants de l'IRIC est tellement précieux. On est chanceux de vous avoir. Vous vous souciez de nous, de notre avenir et ça fait toute la différence. Tout spécialement, merci à Julie Mantovani pour tout le travail qu'elle fait et son soutien sans faille.

Et bien évidemment, j'aimerais remercier ma famille et mes amis en dehors de l'IRIC qui m'ont soutenu tout au long de mon parcours, qui ont cru en moi. Mes parents, Denise et Jacques qui m'ont toujours soutenue depuis Dijon. Mon amie d'enfance, Philippine. Marine, Lise, mes amis du refuge. Félix, qui a vécu mon quotidien et en particulier l'écriture de ma thèse. Gus, mon gros chat noir et blanc qui me réveille chaque matin sans faute (car il a faim !), et qui ronronne vers moi le soir.

J'aimerais finalement remercier certains professeurs, qui m'ont enseigné au cours de ma licence et de mon master. Vous m'avez fait aimer la science et vous m'avez encouragé à continuer. En particulier, je souhaite mentionner ceux qui m'ont accompagné pendant mon aventure iGEM : Dr Olivier Namy et Dr Sylvie Lautru. J'ai tellement appris de vous ! Et finalement, j'aimerais aussi remercier tous ceux qui n'ont pas cru en moi. Oui, car grâce à vous, j'ai voulu me battre pour vous prouver que vous aviez tort, que j'étais capable.

Merci à tous. Vraiment.

Préface

À l'heure actuelle, le vieillissement des individus et des populations est au cœur de nos préoccupations en raison des enjeux sociaux, économiques et de santé qu'il soulève. Un rapport publié en 2016 par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) indique qu'en 35 ans (entre 2015 et 2050), la proportion mondiale de personnes âgées de 60 ans et plus va doubler (Organisation mondiale de la santé, 2016)¹. En parallèle, l'institut national de santé publique du Québec (INSPQ) stipule qu'en 2031, 1 personne sur 4 sera âgée de 65 ans et plus, et de façon plus frappante encore, 25 % de la population québécoise sera âgée de plus de 85 ans en 2061, en faisant l'une des plus vieilles de l'occident (Denise Aubé and Karine Souffez, 2016).

En vieillissant, les individus souffrent d'une perte d'autonomie qui se caractérise par des changements physiques et psychiques, qui affectent le fonctionnement de la personne. Associée à une augmentation de l'espérance de vie, une population vieillissante a de nombreux impacts économiques, en particulier sur les finances publiques, mais aussi en médecine avec l'apparition d'un grand nombre de pathologies gériatriques (Jaul and Barron, 2017). En d'autres termes, une population vieillissante sera moins active et davantage sujette au développement de maladies.

Le déclin dû à l'âge se manifeste par une augmentation de la fréquence des affections chroniques (Jaul and Barron, 2017), par exemple des maladies cardiovasculaires (North and Sinclair, 2012), une dégénérescence du système immunitaire (Salam et al., 2013), de

¹ <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health> 5 février 2018
Organisation Mondiale de la santé

l'ostéoporose (Katsara et al., 2011; Paspaliaris and Kolios, 2019), ou encore une fonte de la masse musculaire (Larsson et al., 2019). Chez un sujet âgé, la plupart des tissus vont voir leur fonction diminuer au cours du temps, notamment, car ils vont accumuler des dommages et n'auront plus la même capacité à se régénérer que chez un sujet plus jeune.

En dépit de toutes ces observations, une même question demeure : pourquoi vieillissons-nous ?

Pour répondre à cette question fondamentale, il est nécessaire de comprendre que le vieillissement n'est pas simplement le passage du temps, mais un processus biologique complexe qui affecte chaque cellule d'un organisme. Il faut donc s'intéresser au vieillissement cellulaire, aux mécanismes et à leurs conséquences.

Pour ma thèse de doctorat, j'ai décidé de m'attarder sur les mécanismes moléculaires conséquents au vieillissement cellulaire. Plus précisément, mes recherches s'articulent autour de la problématique des cellules souches et du vieillissement dû au raccourcissement de la partie terminale de l'ADN, les télomères.

Chapitre 1. Introduction

1.1. Vieillesse cellulaire – généralités

À l'image d'une maison qui va s'endommager au cours du temps, jusqu'à s'écrouler, l'accumulation d'agressions va perturber l'homéostasie des cellules résultant en une perte de leur fonction. S'en suit alors des dysfonctionnements des organes, de l'organisme en entier, menant ultimement à sa mort.

Pour assurer le fonctionnement adéquat d'une cellule, il est essentiel que celle-ci puisse maintenir intègre son ADN. L'ADN est une molécule complexe, contenant nos gènes et des séquences intergéniques régulatrices. Chez les organismes eucaryotes évolués, l'ADN est linéaire et organisé en chromosomes. De plus, l'ADN est enroulé autour de protéines spécialisées, appelées histones, et le niveau d'enroulement est modulé par des modifications physiques ou chimiques des histones. L'ensemble de ces modifications est résumé par le terme « épigénétique » et permet de modifier l'expression des gènes.

Au cours du temps, des lésions vont s'accumuler sur l'ADN et perturber son intégrité. Par exemple, les cellules peuvent acquérir des mutations, des délétions, des additions au niveau de leur ADN. De façon plus grave, les chromosomes peuvent perdre leur intégrité, et subir des réarrangements, des translocations, des délétions, perturbant gravement le fonctionnement des cellules. De plus, l'épigénétique peut aussi être affectée par le vieillissement ce qui conduit à des modifications de l'expression des gènes et, par conséquent, perturbe les fonctions cellulaires.

Lorsque les dommages sont trop importants, les cellules seront éliminées ou vont entrer

en sénescence, ce qui participe au vieillissement des tissus qui ne seront plus en mesure de remplir leur fonction. En plus du déclin progressif des cellules souches qui ne seront plus en mesure de régénérer les organes, l'accumulation de cellules sénescents qui développent un phénotype sécrétoire provoque de l'inflammation, ce qui accélère le vieillissement et donc la dégénération des organes.

Dans certains cas, une cellule endommagée peut dévier de la trajectoire « mort cellulaire, sénescence » et commencer une transformation maligne. Ainsi, vieillissement et cancer possèdent de nombreux points communs puisque ce sont des mécanismes similaires qui en sont responsables.

Parmi les facteurs endommageant les cellules et donc influençant le vieillissement cellulaire, on compte les facteurs environnementaux, et les facteurs intrinsèques au fonctionnement de la cellule (Figure 1-1 ; p6).

Facteurs environnementaux

En évoluant dans notre environnement, notre corps - et donc nos cellules - est exposé à des éléments physico-chimiques, des micro-organismes comme les virus, qui représentent un danger allant jusqu'à altérer les gènes ou l'expression des gènes. Des études montrent que l'environnement influence la génétique et l'épigénétique, modifiant ainsi le fonctionnement cellulaire (Feil and Fraga, 2012; Huidobro et al., 2013). Les mécanismes par lesquels des facteurs environnementaux modifient le fonctionnement cellulaire sont nombreux, et tous ne sont pas élucidés. Lors de la grossesse, l'exposition de la mère à des perturbateurs endocriniens, tels que le bisphénol A, conduit à une modification de l'expression des gènes, à travers l'épigénétique. Ce phénomène a été

étudié chez les souris : l'exposition au bisphénol A change la couleur des souriceaux, qui ont tendance à être jaune, plutôt que jaune agouti, alors qu'ils ont le même fond génétique (Dolinoy et al., 2007). Autres exemples, les UV, les radiations, ou certains agents cytotoxiques peuvent causer des mutations dans la séquence d'ADN. Chez les personnes adeptes de tabac, il a été montré que l'exposition à la fumée va diminuer l'expression de l'ADN méthyltransférase DNMT3B, et ainsi modifier la méthylation de l'ADN des tissus du poumon, et en particulier de l'oncogène prométastatique Synuclein- γ qui ne sera plus réprimé (Liu et al., 2007a). De plus, un composé des cigarettes, l'hydrocarbure aromatique polycyclique, est métabolisé par les cellules, ce qui génère des sous-produits capables de se lier par liaison covalente à l'ADN (Henkler et al., 2012).

La liste des facteurs environnementaux est longue, mais il est important de retenir que majoritairement, ils vont influencer les fonctions cellulaires par des modifications génétiques, épigénétiques, ou en générant des produits secondaires (Huidobro et al., 2013) et (Figure 1-1; p6) .

Facteurs intrinsèques

Prenons cette fois-ci l'exemple du moteur d'une voiture. Sans prendre en compte les détériorations causées par des facteurs extérieurs – comme les accidents – un moteur va s'user à cause du simple fait qu'il fonctionne. Évidemment, il sera possible de le réparer, mais quand l'usure devient trop importante, la voiture va tout simplement cesser de fonctionner. La même chose se produit dans nos cellules. Le fonctionnement cellulaire est fait de mécanismes imparfaits et l'accumulation de dommages, dus par exemple à la réplication de l'ADN, est inévitable. Dernièrement, López-Otín et ses collègues ont établi une liste des principales caractéristiques du vieillissement : **instabilité génomique**,

raccourcissement des télomères, altérations épigénétiques, perte de protéostasie, dérégulation de la détection des nutriments, perte de fonction des mitochondries, sénescence cellulaire, altération de la communication cellulaire et enfin, **épuisement des cellules souches** (López-Otín et al., 2013) et (Figure 1-1 ; p6).

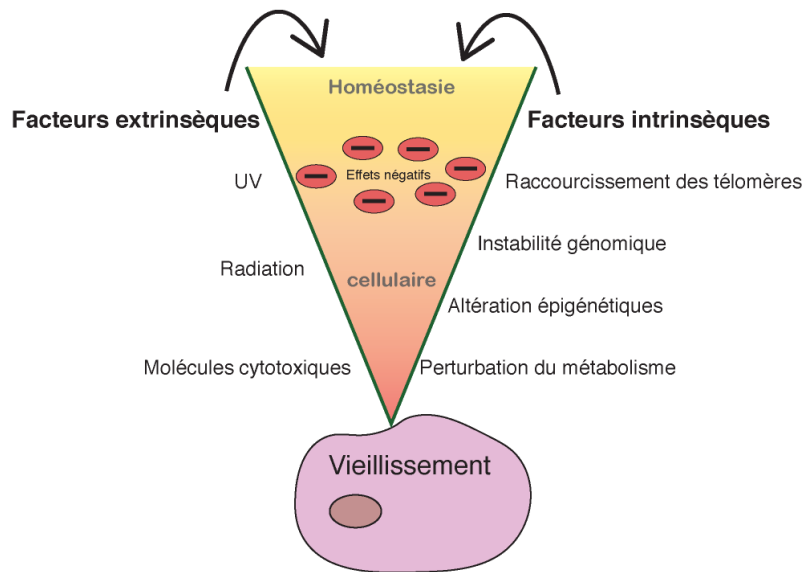


Figure 1-1. Facteurs influençant le vieillissement cellulaire.

En perturbant l'homéostasie cellulaire, les facteurs intrinsèques et extrinsèques conduisent au vieillissement des cellules.

De manière intéressante, on observe que toutes les caractéristiques citées ci-dessus sont en fait interconnectées. Pour mon travail doctorat, je me suis concentrée sur l'effet du raccourcissement des télomères dans les cellules souches. J'ai notamment mis en évidence une connexion entre la longueur des télomères, la réponse aux dommages à l'ADN et un remaniement épigénétique global. Les sections suivantes de cette introduction seront destinées à mieux comprendre les concepts qui entourent mes recherches.

1.2. Perte d'intégrité génomique

Domages à l'ADN

Comme conséquence à l'exposition à l'environnement (radiation, UV, substance chimique extrinsèque) et à une activité métabolique et répllicative soutenue, les cellules accumulent des lésions, parfois irréversibles, notamment lorsqu'elles affectent leur ADN. Les réactions biochimiques, qui constituent le métabolisme cellulaire, génèrent des sous-produits parfois dangereux pour les cellules. Par exemple, les espèces réactives de l'oxygène (EROs), comprenant l'anion super oxyde O_2^- , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyde OH^- ou encore l'oxygène singulet, représentent les sous-produits les plus fréquents, mais aussi les plus réactifs et toxiques pour une cellule. En cas de stress oxydatif, c'est-à-dire quand la présence d'EROS n'est pas compensée par des molécules antioxydantes, il y a réaction chimique entre les dérivés de l'oxygène, et les macromolécules de la cellule (ADN, protéine, lipide, etc.), qui aura une conséquence délétère. En plus des dérivés de l'oxygène, la cellule accumule toutes sortes d'adduits de l'ADN altérant le fonctionnement de la cellule (Forrest et al., 2012; Himmelstein et al., 2009; Weng et al., 2018). De plus, au cours de la réplication, il arrive que la fourche de réplication se bloque, ou que la polymérase introduise des erreurs lors de la duplication de l'ADN.

En une seule journée, dans une seule cellule, il a été estimé que des dizaines de milliers d'événements dommageables pour l'ADN se produisent (De Bont and van Larebeke, 2004; Ou and Schumacher, 2018), soit environ 200 déaminations de cytosines, 3000 méthylations de guanines, 10 000 dépurinations spontanées, entre 10 000 et 100 000 lésions oxydatives, 10 000 cassures simple brin et enfin, entre 10 et 50 lésions double-brin (Madabhusi et al., 2014).

Voies de réparations des dommages à l'ADN

De façon remarquable, les cellules vivantes sont adaptées et possèdent des mécanismes spécialisés capables de détecter et d'activer des cascades de signalisation menant à la réparation de ces lésions. Les Kinases Ataxia telangiectasia mutated (ATM) ou Ataxia telangiectasia mutated related (ATR) sont en amont de la signalisation de dommage à l'ADN et selon l'étape du cycle cellulaire à laquelle la cellule se trouve, le type de cellules et la nature de la lésion, des mécanismes différents seront activés (Maréchal and Zou, 2013).

Pour les lésions affectant seulement une base de l'ADN, c'est la voie « BER » (pour Base Excision Réparation) qui prendra en charge la lésion : détection, élimination et remplacement de la base altérée. Du même ordre, il existe également la voie « NER » (pour Nucléotide Excision Réparation) lorsqu'un nucléotide en entier est altéré ; ou encore une voie détectant les erreurs entre nucléotides appariés du brin sens et anti-sens, mieux connue sous le nom de « mismatch repair », en anglais.

Les lésions les plus toxiques sont sans aucun doute les cassures double-brin (CDB) qui peuvent entraîner une perte du matériel génétique ainsi que de graves anomalies dans l'expression des gènes. C'est d'ailleurs pour cette raison que de nombreuses drogues provoquant des CDB sont utilisées en oncologie afin de réduire ou d'éliminer les masses tumorales (Dunstan et al., 2002).

Quand une CDB survient, la chromatine avoisinante va être modifiée, notamment au travers de l'incorporation et la phosphorylation du variant d'histone γ H2A.X et la kinase ATM va activer un grand nombre d'effecteurs de la voie de réparation aux dommages à l'ADN. Il existe plusieurs voies de réparation des CDB et la prise de décision dépend de

l'étape du cycle cellulaire et des effecteurs présents prenant en charge la lésion.

Lorsqu'une cellule est en division et possède deux copies de chaque chromatide sœur (cellule diploïdes), soit en phase S et G2 et avant le passage en phase M, la recombinaison homologe est utilisée afin de rester fidèle à la séquence d'ADN original. En cas de recombinaison homologe, la lésion va être détectée par le complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1), en coopération avec ATM. La résolution d'une lésion double-brin par recombinaison homologe nécessite la résection des brins afin de créer des extrémités simples brins qui pourront s'apparier avec le brin d'ADN de la chromatide sœur, qui servira de modèle. La protéine BRCA1 est responsable de l'activation de la nucléase CtIP qui avec l'aide du complexe MRN commencera la résection du brin d'ADN. Cette étape est cruciale puisque BRCA1 entre en compétition avec 53BP1 au site de lésion, qui elle, inhibe la résection chromosomique. Ensuite, c'est la nucléase EXO1 qui prendra le relais pour finalement laisser place aux protéines de la famille de RAD51 qui sont impliquées dans l'invasion du simple brin pour former une jonction de Holliday. À la suite de la synthèse d'ADN réparatrice, la jonction de Holliday sera résolue.

En phase G1 du cycle cellulaire, c'est le mécanisme dit « NHEJ » (pour non homologous end joining en anglais soit recombinaison non homologue) qui est utilisé, mais, qui peut causer des pertes d'informations génétiques. Il existe deux voies de réparation non homologue : la réponse NHEJ canonique (C-NHEJ), ou un mécanisme alternatif par microhomologie, moins connu et appelé A-NHEJ. L'initiation d'une réparation par la voie C-NHEJ commence par la détection de la lésion par l'hétérodimère KU70/KU80 en association avec les DNA-Pcs et Artemis. Contrairement à la recombinaison homologue, les extrémités endommagées ne nécessitent qu'un traitement limité, sans résection à long terme, avant d'être ligaturé par le complexe de la ligase 4 (LIGIV).

Lorsque la fréquence et la gravité des dommages ne permettent pas aux mécanismes de

les réparer et de les éliminer entièrement, on observe des erreurs de réparation, provoquant entre autres des mutations, ou de grands réarrangements chromosomiques qui sont extrêmement toxiques pour les cellules. Dans le meilleur des cas, ces anomalies provoqueront la mort cellulaire. Mais dans certain cas, notamment lorsqu'un réarrangement conduit à la formation d'un néo-oncogène, (par fusion, ou en dérégulant l'expression d'un oncogène existant), le risque de transformation maligne est élevé.

Si les dommages sont persistants, comme dans le cas de télomère endommagé (D'Adda Di Fagagna et al., 2003); thème qui sera abordé dans les sections suivantes ; il y a une activation persistante de la réponse aux dommages à l'ADN, révélée par l'accumulation de foyer 53BP1 ou γ H2AX qui décorent le génome (Siddiqui et al., 2015).

Lorsque les dégâts sont trop importants pour maintenir le génome intègre, les cellules sont éliminées du bassin de cellules prolifératif, par la voie apoptotique ou de la sénescence, par l'intermédiaire de la protéine p53. En cas d'échec, c'est-à-dire si la cellule échappe à son abrogation, le risque de transformation en cellule maligne est élevé. En effet, les maladies génétiques impliquant des mutations au niveau des gènes de réparations de l'ADN sont notamment caractérisées par un fort taux de cancers, et un vieillissement prématuré. Par ailleurs, la protéine suppresseur de tumeur p53 est mutée ou inactivée dans plus de 50 % des cancers humain.

Rôle de p53 dans le destin cellulaire

La protéine p53, encodée par le gène *Trp53*, possède un rôle charnière dans la prise de décision en cas de lésion à l'ADN (Ou and Schumacher, 2018). À l'état basal, p53 est présente en faible quantité dans les cellules somatiques et est séquestrée par mdm2 afin de prévenir son activité. MDM2, une E3 ubiquitine ligase, provoque la dégradation par le

protéasome de p53. En cas de dommage à l'ADN ou de stress cellulaire, l'interaction MDM2-p53 va être perturbée par des modifications post-traductionnelles ce qui participe à l'accumulation de p53 et à son homotétramérisation dans le noyau cellulaire. Bien que l'activation de p53 peut-être médiée par plus d'une dizaine de signaux (Levine, 2020), la phosphorylation de la sérine 15 de p53 par ATM/ATR et DNAPk, constitue un signal d'activation fort en cas de dommage à l'ADN. p53, qui est un facteur de transcription, va devenir actif et pourra réguler la transcription d'une pléiotropie de gènes, dont lui-même. p53 est impliqué dans la régulation des voies transcriptionnelles de la réponse aux dommages à l'ADN (XPC, hMSH2, FANCC), de l'arrêt du cycle cellulaire (p21), de la sénescence et de l'apoptose.

Bien qu'étant la protéine la plus étudiée à ce jour, de nombreux mécanismes impliquant p53 restent à élucider. Tout d'abord, p53 est potentiellement impliquée dans la régulation de centaines de gènes, de mi-ARN et d'ARN non codants ; mais déterminer avec précision l'ampleur de ceux-ci est encore en cours. En effet, si p53 se lie préférentiellement à une séquence consensus déterminée (El-Deiry et al., 1992), p53 est capable de se lier à des sites de liaison non canoniques ce qui complique l'établissement des cibles de p53 (Cai et al., 2019). En plus, les expériences de ChIP doivent souvent limiter la recherche de gènes cibles à des séquences de quelques paires de bases en amont ou en aval du site de liaison de p53, ce qui exclut donc les éléments régulés de façon distale par p53 (<10 kb) (Su et al., 2015). Le contexte cellulaire, la nature du stress cellulaire va aussi influencer les fonctions de p53. En effet, p53 possède plus de 300 sites sujets à des modifications post-traductionnelles (MPT) qui peuvent être spécifiques à un type de dommage. Les MPT vont influencer l'activation de p53, sa tétramérisation, son interaction avec d'autres protéines et finalement sa fonction. En effet, une étude a montré que selon sa forme d'oligomérisation (monomérique, dimérique, tétramérique), p53 active

des lots de gènes différents (Fischer et al., 2016). D'autre part et de façon indépendante à son activité de facteur de transcription, p53 peut réguler, via interaction protéine-protéine, d'autres facteurs (Kruse and Gu, 2012).

En somme, p53 est activée dans un contexte de stress (dommage à l'ADN, stress génotoxique), et est responsable de guider la cellule vers un destin cellulaire (arrêt du cycle cellulaire, réparation des dommages à l'ADN, apoptose, sénescence). D'ailleurs, les patients souffrant du syndrome de Li-Fraumeni (mutation de p53) présentent un haut risque de développer des cancers, ce qui témoigne du rôle essentiel de p53 dans le destin cellulaire des cellules endommagées.

Effets néfastes d'une suractivation de la réponse aux dommages à l'ADN

p53 et la réponse aux dommages à l'ADN, peuvent avoir un effet néfaste pour l'organisme si elles réduisent trop la prolifération cellulaire : on observe des dysfonctions tissulaires dues à un manque de régénération et de l'inflammation provoquée par les cellules en sénescence. Par exemple, l'activation constitutive de p53 dans des souris résulte en un vieillissement prématuré (Tyner et al., 2002). De même, l'inhibition de la réponse aux dommages à l'ADN chez des patients atteints du syndrome Hutchinson-Gilford (vieillissement prématuré) améliore la régénérescence de la peau et contribue à prévenir l'accumulation de cellules sénescents (Aguado et al., 2019). De façon surprenante, Stuart M. Chambers et ses collègues ont identifié une diminution de l'expression des gènes associés au maintien de l'intégrité génomique dans les cellules souches hématopoïétiques âgées (Chambers et al., 2007).

Alors que des lésions de l'ADN sont davantage connues pour compromettre l'intégrité génomique, elles entraînent également un remodelage épigénétique afin de permettre

une réparation efficace de la lésion. Afin d'empêcher une transcription active au site, il y a recrutement d'histone déméthylase, déméthylation de la marque de transcription active H3K4me3, au profit de la marque répressive H3K9me3. De plus d'autres changements, comme une éviction des nucléosomes, des altérations des marques de méthylation H3K27, H3K36, H3K79 sont observés — et examinés dans (Gong and Miller, 2019; Siametis et al., 2021) — et participent au phénomène de vieillissement.

1.3. Télomères et télomérase

Définitions

Chez les organismes eucaryotes, l'ADN est linéaire et organisé en plusieurs molécules chromosomiques. À cause de leur nature linéaire, les extrémités des télomères ont une structure semblable à une CDB, mais sont habituellement protégées par des complexes protéiques qui inhibent la réponse à l'ADN. En cas de déprotection des télomères, les extrémités des chromosomes sont considérées comme une CDB, ce qui active la réponse aux dommages à l'ADN. En cas de dommage persistant, la cellule est exposée à une instabilité génomique grave, puisque les télomères peuvent fusionner entre eux et former des chromosomes dicentriques. Pour protéger l'organisme, la cellule est normalement éliminée par sénescence ou apoptose, mais il y a toujours un risque de transformation maligne.

Plusieurs facteurs peuvent conduire à la déprotection des télomères. D'un côté, il peut s'agir d'un phénomène physiologique lié à la division cellulaire qui conduit au raccourcissement progressif des télomères. D'autre part, si des mutations surviennent au niveau de gènes impliqués dans l'homéostasie des télomères, ils peuvent rapidement être déprotégés.

Pour comprendre l'influence des télomères sur le vieillissement cellulaire, il est nécessaire d'étudier les mécanismes qui régissent leur l'homéostasie. Des détails supplémentaires concernant l'homéostasie des télomères et leurs rôles dans le vieillissement cellulaire sont abordés dans les sections suivantes.

Historique

Les premières preuves de la présence d'une structure particulière aux extrémités de l'ADN linéaire des eucaryotes ont été révélées en 1941 par la généticienne Barbara McClintock lors de ses travaux sur les chromosomes dicentriques de maïs (McClintock, 1941) ; et en 1938, par le biologiste Herman Müller qui travaillait alors sur la mouche à fruit (Herman Müller, 1938). Tous deux étaient venus à la conclusion suivante : les extrémités des chromosomes forment une entité différente du reste de l'ADN génomique et auraient un rôle protecteur. Depuis, l'extrémité des chromosomes est désignée par le mot « télomères » provenant du grec, « telos » (fin) et « meros » (partie) (Blackburn et al., 2006).

Structure des télomères

Les télomères sont situés à chaque extrémité chromosomique et forment une structure nucléoprotéique qui protège l'ADN, notamment, d'être reconnu comme une CDB par les mécanismes de réparation de l'ADN.

La longueur des télomères est variable selon les espèces. Chez les humains, elle varie entre 5 et 15 kilobase (kb) alors qu'ils sont beaucoup plus longs chez la souris : entre 40 et 50 kb. Chez les mammifères, l'ADN télomérique est constitué de courtes répétitions en tandem TTAGGG sur le brin 3'5' (brin riche en G, ou « G-rich ») et de la séquence

complémentaire CCCTAA sur le brin opposé. Majoritairement double-brin, l'extrémité des télomères termine en une séquence simple brin portée par le brin 3'5' qui a la capacité de former une boucle, appelée boucle T ou plus communément T-loop en anglais, en s'insérant par complémentarité dans l'ADN télomérique double-brin (Figure 1-2 ; p17). Il y a donc une rupture temporaire de la complémentarité du double-brin au profit de la boucle. Le mésappariement ainsi formé est appelé boucle D, pour « Displacement loop », en anglais (Figure 1-2 ; p17).

Grâce à cette structure en boucle, l'ADN télomérique n'est pas directement reconnu comme une cassure double-brin. Mais surtout, les télomères sont liés par un complexe protéique spécialisé, le « Shelterin » qui a de nombreuses fonctions, dont celle d'inhiber les protéines de la réponse aux dommages à l'ADN (Figure 1-2 ; p17).

Le complexe du Shelterin est composé de 6 protéines, TRF1, TRF2, POT1, TPP1, TIN2 et RAP1 chacune indispensable à la protection des télomères, mais ayant des rôles bien distincts.

TRF1 et TRF2 ont des ressemblances de structures et forment des homodimères. Chaque homodimère se lie à l'ADN télomérique double-brins et est essentiel au maintien de l'intégrité des télomères : la déplétion de TRF1 ou TRF2 entraîne une perte de protection des télomères et des fusions entre extrémités chromosomiques. Individuellement, TRF1 favorise la réplication de l'ADN télomérique en recrutant des hélicases ; et son interaction avec la poly-ADP-ribose polymérase tankyrase 1 favorise l'accès de la télomérase au télomère. Quant à TRF2, elle promeut la protection et la régulation des boucles télomériques et inhibe la voie de réparation homologue aux dommages à l'ADN en collaboration avec RAP1.

POT1 vient se fixer à l'ADN télomérique simple brin et prévient ainsi la liaison des protéines RPA aux télomères. POT1 interagit avec TPP1 avec lequel il forme un

hétérodimère, et ensemble régulent l'activité télomérase. TPP1 augmente l'affinité de POT1 pour l'ADN télomérique d'environ 10 fois. De plus, TPP1 joue un rôle essentiel dans le recrutement, et la processivité de la télomérase (Chu et al., 2015; Kibe et al., 2010). TIN2 n'a pas de domaine de liaison à l'ADN, mais stabilise le complexe du Shelterin en liant TRF1, TRF2 et TPP1. De plus, TIN2 maintient l'intégrité chromosomique, par exemple, en facilitant l'ancrage des télomères dans la matrice nucléaire.

Finalement, RAP1 agirait en complément de TRF2, pour empêcher des recombinaisons homologues et des fusions au niveau des télomères. RAP1 est également connue pour avoir des sites de liaison en dehors des télomères et aurait des rôles extratélomériques, notamment au niveau de la régulation des gènes, qui ne sont pas encore très bien connus (Martínez and Blasco, 2011). La perte de l'une des protéines du complexe du Shelterin affecte significativement l'intégrité des chromosomes. En effet, cette perte de protection des extrémités chromosomiques va entraîner de l'instabilité génomique, allant jusqu'à des fusions télomériques (Sfeir and De Lange, 2012).

En complément du Shelterin, d'autres complexes interagissent avec les extrémités télomériques : le complexe du CST et les Shieldin (Figure 1-2 ; p17). Formé de trois sous-unité, CTC1, STN1 and TEN1, le complexe du CST se lie à l'ADN simple brin des télomères et en coopération avec le complexe du Shelterin, régule la réplication, l'élongation des télomères et prévient l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN. Notamment, le CST interagit avec la primase associée avec l'ADN polymérase α pour favoriser la synthèse du brin C et interagit avec le complexe des Shieldin (SHLD1, SHLD2, SHLD3, REV7) pour inhiber la résection télomérique par des nucléases (Mirman et al., 2019; Setiাপutra and Durocher, 2019). En son absence, on remarque alors que le brin G est simple brin sur une grande longueur (Feng et al., 2017).

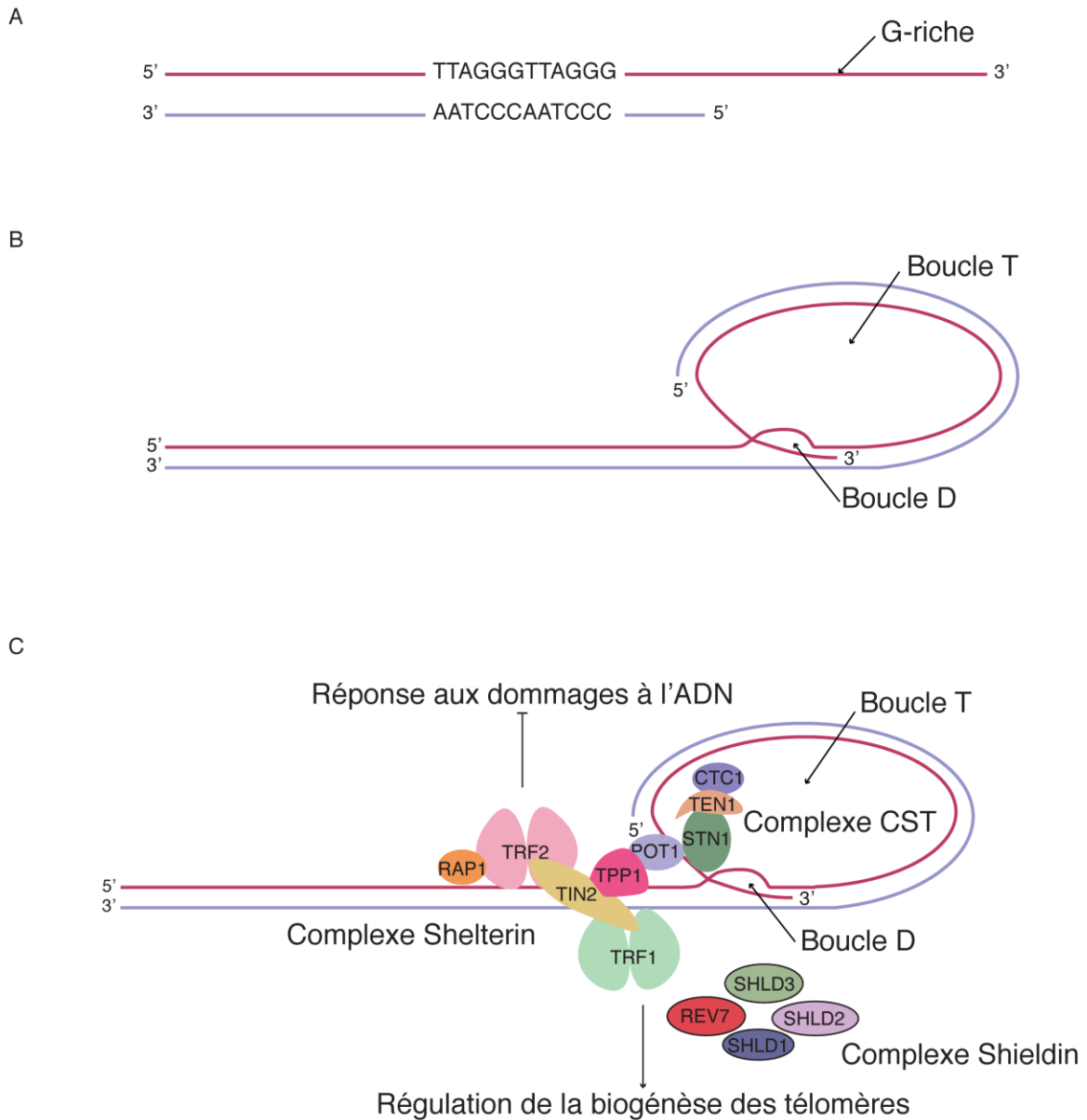


Figure 1-2. Boucle télomérique.

(A) Structure télomérique linéarisée ; (B) Structure télomérique et formation de la boucle T par invasion du brin riche en G au niveau de la zone double-brin (boucle D) ; (C) Boucle télomérique et protéines associées

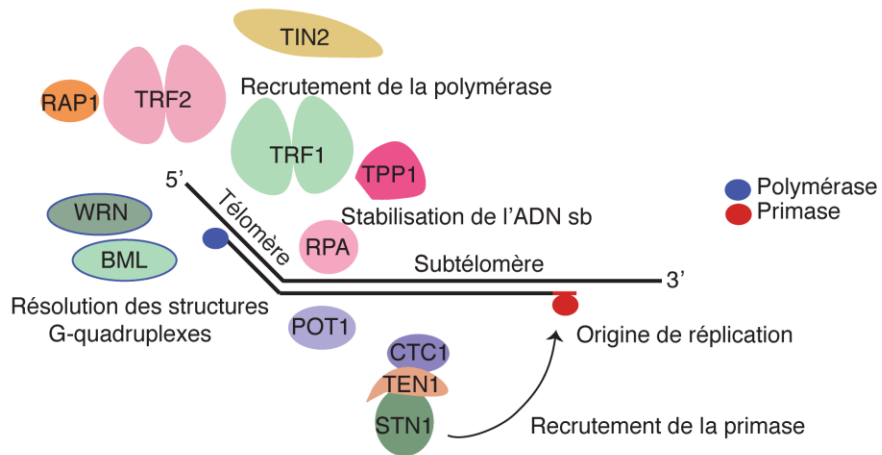
Réplication des télomères et sénescence répllicative

La réplication de l'ADN linéaire, processus inhérent à la division cellulaire, a été démystifiée dans les années 60 par Arthur Kornberg et sa découverte des ADN polymérasés. Les origines de réplication amorçant la réplication des télomères se situent généralement dans la partie subtélomérique des chromosomes. En raison de leur nature répétitive et des structures secondaires (G-quadruplex), la réplication des télomères reste une étape sensible du cycle cellulaire, qui fait appel à de nombreuses protéines en plus du complexe de réplication. En effet, le blocage de la fourche de réplication au niveau des télomères pourrait causer un raccourcissement prématuré des télomères et avoir des conséquences délétères pour la cellule (Liao et al., 2018). Le passage du complexe de réplication fait donc appel à des protéines spécialisées qui grâce à leur action, à la coopération des complexes du Shelterin et du CST, vont permettre le passage de la fourche répllicative. Par exemple, le passage de la fourche de réplication nécessite les hélicases de la famille RECQ, Bloom syndrom protein (BML) et Werner syndrome protein (WRN). En cas de mutations de ces protéines (syndrome de Werner), les individus sont sujets à un vieillissement prématuré et prédisposé à des cancers, en raison de l'instabilité génomique générée par le blocage de la fourche de réplication dans le génome. À cause de leur structure en G-quadruplex, les télomères sont des sites sensibles. Il a été montré que leur réplication est largement altérée lors de mutations dans les hélicases BML et WRN (Barefield and Karlseder, 2012) (Figure 1-3 ; p20).

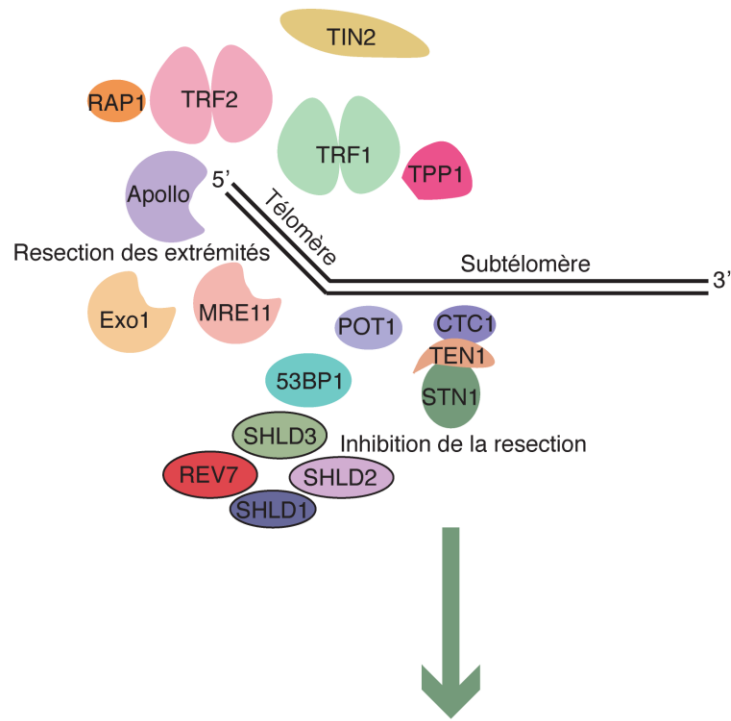
Une fois répliqués, les télomères doivent retrouver leur forme initiale et protectrice et sont donc pris en charge par d'autres complexes enzymatiques. Plusieurs nucléases, dont Apollo, MRE11 et Exo1 vont prendre en charge les extrémités des télomères nouvellement répliqués et en assurer la résection, afin de favoriser la formation de la

boucle T (Figure 1-3 ; p20). Cette étape est encore une fois, très régulée puisqu'un excès de résection pourrait causer la perte prématurée d'un télomère et donc de l'instabilité génomique. Récemment, le rôle de la protéine 53BP1 a été mis en évidence. Normalement impliqué dans la réponse aux dommages à l'ADN, 53BP1 recrute son partenaire REV7 et le complexe des Shieldin afin de moduler la résection télomérique (Setiaputra and Durocher, 2019) (Figure 1-3; p20).

A



B



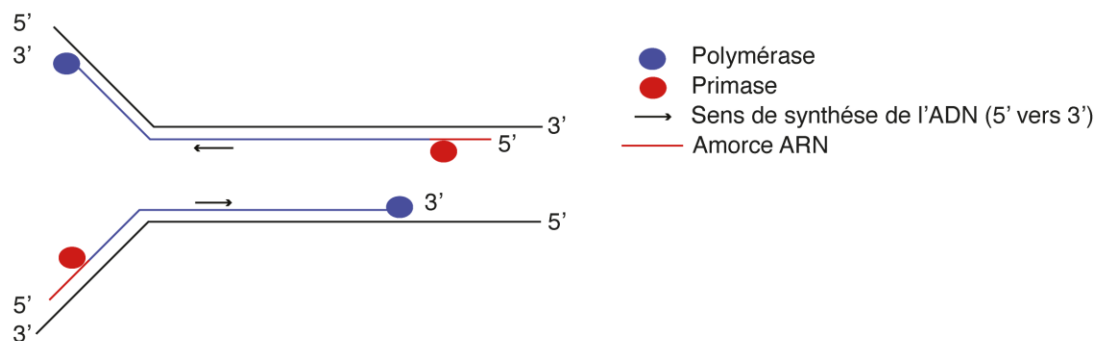
Formation de la boucle T

Figure 1-3. Réplication des télomères.

(A) Le passage de la fourche de réplication au niveau des télomères est compromis par les structures G-quadruplex formées à cause de la nature répétitive des télomères. Les

protéines du Shelterin, le CST et des protéines accessoires (Apollo, BLM, Exo1) recrutent et facilitent le passage de la fourche répliquative. (B) Une fois répliqués, et en coopération avec les protéines du Shelterin, les télomères sont pris en charge par des nucléases afin de créer une structure permettant la formation de la boucle télomérique.

Malgré ces mécanismes sophistiqués et aussi en raison du mécanisme « imparfait » de réplification de l'ADN, les télomères sont raccourcis après chaque division cellulaire. En effet, les ADN polymérase δ et ϵ sont uniquement capable de produire de l'ADN à partir d'un oligonucléotide (amorce) d'ARN synthétisé par une primase associée avec l'ADN polymérase α . L'amorce d'ARN est dégradée par la suite. La néosynthèse d'ADN par les polymérase se fait toujours de 5' vers 3' ; la dégradation de l'amorce ARN en 5' aura donc pour conséquence un raccourcissement du télomère. Ce mécanisme fut décrit en 1971 par Alekseï Olovnikov et en 1972 par James Watson et est connu sous le nom de « problème de réplification des extrémités chromosomique » (Figure 1-4; p21).



Réplication incomplète des télomères en 5' lors de la dégradation de l'amorce d'ARN

Figure 1-4. Le problème de réplification des extrémités chromosomiques.

La dégradation de l'amorce ARN synthétisée par la primase conduit à un raccourcissement progressif des télomères après chaque division cellulaire.

Quand les télomères arrivent à une longueur critique, les protéines liant normalement

l'ADN télomérique ne sont plus capables de se lier et les télomères sont exposés à la machinerie de réparation des dommages à l'ADN. Quand tel est le cas, on observe une activation de la kinase ATM et du point de contrôle dépendant de p53, se soldant par une entrée en apoptose ou en sénescence de la cellule (Webley et al., 2000). La réplication n'est pas la seule cause d'un raccourcissement des télomères. D'autres événements, plus ponctuels, peuvent aussi en être la cause.

Raccourcissement des télomères et événements stochastiques

En plus du raccourcissement des télomères dû à l'impossibilité de répliquer la fin des chromosomes, des événements stochastiques peuvent se produire et conduire à une perte de longueur des télomères. Par exemple, chez la levure, de rapides événements de délétion télomérique, appelée TRD en anglais pour « telomere rapid deletion », ont été observés et il est suggéré que ce phénomène est conservé chez les mammifères (Lustig, 2003). La découverte d'un domaine HJR dans POT1 a émis l'hypothèse que la boucle télomérique pourrait, en l'absence de régulation, évoluer vers une jonction de Holliday (Kar et al., 2016; Lim and Cech, 2021). Normalement caractéristique de la recombinaison homologue, la résolution de telles structures au niveau des télomères pourrait être la cause de délétion télomérique (Longhese, 2008). C'est d'ailleurs par un mécanisme semblable que les télomères ultra-long sont raccourci (Claussin and Chang, 2015).

Comme mentionné précédemment, la réplication des télomères peut s'avérer délicate : à cause de leur nature répétitive, riche en résidus guanine et à la chromatine qui est particulièrement condensée (hétérochromatine constitutive), les télomères sont des sites dits fragiles (Sfeir et al., 2009a), ce qui rend difficile la progression de la fourche

répliquative. Parfois, la fourche de réplication se bloque (Liao et al., 2018) — notamment en raison de l'accumulation de structure G-quadruplex (Martínez and Blasco, 2015) ou de la formation de 8-oxoGuanosine (Ahmed and Lingner, 2018) — produisant des dommages aux télomères, et augmentant le risque d'événements inopportuns (Stroik et al., 2019).

Qu'il s'agisse d'un raccourcissement progressif, dû à la réplication, ou à un événement stochastique n'affectant qu'un seul télomère, cette perte d'intégrité va inévitablement conduire à de l'instabilité génomique, notamment à travers des fusions télomériques qui vont compromettre le génome tout entier (Lo et al., 2002; Sabatier et al., 2005), participant ainsi, au vieillissement.

Perte d'intégrité des télomères et réponses aux dommages de l'ADN

Un télomère est compromis lorsqu'il n'est pas suffisamment protégé et par conséquent, lorsqu'il peut être reconnu comme une cassure double-brin par les mécanismes de réparation de l'ADN. Un télomère déprotégé va activer les kinases ATM/ATR et aura pour conséquence l'activation de la protéine p53. Une telle situation arrive lorsque les télomères sont très courts et que peu d'ADN télomérique est disponible pour la liaison des protéines du Shelterin. De même, si des mutations surviennent au niveau des protéines associées aux télomères, l'inhibition de la réponse aux dommages à l'ADN peut être compromise.

Les lésions télomériques sont en général des dommages persistants puisqu'ils ne peuvent pas être réparés. Lorsque l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN devient trop forte, la cellule peut entrer en apoptose. Mais dans certains cas, la prise en charge du télomère endommagé par les voies de réparation des dommages à l'ADN (C-NHEJ ou A-

NHEJ) provoquera des fusions entre chromatides sœurs ou entre chromosomes (Muraki et al., 2012a). Les fusions résultent d'une liaison covalente entre le brin G d'un télomère et l'extrémité C d'un autre télomère (Smogorzewska and De Lange, 2002).

Durant la mitose, le chromosome dicentrique ainsi formé ségrégera anormalement, résultant en des cassures, puis en d'autres réarrangements chromosomiques (Figure 1-5 ; p25). Les fusions chromosomiques ont lieu préférentiellement entre télomères très courts : le laboratoire du professeur Duncan M. Baird en Écosse, a montré qu'au niveau du site de fusion, on retrouve très peu de répétition télomérique (12,8 maximum), voir aucune (Capper et al., 2007). La protéine du Shelterin TRF2 joue un rôle majeur dans l'inhibition des fusions chromosomiques. L'inhibition ou la déplétion de TRF2 conduit à une augmentation des fusions chromosomiques (Van Steensel et al., 1998a) causée par la voie C-NHEJ (dépendante de la Ligase IV). Au contraire, la délétion du duo TPP1-POT1 va également favoriser les fusions, mais cette fois-ci à travers le mécanisme A-NHEJ (dépendant de la Ligase III) (Nera et al., 2019). Par conséquent, l'inhibition de la ligase IV ou des protéines KU70 (pionnière de la voie NHEJ) réduit la fréquence des fusions (Longhese, 2008).

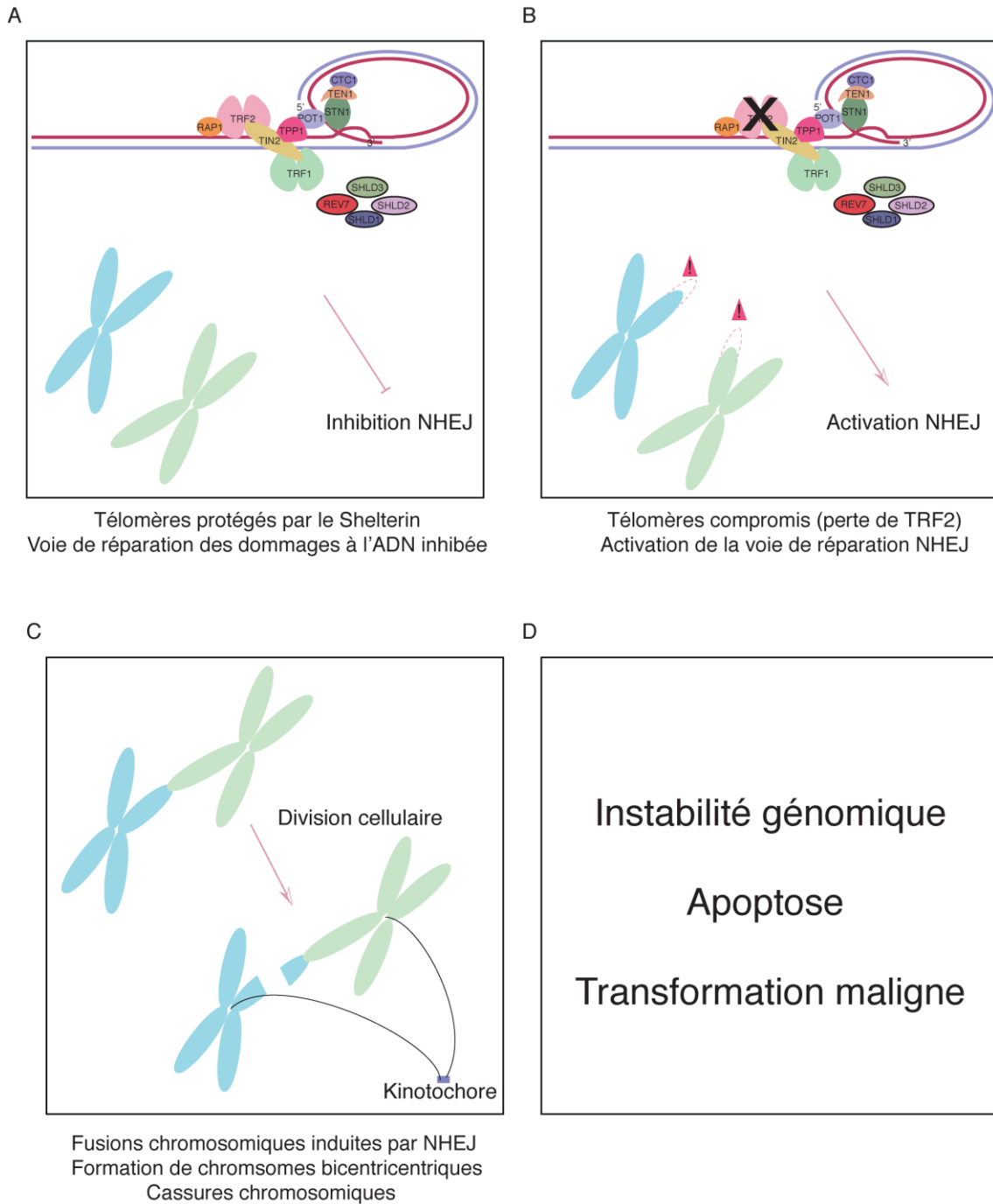


Figure 1-5. La perte d'intégrité des télomères compromet l'intégrité génomique des cellules.

(A) Les protéines du Shelterin, notamment TRF2, inhibent la réponse aux dommages à l'ADN. (B) Quand la liaison de ces protéines aux télomères est compromise, il y a

activation des voies de réparation de l'ADN, et notamment, de NHEJ puisqu'il s'agit d'une cassure double-brin. (C) La voie de réparation NHEJ peut créer des chromosomes dicentriques en fusionnant deux télomères. Lors de la division cellulaire, le chromosome dicentrique peut se casser lors de la ségrégation (D) entraînant de l'instabilité génomique (cycle fusion-cassure-fusion), et possiblement de l'apoptose ou une transformation tumorale.

Téломérase et allongement des télomères

Le raccourcissement des télomères est inévitable chez toute cellule qui se divise et est à l'origine du vieillissement cellulaire. D'ailleurs, le potentiel prolifératif des cellules somatiques est justement limité par le raccourcissement des télomères, c'est ce qu'on appelle la limite de Hayflick (Hayflick and Moorhead, 1961; Shay and Wright, 2000).

Certaines cellules, comme les cellules embryonnaires et les cellules germinales, expriment une enzyme appelée la télomérase et capable de synthétiser *de novo* de l'ADN télomérique (Greider and Blackburn, 1985). Ainsi, le potentiel prolifératif de ces cellules n'est pas restreint et permet de perpétuer l'espèce (Chen et al., 2013). Dans une moindre mesure, les cellules multipotentes adultes expriment la télomérase, mais ne possèdent pas un potentiel prolifératif illimité (Flores and Blasco, 2010). De même, les cellules tumorales, qui se divisent activement, ont besoin d'avoir un moyen d'allonger leurs télomères. Dans environ 73 – 80 % des cancers, la télomérase est réactivée et permet le maintien des télomères.

La télomérase, une ADN polymérase ARN dépendante, est constituée de deux composantes : Tert, la sous-unité enzymatique et catalytique et Terc, l'ARN télomérique

qui sert de modèle à la synthèse *de novo*. L'accès de la télomérase aux télomères est régulé par les protéines accessoires du télomère. Alors que TPP1 favorise le recrutement et la processivité de la télomérase, TRF1 et TRF2 le limitent. En effet, un raccourcissement des télomères a été observé dans des cellules qui surexpriment TRF2/TRF1, alors qu'*in vitro*, TRF1/2 n'ont pas d'effet sur l'activité télomérase (Smogorzewska et al., 2000; Van Steensel and De Lange, 1997). Une fois en place, la télomérase synthétise *de novo* des répétitions télomériques au niveau du brin G, et le brin C sera complété par la réplication, notamment grâce au CST qui recrute la polymérase α aux télomères.

Mécanismes alternatifs d'allongement des télomères.

En absence de télomérase, et si le besoin prolifératif est élevé, les cellules peuvent contrer la sénescence répllicative en utilisant un mécanisme d'élongation des télomères basés sur la recombinaison homologue. Le nom générique ALT lui a été donné, en référence à « alternative lengthening of telomeres ». Initialement, la découverte de ce mécanisme a été faite chez la levure où deux types de « survivants » ont été repérés en absence de télomérase : « survivor 1 » et « survivor 2 ». Le type deux est celui qui se rapproche le plus de ce qui a été observé dans les cellules humaines et nécessite l'action des protéines RAD51, Rad52, Exo1, et le complexe MRX. Bien que le phénomène soit désormais connu, notamment, car environ 15 % des tumeurs le pratiquent, le mécanisme moléculaire n'est pas entièrement décodé. Par exemple, on sait que la recombinaison télomérique est inhibée par l'action concubine des protéines POT1, TRF2, RAP1 et KU et RIF1 ; et par le CST qui inhibe la résection par des nucléases. De plus, l'expression du complexe de remodelage de la chromatine ATRX/DAXX est perdue dans la plupart des tumeurs ALT +

et une association entre la perte de DAXX et l'augmentation des transcrits télomériques TERRA a été faite (Cesare and Reddel, 2010; Claude and Decottignies, 2020; Lovejoy et al., 2012).

Téломères, télomérase et maladies associées

Alors que la perte d'intégrité des télomères constitue un obstacle à la prolifération cellulaire, l'expression inopportune de la télomérase dans des cellules somatiques est l'une des bases de la carcinogenèse. L'utilisation de modèles murins génétiquement modifiés a d'ailleurs participé activement à l'élargissement de nos connaissances au sujet des télomères et des maladies associées. Les premières preuves sont venues de l'établissement de modèles murins « knock-out », KO, pour la télomérase (Blasco et al., 1997; Flores and Blasco, 2010; Liu et al., 2000; Yuan et al., 1999). Après plusieurs générations, les télomères murins sont courts et les souris ont des symptômes associés à un vieillissement prématuré : défaillance du système hématopoïétique et des organes hautement prolifératifs, problème de fertilité et de développement (Erdmann et al., 2004; Herrera et al., 1999, 2000; Lee et al., 1998; Liu et al., 2002b; Meznikova et al., 2009). À l'inverse, la restauration de la longueur des télomères dans ces modèles abolit les symptômes (Erdmann et al., 2004; Hemann et al., 2001; Liu et al., 2002b; Meznikova et al., 2009; Samper et al., 2001).

De même, le vieillissement prématuré peut aussi résulter de mutations touchant les gènes de maintenance des télomères (Adams et al., 2015; Decottignies and d'Adda di Fagagna, 2011; López-Otín et al., 2013). Chez les patients atteints de dyskératose congénitale, les télomères sont généralement très courts et l'instabilité génomique prédispose ces patients aux cancers. En plus des symptômes typiques de vieillissement, ils présentent des

cytopénies dues à une insuffisance de la moelle osseuse, des difficultés pulmonaires et un retard de développement (Kirwan and Dokal, 2009; Townsley et al., 2017). En fait, cette maladie découle de mutations du gène de la Dyskerin, une protéine impliquée dans l'assemblage de la télomérase et faisant parti du complexe télomérase holoenzyme (Ghanim et al., 2021). Il existe de nombreuses pathologies liées à des défaillances de maintien de l'homéostasie des télomères : fibrose pulmonaire idiopathique, syndrome de Hoyeraal Hreidarsson, syndrome de Coats, ce qui confirme le lien entre maintiens de l'intégrité des télomères, et vieillissement.

1.4. Dérèglements épigénétiques

Épigénétique : brèves définitions

L'existence d'un procédé qui régit l'expression des gènes, a été décrit depuis les années 40 par Conrad H. Waddington et se réfère au terme « d'épigénétique ». Alors que deux cellules peuvent avoir le même fond génétique, les gènes exprimés peuvent être complètement différents et définissent alors l'identité et la fonction de la cellule (González-Recio et al., 2015; Villota-Salazar et al., 2016).

En plus de la séquence de nucléotides, l'ADN est enroulé autour d'histones et organisé en nucléosomes compactés dans le noyau cellulaire, formant ainsi la chromatine. Le niveau de compaction de la chromatine, et l'accès de différents facteurs à l'ADN conditionnent l'expression des gènes et régulent de nombreux processus biologiques (réponses aux dommages à l'ADN, réplication). Ce sont des modifications chimiques de l'ADN (méthylations) et des histones (méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitination), ainsi que le positionnement des nucléosomes qui participent au remaniement de la chromatine. Ces modifications chimiques, qui contribuent aux bons

fonctionnements cellulaires, nécessitent une régulation millimétrée (González-Recio et al., 2015; Villota-Salazar et al., 2016).

Or, au cours du temps et à cause de l'environnement ou de procédés cellulaires, l'épigénétique des cellules peut être perturbée. L'exemple des jumeaux est frappant et illustre le phénomène de dérive épigénétique avec l'âge. En bas âges, les différences épigénétiques entre deux jumeaux sont faibles alors que la divergence augmente considérablement chez des sujets plus âgés (Fraga et al., 2005; Song and Johnson, 2018a).

Vieillessement, méthylation de l'ADN et horloge d'Horvath

Cette idée d'évolution de l'épigénome en fonction du temps a surtout été mise en évidence en 2013, après une étude publiée par le professeur Steve Horvath et ses collègues. Ils ont démontré qu'il existait une corrélation entre le niveau de méthylation de l'ADN et le vieillissement. Désignée comme « l'horloge d'Horvath », ou « l'horloge du méthylome », cette corrélation est déterminée sur la base de 353 îlots CpG situés dans des régions qui contrôlent l'expression des gènes de développement et de différenciation. Parmi cet ensemble d'îlots CpG, certains îlots sont méthylés et d'autres ne le sont pas. En étudiant le schéma de méthylation, on se rend compte qu'il varie avec le temps et qu'il est lié au vieillissement chronologique de l'organisme. Toutefois, il est essentiel de mentionner que le statut de méthylation d'un seul CpG de cet ensemble n'est pas corrélé à l'âge chronologique et que seul le modèle global peut être utilisé comme prédicteur d'âge (Horvath, 2013a; Horvath and Raj, 2018). Depuis, d'autres études ont rapporté une corrélation entre la méthylation de l'ADN et le vieillissement en utilisant des modèles

différents (Guarasci et al., 2019; Hannum et al., 2013a; Jung and Pfeifer, 2015; Krauss and de Haan, 2016; Stubbs et al., 2017; Wilson and Jones, 1983). Grâce à sa fiabilité, l'horloge du méthylome est proposée pour être utilisée dans des études épidémiologiques (Lim and Song, 2018). Au contraire, d'autres n'ont pas reporté de corrélation (Hadad et al., 2016). Ces variabilités sont potentiellement dues à une régulation complexe de l'activité des ADN méthyltransférases (Dnmt) avec l'âge (Sun et al., 2014).

Une autre instance mettant en lumière l'effet de l'épigénome sur le vieillissement est la différence existante entre les abeilles travailleuses et leur reine. Alors qu'ayant un fond génétique identique, l'abeille reine a une espérance de vie d'environ 20 fois celle de son homologue travailleuse, et un génome hypométhylé. Ce phénomène a été rapporté dans la revue des auteurs S. Song et F.B Johnson (Song and Johnson, 2018a), selon des études dans lesquels il a été montré d'une part, que modifier la méthylation du génome d'une jeune larve influençait son devenir (reine versus travailleuse) ; et d'autre part, qu'inhiber les ADN méthyltransférases augmentait l'espérance de vie des travailleuses (Cardoso-Júnior et al., 2018).

Vieillesse et modifications post-traductionnelles des histones

En plus de cette corrélation singulière entre le vieillissement et la méthylation, les modifications post-traductionnelles des histones évoluent. Mais contrairement à la méthylation de l'ADN, il n'y a pas de consensus quant aux variations reportées, qui dépendent de l'organisme, du tissu ou du type cellulaire étudié. Ainsi, le profil de la modification répressive H3K27me3 est nettement modifié en vieillissant, mais différemment selon le contexte. En effet, chez les souris âgées, les cellules souches musculaires quiescentes présentent un taux élevé de H3K27me3 par rapport à leurs

homologues plus jeunes, mais lorsqu'il s'agit de cellules souches musculaires activées à la suite d'une blessure, ce sont les souris les plus jeunes qui possèdent un taux de H3K27me3 plus important (Schwörer et al., 2016). Les exemples se multiplient pour H3K27me3 avec une augmentation dans le tissu cérébral, les cellules souches hématopoïétiques et les cellules musculaires (Brunet and Rando, 2017; Cencioni et al., 2019; Ito et al., 2018; Wang et al., 2010) ; mais diminution dans d'autres circonstances qui pourraient être due à une dérégulation des histones méthyltransférases (Fraga and Esteller, 2007; Han and Brunet, 2012; Kane and Sinclair, 2019). De même, le vieillissement impact d'autres modifications post-traductionnelle d'histones, comme H3K4me3, H3K36me3, H3K9me3 (Kane and Sinclair, 2019).

Vieillesse et altération des nucléosomes

Finalement, une altération de la structure des nucléosomes, associée à l'âge, a été reportée chez la levure et chez les mammifères et est corrélée à de l'instabilité génomique (Chen et al., 2020; Hu et al., 2014). Par exemple, la levure perd près de 50 % de sa teneur en histone en vieillissant, mais la surexpression d'histones augmente la longévité de celle-ci (Feser et al., 2010; Hu et al., 2014).

Chez les mammifères, Roderick O'Sullivan et ses collègues ont montré qu'une diminution du nombre d'histones et des chaperonnes d'histones Caf 1 et Asf1 est associé à un raccourcissement des télomères dans des fibroblastes ayant subi un grand nombre de divisions cellulaires, comparé à ces mêmes fibroblastes n'ayant subi que peu de divisions (O'Sullivan et al., 2010). Chez la souris âgée en revanche, et bien qu'il n'y ait pas de changement observable du taux de H3, une modification de l'occupation de H3, ainsi qu'une préférence pour le variant H3.3 a été observée et est compatible avec une

augmentation générale de l'accessibilité de la chromatine dans des régions spécifiques (Chen et al., 2020; Das and Tyler, 2012).

En regardant les effets du vieillissement sur la biologie de la cellule, il paraît inévitable que tous ces changements affectent leur fonctionnement. D'ailleurs certains cancers sont notamment caractérisés par des mutations dans des acteurs de l'épigénétique, ce qui prouve que des altérations de l'épigénétique peuvent affecter profondément les cellules, jusqu'à leur transformation tumorale.

Malgré les efforts déployés ces dernières années à mieux comprendre le lien entre l'épigénétique et le vieillissement, la recherche peine encore à en comprendre tous les rouages. Notamment, les modifications épigénétiques fonctionnent souvent par combinaisons (code épigénétique), et disséquer les mécanismes devient un défi. De plus en plus d'études font des liens entre les différents acteurs du vieillissement. Par exemple, il a été montré que l'organisation chromatinienne au niveau des télomères est bien spécifique ; et va être modifiée considérablement lors de leur raccourcissement.

Dérégulations épigénétiques causées par le raccourcissement des télomères

La chromatine entourant les télomères est caractéristique d'une région d'hétérochromatine constitutive ; mais est aussi atypique. En effet, elle est constituée des marqueurs classiques d'hétérochromatine (H3K9me3, H4K20me3 et heterochromatin protein 1 (HP1), mais les protéines chapeautant les télomères modifient la structure de cette région.

Par exemple, TRF2 promeut la formation de structures compactes, en neutralisant les

charges négatives de l'ADN grâce à son domaine N-Terminal basique. De son côté, TIN2 interagit avec HP1 ; alors que les TERRA sont nécessaires au maintien des marques H3K9me3, H4K20me3 et H3K27me3, grâce à leur interaction avec le complexe Polycomb Repressive 2 (PRC2) (Montero et al., 2018a). Enfin, et contrairement au reste de la chromatine, le variant de l'histone H3, H3.3 est majoritaire au niveau des télomères et serait déposé par le complexe ATRX/DAX.

Lorsqu'ils sont longs, les télomères sont entourés d'hétérochromatine assez dense qui se propage jusqu'aux régions subtélomériques. Les gènes situés dans la zone d'influence télomérique sont réprimés : c'est ce qu'on appelle l'effet « Télomère position », ou TPE (telomere position effect) (Mondoux and Zakian, 2006). Ainsi, les télomères peuvent réprimer des gènes situés au niveau de la zone subtélomérique, ou beaucoup plus loin, jusqu'à 10 megabase de distance, en formant des boucles (Figure 1-6 ; p35) et (Kim and Shay, 2018). Chez l'humain, les gènes rapporteurs placés dans la région subtélomérique sont 10 fois moins exprimés qu'ailleurs dans le génome (Baur et al., 2001; Song and Johnson, 2018a). D'un point de vue mécanistique, RAP1 interagit avec la protéine Sir2 qui désacétyle la marque activatrice H4K16, renforçant la répression de la transcription (Moretti et al., 1994; Tanny et al., 1999). Cette zone désacétylée permet le recrutement des protéines Sir 3 et Sir 4 qui, à leur tour, recrutent davantage de Sir2 qui désacétylera les régions avoisinantes (Barral and Déjardin, 2020). C'est un mécanisme connu pour propager un état chromatinien.

Cet équilibre fragile est normalement maintenu grâce à des télomères longs et fonctionnels. Ainsi, le raccourcissement des télomères cause un bouleversement au niveau de la chromatine des télomères : l'hétérochromatine est moins dense ; et les boucles télomériques peinent à se former (Kozak et al., 2010; Song and Johnson, 2018a). L'altération de l'état chromatinien de cette région aura comme conséquence une

diminution de l'effet TPE sur les zones avoisinantes. Ainsi, un gène habituellement réprimé par les télomères pourra être transcrit (Figure 1-6 ; p35) (Kim and Shay, 2018).

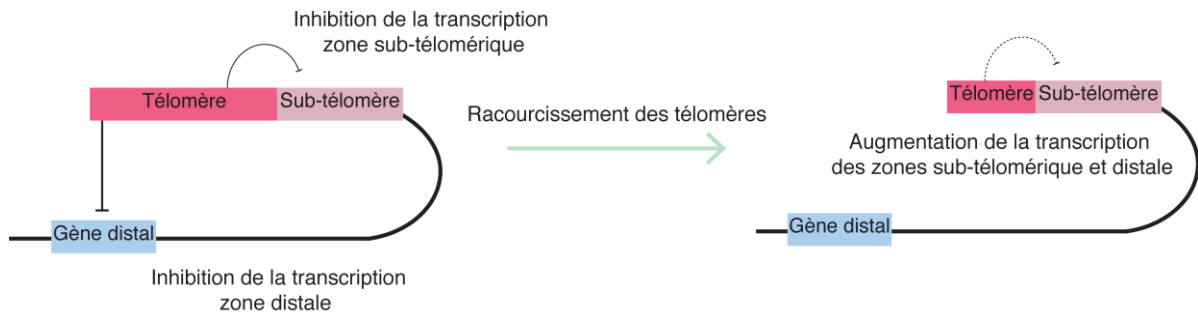


Figure 1-6 . Effet de la position des télomères « TPE ».

Inspiré de (Kim and Shay, 2018). La structure dense et répressive formée par l'hétérochromatine télomérique s'étend jusqu'aux zones subtélomériques pour en réprimer la transcription. De même, la formation de boucle permet de contrôler la transcription de zone plus distale. Lors du raccourcissement des télomères, la structure des télomères est dégradée et la répression de la transcription des zones subtélomérique et distale est compromise.

1.5. Cellules souches et vieillissement

Les cellules souches, en quoi sont-elles si spéciales ?

Le mot cellule souche est en fait un terme générique, utilisé pour décrire une cellule capable de (i) rester quiescente (ii) s'autorenouveler afin de maintenir une population constante et (iii) de se différencier au besoin. La capacité de différenciation dépend du potentiel de la cellule. Les cellules totipotentes correspondent à la cellule œuf, capable de donner tous les tissus embryonnaires et extraembryonnaires ; les cellules pluripotentes

peuvent se différencier en tous les tissus embryonnaires et enfin, les cellules multipotentes ou cellules souches adultes sont des cellules spécialisées qui sont responsables de repeupler un tissu spécifique de l'organisme afin d'en assurer le bon fonctionnement. Alors que les cellules souches totipotentes et pluripotentes n'existent que pour un temps très limité au cours du développement, les cellules souches adultes persistent durant toute la vie d'un être vivant et sont promptes à subir le vieillissement.

Lorsqu'une cellule somatique subit les effets du temps —l'issue sera généralement la sénescence ou l'apoptose — et elle sera remplacée par une autre de ses paires, fraîchement issue de la différenciation d'une cellule souche, afin de maintenir l'intégrité du tissu.

En revanche, et mis à part l'autorenouveaulement, il n'existe pas de moyen de régénérer le bassin de cellules souches lorsque celui-ci est compromis (Coquard, 1997). Il est donc essentiel que les cellules souches possèdent des propriétés permettant de retarder les effets négatifs du vieillissement puisqu'un dysfonctionnement de ces cellules a des conséquences désastreuses sur le tissu. En effet, la majorité des pathologies dues au vieillissement implique une déficience au niveau des cellules souches, et ce, dans des tissus variés (Shufian et al., 2017).

Avec l'arrivée de la médecine régénératrice et une augmentation de la prévalence des pathologies gériatriques, on s'intéresse davantage à la biologie des cellules souches, et comprendre les facteurs influençant leur fonctionnement est crucial afin d'assurer le succès des thérapies (Ghorbaninejad et al., 2020; Odden et al., 2011; Rodriguez et al., 2015).

Grâce à leur nature parfois quiescente, leur métabolisme en pause et l'environnement protecteur dans lequel elles se trouvent, les cellules souches sont moins exposées aux

dommages ; et c'est ce qui permet d'assurer la longévité des individus. Bien que le vieillissement arrive de façon plus lente, les cellules souches vont elles aussi subir des dommages similaires à ce qui a été décrit précédemment.

Dans les paragraphes suivants, j'aborderai les principaux mécanismes du vieillissement des cellules souches, leurs conséquences et soulignerai les différences avec les cellules somatiques.

Maintien de la longueur des télomères pendant l'embryogenèse et à l'âge adulte dans les cellules souches

Maintenir une longueur télomérique adéquate est essentiel à la pérennité des espèces. Alors que les cellules somatiques ne sont pas capables d'allonger leurs télomères, des mécanismes existent durant le développement embryonnaire et dans les cellules souches pour prolonger les extrémités terminales des chromosomes qui se raccourcissent pendant la réplication.

Dans les cellules germinales, et contrairement aux croyances, la télomérase est exprimée à des niveaux assez bas, ce qui persiste après la fécondation et dans les premiers stades du développement embryonnaires (Figure 1-7 ; p38). Il faut attendre la venue du stade « blastocyste » pour observer une augmentation considérable de l'expression de la télomérase (Figure 1-7 ; p38). Pourtant, les télomères sont allongés depuis la fécondation, jusqu'au stade du blastocyste (L. Liu et al., 2007; Liu et al., 2002; Ozturk et al., 2014). Les études montrent qu'au stade deux cellules, les télomères seraient allongés via un mécanisme indépendant de la télomérase, impliquant la protéine Zscan 4 et des événements d'échange entre chromatines sœurs, notamment grâce à une déméthylation de l'ADN (Dan et al., 2017; Nakai-Futatsugi and Niwa, 2016). Au fur et à mesure du

développement, la capacité d'extension des télomères se restreint à certaines cellules spécifiques : les cellules souches multipotentes adultes (Figure 1-7 ; p38). Ces cellules sont spécialisées, se situent dans les différents tissus et expriment la télomérase.

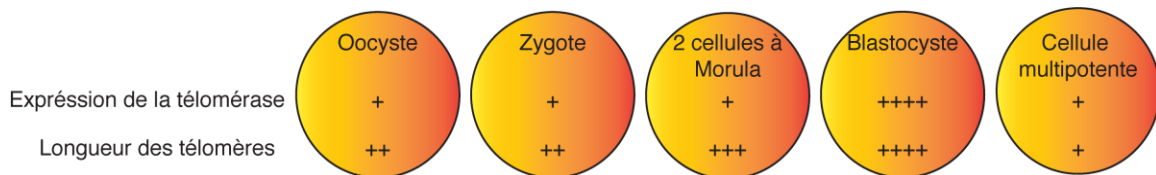


Figure 1-7. Expression de la télomérase et élongation des télomères au cours du développement et dans les cellules souches. Adapté de (Ozturk et al., 2014).

Adapté de (Ozturk et al., 2014). L'expression de la télomérase varie dans les cellules souches au cours du développement.

Raccourcissement des télomères, vieillissement et cellules souches

Les cellules souches ne sont pas constamment en division et restent dormantes la plupart du temps, ce qui permet de ralentir la vitesse de raccourcissement des télomères. De plus, ce sont les seules de l'organisme à exprimer la télomérase ce qui leur confère la capacité de maintenir leurs télomères. Il faut toutefois nuancer ce propos puisque l'expression de la télomérase n'est pas suffisante à leur donner un potentiel prolifératif illimité. En effet, une diminution de l'expression de la télomérase a été décrite à de nombreuses reprises et notamment dans des modèles murins (Flores et al., 2008; Vaziri et al., 1994a). Cette notion de diminution — qui va avoir un impact direct sur la quantité et donc la disponibilité de la télomérase — vient rejoindre les études montrant la relation d'haploinsuffisance de la télomérase, lorsqu'exprimée en quantité inférieure à la normale. Par exemple, des souris possédant seulement la moitié de la quantité normale de télomérase ont une capacité limitée de régénérescence tissulaire à cause du

raccourcissement des télomères (Hao et al., 2005; Harrington, 2012). C'est ce phénomène qui se produit dans les cellules souches adultes : les télomères se raccourcissent, limitant le potentiel.

Domage à l'ADN et destin cellulaire

De la même façon qu'une cellule somatique, le raccourcissement des télomères ou toute autre atteinte de l'ADN va activer des voies de réparation ; en revanche, il existe quelques différences. Lorsqu'elles sont quiescentes, les cellules souches ont tendance à accumuler des dommages qui seront soit réparés par la voie NHEJ — favorisant les erreurs en raison de l'absence d'un brin homologue — ou accumulés et réparés lors de l'entrée en cycle de la cellule (Behrens et al., 2014; Rossi et al., 2007). Dans le cas des cellules souches cancéreuses, cette habilité de résistance aux dommages est particulièrement compromettante lors des chimiothérapies (Phi et al., 2018). En supplément de l'activation des voies classique de réparation, l'émergence de dommages cellulaires va influencer le potentiel de différenciation des cellules souches. Dans certaines circonstances, les cellules souches endommagées vont se différencier afin d'éliminer rapidement les cellules dysfonctionnelles, c'est le cas des neurones, ce qui provoquera une diminution du nombre de cellules disponibles pour régénérer le tissu (Barazzuol et al., 2017; Behrens et al., 2014). Au contraire, chez les cellules souches hématopoïétiques, on observe plutôt l'inverse puisqu'elles ont un potentiel de différenciation restreint. En effet, on va avoir tendance à observer un défaut ou un biais de différenciation, mais pas de diminution du nombre de cellules souches (Krauss and de Haan, 2016; Sekulovic et al., 2011; Sun et al., 2014; Vaziri et al., 1994a).

Altération de la niche

Contrairement aux cellules somatiques, les cellules souches se situent dans un microenvironnement, appelé la niche, qui fournit une protection et régule leur l'état. En transmettant des signaux physiques ou moléculaires aux cellules souches, la niche est en grande partie responsable du maintien en quiescence, du potentiel de différenciation ou d'autorenouveaulement. L'importance du système de niche est soulignée par une conservation entre les espèces (Zhao et al., 2008a). Avec le vieillissement, la composition de la niche change ; par exemple une accumulation d'adipocyte dans la moelle osseuse peu s'installer avec le temps et perturber la régénération de cellules hématopoïétiques effectrices (Ambrosi et al., 2017; Justesen et al., 2001; Song et al., 2010; Wagner et al., 2008). De plus, une autre étude a montré qu'une modification de la myofibre et de la lamine basale, deux éléments en contact étroit avec les cellules souches musculaires, affectent la capacité de régénération du muscle (Gopinath and Rando, 2008).

Altérations épigénétiques dans les cellules souches

Quel que soit leur état, quiescent ou proliférant, les cellules souches possèdent une excellente plasticité qui leur permet de contrôler leur destin rapidement à travers divers programmes transcriptionnels. Elles doivent cette capacité à une chromatine ouverte et dynamique, prête à se réorganiser en fonction des signaux reçus pour changer la transcription des gènes. On comprend donc que les altérations épigénétiques accompagnant le vieillissement peuvent influencer leur destin cellulaire. La sortie de l'état de quiescence requiert un remaniement épigénétique, et de même, la prise de décision entre autorenouveaulement ou différenciation demande l'activation d'un programme

transcriptionnel spécifique. En revanche, les conséquences semblent dépendantes du type cellulaire et du contexte et plusieurs exemples dans la littérature se côtoient. Dans le cas de souris déficientes pour l'ADN méthyltransférase Dnmt3a, l'hypométhylation de l'ADN consécutive n'affecte pas la capacité d'autorenouveau des cellules souches hématopoïétiques, au contraire, on observe une augmentation du nombre de cellules souches et une prédisposition aux cancers de la lymphome, dus à des défaillances d'hématopoïèse (Beerman and Rossi, 2015; Mayle et al., 2015).

Les cellules souches, responsables de régénérer les tissus endommagés, sont un élément clef du bon fonctionnement d'un tissu ou d'un organisme. Lorsqu'elles sont compromises, notamment comme c'est le cas en vieillissant, l'intégrité et la fonction des organes se détériorent. Malgré les connaissances acquises jusqu'à maintenant, leur rareté, leur difficulté à être maintenue en culture les rendent difficiles à étudier. Pour mieux comprendre les mécanismes du vieillissement des cellules souches et leurs conséquences, il est donc nécessaire d'avoir un modèle cellulaire qui faciliterait les travaux de recherche. En effet, si on sait que les cellules souches pâtiennent du vieillissement, les conséquences précises sont encore mal comprises. Or, il est indispensable d'appréhender les détails des différents mécanismes, afin de développer des traitements pour les patients souffrant des conséquences du vieillissement des cellules souches.

1.6. Les cellules souches embryonnaires murines, un bon modèle

Origine et conditions de culture

Dans un organisme formé, les cellules souches adultes sont rares, difficiles à isoler et possèdent un potentiel de différenciation restreint ce qui limite les recherches de laboratoire. Ainsi les scientifiques ont eu l'idée de remonter plus précocement dans le développement des organismes pour trouver des cellules souches primitives, qui s'avèrent être une alternative intéressante pour la médecine et l'étude du bé à bas des cellules souches. Après fertilisation, la cellule-œuf totipotente, ou zygote, va subir différentes vagues de divisions cellulaires où chaque cellule fille gagnera petit à petit en spécialisation. La Figure 1-8 résume les différents stades de développement, jusqu'au stade du blastocyste préimplanté (Figure 1-8 ; p43). À ce stade, la masse interne du blastocyste préimplanté comporte un réservoir de cellules aux propriétés rares dont l'intérêt de la communauté scientifique ne cesse de croître : les cellules souches embryonnaires murines ou cellules ES. Ce sont des cellules pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de s'autorenouveler indéfiniment tout en gardant la possibilité de se différencier en cellule de l'un des trois feuillets embryonnaires. *In vivo*, cet état est éphémère et transitoire, mais en 1981 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981) deux équipes de recherches ont été capables de les isoler ; et il est possible de les maintenir dans un état pluripotent grâce à des conditions de culture adaptée. Traditionnellement, on utilise un milieu enrichi en sérum — qui apportera les facteurs nécessaires à bloquer la différenciation neurale. Il faut aussi ajouter des « Bone Morphogénic protein » (de l'anglais et abrégé BMP), et du Leukemia Inhibitory Factor (LIF) qui soutiendra l'activité des

facteurs de pluripotence via son interaction avec STAT3.

Il existe une autre alternative à ce milieu, cette fois-ci ne nécessitant ni sérum ni LIF, mais exigeant deux inhibiteurs des kinases, Mek1/2 et GSK3, qui permettent de bloquer la différenciation spontanée des cellules ES (Martello and Smith, 2014). De façon similaire, des conditions de cultures contrôlées permettent la différenciation des cellules ES *in vitro*. Un facteur largement utilisé en recherche est l'acide transrétinoïque (ATRA) qui provoque une différenciation de type neural en culture (Lu et al., 2009).

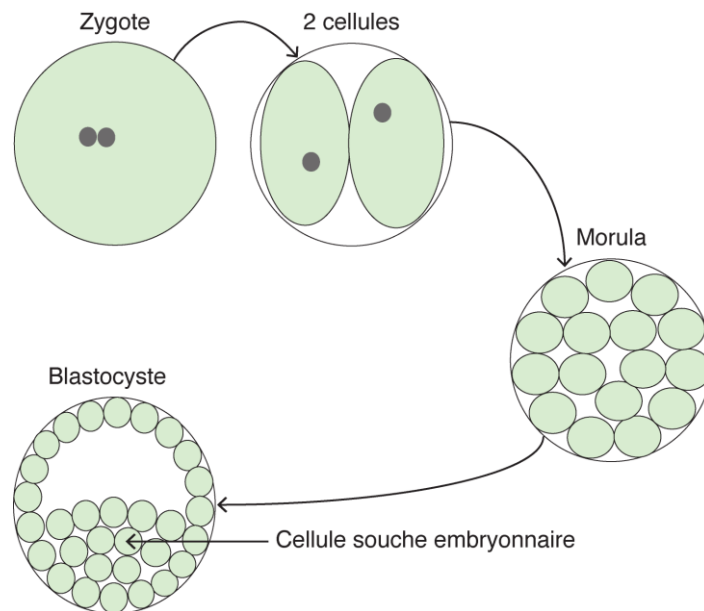


Figure 1-8. Développement embryonnaire et cellules souches embryonnaires.

Les cellules souches embryonnaires sont prélevées de la masse interne du blastocyste préimplanté et peuvent être maintenues en culture.

En plus de leur plasticité et de leur caractère « souche », les cellules ES prolifèrent rapidement, ce qui permet d'utiliser les techniques classiques de biologie moléculaire, cellulaire et de génétique, de façon similaire à ce qui est fait avec des lignées cancéreuses

établies.

Pour ces raisons, j'ai choisi d'utiliser ce modèle cellulaire murin pour étudier l'effet du raccourcissement des télomères —caractéristique notoire du vieillissement — sur les cellules souches.

Pour vous permettre de mieux comprendre les travaux que j'ai effectués au cours de mon doctorat, les paragraphes suivants seront consacrés à détailler le fonctionnement cellulaire des cellules ES.

Maintien d'un état indifférencié et facteurs de pluripotence

Le maintien de l'état de pluripotence nécessite une régulation millimétrée de l'homéostasie cellulaire et est gouverné par l'expression de gènes dits « facteurs de pluripotence ». Ce sont des facteurs de transcription, et si on en compte une pléiotropie, certains ressortent comme les facteurs de bases qui sont nécessaires au maintien de la pluripotence : Oct4 (gène = *Pou5f1*), Sox2, et Nanog, Klf4 et c-Myc (Avilion et al., 2003; Morey et al., 2015; Nichols et al., 1998). Une étude parue dans le journal « Cell research » s'est attardée à étudier les sites de liaison de ces facteurs de transcription et a obtenu deux résultats particulièrement informatifs : d'une part, les sites cibles sont généralement liés par plusieurs facteurs de pluripotences de bases ; et d'autre part, les facteurs de pluripotence ciblent des groupes de gènes régulant (i) les processus du développement, (ii) la transcription des ARNm, (iii) le métabolisme, et enfin (iv) le cycle cellulaire (Boyer et al., 2006). D'autres travaux ont également confirmé la nature redondante des facteurs de pluripotence, et c'est sans doute ce qui confère un état stable et robuste aux cellules souches (Loh et al., 2006). De plus, Klf4 stimule l'expression de la télomérase, donnant ainsi un potentiel prolifératif illimité aux cellules souches embryonnaires (Wong et al., 2010). En 2006, les travaux du professeur Yamanaka, l'un des pionniers de la médecine

régénératrice, a d'ailleurs montré que l'expression des facteurs de pluripotence Oct4, c-Myc, Klf4 et Sox2 dans des fibroblastes de souris était suffisante à induire une dé-différenciation (Takahashi and Yamanaka, 2006). Alors qu'essentielle pour maintenir la pluripotence, l'expression de ces facteurs doit être extrêmement contrôlée (Thomson et al., 2011). Lors de la différenciation, les facteurs de pluripotence sont généralement réprimés en faveur des facteurs de différenciation. Par exemple, une diminution de 50 % de l'expression d'Oct4 est suffisante pour provoquer une différenciation spontanée (Morey et al., 2015; Niwa et al., 2000). À l'inverse, une expression légèrement supérieure à la normale de Sox2 peut déclencher la différenciation (Kopp et al., 2008; Tompkins et al., 2009).

Régulation épigénétique

La régulation des cellules souches est hautement dépendante de l'épigénétique qui gouverne l'expression des gènes. En effet, ce sont les modifications épigénétiques qui permettent l'activation, ou non, d'un programme transcriptionnel. Les facteurs de pluripotence, comme Oct4, Sox2, Nanog ou c-Myc sont en interaction étroite avec les régulateurs de la chromatine, comme le complexe SWI/SNF ou NurD (Orkin and Hochedlinger, 2011), et ensemble assurent l'identité de la cellule souche pluripotente. Contrairement aux cellules différenciées, les cellules souches ont une chromatine très ouverte, dynamique et optimisant ainsi un changement d'état rapide. Ceci signifie que les zones d'hétérochromatine, définie par la présence d'HP1 sont peu nombreuses et éparses (Meshorer et al., 2006). De plus, les marques de chromatine active H3K4me3 sont prédominantes notamment au niveau des gènes de pluripotence qui sont transcriptionnellement actifs. Les gènes associés au développement sont réprimés, mais

des marques de chromatines inactives (H3K27me3) coexistent avec des marques de chromatine active (H3K4me3), formant ainsi des domaines bivalents (Orkin and Hochedlinger, 2011). Généralement, les domaines bivalents se situent au niveau de gènes de différenciation dont l'expression est mise sur pause, mais prête à être activée lorsque des signaux de différenciation seront reçus (Kanayama et al., 2019; Voigt et al., 2013). Cela dit, l'existence de domaine bivalent pourrait être remise en question puisque qu'elle repose sur la détection des méthylations par des anticorps. Or, la spécificité des anticorps ciblant des méthylations est remise en question (Shah et al., 2018). Cet état particulier de la chromatine des cellules pluripotentes est aussi appelé « état permissif » puisque comme son nom l'indique, il s'agit d'un état très actif, qui va permettre la prise de décision rapide quant au destin cellulaire. Ceci est particulièrement important pour le développement embryonnaire puisque la pluripotence n'est qu'un état passager.

Lorsque des signaux de différenciation sont reçus, on assiste à un remaniement majeur de la chromatine : les gènes de pluripotence vont être réprimés via la méthylation de l'ADN et des marques chromatiniennes répressives comme H3K27me3 et H3K9me3 ; les zones d'hétérochromatine vont être plus denses et plus définitives et seuls les gènes correspondant à la voie de différenciation seront actifs et donc transcrits. De plus, les domaines bivalents vont être résolus en faveur de l'une des marques chromatiniennes, active ou répressive, selon si la région se veut être transcriptionnellement active ou réprimée. On observe donc la fermeture de large région de chromatine en faveur de l'activation d'un programme transcriptionnel précis.

Les complexes Polycomb

Les complexes Polycomb (PRC), dont on distingue le complexe PRC1 et le complexe

PRC2, sont l'un des acteurs principaux de la différenciation et de l'identité cellulaire.

Le complexe PRC2 est composé de trois sous-unités — Ezh2 (Enhancer of zeste homolog 2, sous unité catalytique), Eed (embryonic ectoderm development) et Suz12 (Suppressor Of Zeste 12 Homolog) et est responsable de la marque d'histone H3K27me3 dans les régions où la transcription doit être réprimée (Aloia et al., 2013). Lorsque les cellules sont pluripotentes, on retrouve H3K27me3 au niveau des domaines bivalents, mais sa présence n'est pas nécessaire à la persistance de la pluripotence. En revanche, lors de la différenciation, le complexe PRC2 participe à la répression transcriptionnelle, et conséquemment, à la fermeture de la chromatine. Son absence aboutit généralement à un échec de différenciation pendant l'embryogenèse (Aloia et al., 2013; O'Carroll et al., 2001). Le rôle du complexe PRC1 est plus ambigu, notamment puisqu'il en existe plusieurs formes : la forme canonique et la forme non canonique. Initialement, on pensait que le complexe PRC1 était recruté à l'ADN dépendamment de H3K27me3, mais il semble que sa régulation soit plus sophistiquée (Aloia et al., 2013; Vidal and Starowicz, 2017).

Les ADN méthyltransférases *de novo*

En complément des régulateurs chromatiniens et du complexe PRC2, les ADN méthyltransférase *de novo* jouent un rôle prépondérant dans la différenciation. Si à l'instar du complexe Polycomb, leur présence n'est pas capitale pour la pluripotence, elle l'est pour la différenciation. La méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs de gènes réprime la transcription des gènes, déjà grâce à barrière physique qui rend les promoteurs moins accessibles, mais aussi en recrutant à son tour d'autres facteurs répresseur de la chromatine. Par exemple, les facteurs Oct4 et Nanog sont fortement méthylés au niveau

de leurs promoteurs lorsqu'il y a induction de la différenciation (Smith and Meissner, 2013).

1.7. Problématique de recherche

La pluripotence des cellules ES est gouvernée par l'expression de facteurs de pluripotence, qui est associée à une chromatine ouverte et plastique. Lors de la différenciation, les facteurs de pluripotence sont réprimés en faveur des gènes de lignage. Ceci est possible grâce à un remaniement de la chromatine qui consiste notamment en la répression de large région par méthylation de l'ADN et dépôt de H3K27me3 par le complexe Polycomb PRC2.

Notre laboratoire s'est intéressé très vite à l'effet du raccourcissement des télomères dans des cellules souches. Notamment, il a été montré que la longueur des télomères influençait la capacité de différenciation des cellules souches. Dans nos études, nous avons utilisé des cellules ES murine.

Résultats préliminaires à l'étude

Les études présentées dans cette section sont le fruit des recherches du Dr Yie Liu (Liu et al., 2000) et du Dr Fabio Pucci (Pucci et al., 2013), étudiants au doctorat dans le laboratoire avant mon arrivée. Leurs recherches forment les fondations de mon projet de doctorat.

Génération de cellules ES déficientes en télomérase

La génération de cellules ES déficientes en télomérase a été faite en remplaçant trois des sept motifs spécifiques de la télomérase par une construction d'ADN contenant le gène

de résistance à la néomycine (Neo). Des cellules embryonnaires E14 ont été électroporées avec la construction d'intérêt qui a pu s'insérer dans certains clones via recombinaison homologue. Après sélection des clones résistants au G418, une PCR et un southernblot ont été faits afin de valider les clones (Liu et al., 2000). À des passages avancés (autour de passage 50), les télomères sont très courts et le signal — bien qu'hétérogène par Q-FISH — est absent de certains télomères. On observe également des fusions chromosomiques et de l'instabilité génomique (figure 3 de (Liu et al., 2000)). Pour faciliter la clarté, le clone E14 B5, qui a été validé *Tert*^{-/-} a été utilisé pour l'étude du Dr Fabio Pucci et la mienne. Cette lignée clonale au passage avancé (autour de 50), sera simplement appelée « cellules *Tert*^{-/-} ».

Défaut de différenciation des cellules *Tert*^{-/-}

Pour sa thèse de doctorat, Dr Fabio Pucci s'est intéressé aux caractéristiques fondamentales des cellules souches : la pluripotence et la différenciation. Il a testé la capacité des cellules *Tert*^{-/-} à se différencier en les comparant à des cellules ES de type sauvage (wild-type, WT).

Pour cela, il a généré des cellules ES WT ou *Tert*^{-/-} portant le gène de la GFP sous le contrôle du promoteur de pluripotence *Pou5f1/Oct4*. Cette technique permet notamment de suivre la différenciation des cellules par cytométrie de flux et d'avoir des résultats précis. Lorsqu'elles sont indifférenciées (pluripotentes) et donc cultivées dans un milieu enrichi en LIF, les cellules expriment fortement la GFP. En revanche, des cellules différenciées n'exprimeront plus la GFP.

Pour induire la différenciation, le milieu « LIF » est remplacé pendant 6 jours par un milieu supplémenté en ATRA : cette durée est suffisante pour permettre une différenciation stable des cellules ES sauvage. D'ailleurs, la stabilité de la différenciation est estimée en

remplaçant le milieu « ATRA » après 6 jours, par un milieu « LIF » pendant 6 autres jours : les cellules sauvages ne répondent pas aux signaux de pluripotence générés par le LIF et demeurent différenciées (Figure 1.1-9 ; p50).

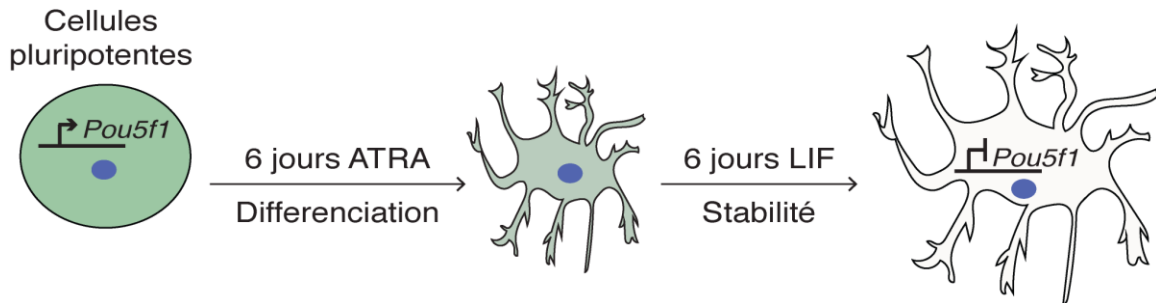


Figure 1.1-9. Essai de différenciation

Cet essai est utilisé afin de tester le potentiel de différenciation des cellules ES. Cette figure a été adaptée de Criqui et al., 2020 (Criqui et al., 2020).

Lors de ses expériences, Dr Fabio Pucci a décrit un défaut de différenciation des cellules *Tert*^{-/-}, qui se traduit par une altération de la répression des gènes de pluripotence (Pucci et al., 2013). Il a également remarqué une diminution de la méthylation de l'ADN, suggérant qu'un mécanisme épigénétique pourrait expliquer le défaut de différenciation des cellules ES *Tert*^{-/-}.

Le travail du Dr Fabio Pucci a mis en évidence un élément important du vieillissement : le raccourcissement des télomères impacte directement la capacité de différenciation des cellules souches. Comme la dégénérescence des cellules souches représente une part importante du déclin dû à l'âge, j'ai décidé de m'attarder davantage sur ce problème, en essayant de décortiquer les mécanismes derrière ce défaut de différenciation. Mes travaux sont présentés dans les chapitres 2 et 3 de ce manuscrit.

Chapitre 2. L'altération de la longueur des télomères perturbe la différenciation des cellules souches à travers des modifications épigénétiques

2.1. Auteurs, contributions et conflits d'intérêts

Mélanie Criqui

Conceptualisation, analyse, validation, investigation, visualisation, méthodologie

Pas de conflit d'intérêts déclaré

Aditi Qamra

Traitement des données, logiciel, analyse, validation, investigation, visualisation et méthodologie.

Pas de conflit d'intérêts déclaré.

Participation égale avec Tsz Wai Chu.

Tsz Wai Chu

Conceptualisation, logiciel, analyse, validation, investigation, visualisation et méthodologie.

Pas de conflit d'intérêts déclaré.

Participation égale avec Aditi Qamra.

Monika Sharma

Validation, investigation, méthodologie.

Pas de conflit d'intérêts déclaré.

Julissa Tsao

Analyse, supervision, validation, investigation, visualisation, révision de l'écriture du manuscrit.

Pas de conflit d'intérêts déclaré.

Danielle A Henry

Validation, investigation

Pas de conflit d'intérêts déclaré.

Dalia Barsyte-Lovejoy

Conceptualisation, méthodologie, révision d'écriture du manuscrit.

Pas de conflit d'intérêts déclaré.

Cheryl H Arrowsmith

Ressources, supervision, financement, méthodologie.

Pas de conflit d'intérêts déclaré.

Neil Winegarden

Ressources, supervision, méthodologie, administration du projet.

Pas de conflit d'intérêts déclaré.

Mathieu Lupien

Ressources, supervision, financement, méthodologie.

Pas de conflit d'intérêts déclaré.

Lea Harrington

Conceptualisation, Ressources, validation des données, analyses, supervision, financement, méthodologie, administration du projet.

Pas de conflit d'intérêts déclaré.

2.2. Référence de publication

Criqui, M., Qamra, A., Chu, T.W., Sharma, M., Tsao, J., Henry, D., Barsyte-Lovejoy, D., Arrowsmith, C. H., Winegarden, N., Lupien, M., et al. (2020). Telomere dysfunction cooperates with epigenetic alterations to impair murine embryonic stem cell fate commitment. *Elife*.

2.3. Résumé traduit en français

La relation qui existe entre les perturbations épigénétiques et le dysfonctionnement des télomères est toujours une question d'actualité. Nous avons précédemment montré que le dysfonctionnement des télomères entraîne une instabilité de la différenciation des cellules souches embryonnaires murines (mESC). Ce défaut de différenciation s'accompagne de perturbations de la méthylation de l'ADN et de la triméthylation de l'histone H3K27 au niveau des promoteurs des facteurs de pluripotence. Ici, nous avons établis que l'inhibition chimique du complexe Polycomb 2 (PRC2), une triméthyltransférase d'H3K27, exacerbe le défaut de différenciation des mESC, mais ceci uniquement lorsque les télomères sont très courts. Notamment, le suivi, au cours de la différenciation, de l'état de la chromatine des cellules aux télomères courts a montré que ces cellules retenaient un état de type pluripotent.

Contrairement à l'inhibition du PRC2 qui altère davantage la différenciation, l'inhibition de la déméthylation de H3K27me3 a permis une restauration partielle de la capacité de différenciation. Ces données révèlent une nouvelle relation d'interdépendance entre H3K27me3 et l'intégrité des télomères dans l'engagement des lignées de cellules souches, qui pourrait avoir des implications dans le vieillissement et le cancer.

2.4. Article

Telomere dysfunction cooperates with epigenetic alterations
to impair murine embryonic stem cell fate commitment

Authors and Affiliations

Mélanie Criqui¹, Aditi Qamra², Tsz Wai Chu^{1,3}, Monika Sharma⁴, Julissa Tsao⁴, Danielle Henry¹, Dalia Barsyte-Lovejoy⁵, Cheryl H. Arrowsmith⁵, Neil Winegarden⁴, Mathieu Lupien^{2,6} and Lea Harrington^{*1}

- 1- Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (IRIC), Département de biologie moléculaire, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada H3T 1J4
- 2- Princess Margaret Cancer Centre, University Health Network, University of Toronto, Department of Medical Biophysics, Toronto, ON Canada M5G 1L7
- 3- Present address: Clinical Research Unit, Montreal Neurological Institute and Hospital, McGill University Health Centre, Montréal, QC, Canada H3A 2B4
- 4- Princess Margaret Genomics Centre, Princess Margaret Cancer Centre, University Health Network, Toronto, ON, M5G 1L7
- 5- Structural Genomics Consortium, Princess Margaret Cancer Centre, University of Toronto, Department of Medical Biophysics, Toronto, ON, M5G 1L7
- 6- Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, ON, M5G 1L7

*Corresponding author: lea.harrington@umontreal.ca

[^]Denotes equal contribution

Abstract

The precise relationship between epigenetic perturbations and telomere dysfunction is an extant question. Previously, we showed that telomere dysfunction leads to differentiation instability in murine embryonic stem cells (mESCs) via perturbations in DNA methylation at pluripotency-factor promoters. Here, we uncovered that telomerase reverse transcriptase null (*Tert*^{-/-}) mESCs exhibit genome-wide perturbations in chromatin accessibility and gene expression during differentiation. These changes were accompanied by an increase of H3K27me3 globally, an altered chromatin landscape at the pluripotency gene promoter *Pou5f1/Oct4*, and impaired *Tert*^{-/-} mESC differentiation. Inhibition of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), an H3K27 trimethyltransferase, exacerbated the impairment in differentiation and pluripotency gene repression in *Tert*^{-/-} mESCs but not wild-type mESCs, whereas inhibition of H3K27me3 demethylation led to a partial rescue of the *Tert*^{-/-} phenotype. This data reveals a new interdependent relationship between H3K27me3 and telomere integrity in stem cell lineage commitment that may have implications in aging and cancer.

Introduction

Cellular processes crucial for development, tissue regeneration or cancer progression depend on the presence of cells that retain the capacity to commit to multiple lineages, called pluripotent or multipotent cells. Murine embryonic stem cells (mESCs) are pluripotent and can form all tissues in the body, whereas multipotent cells can form numerous, but not all, tissue types. The capacity of these cells to replenish committed cell lineages deteriorates with age due to intrinsic and extrinsic factors (Liu and Rando, 2011), Waterstrat and Van Zant 2009). For example, neuronal or melanocyte stem cell numbers

significantly decline with age, whereas aging of hematopoietic stem cells (HSCs) leads to aberrant lineage specification and defects in cell fate determination (Krauss and de Haan 2016, Maslov 2004, Molofsky et al. 2008). Thus, stem cell aging directly impacts tissue function through perturbations in the stem cell reservoir or the function of their lineage-committed progeny.

The gradual attrition of chromosome ends, called telomeres, is observed in human cells in culture and *in vivo*, and is an established hallmark of aging that is often referred to as the 'telomere clock' (Harley et al., 1992). Telomere erosion occurs in cells that lack sufficient activity of an enzyme called telomerase, whose catalytic core is comprised of a reverse transcriptase (TERT) and an integral RNA component (TR). Without telomerase, an inexorable decline in telomere reserves eventually leads to what is termed telomere uncapping. This uncapping elicits a DNA damage response that results in chromosome loss, rearrangements, and cell death or arrest (de Lange, 2018; Lazzarini-Denchi and Sfeir, 2016; Muraki et al., 2012b; Takai et al., 2003). Even in stem cells, the retention of low levels of *TERT* expression cannot fully compensate for the telomere shortening that occurs during DNA replication. For example, although mice retain higher levels of telomerase activity in most adult tissues compared to humans, telomerase activity levels do decrease with age and lead to telomere erosion (Flores et al., 2008). Mice heterozygous for the genes encoding the telomerase RNA (*Terc*) or telomerase reverse transcriptase (*Tert*) are haploinsufficient for telomere maintenance and, depending on the genetic background, eventually exhibit many of the stem cell defects associated with telomerase knockout strains (Harrington, 2012; Strong et al., 2011). Similar telomere erosion occurs in human stem cells during aging, despite the persistence of low levels of telomerase activity (Baerlocher et al., 2007; Lansdorp, 2008; Röth et al., 2003; Vaziri et

al., 1994b). Although a causal link between short telomeres and human aging is still under investigation, shorter telomeres are associated with many human disorders that include dyskeratosis congenita, aplastic anemia, lung fibrosis, and blood cancer (Adams et al., 2015; Armanios and Blackburn, 2012; Blackburn et al., 2015; Decottignies and d'Adda di Fagagna, 2011). These disorders are marked by failures in cell differentiation (Fu et al., 2018; Lo Sardo et al., 2017), and by stem cell depletion in the blood and other tissues (Bertuch, 2016).

Post-translational modifications added to DNA and histones that are inherited over cell divisions, known as epigenetic modifications, are tightly regulated in stem cells and play a crucial role in regulating cell fate. Many epigenetic alterations occur with age and are considered hallmarks of the aging process (Booth and Brunet, 2016). For example, DNA methylation patterns are altered during aging, whereby the genome becomes largely hypomethylated with hypermethylation at some loci (Krauss and de Haan, 2016). One contributing mechanism may be the downregulation of DNA methyltransferase (Dnmt) activity with age (Sun et al., 2014). Despite the finding that DNA hypomethylation does not affect stem cell self-renewal capacity nor the expression of pluripotency genes (Beerman and Rossi, 2015), *Dnmt3a* knock-out mice exhibit an increase in HSC self-renewal and a predisposition to hematopoietic malignancies (Mayle et al., 2015). Changes in the abundance of other epigenetic modifications, such as decreased tri-methylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27me3) is associated with and may help drive the onset of senescence (Ito et al., 2018b; Shah et al., 2013). Conversely, an increase of H3K27me3 in HSCs and muscle stem cells observed in aged mice is suggested to restrict stem cell potential via a differentiation bias of older stem cells (Brunet and Rando, 2017b). Given the role of epigenetics in stem cell differentiation and consequently in tissue maintenance,

these and other findings have led to the notion that epigenetic alterations represent another age-associated clock (Hannum et al. et al., 2013; Horvath, 2013a; Jung and Pfeifer, 2015; Wilson and Jones, 1983). These age-associated changes in DNA methylation patterns may intersect a broad array of health-related issues, ranging from Alzheimer's disease to circadian rhythm disruption to lactose intolerance (Labrie et al., 2016; Oh et al., 2016, 2018, 2019).

A major question that remains unresolved is the role of histone methylation in the epigenetic regulation of cell fate in cells with dysfunctional telomeres. In mice, loss of telomere integrity affects chromatin throughout the telomeric and sub-telomeric DNA (Benetti et al., 2007, 2008; Gonzalo et al., 2006). More recently, roles distal to the telomere have been described for the telomere shelterin subunit, Rap1, in mice and in budding yeast (Marión et al., 2017; Platt et al., 2013a; Song and Johnson, 2018b; Vaquero-Sedas and Vega-Palas, 2018). There are other consequences for cell fate beyond senescence, as telomere dysfunction is known to impair stem cell differentiation in numerous contexts (Harrington and Pucci, 2018). For example, eroded telomeres in mESCs impair their ability to fully consolidate a differentiated phenotype in response to all-trans retinoic acid (ATRA) (Pucci et al., 2013). Repression of the pluripotency-promoting factors *Nanog* and *Pou5f1* (also known as *Oct4*) is impaired in late passage cells with critically short telomeres upon differentiation, compared to wild-type (WT) or earlier passage telomerase-deficient (*Tert*^{-/-}) mESCs with longer telomeres. This impairment is associated with a reduction in DNA methylation at the *Nanog* promoter (Pucci et al., 2013). The impaired repression of pluripotency genes in mESCs with dysfunctional telomeres is reversible, and telomere rescue via *Tert* reintroduction, or ectopic expression of *Dnmt3b*, elicits a partial reversal of this differentiation defect (Pucci et al., 2013). Although the ability of critically eroded

telomeres to induce these changes is unexpected, the consequences of these epigenetic alterations upon cell fate commitment was already well known (Kraushaar and Zhao, 2013; Nativio et al., 2018; Reddington et al., 2013; Smith et al., 2010).

Since the repression of *Nanog* and *Pou5f1* during differentiation rely upon H3K27me3 deposition via the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) (Obier et al., 2015; Villasante et al., 2011), and Dnmt3 and PRC2 are critical to mESC neural differentiation (Liu et al., 2018), we investigated whether perturbation of H3K27me3 levels, genome-wide, could further impact the cell differentiation defect associated with dysfunctional telomeres. We found a striking ability of chemical modulators of histone H3K27 methylation to specifically affect the fate of mESCs with short telomeres, with little effect on WT mESCs. We suggest that telomere status and histone methylation may be more linked than previously appreciated.

Results

Murine ESCs with critically short telomeres fail to consolidate a differentiated state.

To address the role of telomere shortening on stem cell differentiation, we analyzed late-passage (passage 40 or greater) *Tert*^{-/-} mESCs that possess significantly shorter telomeres and an increase in end-to-end fusions compared to WT mESCs (Figure 2-1—figure supplement 1A, B) (Liu et al., 2000). Despite this telomere instability, and consistent with our previously reported results, there was no observable difference in population doubling time between the lines (Pucci et al., 2013) (data not shown). In WT and *Tert*^{-/-} mESCs, we assessed stem cell differentiation by the withdrawal of Leukemia Inhibitory Factor (LIF) and the induction of cell differentiation with 5 μ M all-trans retinoic acid (ATRA)

for 6 days (6DA; blue) (Figure 2-1A). The stability of the differentiated state, i.e. a refractory response to LIF re-addition, was also evaluated upon a further 6 days in LIF-containing media that lacked ATRA (6DA + 6DL; orange) (Figure 2-1A). Both mESC lines contained a green fluorescent protein (GFP) reporter placed under the transcriptional control of the pluripotency gene regulator *Pou5f1*, which enabled their sorting into distinct pluripotent (GFP+) or lineage-committed (GFP-) sub-populations (Figure 2-1A). As expected after induction of differentiation (6DA), WT mESCs went from a GFP+ state (green) to a GFP- state (blue) and remained so even after LIF re-addition (orange) (Figure 2-1B). In contrast, *Tert*^{-/-} mESCs failed to fully repress the GFP reporter when treated with ATRA, and this defect became more pronounced after re-addition of LIF-containing media (Figure 2-1B). The failure of *Tert*^{-/-} mESCs to repress *Pou5f1*-GFP during differentiation was also reflected in higher endogenous levels of *Pou5f1* and *Nanog* mRNA (Figure 2-1C and Figure 2-1D). GFP cell-sorting and further analysis of other pluripotency markers showed that GFP+ sorted sub-populations of *Tert*^{-/-} mESCs retained a higher level of pluripotency gene expression after ATRA (SA), or LIF re-addition (SL) (Figure 2-1—figure supplement 1C). These results are consistent with previous reported observations in WT or *Tert*^{-/-} mESCs that did not contain the *Pou5f1*-GFP reporter (Pucci et al., 2013).

We also found that gamma-irradiation up to 5 Gy did not affect the GFP status of WT mESCs grown in LIF or after differentiation, which argues against a general effect of DNA damage on differentiation commitment under these conditions (Figure 2-1—figure supplement 1F-H). In contrast, *Tert*^{-/-} mESCs, although slightly less radio-sensitive than WT mESCs, exhibited a further defect in differentiation commitment (Figure 2-1—figure supplement 1E). These results suggest that DNA damage may enhance the impact of a critically eroded telomeres, but that the effect is not merely attributable to DNA damage

per se.

Compromised telomere integrity alters gene expression profiles.

Differentiation into a specific cell type is highly context-dependent, and the ability of ATRA to affect gene expression during mESC differentiation *in vitro* has been well documented (Simandi et al., 2010). To further query the lineage commitment of *Tert*^{-/-} mESCs, we examined the expression pattern of 74 lineage-specific genes and 5 pluripotency genes using a commercially available quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) array specific to murine cell lineages (Figure 2-1E, see Materials and Methods). Euclidean clustering and principal component analysis of the transcriptional data revealed heterogeneity between the cell populations, however a few key observations emerged. First, as anticipated the transcriptional profiles between undifferentiated WT and *Tert*^{-/-} mESCs were more alike than other differentiated cell populations (Figure 2-1E, columns 1 and 2, Figure 2-1—figure supplement 1D [circle 1]). Second, in keeping with the differences observed in pluripotency gene expression profiles, WT mESCs treated with ATRA formed a distinct group relative to ATRA-treated *Tert*^{-/-} mESCs (Figure 2-1E, column 3 and 5-7, Figure 2-1—figure supplement 1D [compare blue and orange triangles with circles 2, 3]). Third, within the populations treated with ATRA and LIF (6DA + 6DL) (Figure 2-1E, columns 8-11), there was a difference between *Tert*^{-/-} mESCs that were sorted for GFP- or GFP+ status (Figure 2-1E, column 4, Figure 2-1 —figure supplement 1D [circles 2 and 3]). These data suggest there are at least two distinct sub-populations within *Tert*^{-/-} mESCs with ATRA, or ATRA and LIF: GFP+ populations in which pluripotency genes fail to be repressed (Figure 2-1 —figure supplement 1C), and GFP- populations whose transcriptional profiles differ from GFP- WT mESCs (Figure 2-1E, compare columns 3, 8

versus 4-6). In summary, the transcriptional profiles in *Tert*^{-/-} mESCs after differentiation induction are consistent with the conclusion that some cells are unable to attain and maintain a differentiated state.

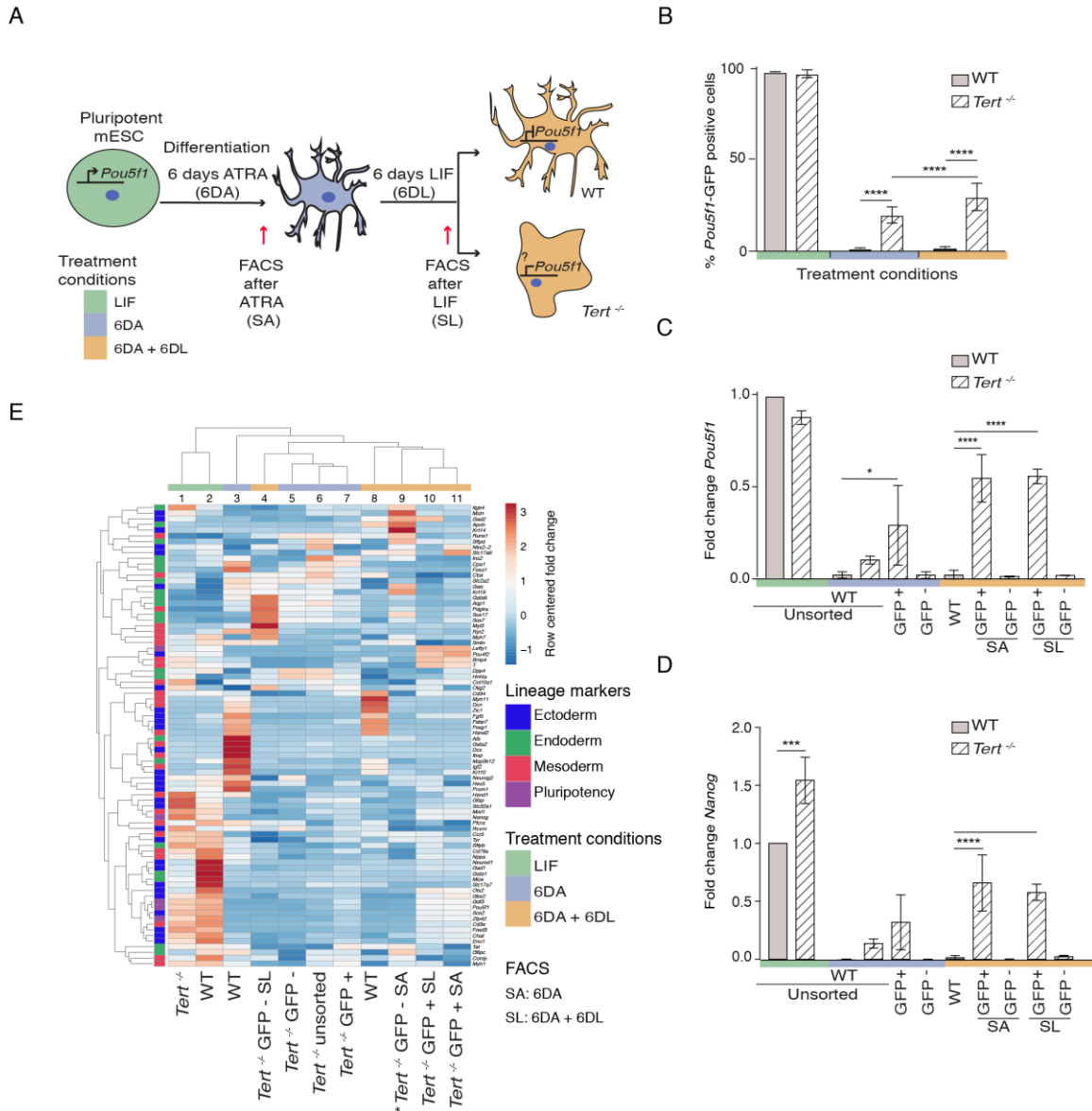


Figure 2-1 Murine ESCs with short telomeres fail to complete differentiation commitment and to suppress pluripotency gene expression.

(A) Schematic representation of the experimental design. Wild-type (WT) and *Tert*^{-/-}

mESCs transduced with *Pou5f1* -GFP were maintained in a pluripotent state in the presence of leukemia inhibitory factor (LIF). Murine ESCs were next induced to differentiate by all-trans retinoic acid (ATRA) treatment for 6 days, followed by re-seeding in LIF-containing media for an additional 6 days to assess their ability to remain stably differentiated (GFP-). The GFP status of mESCs was monitored by flow cytometry (FACS) and sorted samples were collected at each experimental step: (i) LIF (pluripotent), (ii) 6 days ATRA (6DA) and (iii) 6 days ATRA followed by 6 days LIF (6DA + 6DL). SA: mESCs sorted after 6DA. SL: mESCs sorted after 6DA + 6DL (B) FACS analysis of *Pou5f1*-GFP reporter expression in mESCs at each experimental step. Data are represented as mean \pm SD. Data represents n=3 biological replicates: for n=1 and n=2 biological replicates, there were 3 technical replicates; for the n=3 biological replicate, there were 2 technical replicates, for a total of 8 samples. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, * (p<0.0332), ** (p<0.0021), *** (p<0.0002), **** (p<0.0001). Color bars underneath the x-axis represent the same treatment groups as indicated in (A). (C, D) Assessment of relative fold change in *Pou5f1* and *Nanog* expression (WT pluripotent set as 1) by RT-qPCR, normalized to 5 housekeeping genes: *Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Gusb* and *Hsp90ab1*. Data are represented as mean \pm SD (n=3). Statistical analysis was performed using ordinary one-way ANOVA, * (p<0.0332), ** (p<0.0021), *** (p<0.0002), **** (p<0.0001). Color bars underneath the x-axis represent the same treatment groups as indicated in (A). (E) Heatmap representation of relative fold change in gene expression of 77 lineage-specific markers (endoderm, mesoderm and ectoderm) and 5 pluripotency genes from the Qiagen Mouse Cell Lineage Identification qPCR Array (n=3 except for one sample marked * where n=2, see legend Figure 2-1D). Relative fold change in gene expression was calculated using WT pluripotent mESC (2 days in LIF) as control (fold change = 1) and normalized to 5 housekeeping genes: *Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Gusb* and

Hsp90ab1. The color scale represents the row centered fold change values (blue = lower, white = intermediate, red = higher). Euclidean distance clustering and complete linkage was applied to visualize similarity between samples. See Materials and Methods for details.

Inhibition of PRC2 specifically impairs differentiation in mESCs with dysfunctional telomeres.

Telomere dysfunction in mESCs results in reduced expression of the *de novo* DNA methyltransferases 3a and 3b (Dnmt3a/3b) (Pucci et al., 2013). As we demonstrated previously using an antibody that we validated for its specificity against H3K27me₃, global H3K27me₃ levels were also upregulated in *Tert*^{-/-} mESCs (Pucci et al., 2013) (Figure 2-2—figure supplement 1A). While DNA methylation is known to assist in the recruitment of histone methyltransferases, and H3K27me₃ serves an essential role during differentiation (Jones and Wang, 2010; Margueron and Reinberg, 2011), it was unclear if the alterations in H3K27me₃ levels in *Tert*^{-/-} mESCs impinged directly on differentiation commitment. We thus probed the epistatic relationship between telomere dysfunction and H3K27me₃ deposition using chemical inhibitors of the H3K27 methyltransferase PRC2. We tested three different inhibitors of the PRC2 complex that targeted two of its core subunits: Enhancer of zeste homolog, Ezh2 (UNC1999, GSK343) or Embryonic ectoderm development, Eed (A395) (He et al., 2017; Konze et al., 2013; Verma et al., 2012). UNC2400 and A395N are structurally related to UNC1999 and A395 respectively, but exhibit a reduced inhibition activity against PRC2 (He et al., 2017; Konze et al., 2013) (for further details refer to Materials and Methods). These inhibitors were chosen because of the extensive biochemical and *in vivo* data to establish their specificity for their cognate

substrates (He et al., 2017; Konze et al., 2013; Shi et al., 2017). Although *Ezh2* mRNA was slightly lower in undifferentiated *Tert*^{-/-} ESCs compared with WT ESCs, *Ezh2*, *Suz12*, and *Eed* continued to be expressed after differentiation at levels that did not significantly differ from WT ESCs (Figure 2-2—figure supplement 1B). The other active orthologue of *Ezh2*, *Ezh1*, was not detected in mESCs (data not shown). Thus, we presume the major target of PRC2 inhibition in this cellular context is *Ezh2* (this presumption was also tested genetically; see below).

Since these inhibitors had previously been studied primarily in human cell lines (He et al., 2017; Konze et al., 2013; Verma et al., 2012), we first optimized and selected the concentration of PRC2 inhibitors that did not affect the overall population doubling rate of either WT or *Tert*^{-/-} pluripotent mESCs after 2 days in LIF media (data not shown). Using these optimized concentrations, we incubated mESCs with each compound throughout the differentiation assay, over a total period of 14 days (Figure 2-2—figure supplement 1C; for further details refer to Materials and Methods). Western blot analysis showed that the active PRC2 inhibitors, but not their inactive analogues, reduced global H3K27me3 in WT and *Tert*^{-/-} mESCs (Figure 2A and Figure 2-2—figure supplement 1D). Irrespective of genotype, mESCs maintained in LIF or treated with ATRA (6DA) exhibited no significant alteration in the expression of *Pou5f1*-GFP upon treatment with PRC2 inhibitors or their inactive analogues, relative to DMSO-treated controls (Figure 2-2—figure supplement 1E). Therefore, we focused our subsequent analysis on cell populations treated for 14 days, after ATRA treatment and LIF re-exposure (6DA + 6DL).

We found that PRC2 inhibition led to a marked exacerbation of the differentiation defect in *Tert*^{-/-} mESCs. A significant increase in the percentage of GFP+ cells was observed in

Tert^{-/-} mESCs treated with PRC2 inhibitors for 14 days, compared with the inactive analogues or DMSO-treated cells (Figure 2B). The expression of endogenous *Nanog* mRNA or protein (Figure 2-2C, and Figure 2-2—figure supplement 1F, G), and other pluripotency gene markers such as *Gdf3*, *Lefty1* and *Zfp42* were also further increased relative to *Tert*^{-/-} mESCs treated with DMSO (Figure 2-2—figure supplement 1G). In contrast, WT mESCs exhibited no significant increase in the percentage of GFP+ cells after 14 days of inhibitor relative to DMSO treatment (Figure 2-2B) and differentiation induction of WT mESCs led to a sustained downregulation of pluripotency factor expression (Figure 2-2C, Figure 2-2—figure supplement 1F, G). As a control for the possible effects of exposure time, compounds added to undifferentiated WT or *Tert*^{-/-} mESCs for up to 6 days did not alter the percentage of GFP+ cells (data not shown). These results demonstrate that the differentiation consolidation of *Tert*^{-/-} mESCs, but not WT mESCs, was markedly affected by PRC2 inhibition.

To further examine the impact of PRC2 inhibitors on transcription, RNA was isolated from cells treated with DMSO or inhibitors throughout differentiation, and subjected to qPCR analysis using the same cell lineage array as above. Heatmap and principal component analysis showed that PRC2 inhibition also led to an alteration in the overall gene expression profiles in *Tert*^{-/-} mESCs after treatment with the PRC2 inhibitors GSK343, UNC1999 and A395 compared with their inactive analogues (UNC2400, A395N) or DMSO treatment alone (Figure 2-2D, Figure 2-2—figure supplement 1H). These data further establish that PRC2 inhibition elicited alterations in the transcriptional program that accompanied the defect in differentiation commitment.

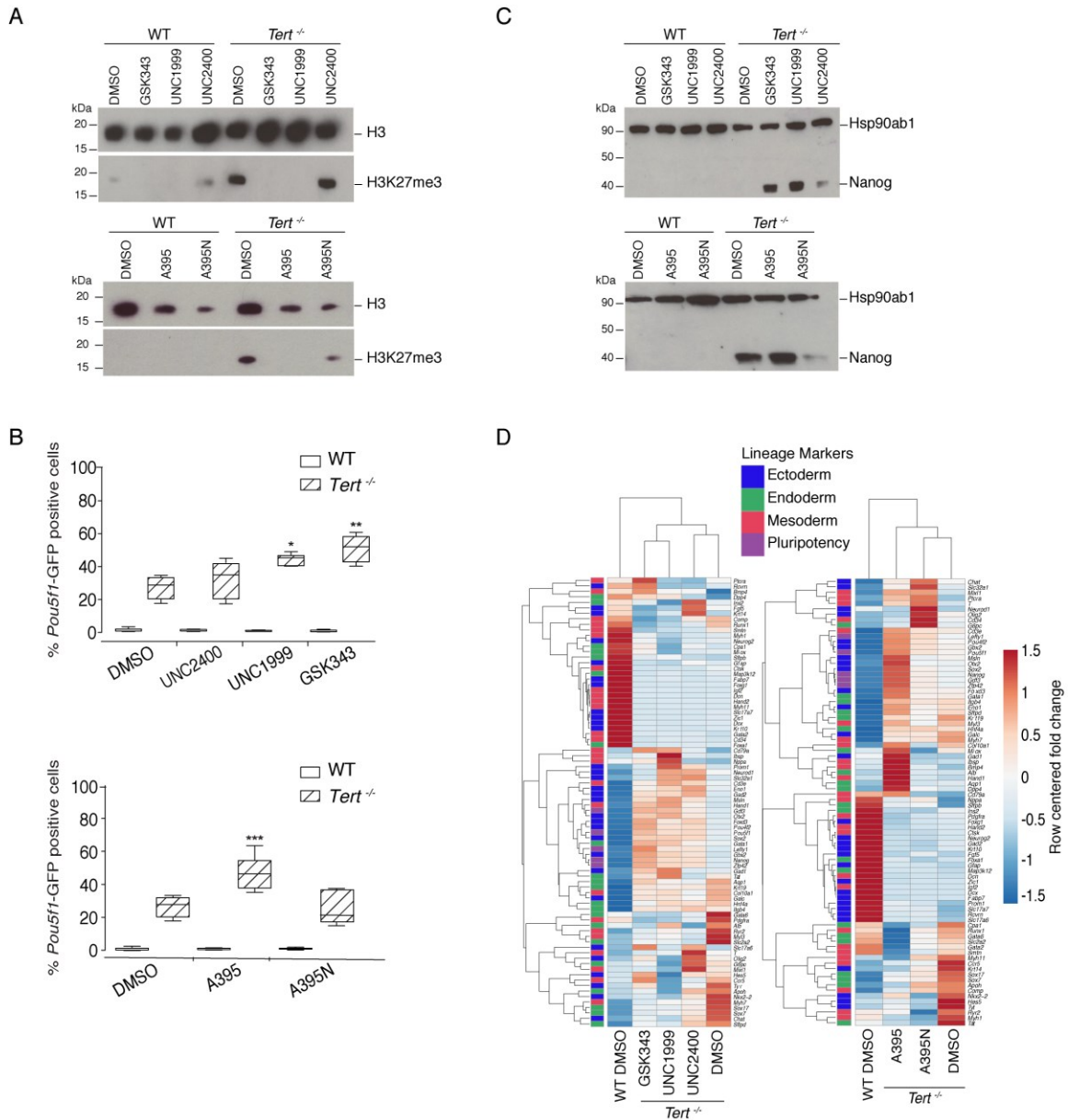


Figure 2-2. Murine ESCs with short telomeres exhibit altered H3K27me3 levels and incomplete differentiation that is exacerbated by PRC2 inhibition.

(A) Western blot analysis of H3K27me3 levels in WT and *Tert*^{-/-} mESCs, in the presence of active PRC2 inhibitors (GSK343, UNC1999 and A395), their corresponding controls (UNC2400 and A395N), or the vehicle-only control DMSO. H3 was used as a loading control. Representative blot from n=3 biological replicates (see Figure 2-2— figure supplement 1D for quantification of additional representative blots). (B) FACS analysis of

Pou5f1-GFP reporter expression in mESCs. Data are represented as mean \pm SD. Data represents n=3 biological replicates: for n=1 and n=2 biological replicates, there were 3 technical replicates; for the n=3 biological replicate, there were 2 technical replicates, for a total of 8 samples. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, * (p<0.0332), ** (p<0.0021), *** (p<0.0002), **** (p<0.0001). Graphs were generated using the online tool BoxPlotR (<http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/>). (C) Western blot analysis of Nanog protein expression. Hsp90ab1 was used as a loading control. Representative blot from n=3 biological replicates (see Figure 2-2—figure supplement 1F). (D) Heatmap representation of relative fold change in gene expression of 77 lineage-specific markers (endoderm, mesoderm and ectoderm) and 5 pluripotency genes from the Qiagen Mouse Cell Lineage Identification qPCR Array (n=3). Gene expression analysis was performed on 6DA + 6DL mESCs treated with active PRC2 inhibitors (GSK343, UNC1999 and A395), the inactive control compounds (UNC2400 and A395N) or DMSO. Relative fold change in gene expression was calculated using *Tert*^{-/-} DMSO as control (fold change = 1) and normalized to 5 housekeeping genes: *Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Gusb* and *Hsp90ab1*. The color scale represents the row centered fold change values (blue = lower, white = intermediate, red = higher). Euclidean distance clustering and complete linkage was applied to visualize similarities between samples.

Inhibition of the H3K27me3 eraser Jmjd3 partially rescues the differentiation impairment of *mTert*^{-/-} mESCs.

Previously, we showed that global DNA hypomethylation in *Tert*^{-/-} mESCs, and the reduced hypomethylation of the *Nanog* and *Pou5f1* promoters could be partially alleviated by ectopic expression of *Dnmt3b* (Pucci et al., 2013). This capacity for phenotype

reversibility prompted us to examine whether inhibition of the JmjC-containing protein and H3K27 demethylase Kdm6b (also known as Jmjd3) might also alleviate the differentiation impairment in *Tert*^{-/-} mESCs. We first assessed *Kdm6b* and *Kdm6a* (UTX) RNA expression, and found that mRNA levels were comparable in *Tert*^{-/-} ESCs and WT ESCs (Figure 2-3—figure supplement 1A, B). Wild-type and *Tert*^{-/-} mESCs were treated with the Kdm6a/b inhibitor GSKJ4, or its inactive analogue GSKJ5 (Kruidenier et al., 2012; Li et al., 2018), under the same experimental conditions described above (Figure 2-3—figure supplement 1C). Despite the modest and statistically insignificant impact of GSKJ4 treatment on global H3K27me3 levels (Figure 2-3A and Figure 3—figure supplement 2-1D), there was a significant reduction in the GFP⁺ population in *Tert*^{-/-} mESCs compared with DMSO or GSKJ5 treatment, and no observable impact on WT mESCs (Figure 2-3B). Quantitative PCR gene expression and western blot analysis showed that *Pou5f1*, *Nanog* mRNA and protein, and other endogenous pluripotency markers were modestly repressed in GSKJ4-treated *Tert*^{-/-} mESCs relative to DMSO-treated cells (Figure 2-3C, and Figure 2-3—figure supplement 1E, F). Heatmap and principal component analysis revealed that GSKJ4 treatment altered the overall transcriptional profile of *Tert*^{-/-} mESCs (Figure 2-3D, Figure 2-3—figure supplement 1G), whereas GSKJ5 and DMSO-treated cells were more similar to each other. GSKJ4 also has a lower affinity for other JmjC-containing proteins, including the H3K4 di- and tri-demethylase encoded by *Kdm5b* (Heinemann et al., 2014a). These data suggest that the differentiation instability of *Tert*^{-/-} mESCs can be partially rescued by inhibition of the molecular targets of GSKJ4.

We found that the differentiation instability of *Tert*^{-/-} mESCs could be partially rescued by inhibition of H3K27 de-methylation. This finding would be expected if, as we observed, PRC2 inhibition exacerbated the differentiation stability of *Tert*^{-/-} mESCs. In addition, the

opposing roles of these gene products on H3K27me3 are consistent with previously published effects of PRC2 and Kdm6a/b inhibitors on human cells (Konze et al., 2013; Kruidenier et al., 2012). To further genetically test these findings, we performed a CRISPR-Cas9 targeting of *Ezh2* or *Kdm6b* in mESCs (Figure 2-3—figure supplement 1H, I). It is known that clonal WT mESCs deleted for *Ezh2* or *Kdm6b* exhibit marked differentiation defects (Chamberlain et al., 2008; Lavarone et al., 2019; Sen et al., 2008). Thus, to improve the ability to detect differences between WT and *Tert*^{-/-} mESCs, we deleted *Ezh2* or *Kdm6b* using CRISPR-Cas9 and analysed the bulk, non-clonal population. In these heterogeneous populations, in which a fraction of cells were disrupted for *Ezh2* or *Kdm6b*, H3K27me3 levels were modestly altered (Figure 2-3—figure supplement I, J, K). Neither knockout population exhibited a difference in the differentiation capacity of WT mESCs, but in *Tert*^{-/-} mESCs *Ezh2* knockdown led to a statistically significant impairment in differentiation (Figure 2-3—figure supplement 1L). Conversely, *Kdm6b* knockdown partially alleviated this defect (Figure 2-3—figure supplement 1L). These genetic data further bolster our findings using chemical inhibitors of *Ezh2* and *Kdm6b*.

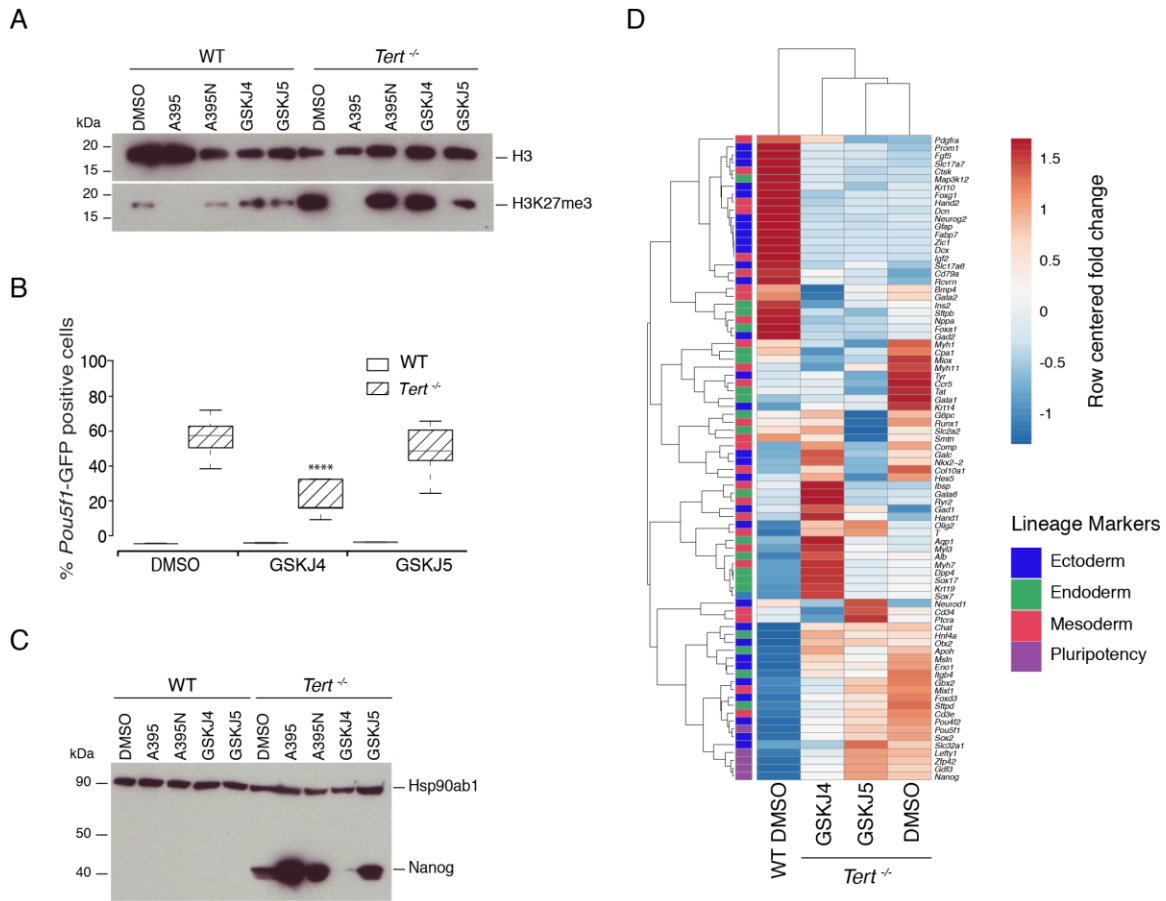


Figure 2-3. Inhibition of Jmjd3/UTX demethylase activity partially rescues cell fate commitment.

Inhibition of Kdm6a/b histone demethyltransferase activity partially rescues cell fate commitment. **(A, C)** Western blot analysis of H3K27me3 or Nanog protein levels in WT and *Tert*^{-/-} mESCs, in the presence of DMSO only, GSKJ4 or GSKJ5. For clarity, no image cropping was performed between lanes and the blot includes an independent replicate of the A395/A395N treatments shown in Figure 2-2. Hsp90ab1 and H3 are used as loading control for Nanog and H3K27me3 respectively. Representative blots from n=3 biological replicates. Quantification of western blots are shown in Figure 2-3—figure supplement 1 D, G. **(B)** FACS analysis of *Pou5f1*-GFP reporter expression in mESCs. Data are represented as mean \pm SD (n=3 biological replicates each with 3 technical replicates).

Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, * ($p < 0.0332$), ** ($p < 0.0021$), *** ($p < 0.0002$), **** ($p < 0.0001$). **(D)** Heatmap representation of relative fold change in gene expression of 77 lineage-specific markers (endoderm, mesoderm and ectoderm) and 5 pluripotency genes from the Qiagen Mouse Cell Lineage Identification qPCR Array ($n=3$ biological replicates). Gene expression analysis was performed on 6DA + 6DL mESCs treated with the Kdm6a/b inhibitor (GSKJ4), the inactive molecule (GSKJ5) or DMSO control. Relative fold change in gene expression was calculated using *Tert*^{-/-} DMSO as control (fold change = 1) and normalized to 5 housekeeping genes: *Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Gusb* and *Hsp90ab1*. The color scale represents the row centered fold change values (blue = lower, white = intermediate, red = higher). Euclidean distance clustering and complete linkage was applied to visualize similarity between samples.

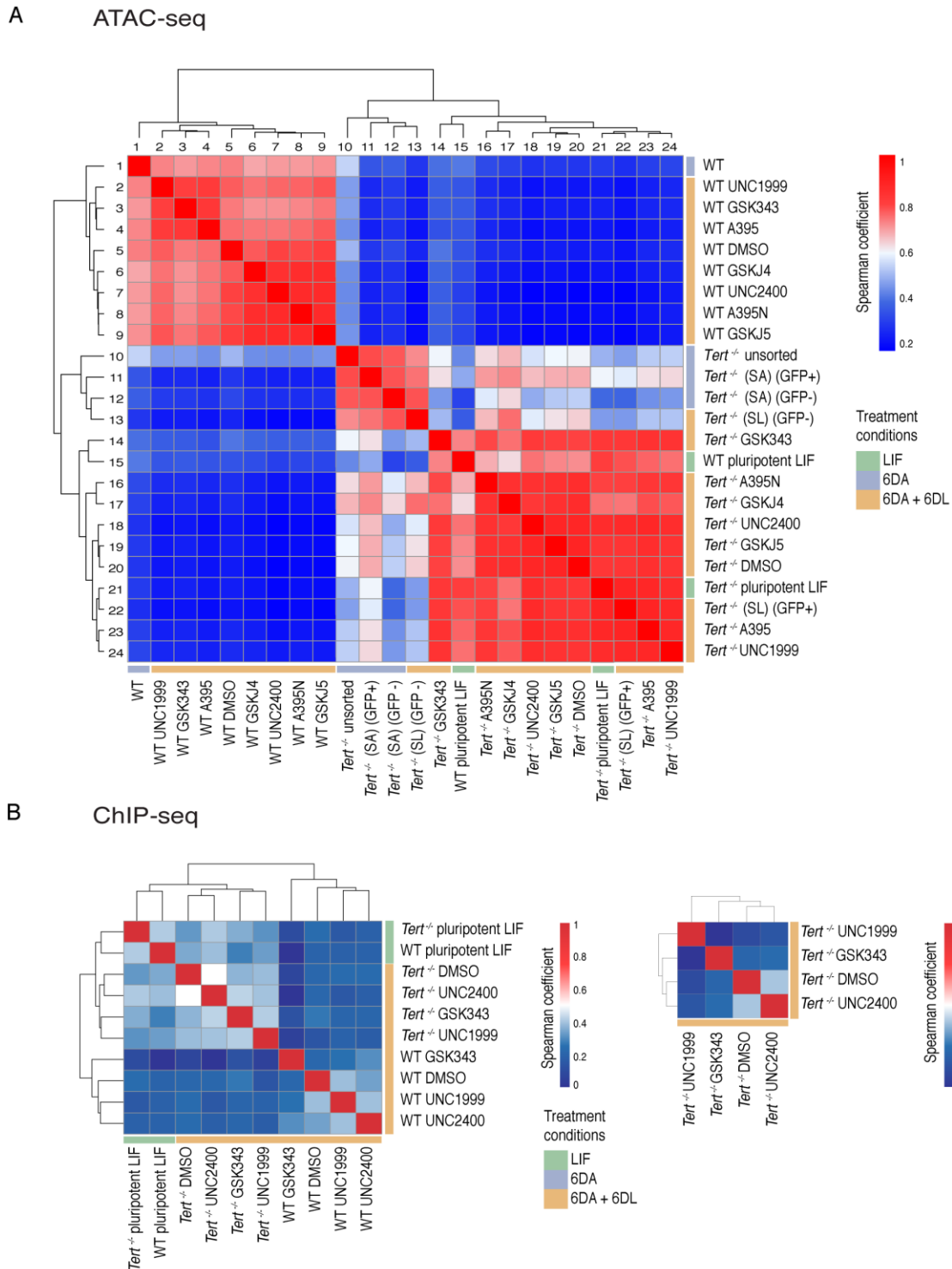
Telomere dysfunction remodels the chromatin accessibility landscape of differentiated cells toward a pluripotent-like state

The differentiation impairment and transcriptional alterations observed in *Tert*^{-/-} mESCs begets the question of whether there is a more global alteration of the chromatin landscape in mESCs with telomere dysfunction. It is known that global epigenetic remodelling is required for embryonic stem cell differentiation, whereby a generally open hyperdynamic chromatin state transitions to a more stable and closed state (Chen and Dent, 2014; Gaspar-Maia et al., 2011; Wang et al., 2015; Zhu et al., 2013). To assess how the chromatin accessibility landscape was remodelled during differentiation in WT and *Tert*^{-/-} mESCs, we performed ATAC (Assay for Transposase-Accessible Chromatin)-seq on cells isolated at various steps throughout the differentiation treatment, with or without compounds that modulated PRC2 or histone demethylase activity (see Materials and Methods for details).

Spearman correlation between ATAC-seq profiles of mESC populations highlighted a distinct chromatin accessibility landscape in differentiated *Tert*^{-/-} mESCs compared to WT mESCs. In differentiated WT mESCs, there was a high degree of similarity between all samples with or without treatment with PRC2 or Kdm6a/b inhibitors (Figure 2-4A; samples 1-9). In contrast, undifferentiated WT mESCs more closely resembled *Tert*^{-/-} mESCs (Figure 2-4A; samples 10-24). Of these latter *Tert*^{-/-} mESC chromatin accessibility profiles, the GSK343-treated cells were most similar to WT undifferentiated mESCs (Figure 2-4A; samples 14-15). This similarity of the ATAC-seq profile to undifferentiated *Tert*^{-/-} mESCs was also evident with PRC2 or Kdm6a/b inhibitor treatment (Figure 2-4A; samples 16-24). Consistent with the principal component analysis (Figure 2-1—figure supplement 1D), *Tert*^{-/-} mESCs treated with ATRA alone also differed from WT mESCs treated with ATRA (Figure 2-4A; compare samples 1 versus 10-12), and clustered with GFP- *Tert*^{-/-} mESCs (Figure 2-4A, sample 13). These data were consistent with visual inspection of the ATAC-seq profiles within the *Pou5f1* promoter, which showed a transition from high to low accessible chromatin signal intensity in WT mESCs but not in *Tert*^{-/-} mESCs (Figure 2-4—figure supplement 1A). This failure to repress chromatin accessibility was in keeping with the elevated and persistent expression of *Pou5f1* we observed in a subset of *Tert*^{-/-} mESCs. In summary, ATAC-seq analysis bolsters the conclusion that *Tert*^{-/-} mESCs failed to consolidate a differentiated phenotype, and that after LIF re-addition they adopt a distinct chromatin accessible landscape.

To test if the differences in chromatin accessibility were accompanied by differences in H3K27me3 recruitment, we performed chromatin immunoprecipitation using the validated H3K27me3 antibody followed by high throughput sequencing (ChIP-seq) on a selected subset of PRC2 inhibitors that were analyzed by ATAC-seq (Figure 2-4B, Figure 2-4—

figure supplement 1B). In keeping with our ATAC-seq results, Spearman analysis of the H3K27me3 ChIP-seq profiles between undifferentiated WT and *Tert*^{-/-} mESCs showed they were similar (Spearman coefficient = 0.4), and possessed little H3K27me3 at the *Pou5f1* promoter (Figure 2-4B, left panel, Figure 2-4—figure supplement 1B). After ATRA and LIF treatment in the presence of the PRC2 inhibitors GSK343 or UNC1999, the WT mESCs clustered separately from *Tert*^{-/-} mESCs, in keeping with the ATAC-seq and transcriptional analysis. Within the *Tert*^{-/-} mESCs, the two active PRC2 inhibitors clustered together (GSK343, UNC1999) and DMSO and the inactive inhibitor UNC2400 formed a different cluster (Figure 2-4B, left and right panels). The assigned ChIP-seq reads obtained from these differentiated mESC populations were insufficient to enable quantitation of chromatin-associated H3K27me3 at specific loci, however visual examination of the *Pou5f1* promoter revealed that differentiated *Tert*^{-/-} mESCs displayed a different pattern of H3K27me3 compared to WT mESCs (Figure 2-4—figure supplement 1B), including subtly increased or broadened peaks, and a few regions with reduced H3K27me3 as we noted previously (region 35642672-35642810) (Pucci et al., 2013). Overall, this data supports our ATAC-seq results that the chromatin landscape is notably altered in *Tert*^{-/-} mESCs, and that the PRC2 inhibitors affected the H3K27me3 pattern. This apparent compensatory upregulation of H3K27m3 methylation at the *Pou5f1* promoter in *Tert*^{-/-} mESCs may partially explain why *Tert*^{-/-} mESCs are so exquisitely sensitive to PRC2 inhibition compared to WT mESCs (see below).



and WT mESCs assessed throughout differentiation, with or without the addition of PRC2 or Kdm6a/b inhibitors, as indicated (a minimum of 2 biological replicates were analysed per sample; see Materials and Methods and Source Data files for Figure 2-4). **(B)** Spearman correlation analysis of called peaks following H3K27me3 ChIP-seq analysis of the indicated samples. At left, the data is shown for 1 replicate, and at right, for a subset of samples in which 2 biological replicates were analysed.

Discussion

The differentiation of mESCs, akin to tissue development *in vivo*, relies on chromatin remodelling. During this process, the precise regulation of DNA methylation and H3K27me3 are critical to the ability of stem cells to adopt a specific state (Jones and Wang, 2010; Margueron and Reinberg, 2011). Defects in chromatin organization occur during aging and it has been suggested that such changes in the stem cell compartment may potentially alter the differentiation programs and consequently impact cellular and organismal lifespan (Beerman and Rossi, 2015; Fairweather et al., 1987; Jung and Pfeifer, 2015). Despite these major advances, significant challenges remain in the determination of the mechanisms that contribute to age-related tissue decline. The present study revealed a close relationship between two aging hallmarks: telomere shortening and genome-wide epigenetic alterations. We showed that mESCs with critically short telomeres failed to consolidate a differentiated state after exposure to ATRA (Figure 2-5).

Further study is required to define the precise transcriptional and chromatin accessibility alterations in *Tert*^{-/-} mESCs in response to PRC2/Kdm6a/b inhibition. For example, although these inhibitor dosages had no impact on WT mESC differentiation capacity, we did not transcriptionally profile WT ESCs treated with compounds. Furthermore, although

overall perturbations in the chromatin landscape were evident in *Tert*^{-/-} mESCs, further ATAC-seq and CHIP-seq analysis would be needed to quantify the impact of PRC2 or Kdm6a/b inhibition on the chromatin accessibility or the density of H3K27me3 enrichment at specific pluripotency gene promoters or other loci. Despite these important considerations, there was a marked defect in pluripotency marker repression and differentiation commitment that was specific to *Tert*^{-/-} mESCs upon PRC2/Kdm6b inhibition, both chemically and genetically, and these defects were mirrored by overall alterations in transcription and chromatin accessibility, some of which may reflect this aberrant cell fate commitment.

Given their known roles in the establishment of the heterochromatin state and in agreement with previous studies from other groups, our data also suggest a complex interplay between H3K27me3 and DNA methylation. A study by Hagarman et al. showed that the absence of all three *Dnmt* genes resulted in an increase in the level of H3K27me3 in mESCs (Hagarman et al., 2013). This data led to the emergence of two different hypotheses regarding the crosstalk between H3K27me3 and DNA methylation. In one hypothesis, DNA methylation may antagonize H3K27me3 through the exclusion of the PRC2 components from methylated DNA (Hagarman et al., 2013). In the alternative model, unmethylated CpG can recruit the PRC2 complex (Lynch et al., 2012; Wachter et al., 2014) which is known to interact with Dnmts, thereby positively regulating DNA methylation (Viré et al., 2006). We have yet to ascertain if the increase in global H3K27me3 levels observed in *Tert*^{-/-} mESC extracts reflects a significant increase in H3K27me3 recruitment to the promoters of specific loci, however it is interesting to speculate it could be a compensatory mechanism to offset the suboptimal DNA methylation levels when Dnmt levels are limiting. Despite this accumulation of H3K27me3,

it is insufficient to overcome the differentiation defect of *Tert*^{-/-} mESCs, and inhibition of H3K27 methylation led to a further impairment of differentiation (Figure 2-5). In humans, Yu and colleagues suggested a feedback loop between *TERT* and *DNMT3B* transcription. They found that *TERT* depletion in hepatocellular carcinoma cells (HCC) resulted in reduced *DNMT3B* transcription, and they proposed that TERT itself may cooperate with the transcription factor Sp1 to promote *DNMT3B* transcription (Yu et al., 2018). This complex interplay between DNA and histone methylation, and how it is affected in *Tert*^{-/-} mESCs, will be an interesting topic for future investigation.

More generally, this study also examined the impact of PRC2 and Kdm6a/b inhibition on the chromatin accessibility landscape in mESCs after differentiation. To our surprise, the impact of these inhibitors on chromatin accessibility was relatively modest over the 14 days during which WT mESCs were exposed to ATRA followed by LIF. In WT mESCs, this relative resistance to epigenetic perturbation may, in part, be reflected by the relatively low inhibitor concentration and the duration of exposure. Similarly, inhibitor treatment of differentiated *Tert*^{-/-} mESCs re-exposed to LIF did not dramatically alter the overall chromatin accessibility landscape, perhaps because the landscape was already significantly altered toward a more pluripotent-like state. This result differs from mESCs completely lacking functional PRC2, in which the ability of differentiated somatic cells to be reprogrammed was dramatically impaired (Pereira et al., 2010). Thus, the response to PRC2 inhibition is likely dosage-dependent, and under the conditions we tested, inhibition of PRC2 did not significantly impede the differentiation potential of WT mESCs.

Unlike normal cells, the cancer epigenome is exceptionally plastic, particularly within non-coding regions, and upon PRC2 inhibition (Fioravanti et al., 2018; Lan et al., 2017; M.

Dawson, 2017; Stricker et al., 2013; Zhou et al., 2016). PRC2 inhibition also has dramatic consequences for early murine development and cell differentiation *in vivo* (Khan et al., 2015), although the impact on gene expression in adults is more restricted to bivalently controlled, tissue-restricted transcripts (Jadhav et al., 2016). In this regard, differentiated *Tert*^{-/-} mESCs could also be considered more plastic, as they demonstrated a strong propensity to re-express pluripotent genes even in the absence of PRC2 inhibitors, and re-acquired a chromatin landscape reminiscent of pluripotent mESCs. Furthermore, this property does not appear to be specific to retinoic acid-induced ESC differentiation. In a recent study, *Terc*^{-/-} (telomerase RNA knockout) ESCs with short telomeres exhibited a disruption in PRC2/H3K27me3-mediated repression of Follistatin, *Fsp*, that led to impaired epidermal stem cell specification and differentiation (Liu et al., 2019). These results underscore that telomere erosion impairs the epigenetic regulation of cell fate specification in multiple contexts.

Further investigation will ascertain exactly how critically short telomeres elicit these genome-wide perturbations, and whether the epigenetic alterations mirror the altered patterns in methylated DNA observed in older humans or in cancer cells with short telomeres (Hannum et al. et al., 2013). Since many cancer cell types and aged tissues possess shorter telomeres, it is possible that the plasticity of these epigenetic modifications may, in part, be affected by telomere integrity. If so, stress responses that promote cellular reprogramming might be linked to eroded telomeres. For example, Mosteiro and colleagues found that senescence promoted *in vivo* programming of murine iPSCs, although the relevance of telomere integrity in this process was not directly assessed (Mosteiro et al., 2018). In cardiomyocytes stimulated to undergo iPSC reprogramming, there was an inverse correlation between reprogramming potential and

telomere length (Aguado et al., 2016). In primary human cells undergoing senescence, H3K27me3 loss is correlated with gene expression changes that may drive senescence, and depletion of *EZH2* contributes to Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) (Ito et al., 2018b; Shah et al., 2013). SASP itself may promote cellular reprogramming via both cell-autonomous and cell non-autonomous mechanisms (Milanovic et al., 2018; Ritschka et al., 2017). Thus, one possibility is that short telomeres promote cell fate alterations directly, or indirectly via SASP induction.

In this study, we examined stem cells lacking telomerase, and revealed a genetic interdependency between eroded telomeres and epigenetic alterations required for differentiation. There are other connections between epigenetic modifications and telomeres, even when telomerase is present. Knockdown of the TET enzymes Tet1 and Tet2 has been shown to impact telomere integrity and subtelomeric DNA methylation in addition to playing a key role in cell lineage commitment (Lu et al., 2014; Yang et al., 2016). Another example is the presence of unstable telomeres in humans harboring a *DNMT3B* deficiency (Sagie et al., 2017; Toubiana et al., 2019). Mutation of the *TERT* promoter, one of the mostly commonly found non coding mutations in cancer (Mularoni et al., 2016; PCAWG Consortium, 2020), leads to telomerase upregulation via allele-specific epigenetic alterations involving PRC2 and DNA methylation (Leao et al., 2018; Lee et al., 2019; Stern et al., 2017). The telomeric transcript TERRA associates with PRC2, and in murine iPSCs lacking *Tp53*, TRF1 depletion results in TERRA-PRC2 recruitment to pluripotency genes (Marión et al., 2019; Montero et al., 2018b). Thus, even in situations where telomeres are not critically eroded, epigenetics impinges on telomeres, and telomeres impinge on epigenetics.

Finally, we are intrigued by the discovery that the differentiation defect in *Tert*^{-/-} mESCs was modestly rescued with the histone de-methylation inhibitor GSKJ4. Although GSKJ4 is highly selective for Kdm6a/b, it does inhibit other JmjC-domain containing histone demethylases such as *Kdm5b* (Heinemann et al., 2014b). Our work adds a new twist to the investigation of histone demethylase inhibitors as a potential anticancer therapy (D'Otto et al., 2016; Hoffmann et al., 2012; Yang et al., 2019a, 2019b). Notwithstanding the potential deleterious effects of telomere repair in conferring cellular immortality, when combined with stabilization of histone methylation it may prove to be a viable strategy to promote the stable differentiation of cancer cells or the maintenance of tissue homeostasis.

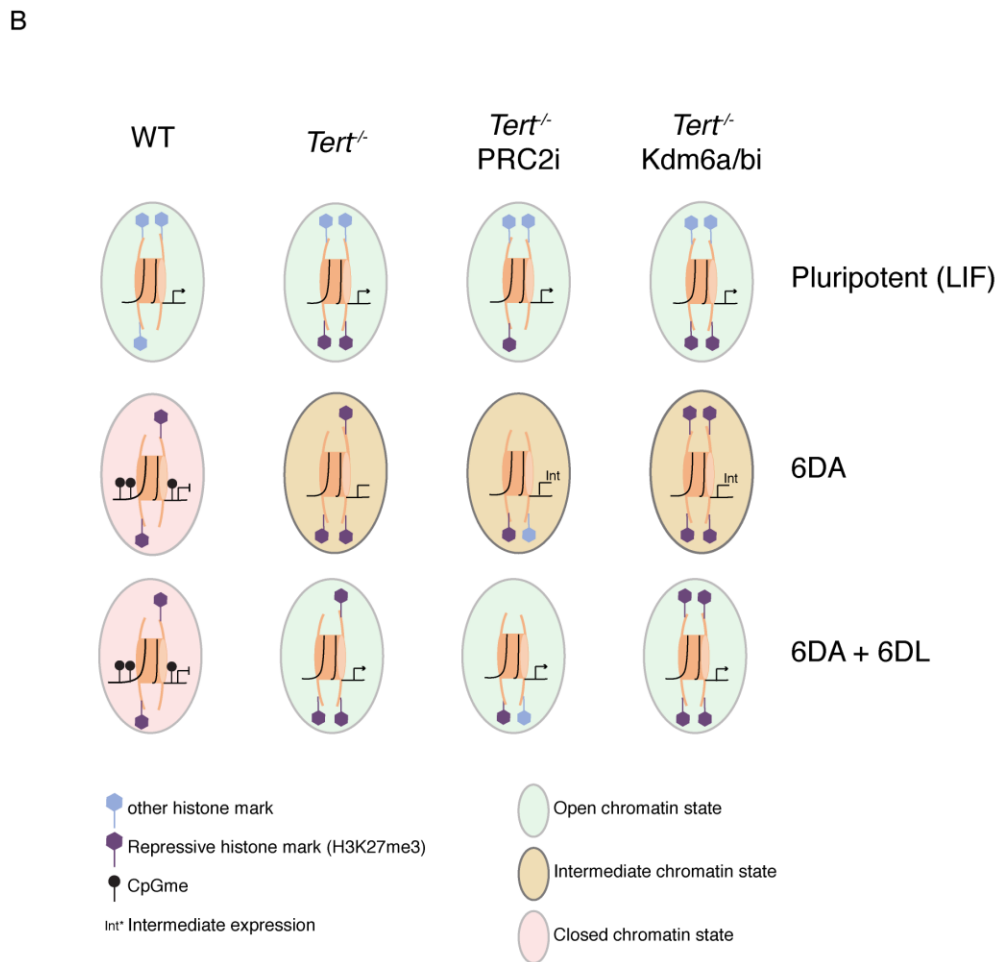
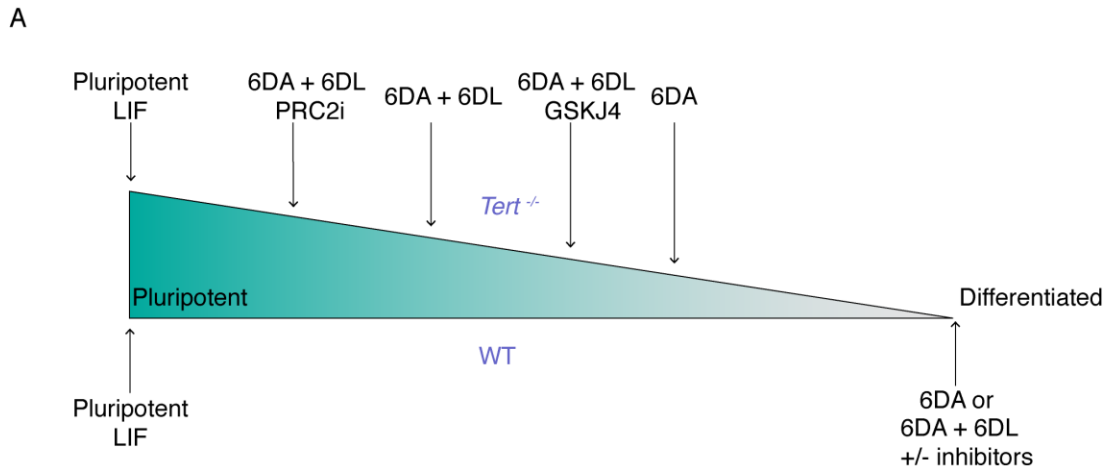


Figure 2-5. The unstable differentiation of mESC with short telomeres is exacerbated by epigenetic remodeling.

(A) Schematic of the cell state of WT and *Tert*^{-/-} ESCs upon differentiation induction,

based on our data. The slope is intended only to illustrate hypothetical relative differences between cell states. **(B)** Schematic representation of the potential epigenetic landscape(s) at pluripotency gene promoters in WT, *Tert*^{-/-} or *Tert*^{-/-} mESCs treated with PRC2 or Kdm6a/b inhibitors

Materials and Methods

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, Lea Harrington (lea.harrington@umontreal.ca).

Cell lines

The parental cell line used is E14 murine embryonic stem cells, derived from 129J. The wild-type and *Tert*^{-/-} ESCs were generated and described in Liu et al., 2000. The lines are genotyped using PCR. The genome was confirmed to be murine based on the alignment of raw HTS data (fastq) against the mm9 dataset. The pluripotency status of the lines prior to differentiation was also confirmed by teratoma formation competency *in vivo* (data not shown), and expression analysis.

Cell culture

Murine embryonic stem cells (mESCs) were cultured as described in (Pucci et al., 2013). Briefly, mESCs were seeded on 100 mm gelatin-coated plates (VWR, Mont-Royal QC, Canada, CABD353003 and Sigma, Oakville, ON, Canada, cat. # G1890) at a density of 0.9×10^6 cells per plate and propagated in Glasgow Modified Eagle Medium (GMEM, Gibco™, Invitrogen, acquired by Thermo-Fisher, Nepean, ON, Canada, cat. # 11710035) supplemented with 15% v/v fetal bovine serum (FBS; Wisent, St-Bruno, QC, Canada, cat.

920-040), and 50 units/mL penicillin/streptomycin (Invitrogen, cat. # 15070-063), 0.1 mM non-essential amino acids (Life Technologies, acquired by Thermo-Fisher, Napean, ON, Canada, cat. # 11140050), 0.055 mM 2-mercaptoethanol (Life Technologies, cat. # 21985023) and 1000 U/mL of ESGRO LIF (1×10^7 units, Millipore/Sigma, cat. # ESG1107). Cell cultures were maintained at 37 °C with 5% v/v CO₂. Cells were split every two days, when they reached an approximate confluency of 80%. All cell lines used in this publication were regularly assessed for mycoplasma contamination and remained mycoplasma-free.

Generation of *Pou5f1*-GFP mESCs

WT and *Tert*^{-/-} mESC lines were transduced (at MOI 25) with a lentivirus expressing pGreenZeo under the *Pou5f1* reporter (*Pou5f1*-GFP; System Biosciences, distributed by Cedarlane, Burlington, ON, Canada, cat. # SR10029VA-1) according to the manufacturer's instructions. The two *Pou5f1*-GFP expressing lines (WT and *Tert*^{-/-}) were analyzed at comparable passages beyond 40 (and typically less than passage 68). At these passages, *Tert*^{-/-} mESCs exhibit shorter telomeres but cell division, as judged by FACS analysis, was not impaired (Liu et al., 2000, Pucci et al. 2013 and data not shown).

Differentiation assay

Differentiation analysis was performed as in Pucci et al., 2013. Briefly, after 2 days of growth in LIF-containing media (as above), cells were plated at a density of approximately 0.2×10^6 cells/100 mm plate on non-gelatin-coated dishes (VWR, cat. # CABD353003), in media without LIF but supplemented with 5 µM all-trans retinoic acid (ATRA, Sigma, R2625-50MG) for 6 days. At day 6, cells were trypsinized using 0.05% w/v trypsin-EDTA 0.5mM (Invitrogen, cat. # 25300-054), transferred to gelatin-coated plates in GMEM media

without ATRA and supplemented with LIF (as above) for 6 days or longer, as indicated. Cells were split to ensure they did not exceed 80% confluency After each step of the differentiation assay, and before reseeding the trypsinized cells, $0.2-0.5 \times 10^6$ cells were used for flow cytometry analysis or 3×10^6 cells for FACS. The pluripotent state was assessed by flow cytometry, using the *Pou5f1*-GFP reporter gene as a quantitative tool (see below). All experiments were repeated at least three times ($n=3$ biological replicates), and typically included $n=3$ technical replicates. A biological replicate represents a distinct mESC population (usually analyzed on a different day), and a technical replicate is the same biological replicate processed separately (usually on the same day).

Treatment of mESCs lines with compounds

Compounds were provided by the Structural Genomic Consortium (SGC) (<https://www.thesgc.org>) or purchased as a powder and dissolved in DMSO at 20 mM. UNC1999 and GSK343 are small competitive inhibitors of the Ezh2 co-factor S-adenosylmethionine (SAM) and are 1000-fold more selective over other Histone Methyl Transferases (HMT). The major difference between UNC1999 and GSK343 is their inhibition selectivity for Ezh2 (compared to Ezh1), at 22- and 60-fold, respectively (<https://www.thesgc.org/chemical-probes/GSK343>; <https://www.thesgc.org/chemical-probes/UNC1999>), (Konze et al., 2013; Verma et al., 2012). A395 was also employed as an allosteric inhibitor of Eed that antagonizes binding to H3K27me3 and leads to impaired PRC2 function (He et al., 2017). UNC2400, a less active compound control for UNC1999 (>1,000-fold lower), and an inactive molecule A395N, structurally similar to A395, were also assessed as controls for the effects of their active analogues. GSKJ4 is an inhibitor of H3K27me3 demethylase and GSKJ5 is a less potent, structurally related molecule (<https://www.thesgc.org/chemical-probes/GSKJ1>). Compounds were provided by the

Structural Genomics Consortium or were purchased, for example: A395, A395N (Sigma, cat. # SML1879-25MG, SML1923-5MG) and GSKJ4, GSK343 (Medchem Express, NY, USA, distributed in Canada by Cedarlane, Burlington, ON, Canada, cat. # HY-15648B, HY-13500). The concentrations chosen for analysis were based on published IC50 values (by the SGC and others; see <http://www.thesgc.org/chemical-probes>). A similar titration of compound concentrations was tested in mESCs to determine the highest concentration (at or below the IC50) at which no impairment in cell growth was observed after 2 days in LIF-containing media (data not shown).

All compounds were employed at a final concentration of 1 μ M, except GSK343 (3 μ M). For the differentiation analysis (as described above), compounds were added to LIF-containing media for two days and were added again when the cells were re-plated onto ATRA-containing media without LIF for 6 days. At the midpoint of this 6-day incubation period, the media was replaced with fresh media containing compound or DMSO. After 6 days in ATRA-containing media, the cells were switched to media containing LIF and no ATRA for 6 days, with fresh media and compound or DMSO added at the midpoint of this incubation period. Except where stated otherwise, 3 biological replicates of each treatment group were analyzed within an experiment, and additionally included technical replicates.

Quantitative-Fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH) analysis to measure relative telomere length

Cell preparation

mESCs were seeded to reach a confluency of 60-80% in a 10 cm petri-dish. Cells were treated with 0.2 μ g/mL KaryoMAX® Colcemid™ (Gibco™, Invitrogen, acquired by Thermo-Fisher, Nepean, ON, Canada, cat. # 15210-040) for 6 hours to synchronize the

cells in metaphase.

Cell swelling and fixation

After collection, cells were centrifuged (5 min 200 x g) and the supernatant was removed. 10 mL of 0.075 M KCl was gently added to the cells and incubated for 30 min at 37 °C with gentle agitation to keep the cells in suspension. Cells were subjected to centrifugation (as above) and fixed by addition of a solution containing 3:1 methanol:glacial acetic acid) and incubated overnight. For a 10 cm dish, 10 mL of fixative was used.

Slide preparation

Slides were sprayed with cold water (distilled, deionized) droplets prior to metaphase spread preparation.

Nuclei preparation for microscopy

After fixation, cells were centrifuged (5 min, 200 x g) and the fixative was removed. The pellet was resuspended into 1 mL of fresh fixative and cells were dropped onto the slides. After dropping, slides were immediately washed 3 times with fixative and incubated for 1 min at 70 °C in a humidifier chamber. Slides were dried overnight at room temperature.

Slide hybridization

Slides were rehydrated with 1X PBS (Phosphate Buffered Saline, 127 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) for 15 min and fixed with 4% v/v formaldehyde/1X PBS for 2 min. Three 1X PBS washes of 5 min each were performed. Slides were treated with 1 mg/mL pepsin in 1X PBS + 0.08 % v/v HCl, washed 2 times with 1X PBS and fixed as described above. Slides were then dehydrated in 70% v/v, 90% v/v and 100 % v/v

ethanol (5 min each) followed by air drying. Hybridization to the telomeric probe was performed in the dark using 50 μ L per slide of the Cy3 TelC probe (PNAbio, distributed by Cedarlane, Burlington, ON, Canada, cat. # F1002) in an hybridization buffer (70% v/v ultra-pure deionized formamide, 0.2% w/v BSA, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.5 μ L/mL of 50 μ L PNA TelC-Cy3), incubated in a humidifier chamber at 80 °C for 3 min and cooled down overnight at room temperature. The slides were washed twice for 15 min each in wash solution I: 70% v/v pre-deionized formamide (Fisher Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada, cat. # 46-505-00ML), 0.1% w/v BSA, 0.01 M Tris-HCl pH 7.4. Slides were washed 3 times in a 0.075% v/v Tween20/Tris Buffered Saline 1x solution, 5 min per wash and dehydrated as described above. Vectashield with DAPI (Vector Laboratories, distributed by MJS BioLynx, Brockville, ON, Canada, cat. # H-1200) was added to each slide and the coverslip was sealed with nail polish.

Quantitative fluorescence *in situ* hybridization microscopy

Standard calibration beads, TetraSpec microspheres 0.1 μ M blue/green/orange (Life Technologies, cat. # T7279) were used to ensure that the laser fluctuation did not influence the quality of the analysis. Exposure times were kept constant throughout the image acquisition on the Microscope Zeiss Axio-Imager Z1 using DAPI (excitation, G365 nm; emission, BP 445/50 nm) and Rhodamine (excitation, BP 546/12 nm; emission, BP 575-640 nm) filters. Pictures were then analyzed using the software TFL-telo (<https://www.flintbox.com/public/project/502>). A minimum of 1587 telomeres were quantified per sample.

Flow cytometry and cell sorting

Murine ESCs expressing the *Pou5f1*-GFP transgene were sorted at specific times (Figure 2-1A) during the differentiation analysis using the Canto II (Becton Dickinson) analyzer or the ARIA (Becton Dickinson) cell sorter. Cells were harvested using trypsin, washed in PBS and resuspended into 0.2 mL of FACS buffer (PBS 1X, 2% v/v FBS and 0.05 M EDTA). Data were acquired with BD FACSDIVA software and results were analyzed using Flowjo v10. The percentage of GFP+ cells in the population was measured as described (Zheng and Hu, 2012). Cells were first gated for FSC/SSC to select the live population. Then doublets were excluded from gating and cells were plotted according to their PE (autofluorescence) and GFP expression. Cells which did not contain the *Pou5f1*-GFP construct were used to establish the gating conditions. No evidence of major cell death was observed during flow cytometry. At least 10 000 events within the GFP+ gate were recorded for each experiment and all the experiments were repeated a minimum of three times (biological replicates) with triplicate technical measurements in each experiment.

Gamma-irradiation and cell viability analysis

Murine ESCs were seeded for 2 days in LIF-containing media prior to exposure to gamma-irradiation. The irradiation time was calculated to expose the cells to 2 or 5 Gray (Gy). Cells were propagated in LIF-containing media for 2 days and analyzed by propidium iodide staining as follows: after trypsinization, cell pellets were washed with cold PBS two times and stained with 0.5 µg/mL of propidium iodide in 1x binding (10 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂) buffer for 20 min at RT in dark and analyzed by flow cytometry (BD Fortessa).

Differentiation assay following gamma-irradiation

Murine ESCs were seeded and exposed to gamma-irradiation as previously mentioned in the above paragraph. After 2 days of recovery in LIF-containing media, differentiation was induced.

Protein extraction and western blot analysis

mESC pellets were lysed in 1x Laemmli buffer (Bio-Rad, Saint-Laurent, QC, Canada, 161-0747) supplemented with 2-mercaptoethanol (355 mM) according to the manufacturer's instructions. Samples were boiled for 10 min at 95 °C and centrifuged at high speed (511258 x g) for 20 min (Beckman Coulter, Optima Max XP ultracentrifuge, rotor TLA 120.1). The supernatant was collected and stored at -80 °C or used immediately. For detection of H3 (total H3 or H3K27me3), protein extracts were resolved on a 15% w/v Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) containing a 6% w/v stacking gel and transferred to nitrocellulose membrane specific for small proteins (Bio-Rad, cat. # 1620112) using a wet transfer protocol with 20% v/v methanol Tris glycine-based buffer (25 mM Tris-Cl, 192 mM glycine, pH 8.3). After the transfer, the membrane was incubated in blocking solution (5% w/v milk diluted in Tris-Buffered Saline containing 0.1% v/v Tween 20 - TBST) for 1 hour at room temperature. Mouse anti-H3K27me3 primary antibody (Active Motif, distributed by Cedarlane, Burlington, ON, Canada, cat. # 39155) was added to the blocking solution at a dilution of 1:750, and incubated overnight at 4 °C. The membrane was then washed 3 times in TBST followed by incubation with the secondary antibody VeriBlot for IP Detection Reagent HRP (Abcam, Toronto, ON, Canada, cat. # ab131366) at a dilution of 1:2000 for 1 hour at room temperature. The signal was detected using the ECL SuperSignal West Femto maximum sensitivity substrate (Thermo-Fisher, cat. # 34095) according to manufacturer's instructions, followed by exposure to film (GE Healthcare Life Sciences, distributed by Cedarlane, Burlington,

ON, Canada, cat. # 28906839). The membrane was stripped in a pre-warmed (50 °C) stripping buffer containing 10% w/v SDS, 0.5M Tris HCL pH 6.8 and 0.8% v/v 2-mercaptoethanol for 15 min at 50 °C, washed 3 times for 5 min in TBST (<http://www.abcam.com/protocols/western-blot-membrane-stripping-for-restaining-protocol>), blocked in the same blocking buffer as above, and re-probed with anti-H3 antibody (Abcam, cat. # Ab1791) at a dilution of 1:10,000 for 1 hr at room temperature in the blocking buffer. The membrane was then incubated with secondary antibody and developed as above. For detection of Nanog and Hsp90ab1, the procedure used was as described above with the following changes: the protein extracts were resolved on a 10% w/v SDS-PAGE gel and 6% w/v stacking gel, and the primary antibodies were anti-Nanog (1:1000 dilution, Bethyl Labs, distributed by Cedarlane, Burlington, ON, Canada, cat. # A300-397A) and anti-Hsp90ab1 (1:2000 dilution, VWR, cat. # 10088-510). Figures contain representative western blots from independent experiments that were replicated at least three times.

RNA isolation

Total RNA was isolated from cell pellets using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada, cat. # 217004) and the miRNeasy Micro Kit (Qiagen, cat. # 217084).

Real-time qPCR array

RNA integrity was assessed using the Bioanalyzer from Agilent according to the manufacturer's instructions. RNA samples were excluded from the analysis if the RNA integrity number was less than 7. Reverse transcription of RNA was performed using the RT² First Strand Synthesis Kit according to manufacturer's instructions (Qiagen, cat. # 330404). Gene expression analysis was conducted using the PAMM 508ZC RT² Profiler

PCR Array for mouse cell lineage identification (Qiagen, cat. # 330231). This array contains 84 pathway-focused genes (5 of which are pluripotency markers) and 5 housekeeping genes (*Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Gusb* and *Hsp90ab1*). Controls for mouse genomic DNA contamination, reverse transcription efficiency, and PCR amplification efficiency are included on each array (see Source data files for further information). Quantitative PCR amplification was carried out using the Applied Biosystem StepOnePlus and RT² SYBR Green Mastermix (Qiagen, cat. # 330523) according to the manufacturer's protocol. Fold-changes in gene expression (after normalization to the 5 housekeeping genes) were determined using the Qiagen data analysis center at: <https://www.qiagen.com/ca/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/custom-rt2-pcr-arrays-data-analysis-center/>.

Real-time qPCR for single gene amplification

Reverse transcription of RNA was performed using the RT² First Strand Synthesis Kit according to manufacturer's instructions (Qiagen, cat. # 330404). Quantitative PCR amplification was carried out using the Applied Biosystem StepOnePlus and the FastStart Universal SYBR Green Master (Roche, cat 04913850001), according to the manufacturer's instructions. Please refer to Supplementary File 1 for the specific oligonucleotides used for the amplification of specific mRNA species.

ATAC-seq

The following ATAC-seq protocol was adapted as follows from (Buenrostro et al., 2015). As indicated in the source data file to accompany Figure 2-4, a total of 56 samples were analyzed over a total of 3 separate sequencing runs. The sample groups comprise two different genotypes (WT or *Tert*^{-/-}) that were isolated by FACS after different steps in the

differentiation protocol (i.e. as in the schematic in Figure 2-1A), or after differentiation and LIF re-addition (6DA + 6DL) that were untreated or treated with compound, as indicated. A minimum of 2 biological replicates were analyzed for all samples, except 2 samples for which there were 3 biological replicates and 2 samples for which there were 3 biological replicates and two technical replicates. These additional replicates were included to ensure reproducibility between the 3 separate occasions on which samples were prepared for sequencing (experimental sets 1-3). Only 1 sample (a third replicate of KO.6DA_GFP_pos) failed the quality control (# peaks < 20 M), and was excluded from further ATAC-seq analysis. See Source Data files within Figure 2-4 for further information.

Cell Thawing and Viability Measurements

To maximize cell viability, frozen cell pellets were rapidly thawed and then diluted to help remove residual DMSO. Cryotubes were thawed with continuous agitation by hand in a 37 °C water bath until only a small piece of ice roughly the size of a grain of rice remained. Cells were transferred by pipette to a 50 mL conical centrifuge tube and 10 mL of pre-warmed 37 °C Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS; Sigma cat. # 14190-144) was added dropwise with constant gentle swirling of the sample. Samples were then placed on ice and maintained at 4 °C for the remainder of the processing time. Cells were pelleted at 500 x g for 10 min at 4 °C. PBS was removed without disturbing cell pellets and 1 mL of 4 °C PBS was then added to resuspend the cells by pipetting. Cell viability was determined via Trypan Blue (Thermo Fisher, cat. # T8154) and counted on a haemocytometer. The equivalent of 50,000 live cells were transferred to a 1.5 mL Eppendorf tube and cells were pelleted by centrifugation at 600 x g for 10 min at 4 °C.

Nuclei Preparation

ATAC-seq assays were performed essentially as previously described by Buenrostro et al. (Buenrostro et al., 2015). All nuclei preparation procedures were performed on ice. After pelleting, PBS was removed by pipette while being careful not to disrupt the cell pellet. Cells were lysed by the addition of 100 μ L of cold lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.1% v/v IGEPAL Ca630 (Sigma, cat. # I8896), and 0.1 % v/v Tween 20 (Thermo-Fisher, cat. # 28320) and then incubated on ice for 5 min. Nuclei were pelleted by centrifugation at 600 x g for 10 min. The supernatant was removed carefully to avoid disturbing the nuclei pellet and pelleted nuclei were kept on ice proceeding directly to the transposase step.

Transposase Treatment and DNA Purification

Transposase treatment was carried out by the addition of 50 μ L of Transposase Master Mix (25 μ L Nextera TD Buffer (Illumina, San Diego, CA, USA, cat. # FC-121-1030), 2.5 μ L Nextera TDE1 Tn5 Transposase (Illumina cat. # FC-121-1030), 0.5 μ L 10% v/v Tween-20 (Thermo-Fisher cat. # 28320), and 22 μ L of molecular biology grade water (Sigma, cat. # W4502)) followed by incubation at 37 °C for 30 min in a hot block. Post-incubation samples were transferred onto ice, purified with Qiagen MinElute PCR Purification columns (Qiagen, cat. # 28004) and eluted in 15 μ L of molecular biology grade water (Sigma, cat. # W4502).

PCR Optimization and Amplification

The number of cycles required to amplify the transposed products was optimized using qPCR. An aliquot of 1.2 μ L of purified transposed DNA was removed and diluted 1:1 with molecular biology grade H₂O (Sigma, cat. # W4502). Duplicate PCR reactions were carried out (25 μ L NEB Next HiFi 2x PCR mix, 6.25 μ L of primer Ad1, 6.25 μ L of primer

Ad2.X (see specific primer details in Supplementary File 1), 1 μ L of 1:1 diluted transposed DNA and 11.5 μ L molecular biology grade H₂O (Sigma, cat. # W4502). Samples were amplified on a Bio-Rad CFX96 qPCR thermal cycler with the following protocol: 72 °C for 5 min, 98 °C for 30 seconds and then 20 cycles of 98 °C for 10 seconds, 63 °C for 30 seconds and 72 °C for 1 min. Post-cycling samples were held at 4 °C until proceeding with the next step. Amplification curves were consulted and a cycle number that occurs just prior to saturation was chosen for each sample (typically 10-12 cycles). Once the correct number of cycles for each sample was determined, amplification reactions were prepared (25 μ L NEB Next HiFi 2x PCR mix, 6.25 μ L of primer Ad1, 6.25 μ L of primer Ad2.X, and 12.5 μ L transposed DNA). Each sample was amplified using a different Ad2.X primer to allow for sample pooling. PCR was carried out using the same temperature profile as during optimisation but with the determined number of cycles using a ThermoFisher Veriti thermal cycler. Post-amplification samples were purified with Qiagen MinElute PCR Purification columns (Qiagen, cat. # 28004) and eluted in 20 μ L of molecular biology grade water (Sigma, cat. # W4502).

Size Selection and Quality Check of Libraries

Post-purification, libraries were individually size-selected using a Pippin HT (Sage Science) and 2% w/v agarose gel cassettes (Sage Science). The Pippin HT was set to collect products in the range of 240 to 360 bp. Proper size selection was validated by running a 1 μ L aliquot on a BioAnalyzer (Agilent) using a High Sensitivity DNA kit (Agilent, cat. # 5067-4625)

Assessment of Open Region Enrichment

To determine if the ATAC reactions were successful, an assessment of the overall

enrichment of open chromatin regions was assayed by qPCR. Amplification of two canonically open (GAPDH, KAT6B) and one canonically closed region (QML7/8) was performed in duplicate by qPCR on a Bio-Rad CFX96 thermal cycler. qPCR reactions were set up as follows: (5 μ L 2x Kapa SYBER FAST Master Mix (Roche cat # 07959389001), 0.5 μ L Forward Primer (Supplementary File 1 for details), 0.5 μ L Reverse Primer (Supplementary File 1 for details), 2 μ L molecular biology grade water (Sigma, cat. # W4502). The following amplification protocol was utilized: 72 °C for 5 min, 98 °C for 30 seconds and then 40 cycles of 98 °C for 10 seconds, 63 °C for 30 seconds and 72 °C for 1 min. Enrichment scores were calculated for each possible open vs closed region ($2^{(Ct_Open - Ct_Closed)}$). Scores over 10 were considered to be positively enriched.

Sequencing

Sequencing libraries were quantified with the Kapa Library Quantification Kit (Roche, distributed by Sigma-Aldrich, cat. # 07960140001). Libraries were normalized to 4 nM and then pooled and denatured with 0.2N NaOH. Libraries were further diluted to a final concentration of 1.4 pM. The pooled libraries were loaded onto an Illumina NextSeq 500 (1.3 mL total) for cluster generation and sequencing. A single-end 75 bp protocol was used and ~60 million reads per sample were targeted.

Read analysis after ATAC-seq

Fifty-thousand cells were processed from each sample as described above. The resulting libraries were sequenced with 75 bp single-end reads (Buenrostro et al., 2013) which were trimmed to 36bps and mapped to mm9 using Bowtie2 (v2.0.5) (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>) with default parameters. Any sample with reads less than 10M and/or peaks less than 20K were excluded from further analysis (there was

only one such sample, as noted above). Alignment statistics of all samples and replicates have been listed in Source Data File 2 for Figure 2-4- figure supplement 1. Poor quality reads (MAPQ<=30, (Zhang et al., 2008), reads mapping to chrM, chrY and patch chromosomes were removed. Reads were further filtered to remove PCR duplicates using Picard Tool MarkDuplicates (v2.6.0, <https://broadinstitute.github.io/picard/>). Accessible chromatin regions (peaks) were called using MACS2 v2.0.10. Default parameters were used except for the following: --keep-dup all -B -- nomodel --SPMR -q 0.05. The signal intensity was calculated as the fold enrichment of the signal per million reads in a sample over a modelled local background using the bdgcmp function in MACS2. We then calculated the maximum signal intensity over every peak for conditions being compared using mapBed -o max and quantile normalized them across samples. The average normalized signal intensity across replicates for each condition was then plotted in PCA. All downstream analyses (e.g. Spearman correlation coefficient analysis) were carried out using Bedtools v2.26.0 (<https://bedtools.readthedocs.io/en/latest/>) and R 3.4.1 (<https://www.r-project.org/>). Figures were plotted using ggplot2 (<https://ggplot2.tidyverse.org/>).

ChIP-seq

Sample preparation

Murine ESCs were harvested, washed with PBS and cross-linked with 1% v/v formaldehyde (methanol-free) for 7 min at room temperature (RT) with agitation. The reaction was quenched by adding 0.125 mM of glycine for 5 min RT. The fixed cells were centrifuged (3 min, 3000 rpm), resuspended in PBS and aliquoted (1 million cells per immunoprecipitation). Aliquots were centrifuged for 10 min 3000 rpm, and flash-frozen with liquid nitrogen. Aliquots were either used immediately or kept at -80 °C until

immunoprecipitation.

Preparation of Beads

30 μ L of the protein A Dynabeads (ThermoFisher, #10002D) were used per immunoprecipitation (IP). Using a magnetic rack, beads were washed 2 times with the ChIP dilution buffer (1% v/v Triton, 10mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 2mM EDTA) and incubated overnight at 4 °C in a low-binding Eppendorf tube on a rotator in the presence of 5 μ g of antibody (Active Motif, distributed by Cedarlane, Burlington, ON, Canada, cat. # 39155) in ChIP dilution buffer. Subsequently, beads were washed twice with ChIP dilution buffer and resuspend in 250 μ L ChIP dilution buffer and 140 μ L of TpS buffer (0.5% v/v Triton, 10 mM Tris pH 8.0, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA and protease inhibitors) before immunoprecipitation.

Chromatin preparation and sonication

Crosslinked cells were thawed, resuspended in TpA buffer (0.25 % v/v Triton, 10 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5 mM EGTA) and incubated on ice for 5 min. Cell nuclei were pelleted by centrifuging for 5 min at 5,000 rcf (8,000 rpm) at 4 °C, resuspended in TpB buffer (200 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, protease inhibitors) and incubated on ice for 30 min and centrifuged for 5 min at 5,000 rcf (8,000 rpm) at 4 °C. Finally, the lysed nuclei were resuspended in 140 μ L of TpS-SDS buffer (0.5% v/v SDS, 0.5% v/v Triton, 10 mM TRIS pH 8.0, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA and protease inhibitors).

Samples were transferred into Covaris tube and sonicated on the Covaris E220 instrument (DC10%, 105W, 200CBP, 2 min) to generate DNA fragments. A small amount (10 μ L) of DNA was kept as input.

Immunoprecipitation

Chromatin preparations were added to the beads and incubated for 4h at 4°C on the rotator. Using a magnetic rack, samples were washed subsequently with ice cold low buffer W1 (0.5% v/v NP40, 150 mM KCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA), W2 (0.5 % v/v Triton, 0.1% v/v NaDOC, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0), W3A (0.5% v/v Triton, 0.1% v/v NaDOC, 400 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0), W3B (0.5% v/v Triton, 0.1% v/v NaDOC, 500 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0, W4 (0.5% v/v NP40, 0.5% v/v NaDOC, 250 mM LiCl, 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA) before proceeding to elution.

Elution and DNA extraction

120 µL of TpE (0.3% w/v SDS, 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.4 M NaCl) was added to the washed samples and incubated overnight at 65 °C with agitation at (200 x g) and DNA was purified by phenol/chloroform.

Sample quantification and Library preparation

DNA samples were quantified using Qubit dsDNA HS Assay kit (ThermoFisher cat # Q32851) to determine concentration of each DNA sample. Library preparations were performed starting with 1ng of DNA from input DNA or ChIP DNA in a final volume of 10 µL following ThruPlex DNA-seq kit (Takara Bio USA cat # R400676), which consisted of the addition of 3 µL Template Preparation D Master Mix (2 µL Template Preparation D Buffer and 1 µL Template preparation D Enzyme) to each sample, mixed thoroughly by pipetting, and incubated on an Eppendorf Master cycler at 22 °C for 25 min, 55 °C for 20 min, 4 °C hold. Once samples reached 4 °C, they were removed from thermal cycler for

the addition for 2 μL of Library Synthesis D Master Mix (1 μL Library Synthesis D Buffer, 1 μL Library Synthesis D Enzyme), incubated on thermal cycler at 22 $^{\circ}\text{C}$ for 40 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ hold. 30 μL of library amplification master mix (25 μL Library Amplification D Buffer, 1 μL Library Amplification Enzyme, 3.25 μL Nuclease free water, 0.75 μL 10X SyBr Green I dye 1:1000 dilution) were added to each sample, followed by 5ul of indexing reagent (SMARTer DNA Unique Dual Index) for a final volume of 50 μL , stored on ice, dark. Ten μL was removed and transferred to a different plate for PCR cycle optimization using. The number of cycles required to amplify the library was optimized using a Bio-Rad CFX96 qPCR thermal cycler with the following program:

Step 1	1 cycle	72 $^{\circ}\text{C}$	3 min
Step 2	1 cycle	85 $^{\circ}\text{C}$	2 min
Step 3	1 cycle	98 $^{\circ}\text{C}$	2 min
		98 $^{\circ}\text{C}$	20 secs
Step 4	4 cycles	67 $^{\circ}\text{C}$	20 secs
		72 $^{\circ}\text{C}$	40 secs
		98 $^{\circ}\text{C}$	20 sec
Step 5	16 cycles	72 $^{\circ}\text{C}$	50 sec
Step 6	1 cycle	4 $^{\circ}\text{C}$	Hold

The optimal number of cycles at step 5 were determined from melt curve results (ranging from 8-12 cycles). An additional 10 μL of nuclease free water was added to each sample prior to final PCR amplification using Eppendorf Master cycler using sample program with adjusted cycles at step 5. Post amplification samples were purified with 35 μL AmPure XP beads (Beckman Coulter cat # A63881), washed twice with 80% v/v ethanol and eluted in 15 μL of EB buffer (Qiagen cat # 19086), 1 μL was loaded on an Agilent BioAnalyzer (Agilent) using a High Sensitivity DNA kit (Agilent, cat. # 5067-4625) for library size determination.

Sequencing

One μL of each library were pooled together, quantified by Kapa Library Quantification Kit (Roche cat. # 07960140001). Samples were diluted to 4 nM, denatured with 0.2 N NaOH, and the library pool was further diluted to 12.5 pM prior to loading on an Illumina Miseq Nano kit for cluster and sequencing to determine amount required for deep sequencing. Libraries were pool based on Miseq read counts, diluted to 1.25 nM, denatured with 0.2 N NaOH, neutralized with 400 mM Tris-HCL pH 8 and diluted to a final loading concentration of 250pM. Pooled libraries were loaded onto an Illumina Novaseq6000 sequencer for cluster generation and sequencing to achieve a minimum of 20 million reads per sample using 100 bp single read.

Read Analysis After ChIP-seq

Sequences obtained above were mapped to mm9 using Bowtie2 (v2.0.5) (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>) with default parameters. Alignment statistics of all samples and replicates are listed in Source Data File 3 for Figure 2-4. Poor quality reads (MAPQ \leq 30, (Zhang et al., 2008), reads mapping to chrM, chrY and patch chromosomes were removed. Reads were further filtered to remove PCR duplicates using Picard Tool MarkDuplicates (v2.6.0, <https://broadinstitute.github.io/picard/>). H3K27me3 peaks were called using MACS2 v2.0.10 using the following parameters --keep-dup all -B --broad -q 0.05. The signal intensity was calculated as the fold enrichment of the signal per million reads in a sample over the input sample. We then calculated the maximum signal intensity over every peak for conditions being compared using mapBed -o max and quantile normalized them across samples. Spearman correlation was then calculated between the average normalized signal intensity across replicates for each condition

which was then plotted in heatmap. Analysis downstream of peak calling were carried out using Bedtools v2.26.0 (<https://bedtools.readthedocs.io/en/latest/>) and R 3.4.1 (<https://www.r-project.org/>). Figures were plotted using ggplot2 (<https://ggplot2.tidyverse.org/>).

Single-guide RNA nucleofection

Eight µg of a synthetic-guide RNA (sgRNA) (Synthego, customized) were mixed with 15 µg of a purified recombinant Hifi Cas9 nuclease V3 (IDT, cat. #262104678), incubated 20 min at RT, and added to 1 million cells in PBS. Nucleofection was performed using the Lonza 4D nucleofector machine, according to the manufacturer instructions.

Following nucleofection, cells were seeded and kept in culture for 4 passages before indel quantification and differentiation induction.

Quantification and statistical analysis

Cytometry analysis, quantitative real time PCR and western blot quantification

Flow cytometry experiments in Figures 2- (1, 2, 3) were repeated at least 3 times in triplicate, and values shown represent the mean \pm SD. Prism GraphPad was used to perform analysis and statistics. In Figures 2- (1, 2, 3) we performed two-way ANOVA using the standard confidence parameter from the software (alpha = 0.05 and CI 95%) and multiple comparisons. Quantitative real time PCR experiments were repeated in triplicate (except for one n=2 sample, as indicated in Figure 2-1 and Figure 2-1—figure supplement 1) and results were compared using ordinary one-way ANOVA (alpha = 0.05 and CI 95%) (Figure 2-1C, D, Figure 2-2—figure supplement 1B, and Figure 2-3—figure supplement 1A, B). P-values and significance are shown using the GP method in Prism GraphPad, i.e. $p > 0.5$ = ns (non-significant); * ($p < 0.0332$), ** ($p < 0.0021$), *** ($p < 0.0002$), ****

($p < 0.0001$). Western blots were repeated 3 times ($n=3$) and quantification was performed using Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>). The ratio of the protein-of-interest to the control protein (as indicated in the figure legends) was analyzed using two-way ANOVA, as described above (see Source Data files for raw data values).

Real-Time quantitative PCR analysis

Analysis of the Qiagen mouse cell lineage identification qPCR array data was performed following the manufacturer's guidelines. Briefly, following completion of the qPCR run using the Applied Biosystems StepOne Plus cycler, the baseline value was set with the automated baseline option. Using the log view of the amplification plot, the threshold value was chosen within the linear range of the curve. The threshold value was kept constant across all RT2 profiler runs in the same analysis. A dissociation curve analysis was also performed to ensure PCR specificity. CT values were exported to an Excel spreadsheet for use with the Qiagen Data Analysis Center Web-based software (<https://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>). The lower limit of detection was set to 35 CT. Normalization by average arithmetic mean was performed using CT values of 5 housekeeping genes (*Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Gusb* and *Hsp90ab1*). Fold change in gene expression relative to control sample (eg. WT undifferentiated or WT DMSO) was calculated using the delta delta CT method as described in the manufacturer protocol and using the Web-based software mentioned above (see Source Data files for raw data values).

Fold change analysis

Statistical analysis of fold change in gene expression (e.g. as in Figure 2-2 – figure supplement 1B) was calculated using GraphPad Prism 7. Ordinary two-way ANOVA was

performed to compare the mean of each sample with the mean of every other sample. Sidak's multiple comparisons test was applied to correct for multiple comparisons using statistical hypothesis testing, with a single pooled variance. Each P value was adjusted to account for multiple comparisons and the confidence interval was set at 95%.

Principal Component Analysis (PCA) plots and heatmaps

Using the fold change values obtained as described above, PCA plots and heatmaps were generated using ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) (Metsalu and Vilo, 2015). Row centering was performed and unit variance scaling for rows was applied. Principal components were calculated using SVD with imputation method. Principal components with the highest percentage of variance (PC1 and PC2) were used for the PCA plots. For the generation of heatmaps, Euclidean clustering distance was calculated for rows and columns and the linkage criterion (clustering method) was set as complete. Tree ordering for rows and column was set to have the tightest cluster first.

Additional details about reagents, primers, kits used in this publication can be found in the Supplementary File 1: Key Resource Table

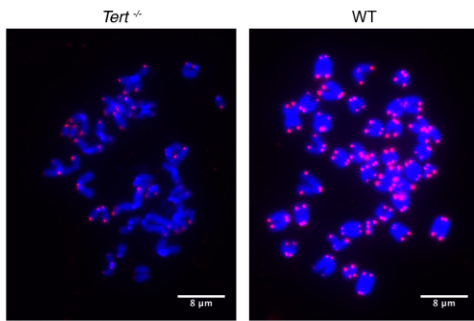
Acknowledgments

The authors thank the Toronto Structural Genomics Consortium (SGC), including Dr. Suzanne Ackloo and Dr. Taylor Mitchell, for providing compounds, and Zhibin Lu (University Health Network) for assistance with ftp data transfers. We thank the IRIC Cytometry facility, including Danièle Gagné, Dr. Gaël Dulude, and Angélique Bellemare

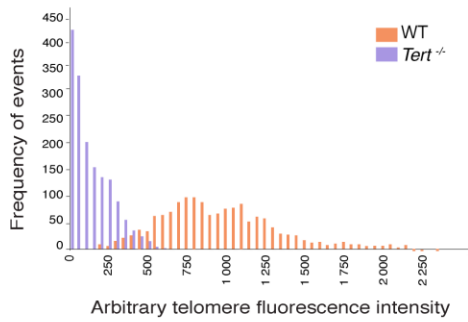
Pelletier for technical assistance with FACS, Nadine Mayotte for assistance with the gamma-irradiator, and the IRIC Microscopy facility and Dr. Christian Charbonneau for microscopy training services. We thank present and past members of the lab and colleagues, including Dean Betts, Mike Tyers, Yahya Benslimane, Fabio Pucci, Camille Simon, and Thomas Milan for helpful advice, and E. Andrea Mejia Alfaro and Corinne St-Denis for technical assistance. LH acknowledges financial support from the Canadian Institutes for Health Research (Canada) and past support from the Wellcome Trust, UK (084637). The SGC is a registered charity (number 1097737) that receives funds from AbbVie, Bayer Pharma AG, Boehringer Ingelheim, Canada Foundation for Innovation, Eshelman Institute for Innovation, Genome Canada through Ontario Genomics Institute [OGI-055], Innovative Medicines Initiative (EU/EFPIA) [ULTRA-DD grant no. 115766], Janssen, Merck KGaA, Darmstadt, Germany, MSD, Novartis Pharma AG, Ontario Ministry of Research, Innovation and Science (MRIS), Pfizer, São Paulo Research Foundation-FAPESP, Takeda, and the Wellcome Trust.

Figures supplémentaires du chapitre 2

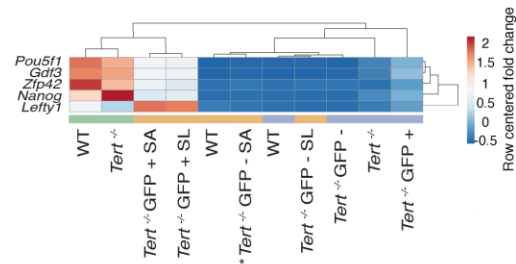
A



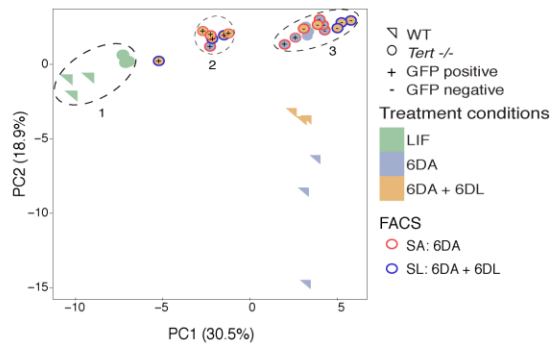
B



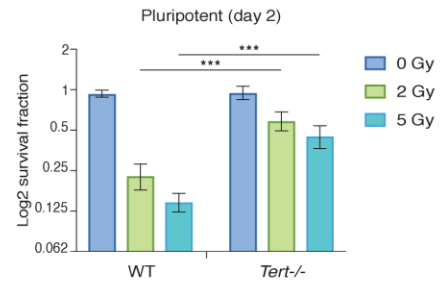
C



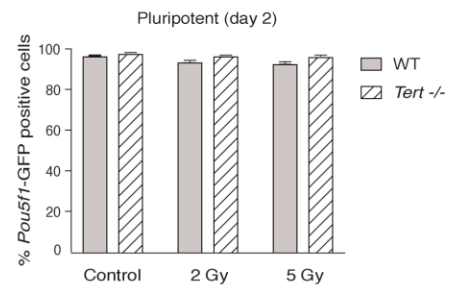
D



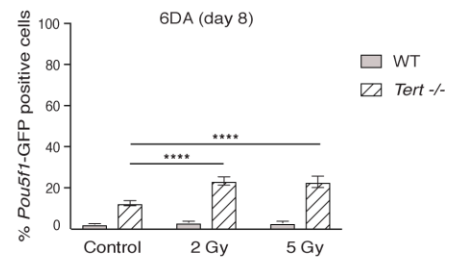
E



F



G



H

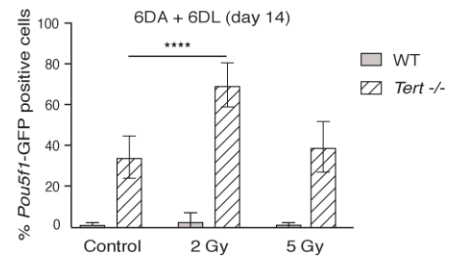


Figure 2-1—figure supplement 1

Relative telomere length measurement by Quantitative Fluorescence In-situ Hybridization (Q-FISH) analysis of WT and Tert^{-/-} mESCs at passage 50.

(A) Representative photo of metaphase preparations. DNA/chromosomes are stained with DAPI (blue) and telomeres can be visualized in red (Cy3). The scale is indicated with a microbar within each image. See Materials and Methods for further detail regarding sample preparation and image acquisition. (B) Histogram of relative telomere length measured as frequency of events vs. arbitrary telomere fluorescence intensity, extracted from data as in (A). The data represent at least 1587 telomeres analysed per sample. (C) Heatmap representation of pluripotency gene expression assessed by RT-qPCR (n=3 biological replicates, except for one sample marked with an asterisk * *Tert*^{-/-} GFP- SA, where n=2 biological replicates). Relative fold change in gene expression was calculated using WT pluripotent mESCs set as control (fold change = 1) and normalized to 5 housekeeping genes: *Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Gusb* and *Hsp90ab1*. The color scale represents the row centered fold change values (blue = lower, white = intermediate, red = higher). Euclidean distance clustering and complete linkage was applied to visualize similarity between samples. Refer to A for sample labelling. (D) Principal component analysis (PCA) of RT-qPCR data, see also heatmap in Figure 2-1—figure supplement 1D. Percentage values indicate the principal components with the greatest variance, in the first and second dimensions, respectively. Circles indicate groups referred to in the text (1, 2, 3). Refer to Figure 2-1A for sample labeling. See also Source Data file 1 for Figure 2-1 and Figure 2-1—figure supplement 1. (E) Survival fraction (logarithmic scale) of mESCs grown in LIF-containing media, measured by propidium iodide staining, 2 days after gamma-irradiation at the indicated doses. Data are represented as mean + SD (n=3 biological replicates). Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, (p<0.0332), ** (p<0.0021), *** (p<0.0002), **** (p<0.0001). (F, G, H) Differentiation analysis of irradiated mESCs. GFP+

status was measured by flow cytometry **(F)** after 2 days in LIF-containing media (pluripotent) **(G)** followed by 6 days in ATRA (6DA, day 8) **(H)** after 6 days of LIF re-addition (6DA + 6DL, day 14). Data are represented as mean + SD (n=3 biological replicates). Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, (p<0.0332), ** (p<0.0021), *** (p<0.0002), **** (p<0.0001)

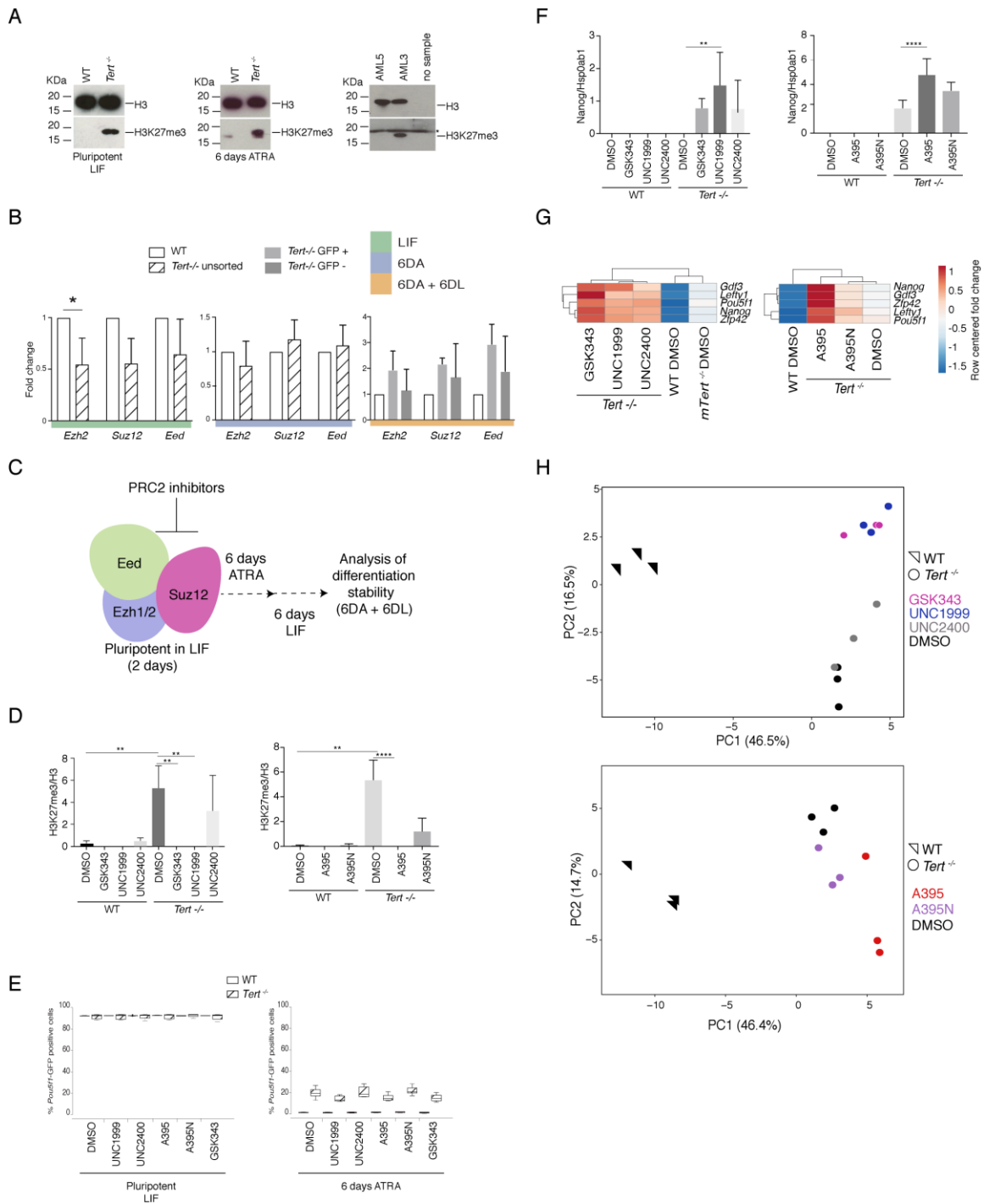


Figure 2-2—figure supplement 1

A) Western blot of H3K27me3 in pluripotent (maintained in LIF) or ATRA treated (6DA) WT and *Tert*^{-/-} mESCs. H3 was probed as a loading control. Representative blot from n=3.

A western blot of the OCI-AML3 and EZH2R690H-mutant²⁷ OCI-AML5 (showing a drastic decrease of PRC2 activity) lines was also performed as a control for the antibody (Lehnertz et al., 2017). A non-specific signal, which is also evident in the lane in which no sample was added (at right) is marked with an asterisk (*). **(B)** Assessment of relative fold change in Ezh2, Suz12 and Eed expression (relative to WT) by RT-qPCR, normalized to 2 housekeeping genes: B2m and Gapdh, Data are represented as mean + SD (n=3 biological replicates). Statistical analysis was performed using ordinary one-way ANOVA, * (p<0.0332), ** (p<0.0021), *** (p<0.0002), **** (p<0.0001). See figure 1A for color coding. **(C)** Schematic representation of the experimental design. PRC2 inhibitors were added to the mESC culture media prior to differentiation induction and maintained during differentiation (6DA) and after LIF re-addition (6DA + 6DL). See Materials and Methods for details. **(D, F)** Quantification of 3 biological replicates of the western blot data in Figure 2-2 A, C using Image J. The y-axis indicates the relative level of the protein species of interest normalized to the level of the control protein, as indicated. Statistical analysis was performed using ordinary one-way ANOVA, * (p<0.0332), ** (p<0.0021), *** (p<0.0002), **** (p<0.0001). **(E)** FACS analysis of *Pou5f1*-GFP reporter expression in mESCs. Data are represented as mean \pm SD. Data represents n=3 biological replicates: for n=1 and n=2 biological replicates, there were 3 technical replicates; for the n=3 biological replicate, there were 2 technical replicates, for a total of 8 samples. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, * (p<0.0332), ** (p<0.0021), *** (p<0.0002), **** (p<0.0001). Graphs were generated using the online tool BoxPlotR (<http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/>). The left graph represents pluripotent cells after 2 days of treatment with the inhibitor. The right graph represents the cells treated with the inhibitors for 2 days in LIF followed by 6 days in ATRA (6DA) **(G)** Heatmap representation of 5 pluripotency gene expression assessed by RT-qPCR (n=3 biological replicates).

Relative fold change in gene expression was calculated using *Tert*^{-/-} DMSO as the control (fold change = 1) and normalized to 5 housekeeping genes: *Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Gusb* and *Hsp90ab1*. The color scale represents the row centered fold change values (blue = lower, white = intermediate, red = higher). Sample clustering by Euclidean distance and complete linkage was applied to visualize similarity between samples. **(H)** Principal component analysis (PCA) of RT-qPCR data, also shown in the heatmap in Figure 2-2 D. WT mESCs, triangles; *Tert*^{-/-} mESCs, circles. Color legend for the indicated treatment groups is shown on the right. Note that not all biological replicates treated with the Eed inhibitor A395 exhibited an identical profile (lower panel; red circles at right).

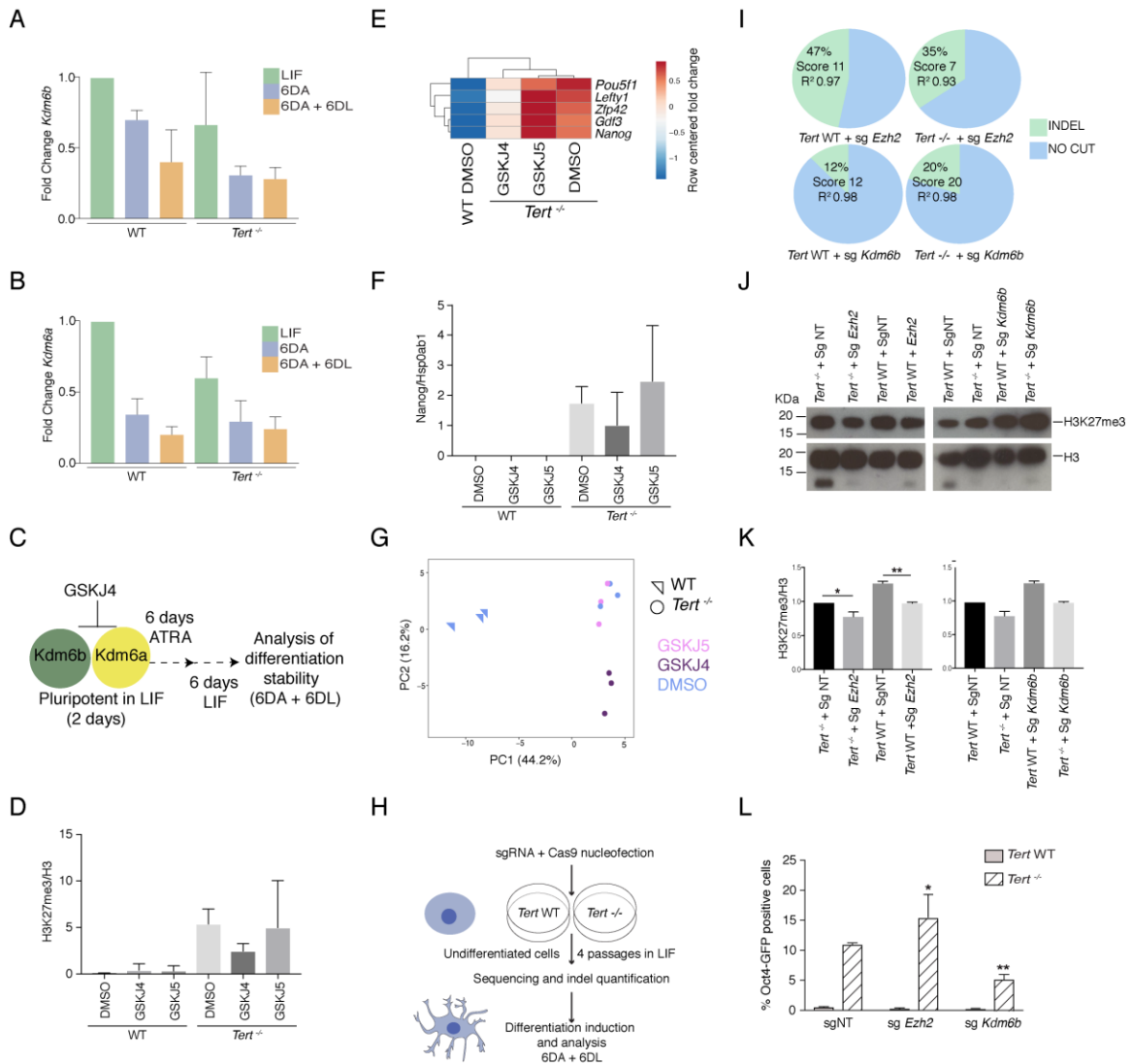


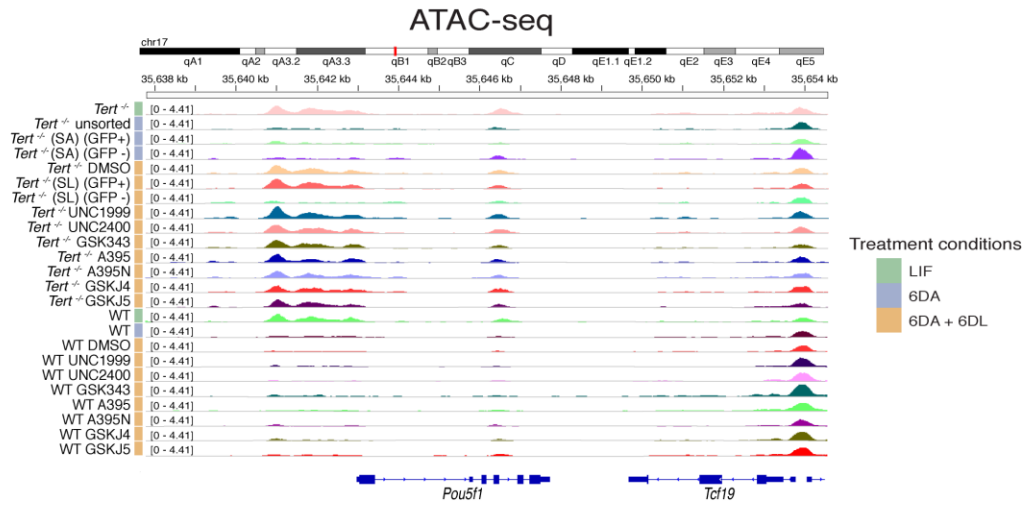
Figure 2-3—figure supplement 1

(A, B) Assessment of relative fold change in *Kdm6b* and *Kdm6a* expression (relative to WT 2DL) by RT-qPCR, normalized to 2 housekeeping genes: *B2m* and *Gapdh*, Data are represented as mean \pm SD (n=3 biological replicates). Statistical analysis was performed using ordinary one-way ANOVA, * (p<0.0332), ** (p<0.0021), *** (p<0.0002), **** (p<0.0001). See figure 1A for the color coding. **(C)** Schematic representation of the experimental design. The *Kdm6a/b* histone demethyltransferase inhibitor GSKJ4, or its inactive analogue GSKJ5, was added to the cell culture media prior to differentiation

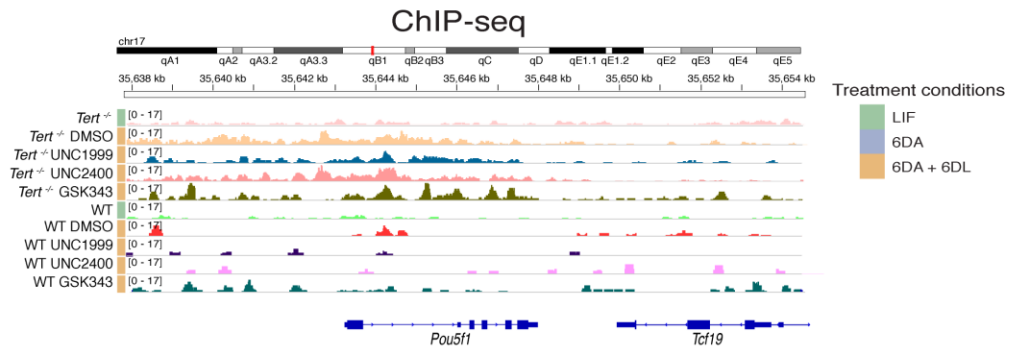
induction and maintained during differentiation (6DA) and after LIF re-addition (6DA + 6DL). See Materials and Methods for details. **(D, F)** Quantification of western blot data in Figure 2-3 A, C using image J (n=3). The y-axis indicates the relative level of the protein species of interest normalized to the level of the control protein, as indicated. Statistical analysis was performed using ordinary one-way ANOVA, * (p<0.0332), ** (p<0.0021), *** (p<0.0002), **** (p<0.0001). **(E)** Heatmap representation of pluripotency gene expression assessed by RT-qPCR (n=3 biological replicates). Relative fold change in gene expression was calculated using *Tert*^{-/-} DMSO as the control (fold change = 1) and normalized to 5 housekeeping genes: *Actb*, *B2m*, *Gapdh*, *Gusb* and *Hsp90ab1*. The color scale represents the row centered fold change values (blue = lower, white = intermediate, red = higher). Euclidean distance clustering and complete linkage was applied to visualize similarity between samples. **(G)** Principal component analysis (PCA) of RT-qPCR data, see also heatmap data in Figure 2-3 D. WT ESCs, triangles; *Tert*^{-/-} ESCs, circles. Color legend for treatment group as at right. All samples were analysed after 6D ATRA + 6D LIF, as in (C). **(H)** Schematic representation of the experimental design. The synthetic guide RNA (sgRNA) and Cas9 were electroporated into cells and propagated for 4 passages. At this time, Indel percentages within each population were quantified with the Synthego Ice Algorithm, and the differentiation analysis was commenced as described in Figure 2-1. **(I)** Indel percentages. Knockout scores represent the proportion of indels that indicate a frameshift or are greater than 21bp in length. R² values indicate the confidence level of indel determination based on the sequencing quality. For more details, visit the Synthego website (<https://ice.synthego.com/#/>). See also Source Data file 1 for Figure 2-3 and Figure 2-3—figure supplement 1. Three biological replicates were analysed for each sgRNA. **(J)** Western blot analysis of H3K27me3 levels in WT and *Tert*^{-/-} mESCs after electroporation of single gRNA (Non-targeting, NT or as indicated). H3 was used as a

loading control. Representative blot from n=2 biological replicates. **(K)** Quantification of western blot data in Figure 2-3—figure supplement 1 (J), using image J (n=2). The y-axis indicates the relative level of the protein species of interest normalized to the level of the control protein, as indicated. Statistical analysis was performed using ordinary one-way ANOVA, * (p<0.0332), ** (p<0.0021), *** (p<0.0002), **** (p<0.0001). (L) FACS analysis of *Pou5f1*-GFP reporter expression in mESCs. Data are represented as mean \pm SD (n=3 biological replicates) sgNT: non-targeting guide RNA. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, * (p<0.0332), ** (p<0.0021), *** (p<0.0002), **** (p<0.0001).

A



B



C

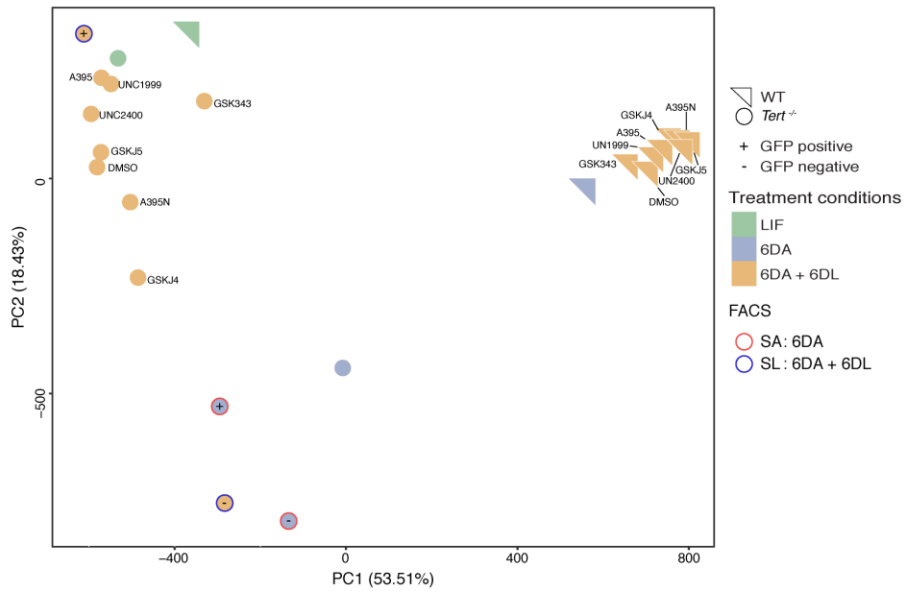


Figure 2-4. figure supplement 1.

IGV screenshot of the genomic region surrounding the *Pou5f1* promoter, derived from either ATAC-seq data (A) or H3K27me3 ChIP-seq data (B) as shown in Figure 2-4. One representative replicate was arbitrarily chosen for each sample. Track Height was defined to fit to full screen mode on IGV and was scaled equivalently for all samples within the same panel, using the auto scale mode. (C) Principal component analysis of called peaks following ATAC-seq analysis, of the same samples as shown in (A). WT mESCs, triangles; *Tert*^{-/-} mESCs, circles. The symbol color indicates the treatment stage, as indicated in the legend at right, and in Figure 2-1A schematic. Circle outline colors indicate samples sorted for GFP status after 6D ATRA (SA, red) or a further 6D ATRA + 6D LIF (SL, blue). See also Source Data files 1 and 2 for Figure 2-4 and Figure 2-4—figure supplement 1.

Chapitre 3. Implication du facteur p53 dans l'échec de différenciation observé dans les cellules Tert *-/-* possédant des télomères courts.

3.1. Auteurs et contributions

Mélanie Criqui

Conceptualisation, analyse, validation, investigation, visualisation, méthodologie

Pas de conflit d'intérêts déclaré

Lea Harrington

Conceptualisation, Ressources, validation des données, analyses, supervision, financement, méthodologie, administration du projet.

Pas de conflit d'intérêts déclaré.

3.2. Références de publications

Manuscrit en préparation, mais non soumis.

3.3. Résumé traduit en français

Le lien entre la déprotection des télomères et le destin cellulaire reste une question passionnante, en particulier dans les cellules souches pour lesquelles la stabilité génomique est essentielle pour assurer une régénération tissulaire adéquate. Précédemment, nous avons montré que les cellules souches embryonnaires murines avec des télomères courts (mESC, *Tert* *-/-*) présentent un défaut de différenciation accompagné d'altérations épigénétiques. Le raccourcissement des télomères est connu

pour activer la réponse aux dommages de l'ADN, ce qui entraîne l'activation de p53. p53 joue un rôle clef dans les cellules puisqu'elle est capable d'influencer le destin cellulaire. Ainsi, nous avons testé si p53 est à l'origine de la différenciation instable des mESC *Tert*^{-/-}. En utilisant une approche génétique (CRISPR-cas9), nous avons découvert que l'absence de la protéine p53 dans les cellules *Tert*^{-/-} avec des télomères courts rétablit leur potentiel de différenciation. Nos résultats suggèrent un nouveau mécanisme d'assurance-qualité, dépendant de p53, qui précède l'achèvement de la différenciation.

3.4. Article

The unstable differentiation observed in short telomeres murine embryonic stem cells is p53-dependent

Authors and Affiliations

Mélanie Criqui, Lea Harrington

Abstract

The link between telomere deprotection and cell fate remains an exciting question, especially in stem cells for which genomic stability is essential to ensure adequate tissue regeneration. Previously, we showed that murine embryonic stem cells with short telomeres (mESC, *Tert*^{-/-}) exhibit a differentiation defect accompanied by epigenetic alterations. Telomere shortening is known to activate the DNA damage response (DDR), resulting in p53 activation. p53 is well known to modify cell fate; thus, we tested whether p53 is linked to the unstable differentiation of mESC *Tert*^{-/-}. Using a CRISPR-cas9 approach, we uncovered that the genetic disruption of *Trp53* in *Tert*^{-/-} cells with short telomeres rescues the differentiation potential. Our results suggest a new p53-dependent mechanism that ensures the quality of stem cells prior to differentiation completion.

Introduction

The well-known tumor suppressor p53, "the guardian of the genome," has an established role in protecting the genome when DNA integrity is compromised. Following stress

induced by DNA damage, p53 is stabilized by phosphorylation at multiple residues, such as the serine residue at amino acid 15, and upregulated through a positive feedback loop (Maclaine and Hupp, 2009). Once activated and stabilized via these post-translational mechanisms, p53 can act as a transcription factor to upregulate thousands of genes involved in cell cycle arrest, DNA repair, apoptosis, or senescence, which collectively bestow tumor-suppressive functions. However, the transcriptional program induced by p53 will depend on its activation level, which may be proportional to the stress signal. Thus, the stability of p53 and the cellular context in which it is activated, rather than a high level of expression, appears to be the primary determining factor in dictating cell fate (Wu and Prives, 2018).

The integrity of the genome also depends on chromosome end stability. Telomeres are repetitive G-rich sequences associated with specific proteins, which protect the chromosome ends from being recognized as a double-strand break. However, telomeres are vulnerable to DNA replication stress and double-stranded breaks induced during replication (Sfeir et al., 2009b). When telomere integrity is compromised — such as replicative telomere shortening — the DNA damage response is activated (Cesare et al., 2013). However, solving problems at chromosome ends can be even more harmful than the initial insult. As a consequence of the activation of the non-homologous end joining (NHEJ) pathway, deprotected telomeres are prone to undergo end-to-end fusions, which results in genomic instability (Van Steensel et al., 1998b). To mitigate these deleterious consequences, p53 is activated to drive apoptosis or senescence (Deng et al., 2008; Herbig et al., 2004). In the context of short telomeres, the removal of *Trp53* rescues cell proliferation capacity, which reveals a p53 dependence for cell fate (Chin et al., 1999). However, this restoration of proliferation capacity can exert a deleterious effect, as

tumorigenesis is induced (Chin et al., 1999; Evans and Lozano, 1997; Jacks et al., 1994). In addition to these findings, p53 may prevent damage from occurring at telomeres and confer a protective role (Benslimane et al., 2021; Herbig et al., 2004; Matsumoto et al., 2018; Schwartz et al., 2001; Tutton et al., 2015). For instance, emerging evidence of the presence of p53 near the replication fork suggest its implication in the recruitment of downstream proteins to avoid fork collapse (Roy et al., 2018). These findings have led to the idea that p53 has a dual role in cells. Its presence is necessary to avoid transformation, but too much activity is deleterious for cell fitness (Sharpless and DePinho, 2002). Since perturbations in cell fitness can impact the rate of tissue regeneration, these countervailing forces may therefore impinge on aging.

In stem cells, the role of p53 goes well beyond its activity in the DNA damage response, as it is thought to influence cell fate in the absence of damage. However, the contribution of p53 to stemness is still controversial as it is still discussed whether p53 contributes to differentiation or the maintenance of quiescence, both of which can be context-dependent. For instance, and under normal conditions, p53 in hematopoietic stem cells favors quiescence (Asai et al., 2012), whereas its activity is also essential during pluripotency exit for mesodermal differentiation (Wang et al., 2017). In addition, deletion of *Trp53* by siRNA expression can significantly increase iPS cell reprogramming efficiency (Lin and Lin, 2017; Zhao et al., 2008b). Relevant to this observation, the loss of p53 in cancer contributes to the development of cancer stem cells (Ghatak et al., 2021).

Just like any other cell type, stem cells can undergo DNA damage and stress, which will activate the p53-dependent pathway. Following its stress-dependent activation, the activity of p53 will switch to activate new sets of genes (Wu and Prives, 2018). These transcriptional changes can directly influence cell fate (Ferro et al., 2009; Kannappan et

al., 2017; Matsumoto et al., 2018). However, the conclusions between studies diverge, indicating that the role of activated p53 in cell fate requires more investigation.

Murine embryonic stem cells (mESC) KO for the telomerase reverse transcriptase (*Tert*^{-/-}), at advanced passages (passage 40), display short telomeres and are associated with a differentiation defect (Pucci et al., 2013). Previously, we showed that telomere integrity prevents the repression of the pluripotency genes during differentiation and perturbs the epigenetic landscape of the cells. Indeed, mESCs that undergo telomere shortening exhibit a global DNA demethylation, accompanied by an increase of the epigenetic mark H3K27me3. These epigenetic alterations are, in part, responsible for the differentiation defect (Criqui et al., 2020; Pucci et al., 2013). However, modulation of the epigenetic context rescues only partially the defect, meaning that other factors are involved. Given the role of p53 in DNA damage and cell fate, we tested whether p53 is involved in the differentiation defect observed in mESC with eroded telomeres (*Tert*^{-/-}). We generated double KO mESC (*Trp53*^{-/-} ; *Tert*^{-/-}), and to our surprise, we observed that the disruption of *Trp53* abolished the differentiation defect conferred by telomere erosion. mESC are early development stem cells that are capable of differentiation into any tissue. We discuss the potential implication of p53 in a checkpoint that may occur before differentiation to maintain genome integrity in daughter cells and the relevance of these findings to prior studies (Lin and Lin, 2017).

Results and discussion

***Trp53* expression is downregulated in both *Tert* WT and *Tert* *-/-* cells upon differentiation**

Embryonic stem cell pluripotency is regulated by different pathways that are essential to embryonic development. In addition to the core pluripotency factors, the Wnt signaling pathway stands out for its requirement during embryonic development (Anton et al., 2007; Ogawa et al., 2006). A genome-wide study identifies *Trp53* as a primary activator of WNT signaling (Lee et al., 2010), and the WNT signaling pathway has been linked to antidifferentiation function (Sato et al., 2004). Pertinent to these findings, *Trp53* is highly expressed in embryonic stem cells and is downregulated upon differentiation induction (Schmid et al., 1991). Thus, we wondered whether the differentiation defect might be due to a failure of the *Tert* *-/-* cells to repress *Trp53*. An analysis of *Trp53* mRNA levels using qPCR exhibited no defect in *Trp53* transcriptional suppression during differentiation for both *Tert* WT and *Tert* *-/-* mESC (Figure 3.1A). Thus, at the transcriptional level, we observed no detectable difference in *Trp53* mRNA downregulation in response to differentiation. Relevant to this result, a previous study from our group found that the WNT signaling pathway is not altered in *Tert* *-/-*, compared to *Tert* WT cells (Gardano et al., 2013).

Generation of *Trp53* depleted mESC by CRISPR

It is well known that telomere erosion can impact the sensitivity to other types of cell damage. For example, in late generation (G5) mice lacking the telomerase RNA component, mTR, the mortality rate was higher than WT mice after exposure to multiple doses of γ -irradiation (Goytisolo et al., 2000). In addition, we uncovered that exposure to

2 Gy of γ -irradiation exacerbates the differentiation defect of *Tert*^{-/-} mESC (Criqui et al., 2020). In contrast, no effect on differentiation was reported when WT mESC were exposed to the same dose of γ -irradiation (Criqui et al., 2020). The ability of low dosage γ -irradiation to exacerbate the differentiation ability of *Tert*^{-/-} mESC with eroded telomeres led us to investigate whether the presence of p53, a key factor of the DNA damage response, influences *Tert*^{-/-} cell fate.

We used a genetic approach to disrupt the genomic sequence of *Trp53*. A single guide RNA (sgRNA) against *Trp53* was designed and co-introduced with Cas9 in both WT and *Tert*^{-/-} mESC by nucleofection (Figure 3.1B). The targeting sgRNA was designed to target a sequence located at the beginning of exon 4, corresponding to the proline-rich domain. Directed by the sgRNA at the targeted site, Cas9 induces a cut that will be repaired via the non-homologous end joining pathway, resulting in the introduction of an insertion or deletion, referred to as an indel. Indels that are longer than 21 base pairs, or that occur in multiples other than 3 (and thus would induce a frameshift), would disrupt the full-length protein (FLp53) and a variant of p53 termed p53 Δ 40 (Ungewitter and Scrabble, 2010). After two days, genotyping of the population was performed, and 59% and 57% indels were found in the WT and *Tert*^{-/-} cells, respectively (Figure 3.1B). Clonal enrichment was performed to complement the analysis of the polyclonal population, and clones were validated by sequencing, qPCR, and western blot analysis (Figure 3.1C-E). The clones that were considered as potentially *Trp53*^{-/-} possessed a knock-out score of over 90% (Figure 3.1C). The R² value indicates the confidence of indel determination based on the quality of the Sanger sequencing (Figure 3.1C). Clones that received the sgRNA and Cas9 but that did not result in an indel were retained as a negative control, as they would retain

p53 function (e.g., see WT clone A, Tert^{-/-} clone C) (Figure 3.1B).

Two clones were validated as (*Trp53*^{-/-}; *Tert*^{+/+}), and one clone as (*Trp53*^{-/-}; *Tert*^{-/-}) (Figure 3.1D-E; *Tert*^{WT} clone B and C; *Tert*^{-/-} clone B). However, in clones lacking a detectable full-length p53 protein, we detected species that migrated at 38 kDa, 33 kDa, and less than 25 kDa. Importantly, the monoclonal antibody used in this study binds to the C-terminal domain, which allows recognition of a truncated form of p53 that may co-exist in cells. According to our results, the disruption of exon 4 should disrupt FLp53 and the p53 Δ 40. However, the internal P2 promoter, located in the intron between exon 4 and 5, can induce the transcription of 6 variants: Δ 133p53 α (35KDa), Δ 133p53 β (29KDa), Δ 133p53 γ (29KDa), Δ 160p53 α (31KDa), Δ 160p53 β (26KDa), Δ 160p53 γ (29KDa) (Marcel et al., 2011). If we compare the size of those variants with the blot presented in (Figure 3.1E), it does not correspond exactly to those predicted molecular masses. Still, we have not ruled out the possibility of transcription from the P2 internal promoter that may give rise to a p53 truncation product.

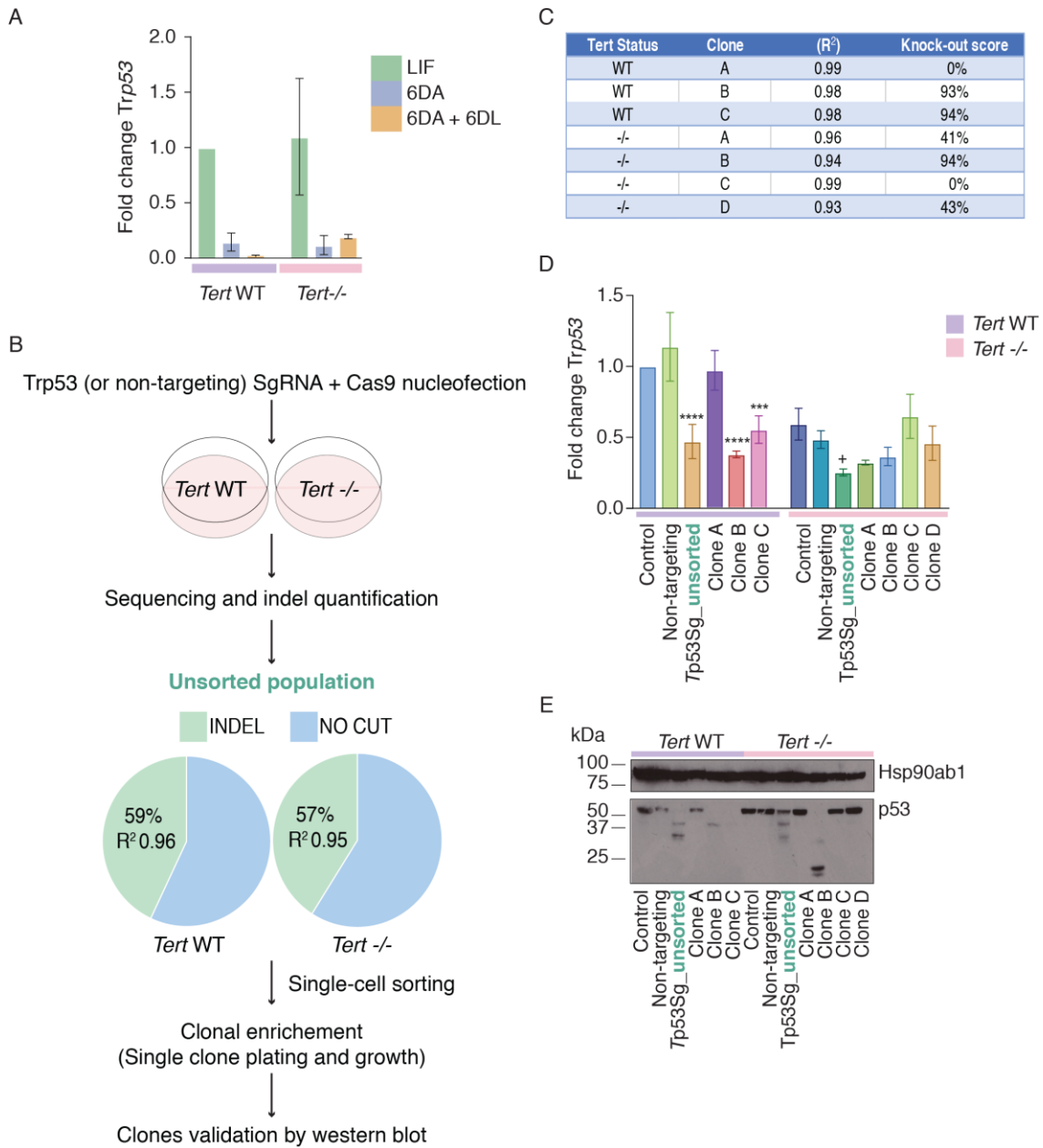


Figure 3-1. Generation of *Trp53*-disrupted *Tert* WT and *Tert* -/- murine embryonic stem cells

(A) Histogram representing the *Trp53* fold change in *Tert* WT or *Tert* -/- cells before, during differentiation (6 days ATRA), or after LIF re-addition (6 days ATRA + 6 days in LIF). (B) Schematic representation of the experimental design used to generate *Trp53* -/- mESC and indicate the indel percentage. Both *Tert* WT and *Tert* -/- cells were nucleofected,

whether with *Trp53* single guide (sg) RNA or non-targeting sgRNA. After 4 passages, cells were harvested to perform sequencing and indel quantification. Following the indel quantification, cells were sorted for single cells to select *Trp53*^{-/-} clones. **(C)** Summary of the sequencing results obtained for each selected clone. R^2 is a statistical measure calculated by the syntheGO algorithm, which indicates the fitness between indel distribution and the Sanger sequencing (see Methods for details). Values close to 1 refer to a high confidence in the sequencing result, and the knock-out score specifies the percentage of indels that induce a frameshift or a greater than 21bp length deletion or insertion. **(D)** *Trp53* fold change in selected clones or controls by RT-qPCR. Data were analyzed relative to *Tert* WT (first column) and two housekeeping genes (*B2m* and *Hsp90ab1*). Data are represented as mean \pm SD (n=3, biological replicate). Statistical analysis was performed using ordinary one-way ANOVA. WT *Tert* samples were compared to the *Tert* WT sample as followed: * (p<0.0332), ** (p<0.0021), *** (p<0.0002), **** (p<0.0001). *Tert*^{-/-} samples were compared to *Tert*^{-/-} sample as followed: + (p<0.0332), ++ (p<0.0021), +++(p<0.0002), +++ (p<0.0001). **(E)** Western blot of p53 in the different clones or controls. Representative blot from n=3. *Hsp90ab1* was used as a loading control.

***Trp53* depletion did not alter *Nanog* and *Pou5f1/Oct4* expression in *Tert* WT or *Tert*^{-/-} mESC**

The notion that p53 dictates cell fate, i.e., whether it maintains pluripotency or supports differentiation, is not fully understood. In mESCs with eroded telomeres, we wished to examine if p53 affected the level of pluripotency factors such as *Nanog* and *Pou5F1/Oct4*. When the cells were sustained in Leukemia Inhibitory Factor (LIF), we observed that the

expression of the pluripotency gene *Nanog* was not altered in *Tert*^{-/-} cells as a function of p53 status (Figure 2A-B). However, the levels of *Trp53* transcript appeared variable in the WT cells, but this variability did not track precisely with genotype, and western blot data did not reveal a detectable change in *Nanog* levels in cells with or without p53 (Figure 3.2A-B). To assess *Pou5f1/Oct4* expression, we used FACS to monitor the percentage of GFP-positive cells in cells constitutively expressing the reporter gene GFP under the control of the *Pou5f1/Oct4* promoter (Criqui et al., 2020). Similar to the results with *Nanog*, we did not observe any significant loss of the GFP reporter expression regardless of the status of p53 (Figure 3.2C). As a control, we included a clone that received by nucleofection the *Trp53* sgRNA and Cas9 but did not result in any insertion/deletions at the sgRNA-directed cut site (indels) (see, *Tert* WT clone A and *Tert*^{-/-} clone C, Figure 3.1C). Thus, even though p53 is known to influence the transcriptional profile of mESC (Yan et al., 2015), we did not observe any impact of p53 on the expression of *Nanog* and *Pou5f1/Oct4*. This result is consistent with previous findings that p53 is unnecessary to maintain pluripotency (Shigeta et al., 2013).

***Trp53* depletion rescued the differentiation potential of *Tert*^{-/-} mESC**

Differentiation induction results in the repression of the pluripotency transcriptional program favoring the specialization of the cells toward a specific lineage (Martello and Smith, 2014). This mechanism involves thousands of genes and is therefore sensitive to transcriptional alteration. Under stress, p53 can modify the transcriptional programs of cells to alter their fate (Deng et al., 2008; Herbig et al., 2004). Thus, we wondered if the activation of p53 in response to eroded telomeres could be responsible for the unstable differentiation observed in *Tert*^{-/-} ESCs with short telomeres (Criqui et al., 2020; Pucci et

al., 2013). To address this question, we compared the differentiation potential of *Tert*^{-/-} ESCs at late passages, with or without disrupted *Trp53*. Cells that retained wild-type *Tert* (WT) were assessed as a control, with or without *Trp53*. Differentiation was induced for six days with 5 μ M all-trans retinoic acid (ATRA) (Figure 3.2D). The stability of the differentiation was assessed following a six-day period in which LIF was re-added to the media, as described in our previous studies (Criqui et al., 2020; Pucci et al., 2013) (Figure 3.2E). As expected, during the first 6 days in ATRA, *Tert* WT cells differentiated appropriately and lost GFP-Oct4 expression, whereas a fraction of *Tert*^{-/-} cells failed to differentiate and remained Oct4⁺, similar to previously published observations (Criqui et al., 2020; Pucci et al., 2013) (Figure 3.2D). The population of cells that retained GFP expression after 6 days in ATRA was unaffected by the status of *Trp53*, regardless of whether the cells were WT or *Tert*^{-/-} (Figure 3.2D).

Upon LIF re-addition, *Tert* WT cells remain differentiated irrespective of *Trp53* status (Figure 3,2 E). These results suggest that p53 is dispensable for pluripotency and differentiation in mESCs under the growth conditions used in our study. These results also confirm the existing notion that p53 is dispensable for development as *p53*^{-/-} mice can reach adulthood. However, these mice are more prone to develop cancer (Donehower, 1996) and a defect in the neural tube close and in the brain has been reported (Armstrong et al., 1995; Sah et al., 1995). This implies a role of p53, in a subset of cells, later in development.

To our surprise, depletion of p53 in *Tert*^{-/-} mESCs restored the ability of the Oct4-GFP reporter to remain repressed upon re-addition of LIF, suggesting a rescue of the differentiation potential (Figure 3.2E). This rescue was specific to the 6DA + 6DL stage, since this observation was not observed in *Tert*^{-/-} mESCs treated with ATRA alone. These

results may reflect a full restoration of differentiation potential, in which case other pluripotency factors such as *Nanog* would also be expected to be downregulated, or a change in differentiation bias. Pertinent to this latter possibility, p53 is necessary to enable correct mesodermal differentiation (Wang et al., 2017). Future experiments would be needed to address the precise transcriptomic and epigenetic changes that are induced by disruption of 53 in the context of eroded telomeres, and whether this rescue is specific to neuronal precursor cells or other differentiated lineages.

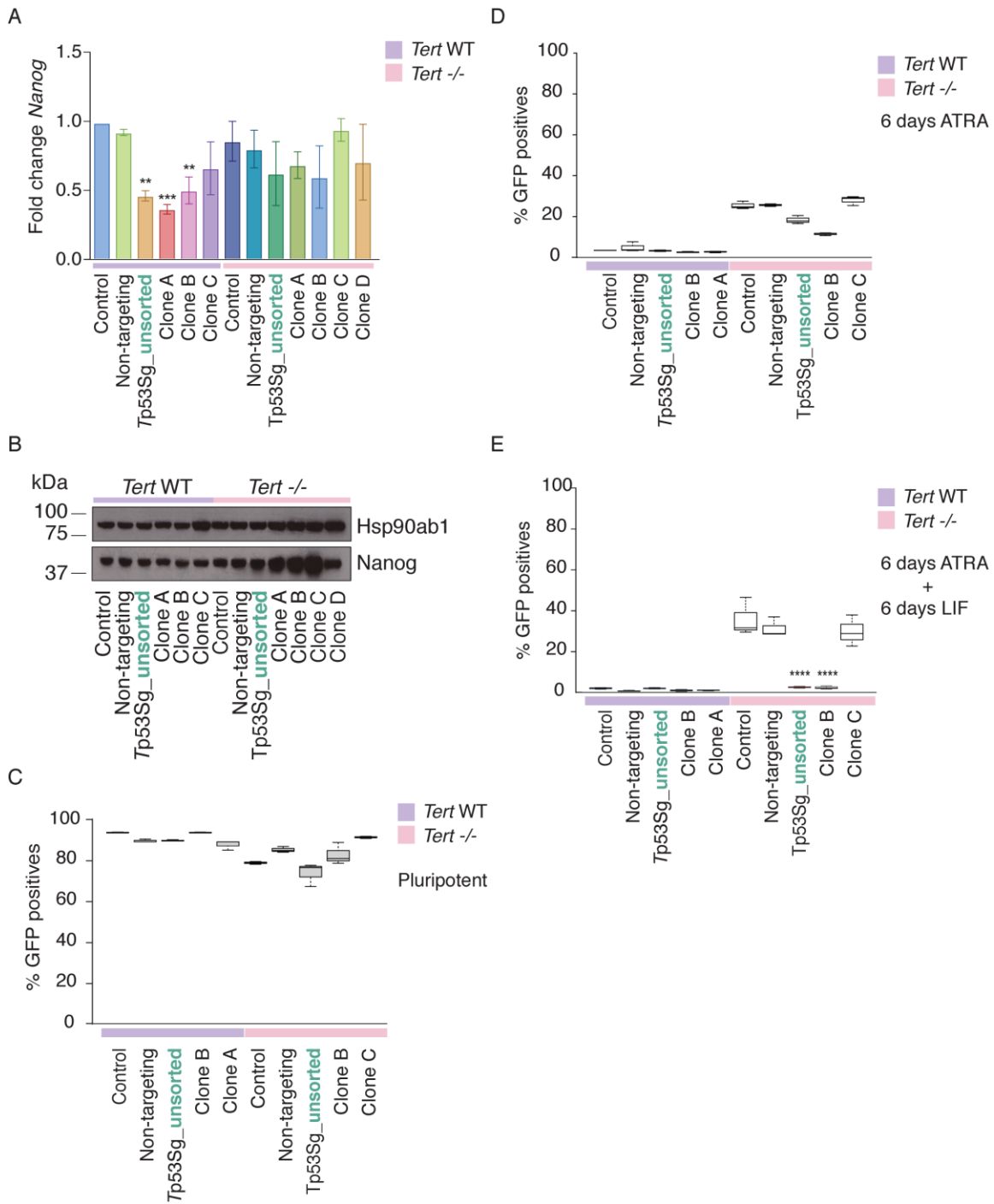


Figure 3-2. The unstable differentiation commitment of *Tert*^{-/-} mESCs is p53-dependent

(A) Fold change of *Nanog* in selected clones or controls by RT-qPCR. Data were analyzed relative to *Tert* WT (first column) and two housekeeping genes (*B2m* and *Hsp90ab1*). Data

are represented as mean + SD (n=3, biological replicates). Statistical analysis was performed using ordinary one-way ANOVA. * (p<0.0332), ** (p<0.0021), *** (p<0.0002), **** (p<0.0001). **(B)** Western blot of Nanog in the different clones or controls. Representative blot from n=3. Hsp90ab1 was used as a loading control. **(C)-(E)** GFP positives cells were measure by flow cytometry, either when they are maintained in LIF **(C—Undifferentiated)**, after 6 days in ATRA **(D)**, or after 6 days in ATRA + 6 days in LIF **(E)**. Data are represented as mean + SD from 3 biological replicates. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, (p<0.0332), ** (p<0.0021), *** (p<0.0002), **** (p<0.0001).

Conclusion

Telomere integrity ensures the stability of the genome and contributes to the maintenance of cell homeostasis. A decrease in telomere length, leading to telomere deprotection, prompts the activation of the DNA damage response (DDR). Here, we investigated whether p53, a key factor of the DDR and cell fate, is involved in this unstable differentiation. Our results indicate that the removal of p53, by CRISPR, rescues the differentiation defect.

To illuminate the possible mechanism, we propose a hypothetical model based on our findings (Figure 3.3A). In the absence of telomerase, dividing cells undergo telomere erosion. Uncapped telomeres are interpreted as a double-strand break by the DDR machinery. Consequently, p53, which is already present at a high level, might be activated and serve to prevent lineage commitment or differentiation. However, the mechanisms linking p53 to the differentiation defect remain to be understood, and several angles

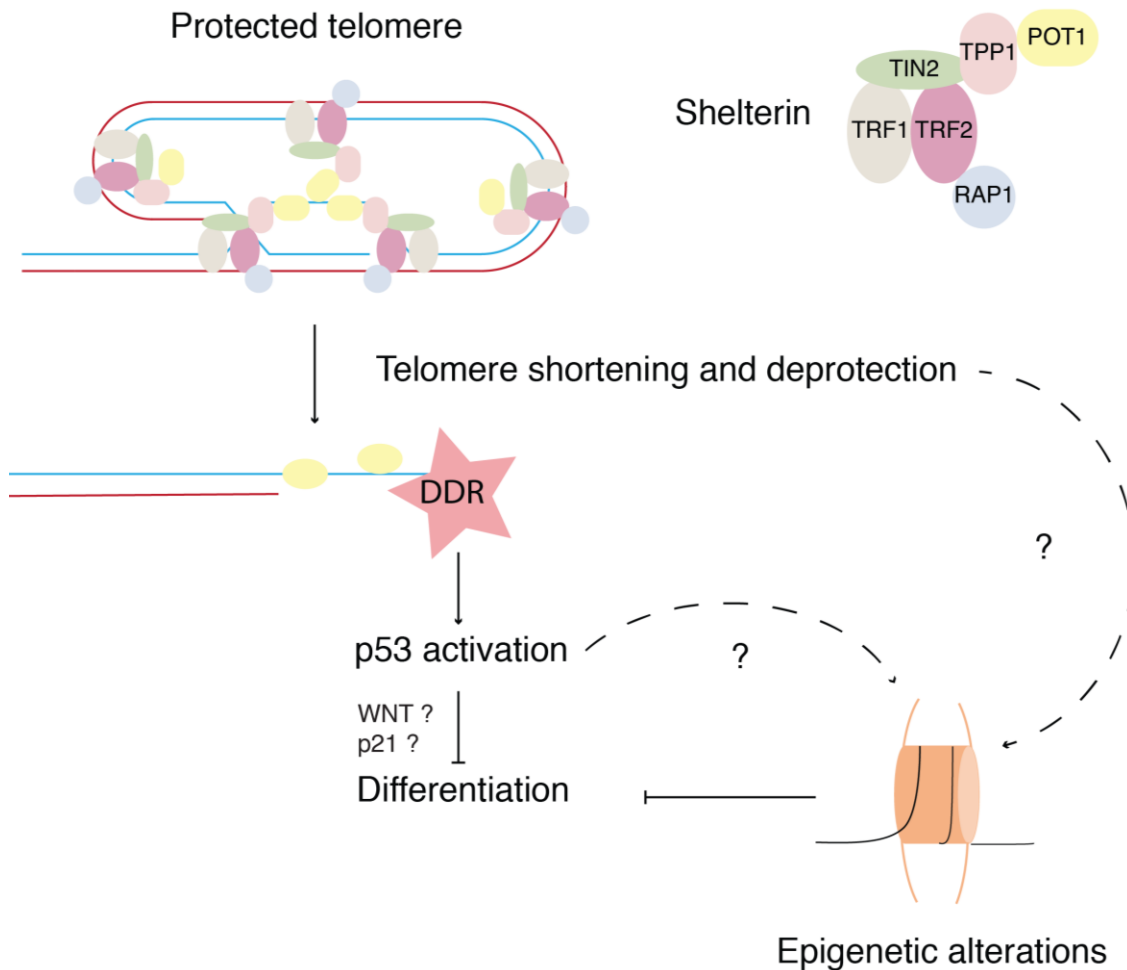
remain to be explored to understand the role of p53 in *Tert*^{-/-} mESCs. For instance, p21, a direct effector of p53 in the DNA damage cascade, could transmit the cell arrest signal that contributes to the differentiation defect. In addition, p53, alone or in cooperation with other effectors, might sustain the pluripotency potential by activating the WNT signaling pathway (Figure 3.3A). It was suggested that in the context of DNA damage, the p53 antidifferentiation function is mediated through the WNT signaling pathway (Abdelalim and Tooyama, 2012; Eldridge et al., 2020). The use of small molecules or other inhibitors of the WNT signaling pathway, or the removal of p21 by CRISPR could help to delineate these possibilities. From another perspective, it would also be interesting to examine whether p53 influences the epigenetic landscape of mESC with short telomeres.

Previously, we showed that telomere deprotection in embryonic stem cells perturbs cell differentiation through epigenetic alterations (Criqui et al., 2020; Pucci et al., 2013). The chemical modulation of H3K27me3, that is overrepresented in *Tert*^{-/-} mESCs, further perturbs the differentiation response, thus underlying the importance of epigenetic regulation in this process. However, little is known about how short telomeres elicit such epigenetic alterations. We propose that p53 might be the mediator between telomere shortening, epigenetic alterations, and the differentiation defect (Figure 3.3A); or that epigenetic alterations and p53 might exert a synergistic effect that results in differentiation perturbation (Figure 3.3A).

Our results differ from other studies that support a pro-differentiation effect of p53. For example, (Lin et al., 2005) showed that p53 binds to the *Nanog* promoter to suppress its expression. Other studies supported this model with the idea that p53 pushes the cells toward differentiation to eliminate deficient cells from the pool of stem cells (de Pedro et

al., 2018). We postulate that culture conditions (for example, our mESCs are not cultured on feeder fibroblasts or maintained in a 2C state), cellular context, and other factors might explain the differences between these findings and would necessitate further investigation.

In conclusion, our study has uncovered a novel role of p53 in the regulation of differentiation of mESCs with critically eroded telomeres that suggests a previously unknown linkage between p53 and eroded telomeres in the regulation of cell fate in murine embryonic stem cells.



DDR = DNA Damage response

Figure 3-3. Telomere shortening triggers activation of the DNA damage response and prevents mESC differentiation in a p53-dependent manner

Schematic representation of a possible mechanism involving p53 in the differentiation defect observed in *Tert*^{-/-} mESCs with eroded telomeres. Intact telomeres are protected from the DDR by associated proteins, i.e. the shelterin complex. Sufficient telomere attrition triggers a change in conformation of the telomere and the subsequent loss of the shelterin complex, leading to deprotected telomeres. Deprotected telomeres are known to activate the DDR, and consequently, p53. In this context and according to our results, p53 appears to control cell fate and prevent differentiation. However, information regarding the

signals responsible for this transmission are as yet unknown. We hypothesize a potential role of WNT or p21 that remains to be tested. The link between p53 and the epigenetic perturbations induced by eroded telomeres (Criqui et al., 2020) also remain to be explored.

Materials and Methods

The lead contact, Lea Harrington, should be contacted regarding requests for detailed protocols, resources, or reagents.

(lea.harrington@umontreal.ca).

Cell lines

Specifications regarding the cell lines used in this publication can be found in the material and methods, «cells line» section, of Criqui et al., 2020. Briefly, wild-type or *Tert*^{-/-} cells were generated from E14 J129 and validated in Liu et al. (2000). Both cell lines were used at late passages (p40-p60). *Tert*^{-/-} displayed critically short telomeres at those advanced passages. The *Pou5f1-GFP* reporter gene was stably transfected into those cells, as mentioned in the section « Generation of Pou5f1-GFP mESCs » and was used as a quantitative tool to follow pluripotency by flow cytometry.

Cell culture

Culture conditions were identical to those described in Criqui et al., 2020; no deviation from this protocol is reported.

Single-guide RNA nucleofection and sequencing

Single-guides RNA was designed and provided by Synthego. The sequence of the gRNAs

used in this study are Trp53: ACAGCCAUCACCUCACUGCA ; non targeting: Negative Control sgRNA (modified) #1 designed by Synthego.

Details about the nucleofection protocol are detailed in Criqui et al., 2020. As mentioned, cells were grown for 4-5 passages before indel quantifications of the heterogeneous population. The clonal selection was performed at that step using single-cell sorting (ARIA, Becton Dickinson). After 8 days, growth was sufficient to perform analysis and experiment on the survival clones.

Several hypotheses can explain the deviation of the knock-out scores from 100%. First, the quality of the sequencing read can affect the score. It is also possible that the cells that have been kept for generation in culture have karyotype abnormalities. Finally, the clonality of cells might have been compromised during the sorting step. For the aforementioned reason, "clone" here will refer to a clonal enrichment for p53^{-/-} disrupted cells

Differentiation assay

Differentiation was achieved exactly as in Criqui et al., 2020, using the same reagents and materials. Briefly, pluripotent cells were transferred in a gelatin-coated plate in a media containing 5 μ M of All trans-retinoic acid (ATRA), instead of LIF, for 6 days. Following the ATRA treatment and to assess the stability of the differentiation, cells were transferred into a gelatin-coated plate and incubate for another 6 days in LIF media.

Flow cytometry

When required, the percentage of GFP-positive cells, which mirror the pluripotency state, was assessed by flow cytometry. Cells were harvested with trypsin, washed in Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS; Thermofisher cat. # 14190144), and resuspended in FACS buffer (PBS 1X, 2% v/v FBS and 0.05 M EDTA) at an approximate concentration of 5 millions cells per ml. GFP percentage within the population was analyzed using the Canto II (Becton Dickinson) analyzer. Data were acquired with BD FACS DIVA software, and results were analyzed with the compatible software Flowjo v10. Debris and doublets were excluded from the analysis through SSC/FSC gating. The remaining cells were plotted according to their GFP and PE expression. Further details are available in Criqui et al., 2020 regarding flow cytometry.

RNA isolation

Total RNAs were extracted from frozen cell pellets using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada, cat. # 217004).

Real-time qPCR

cDNA synthesis was performed using the supercripIV first strand kit (Invitrogen, acquired by Thermo-Fisher, Nepean, ON, Canada, cat. # 18091050), according to the manufacturer's instructions. Quantitative PCR amplification was carried out using the Applied Biosystem Quant studio 7 flex (Life Technologies, acquired by Thermo-Fisher, Nepean, ON, Canada and the FastStart Universal SYBR Green Master (Roche, Laval, QC, Canada, cat. # 04913850001), according to the manufacturer's instructions. The following primers were used for the amplifications:

p53 forward: GCG TAA ACG CTT CGA GAT GTT

p53 reverse: TTT TTA TGG CGG GTA GAC TG

B2m forward: TTCTGGTGCTTGTCTCACTGA

B2M reverse: CAGTATGTTTCGGCTTCCCATTC

Hsp90ab1 forward: GTC CGC CGT GTG TTC ATC AT

Hsp90ab1 reverse: GCA CTT CTT GAC GAT GTT CTT GC

Protein extraction

Frozen cell pellets were resuspended in laemeli 1x + 2-mercaptoethanol (355 mM) (Bio-Rad, Saint-Laurent, QC, Canada, cat. # 161–0747); and boiled 5 min at 95°C. Afterward, samples were centrifuged at high speed (511258 x g) for 20 min (Beckman Coulter, Optima Max XP ultracentrifuge, rotor TLA 120.1). The supernatant was collected and used immediately or stored at –80°C for later use. Protein concentration was determined using the RC DC™ Protein Assay (Bio-Rad, cat. # 5000122).

Western blot analysis

To detect p53 and Nanog, the protein extracts were resolved on a 10% w/v SDS-PAGE gel and 6% w/v stacking gel. The primary antibodies were anti-Nanog (1:1000 dilution, Bethyl Labs, distributed by Cedarlane, Burlington, ON, Canada, cat. # A300-397A), and anti-p53 D3H90 rabbit rodent specific (Cell signaling, distributed by New England Biolabs, Whitby, ON, Canada, Cat. # 32 532, lot 2). Hsp90ab1 was used as a loading control and detected with an anti-Hsp90ab1 antibody (1:2000 dilution, VWR, cat. # 10088–510). The secondary antibody used in this publication was a Goat anti-Rabbit IgG (1:50000 dilution, Jackson ImmunoResearch, #cat: 111-035-003). Each western blot was repeated three

times from independent experiments.

Acknowledgments

The authors thank present and past lab members for their precious advice, including Yahya Benslimane, Gustavo Borges, María Sánchez Osuna, Tsz Wai (Josephine) Chu, and Corinne St-Denis for technical assistance in the generation of the Oct4-GFP lines. We thank the IRIC Cytometry facility, including Angélique Bellemare Pelletier and Annie Gosselin. We are grateful for the financial support from the Leopold-Renaud foundation, Université de Montréal (MC), and past and previous support from the Canadian Institutes for Health Research (Canada) and Wellcome Trust, UK (084637) (LH).

Chapitre 4. Discussion

4.1. Récapitulatif

De nombreuses preuves, notamment apportées par le développement d'organismes modèles, ont mis en évidence une perte de fonction des cellules souches dans un contexte de vieillissement (Jones and Rando, 2011). Une diminution du nombre de cellules souches disponibles ou un biais de différenciation sont les éléments les plus rapportés (Kowalczyk et al., 2015; Maslov et al., 2004). Les maladies associées à un vieillissement prématuré sont généralement liées à un défaut de l'homéostasie des télomères qui coïncide avec des effets phénotypiques dans les tissus qui prolifèrent le plus (Armanios, 2013; Jaskelioff et al., 2011). Même si ces manifestations sont dues à plusieurs facteurs, l'épuisement du potentiel des cellules souches est responsable du manque de régénération des tissus, mettant les cellules souches au cœur des discussions qui s'attardent aux maladies du vieillissement (Armanios, 2013). Notre laboratoire a développé un modèle de cellules souches vieillissantes, en utilisant une lignée de cellules souches embryonnaires murine génétiquement modifiée pour ne plus exprimer la télomérase (*Tert*^{-/-}) (Liu et al., 2000). À des passages tardifs (passage 40 et plus), les cellules ont des télomères très courts, ce qui imite la perte de télomères associée à l'âge observée chez l'homme. Ces cellules sont réfractaires à la différenciation *in vitro*. En effet, lorsqu'on provoque la différenciation en culture en utilisant l'agent de différenciation ATRA, on remarque qu'un fort pourcentage de cellules échoue à se différencier de façon stable (Pucci et al., 2013).

4.2. Discussion du chapitre 2, altérations épigénétiques

Nous avons constaté que le raccourcissement des télomères, dû à l'absence de télomérase — provoque un bouleversement épigénétique des cellules souches.

Parmi les modifications épigénétiques observées, il y a une diminution globale de la méthylation de l'ADN, qui s'accompagne de façon surprenante par une augmentation de la marque d'histone H3K27me3 (Criqui et al., 2020; Pucci et al., 2013). Ultiment, ces altérations épigénétiques mènent à des changements de transcriptomes dans les cellules *Tert*^{-/-} qui provoquent un défaut de différenciation. Notamment, les cellules *Tert*^{-/-} ne parviennent pas à réprimer correctement les gènes de pluripotence lors du processus de différenciation.

Mes résultats ont démontré les éléments suivants :

(1) L'érosion des télomères est responsable du défaut de différenciation. Lorsque les télomères sont longs mais qu'il y a absence de la télomérase, le potentiel de différenciation n'est pas altéré. De plus, rallonger les télomères, en exprimant *Tert* ectopiquement, élimine également le défaut de différenciation (Pucci et al., 2013).

(2) Le défaut de différenciation observé est le résultat du raccourcissement des télomères, et non d'un signal non spécifique de dommage à l'ADN. En effet, l'exposition aux rayons γ n'affecte pas le potentiel de différenciation des mESC *Tert* *WT* (Criqui et al., 2020).

(3) Rétablir la méthylation de l'ADN, en forçant l'expression de la *de novo* ADN méthyltransférase Dnmt3b, rétablis une différenciation plus stable (Pucci et al., 2013). De même, moduler les niveaux de H3K27me3 se répercute directement sur le potentiel de

différenciation des cellules souches (Criqui et al., 2020). En effet, des inhibiteurs du complexe PRC2 exacerbent le défaut de différenciation ; alors que des inhibiteurs de la déméthylase JMJD3, rétablissent partiellement la différenciation. Les inhibiteurs exercent leur action en modifiant l'expression des gènes de pluripotence, ce qui vient directement affecter le potentiel de différenciation. En revanche, l'étude par ATAC-seq de l'utilisation de ces inhibiteurs montre qu'ils n'influencent pas l'accessibilité de la chromatine (Criqui et al., 2020). Au-delà d'une limitation de la technique, on peut penser que H3K27me3 a un rôle beaucoup plus discret quant à la formation de zone de chromatine dense et répressive. Cette supposition pourrait expliquer la redondance uniquement partielle entre les fonctions d'H3K27me3 et la méthylation de l'ADN.

(4) Les altérations épigénétiques provoquent une modification du transcriptome, qui empêcherait la répression stable du programme transcriptomique de pluripotence, et donc la différenciation (Criqui et al., 2020).

Ces résultats suggèrent une connexion directe entre raccourcissement des télomères et épigénétique, deux des caractéristiques principales du vieillissement. De plus, nous avons mis en évidence une situation contradictoire, où on observe une diminution globale de la méthylation, mais une augmentation de la marque répressive H3K27me3. L'effet de la modulation d'H3K27me3 sur la différenciation nous suggère un effet redondant, voire compensatoire. Plus précisément, on peut penser qu'en absence de méthylation, la présence de H3K27me3 est augmentée afin de promouvoir une répression, même partielle, des gènes normalement réprimés par méthylation. En revanche, si la redondance des fonctions épigénétique est possible, elles ne semblent pas équivalentes. Cette étude soulève plusieurs questions, qui, au-delà de notre modèle cellulaire, relèvent

la complexité des interactions épigénétiques, et de leurs conséquences transcriptionnelles et phénotypiques.

(A) Comment expliquer le mécanisme compensatoire, s'il a lieu, entre méthylation de l'ADN et H3K27me3 ?

Le lien entre méthylation de l'ADN et modifications post-traductionnelles des histones est beaucoup étudié, mais de façon surprenante, la compréhension de ces mécanismes reste une énigme non résolue à ce jour (Rose and Klose, 2014).

La méthylation de l'ADN a un rôle indéniable dans le développement, puisqu'elle est responsable de l'inactivation du chromosome X, de maintenir le statut des gènes à empreinte, de réprimer les transposons intergénique, mais aussi de réguler l'expression des gènes (Greenberg and Bourc'his, 2019). Notamment, la méthylation de l'ADN est en partie responsable de la répression des gènes de façon tissus spécifiques. Il existe une dynamique et une connexion entre la méthylation de l'ADN et d'autres modifications d'histones. Par exemple, dans les cellules souches embryonnaires, H3K27me3 se situe dans des régions qui coïncident, la plupart du temps, avec des régions riches en îlots CpG, mais dépourvues de méthylation de l'ADN (Rose and Klose, 2014). En revanche, il ne s'agit pas d'une généralité puisque dans d'autres modèles cellulaires, H3K27me3 et méthylation de l'ADN cohabitent dans les mêmes loci (Rose and Klose, 2014). Les mécanismes gouvernant le placement de H3K27me3 dans le génome par le complexe Polycomb sont encore très mal compris, mais sembleraient être le fruit d'interaction entre plusieurs facteurs épigénétiques (Rose and Klose, 2014). Aux vues de nos observations, et de façon très hypothétique, on pourrait penser qu'un lecteur de l'ADN non méthylé recruterait le complexe PRC2 et stimulerait son activité afin de compenser le manque de méthylation de l'ADN par H3K27me3. Au contraire, la méthylation de l'ADN inhibe peut-

être, via des intermédiaires, le complexe Polycomb de déposer la marque répressive H3K27me3. Dans notre modèle, il serait possible d'étudier la présence de protéines se liant à de l'ADN méthylé ou non méthylé, en combinant des techniques de protéomique et de séquençage au bisulfite.

Une autre étude, publiée il y a quelques années, vient renforcer l'hypothèse d'une redondance dans les mécanismes épigénétiques (Dozmorov, 2015). L'expression de certains gènes, nommés « gène associé à l'âge » ou « aGEN », change avec l'âge, servant ainsi de prédicteur chronologique. De même, les régions dont la méthylation change avec l'âge sont nommées « aDMR ». Selon leurs résultats, ces régions sont également associées avec de nombreuses marques épigénétiques, suggérant ainsi qu'il s'agit de régions sujettes à la régulation. Étonnamment, la comparaison de plusieurs lignées suggère également une présence plus élevée de marque de chromatine autour des aGEN et des aDMR dans les cellules souches ou à haut potentiel prolifératif. Comme les auteurs le mentionnent, on peut penser que ces cellules sont davantage sensibles aux changements, et nécessitent donc une régulation accrue (Dozmorov, 2015).

(B) Existe-t-il un lien entre l'horloge d'Horvath et la dégénérescence épigénétique observée dans les cellules *Tert* -/-

La déméthylation de l'ADN au cours du vieillissement est maintenant un fait bien établi. Mais plus précisément, l'équipe du Pr Steve Horvath et des autres équipes ont découvert que le statut de méthylation d'un groupe très précis de loci, était un prédicteur de l'âge chronologique d'un individu (Hannum et al., 2013b; Horvath, 2013b; Wilkinson et al., 2021). Ils ont d'ailleurs développé un essai universel et basé sur la méthylation de ces loci pour prédire l'âge chronologique de cellules de mammifère. Bien que la longueur des télomères diminue également au cours des divisions cellulaires, seule une faible

corrélation avec le prédicteur d'Horvath a été rapportée (Lu et al., 2019; Marioni et al., 2016). Récemment, une étude a découvert que le statut de méthylation d'un groupe de 140 îlots CpG corrélait avec la longueur des télomères (Lu et al., 2019). En revanche, cette même étude montre qu'*in vitro*, le statut de méthylation de ces îlots correspond davantage au doublement de population. En effet, les auteurs remarquent une corrélation nette entre leurs mesures de la méthylation des 140 îlots et le doublement de population. En revanche, la longueur des télomères varie très peu (Lu et al., 2019). En utilisant l'essai développé par l'équipe de Steve Horvath, il serait intéressant d'étudier si nos cellules *Tert*^{-/-} passage 40 et plus, montrent un schéma de vieillissement au niveau de ces loci de méthylation, par rapport aux cellules *Tert* WT à des passages similaires. Ainsi, nous serions en mesure d'établir si une différence existe entre déméthylation globale de l'ADN dû à un raccourcissement des télomères et horloge épigénétique.

(C) En dehors de la méthylation de l'ADN et de H3K27me3, d'autres marques chromatinienne sont-elles altérées dans les mESC *Tert*^{-/-} aux télomères courts ?

L'interdépendance des marques chromatinienne entre elles suggère fortement que le défaut épigénétique observé pour la méthylation de l'ADN et H3K27me3 pourrait s'étendre à d'autres marques d'histones (Jeltsch et al., 2018; Kasinath et al., 2021). Pour le savoir, il faudrait réaliser des expériences de ChIP avec plusieurs autres marques d'histones. Cela dit, si ces expériences apportaient des réponses concernant les interactions entre marques chromatinienne, la question concernant le point de départ déclenchant toutes ses altérations reste en suspens. Je pense que pour le futur, nous devrions concentrer nos efforts pour découvrir le signal responsable de ce bouleversement épigénétique.

Nos résultats suggèrent que les télomères sont à l'épicentre de la signalisation résultant

en ce défaut de différenciation. Pour une deuxième étude, nous avons donc cherché quels pourraient être les acteurs transmettant le signal depuis les télomères déprotégés. Naturellement, nous avons pensé à chercher du côté de la réponse aux dommages à l'ADN, puisque celle-ci n'est pas réprimée lorsque les télomères sont endommagés. Étant donné le rôle de p53 dans la réponse aux dommages à l'ADN suivant le raccourcissement des télomères, p53 s'est distingué comme une cible de choix. Nous avons utilisé une approche génétique, présentée dans le chapitre 3, afin de démontrer son rôle dans l'échec de différenciation des mESCs *Tert*^{-/-}.

4.3. Discussion du chapitre 3, p53 et destin cellulaire

En plus de son activité connue au sein de la réponse aux dommages de l'ADN, p53 joue un rôle très important dans le destin cellulaire puisqu'il est capable de l'influencer (Kannappan et al., 2017) (Hong et al., 2009). En effet, il a été rapporté que p53 peut promouvoir la sénescence, l'apoptose, la quiescence, la différenciation et la pluripotence (Cicalese et al., 2009; Lin et al., 2005; Maimets et al., 2008). Face à ses rôles multiples, nous sommes interrogés quant au rôle de p53 dans les cellules *Tert*^{-/-} et avons obtenus les résultats suivants :

(1) Il n'y a pas de défaut d'expression de p53 dans les cellules *Tert*^{-/-} comparé aux cellules WT.

(2) L'expression de *Trp53* est diminuée au cours de la différenciation dans les mESC *Tert*^{-/-} et *Tert* WT. Ces résultats suggèrent que l'impact de la perte de *Tert* sur la différenciation n'est pas dû à une expression aberrante de l'ARNm de *Trp53* au cours de

la différenciation.

(3) p53 est responsable du défaut de différenciation observé dans les mESC *Tert*^{-/-} aux télomères courts. En effet, abolir l'expression de *Trp53* par CRISPR Cas9 restaure le potentiel de différenciation des mESC *Tert*^{-/-}.

Si cette étude nous a apporté une réponse majeure, à savoir, p53 est impliqué dans le défaut de différenciation, de nombreux points, qui seront discutés ci-dessous restent à élucider.

(A) Quelles sont les modifications post-traductionnelles de p53 dans les cellules *Tert*^{-/-} vs *Tert* WT ?

L'expression de p53 semble similaire dans les mESC *Tert*^{-/-} et *Tert* WT. En revanche, et outre son expression, p53 peut-être régulée via des modifications post-traductionnelles (Gu and Zhu, 2012). Sachant cela, il serait intéressant de comparer, par protéomique, les différences de modifications de p53 dans les cellules *Tert*^{-/-} et les cellules *Tert* WT.

(B) Qui sont les interactants de p53 dans les mESC *Tert*^{-/-} et *Tert* WT ?

Les modifications post-traductionnelles de p53 permettent notamment à d'autres protéines d'interagir avec p53 et de modifier leurs activités. En plus d'être un facteur de transcription influençant une pléiotropie de gènes, p53 interagit avec de nombreuses protéines capables de moduler l'action de p53 selon le contexte cellulaire (Collavin et al., 2010; Huang et al., 2012). Une étude de bio-ID ciblant les interactants de p53 dans les cellules *Tert*^{-/-} et *Tert* WT participerait à élucider la voie de signalisation par laquelle p53 participe au défaut de différenciation.

(C) Quel est le rôle des formes tronquées de p53 ?

Outre la forme pleine longueur, de nombreuses isoformes et formes tronquées de p53 cohabitent dans les cellules (Marcel et al., 2011). Dans les cellules souches embryonnaires murines 129/SvJ, la forme $\Delta 40p53$ est majoritaire et maintient l'état de pluripotence en contrôlant l'activité de la forme entière de p53 (Ungewitter and Scrable, 2010). Notamment, les auteurs Erica Ungewitter et Heidi Scrable ont montré que cette forme $\Delta 40p53$ régulait l'expression de Nanog et de IGF-1R (Ungewitter and Scrable, 2010). Les cellules que nous utilisons, mESC E14 *Tert* WT ou *Tert* $-/-$, ne semble pas exprimer cette forme tronquée $\Delta 40p53$ (voir figure 3.1). En revanche, il est possible que la résolution du western blot ne permettent pas un bon discernement de ces formes et d'autres analyses pourraient être nécessaire. De façon surprenante, on remarque que certains clones, ayant subi une coupure et une ablation de la forme canonique de p53, possèdent des formes secondaires, de petites tailles, reconnues par l'anticorps anti-p53. (Voir figure 3,1, 38, 33, et 25 kDa). Ces fragments pourraient correspondre à une transcription/traduction à partir du promoteur P2, se situant juste après l'exon 4. Pour rappel, nous avons ciblé le début de l'exon 4 par CRISPR Cas9. Si on exclut la possibilité que ces fragments soient des artefacts, il serait important de comprendre leur structure afin de déterminer quel pourrait être leur rôle. Cependant, ces formes sont différentes selon les clones et ne semblent pas influencer le résultat de la différenciation des mESCs. Si on prend pour exemple les cellules *Tert* $-/-$, le résultat obtenu est similaire, c'est-à-dire une restauration complète de la différenciation— avec la population non triée et le clone B (Figure 3,2 E).

(D) La présence, ou l'absence de p53 influence-t-elle le profil transcriptomique des mESC pluripotentes ?

En contrôlant l'expression de *Nanog*, p53 est pensée comme un candidat idéal permettant de réguler le commutateur entre pluripotence et différenciation (Lin et al., 2005; Maimets et al., 2008). Selon notre étude et d'autres, l'absence de p53 n'influence pas la capacité des cellules à exprimer *Nanog* et *Pou5f1/Oct4* (Shigeta et al., 2013). En revanche, nous n'avons pas examiné l'effet de l'absence de p53 sur le transcriptome des mESC. En utilisant des cellules *Tert* WT, nous pourrions comparer l'expression des gènes dans les cellules p53 WT ou p53 *-/-*. De même, ils seraient intéressants de comparer les cellules *Tert -/-* p53 WT avec les *Tert -/-* p53 *-/-*. D'éventuels candidats, cible de p53, et influençant le destin cellulaire, pourraient alors être mis en lumière.

(E) L'absence de p53 restaure le potentiel prolifératif des mESCs *Tert -/-*. En revanche, une fois différenciées, les cellules *Trp53 -/-* *Tert -/-* sont-elles identiques aux cellules WT ?

Notre conclusion quant à la restauration du potentiel de différenciation des mESC *Tert -/-* en absence de p53 se base sur l'expression du gène de pluripotence *Pou5f1/Oct4*. *Pou5f1/Oct4* fait partie du trio des gènes régulateurs de la pluripotence, avec *Nanog* et *Sox2*. En revanche, et si la perte de l'expression de *Pou5f1/Oct4* indique une sortie de la pluripotence, nous n'avons aucune réponse concernant la voie de différenciation empruntée par les cellules *Trp53 -/-*. En effet, il est possible que tout en restaurant le potentiel de différenciation, l'absence de p53 provoque un biais de différenciation. Par exemple, il a été montré que p53 favorise une différenciation mésodermique des tissus (Wang et al., 2017a). Ainsi, il est possible qu'un biais de différenciation existe dans les cellules mESCs *Trp53 -/-*. Une analyse transcriptomique, comparant les 4 échantillons

suivants : (*Tert* WT, *Trp53* WT), (*Tert* WT, *Trp53* -/-), (*Tert* -/-, *Trp53* WT), (*Tert* -/-, *Trp53* -/-), nous indiquerait si de tels changements existent.

(F) Y a-t-il un lien entre épigénétique et p53 ?

Une fois notre première étude terminée, l'idée était de comprendre comment les télomères pouvaient transmettre un signal menant une altération de l'épigénétique et donc de la différenciation. Nous avons par la suite montré que le facteur p53 jouait lui aussi un rôle puisque sa présence semble prévenir la différenciation dans les mESCs *Tert* -/-. En revanche, le lien entre p53 et épigénétique reste à investiguer et fera l'objet de prochaines recherches. Pour commencer, il faudra vérifier comment p53 influence H3K27me3 ainsi que la méthylation de l'ADN.

4.4. Perspectives

Grâce à mes deux études, nous comprenons un peu plus l'effet du raccourcissement des télomères sur le potentiel des cellules souches. Néanmoins, l'histoire est encore incomplète et de nombreux projets peuvent émaner afin de compléter nos connaissances. En plus d'étayer la dimension épigénétique et le rôle de p53, nous pourrions voir si d'autres facteurs sont impliqués.

(A) Le Shelterin et la réponse aux dommages à l'ADN

Lorsque les télomères atteignent une longueur critique, la structure des télomères est perturbée puisque les répétitions télomériques restantes ne suffisent plus à la formation de la boucle télomérique (boucle T). Cette structure étant le substrat de liaison des protéines du Shelterin, celles-ci ne sont plus capables de se lier correctement aux

télomères.

Parmi les candidats intéressants, il a été rapporté que RAP1 pouvait se lier sur l'ADN à travers le génome pour réguler des fonctions télomérique et non télomérique (Martínez et al., 2016; Platt et al., 2013b). Par exemple, RAP1 est un régulateur de l'obésité et du métabolisme (Yeung et al., 2013). Ne pouvant plus se lier aux télomères dans les cellules *Tert*^{-/-}, on pourrait alors se demander si (1) RAP1 subit une relocalisation à travers le génome et (2) si RAP1 influence le destin cellulaire. Des expériences de CHIP pourraient donner des indices concernant le rôle de RAP1.

De plus, beaucoup des acteurs de la réponse aux dommages à l'ADN sont aussi impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN. L'implication de candidat tel que Mre11 pourrait être examinée. En effet, Mre11 est à la fois impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN et dans l'homéostasie des télomères (Stracker and Petrini, 2011).

(B) Recherche de candidats par criblage haut débit

Jusqu'à maintenant et grâce à l'étude de la littérature, nos travaux ciblaient des éléments très précis : l'épigénétique, p53 et nous avons investigué selon ces hypothèses. Malgré l'avancée de nos recherches, nous pensons que nous devons encore découvrir certains intermédiaires afin d'avoir une image plus globale de la signalisation partant du raccourcissement des télomères, jusqu'au défaut de différenciation. Nous pourrions faire un criblage haut débit, en utilisant la librairie GeKO v2 dessinée par le laboratoire de Feng Zang et ciblant pour CRISPR-cas9 plus de 20 000 gènes murins (Sanjana et al., 2014). Par exemple, nous pourrions réaliser cette expérience sur les lignées *Tert*^{-/-} et *Tert* WT. Typiquement,

nous conduirons une infection avec un vecteur lentivirus à grande échelle sur les cellules puis nous procéderons à l'expansion des populations. Ces populations seront ensuite

congelées et séquencées afin de s'assurer de la bonne intégration de la librairie dans les cellules.

Une fois que la validation sera établie, les cellules pourront être décongelées et Cas9 pourra être introduite sous forme protéique par nucléofection. Après environ 48h, la population sera séquencée et nous considérerons cette étape comme le jour zéro de l'expérience. Finalement, un essai de différenciation sera conduit : les cellules seront traitées avec de l'ATRA pendant 6 jours et séquencées. Ensuite du LIF sera rajouté dans le milieu pour remplacer l'ATRA et au bout de 6 autres jours, les cellules seront séquencées à nouveau. La distribution des sgRNA sera alors comparée par rapport au jour zéro et nous rechercherons les sgRNA qui seront enrichis ou au contraire, appauvris après différenciation.

Des analyses bio-informatiques permettrait ensuite de découvrir d'éventuels candidats, jouant un rôle sur le potentiel de différenciation, spécifiquement dans les cellules *Tert*^{-/-}. Ce projet serait un défi puisqu'il soulèverait de nombreuses difficultés techniques, mais après de multiples validations, nous pourrions découvrir d'autres intermédiaires affectant la différenciation des mESC *Tert*^{-/-}.

4.5. Remarques et conclusions

Mon travail, réalisé au cours de mes cinq années de doctorat, a mis en évidence que l'une des caractéristiques majeures du vieillissement, le raccourcissement des télomères, influençait fortement les fonctions des cellules souches. Notamment, nous avons montré que la différenciation des cellules souches est compromise en cas de raccourcissement des télomères. Si nos résultats s'imbriquent dans la compréhension du vieillissement, et des maladies associées, je pense également qu'ils ouvrent à d'autres recherches dans

plusieurs autres domaines. Par exemple, dans les transplantations de cellules souches, il paraît évident que la longueur des télomères des cellules souches du donneur pourrait influencer le succès de la restauration des fonctions des organes. De plus, le raccourcissement des télomères est source d'instabilité génomique, ce qui participe à la progression tumorale. Ici, mes résultats suggèrent qu'en plus, il pourrait y avoir une influence sur le comportement de cellule souche tumorale puisque que plusieurs études ont montrés que les télomères des cellules souches cancéreuses avaient tendance à être plus court que ceux du reste de la tumeur (Shay and Wright, 2010).

Bibliographie

- Abdelalim, E.M., and Tooyama, I. (2012). The p53 inhibitor, pifithrin-alpha, suppresses self-renewal of embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *420*, 605–610.
- Adams, P.D., Jasper, H., and Rudolph, K.L. (2015). Aging-Induced Stem Cell Mutations as Drivers for Disease and Cancer. *Cell Stem Cell* *16*, 601–612.
- Aguado, J., Sola-Carvajal, A., Cancila, V., Revêchon, G., Ong, P.F., Jones-Weinert, C.W., Wallén Arzt, E., Lattanzi, G., Dreesen, O., Tripodo, C., et al. (2019). Inhibition of DNA damage response at telomeres improves the detrimental phenotypes of Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome. *Nat. Commun.* *10*, 1–11.
- Aguado, T., Francisco J, G., Aix, E., Schneider, R.P., Giovinazzo, G., Blasco, M. a, and Flores, I. (2016). Telomere Length Defines the Cardiomyocyte Differentiation Potency of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell.*
- Ahmed, W., and Lingner, J. (2018). Impact of oxidative stress on telomere biology. *Differentiation* *99*, 21–27.
- Aloia, L., Di Stefano, B., and Di Croce, L. (2013). Polycomb complexes in stem cells and embryonic development. *Dev.* *140*, 2525–2534.
- Ambrosi, T.H., Scialdone, A., Graja, A., Gohlke, S., Jank, A.M., Bocian, C., Woelk, L., Fan, H., Logan, D.W., Schürmann, A., et al. (2017). Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. *Cell Stem Cell* *20*, 771-784.e6.
- Anton, R., Kestler, H.A., and Kühl, M. (2007). β -Catenin signaling contributes to stemness and regulates early differentiation in murine embryonic stem cells. *FEBS Lett.* *581*, 5247–5254.
- Armanios, M. (2013). Telomeres and age-related disease: How telomere biology informs

clinical paradigms. *J. Clin. Invest.* 123, 996–1002.

Armanios, M., and Blackburn, E.H. (2012). Telomere Syndromes. *Nat Rev Genet* 70, 646–656.

Armstrong, J.F., Kaufman, M.H., Harrison, D.J., and Clarke, A.R. (1995). High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr. Biol.* 5, 931–936.

Asai, T., Liu, Y., Bae, N., and Nimer, S.D. (2012). The p53 Tumor Suppressor protein Regulates Hematopoietic Stem Cell Fate. *J. Cell. Physiol.* 8, 74299–74311.

Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17, 126–140.

Baerlocher, G.M., Rice, K., Vulto, I., and Lansdorp, P.M. (2007). Longitudinal data on telomere length in leukocytes from newborn baboons support a marked drop in stem cell turnover around 1 year of age. *Aging Cell* 6, 121–123.

Barazzuol, L., Ju, L., and Jeggo, P.A. (2017). A coordinated DNA damage response promotes adult quiescent neural stem cell activation. *PLoS Biol.* 15, 1–25.

Barefield, C., and Karlseder, J. (2012). The BLM helicase contributes to telomere maintenance through processing of late-replicating intermediate structures. *Nucleic Acids Res.*

Barral, A., and Déjardin, J. (2020). Telomeric Chromatin and TERRA. *J. Mol. Biol.* 432, 4244–4256.

Baur, J.A., Zou, Y., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2001). Telomere position effect in human cells. *Science* (80-.). 292, 2075–2077.

Beerman, I., and Rossi, D.J. (2015). Epigenetic Control of Stem Cell Potential during Homeostasis, Aging, and Disease. *Cell Stem Cell* 16, 613–625.

Behrens, A., Van Deursen, J.M., Rudolph, K.L., and Schumacher, B. (2014). Impact of

genomic damage and ageing on stem cell function. *Nat. Cell Biol.* *16*, 201–207.

Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I., Schotta, G., Klatt, P., Jenuwein, T., and Blasco, M.A. (2007). Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. *J. Cell Biol.* *178*, 925–936.

Benetti, R., Schoeftner, S., Muñoz, P., and Blasco, M.A. (2008). Role of TRF2 in the assembly of telomeric chromatin. *Cell Cycle* *7*, 3461–3468.

Benslimane, Y., Sánchez-Osuna, M., Coulombe-Huntington, J., Bertomeu, T., Henry, D., Huard, C., Bonneil, É., Thibault, P., Tyers, M., and Harrington, L. (2021). A novel p53 regulator, C16ORF72/TAPR1, buffers against telomerase inhibition. *Aging Cell* *20*, 1–11.

Bertuch, A.A. (2016). The molecular genetics of the telomere biology disorders. *RNA Biol.* *13*, 696–706.

Blackburn, E.H., Greider, C.W., and Szostak, J.W. (2006). Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat. Med.* *12*, 1133–1138.

Blackburn, E.H., Epel, E.S., and Lin, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science (80-.)*. *350*, 1193–1198.

Blasco, M.A., Lee, H.W., Hande, M.P., Samper, E., Lansdorp, P.M., DePinho, R.A., and Greider, C.W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* *91*, 25–34.

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

Booth, L.N., and Brunet, A. (2016). The Aging Epigenome. *Mol. Cell* *62*, 728–744.

Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., et al. (2006). Polycomb complexes repress

developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441, 349–353.

Brunet, A., and Rando, T.A. (2017). Interaction between epigenetic and metabolism in aging stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 45, 1–7.

Buenrostro, J., Wu, B., Chang, H., and Greenleaf, W. (2015). ATAC-seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 109: 21.29.1–21.29.9.

Buenrostro, J.D., Giresi, P.G., Zaba, L.C., Chang, H.Y., and Greenleaf, W.J. (2013). Transposition of native chromatin for multimodal regulatory analysis and personal epigenomics. *Nat Methods* 6, 2166–2171.

Cai, B.H., Chao, C.F., Huang, H.C., Lee, H.Y., Kannagi, R., and Chen, J.Y. (2019). Roles of p53 family structure and function in non-canonical response element binding and activation. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3681.

Capper, R., Britt-Compton, B., Tankimanova, M., Rowson, J., Letsolo, B., Man, S., Haughton, M., and Baird, D.M. (2007). The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells. *Genes Dev.* 21, 2495–2508.

Cardoso-Júnior, C.A.M., Guidugli-Lazzarini, K.R., and Hartfelder, K. (2018). DNA methylation affects the lifespan of honey bee (*Apis mellifera* L.) workers – Evidence for a regulatory module that involves vitellogenin expression but is independent of juvenile hormone function. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 92, 21–29.

Cencioni, C., Heid, J., Krepelova, A., Rasa, S.M.M., Kuenne, C., Guenther, S., Baumgart, M., Cellerino, A., Neri, F., Spallotta, F., et al. (2019). Aging Triggers H3K27 Trimethylation Hoarding in the Chromatin of *Nothobranchius furzeri* Skeletal Muscle. *Cells* 8.

Cesare, A.J., and Reddel, R.R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet* 11, 319–330.

Cesare, A.J., Hayashi, M.T., Crabbe, L., and Karlseder, J. (2013). The telomere

deprotection response is functionally distinct from the genomic DNA damage response. *Mol. Cell* 23, 1–7.

Chamberlain, S.J., Yee, D., and Magnuson, T. (2008). Polycomb Repressive Complex 2 Is Dispensable for Maintenance of Embryonic Stem Cell Pluripotency. *Stem Cells* 26, 1496–1505.

Chambers, S.M., Shaw, C.A., Gatz, C., Fisk, C.J., Donehower, L.A., and Goodell, M.A. (2007). Aging Hematopoietic Stem Cells Decline in Function and Exhibit Epigenetic Dysregulation. *Plos Biol.*

Chen, T., and Dent, S.Y.R. (2014). Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nat. Rev. Genet.* 15, 93–106.

Chen, L.Y., Majerská, J., and Lingner, J. (2013). Molecular basis of telomere syndrome caused by CTC1 mutations. *Genes Dev.* 27, 2099–2108.

Chen, Y., Bravo, J.I., Son, J.M., Lee, C., and Benayoun, B.A. (2020). Remodeling of the H3 nucleosomal landscape during mouse aging. *Transl. Med. Aging* 4, 22–31.

Chin, L., Artandi, S.E., Shen, Q., Tam, A., Lee, S.L., Gottlieb, G.J., Greider, C.W., and DePinho, R.A. (1999). P53 Deficiency Rescues the Adverse Effects of Telomere Loss and Cooperates With Telomere Dysfunction To Accelerate Carcinogenesis. *Cell* 97, 527–538.

Chu, T.W., D’Souza, Y., and Autexier, C. (2015). The human telomerase “Insertion in Fingers Domain” can mediate enzyme processivity and telomerase recruitment to telomeres in a TPP1-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* 36, MCB.00746-15.

Cicalese, A., Bonizzi, G., Pasi, C.E., Faretta, M., Ronzoni, S., Giulini, B., Brisken, C., Minucci, S., Di Fiore, P.P., and Pelicci, P.G. (2009). The Tumor Suppressor p53 Regulates Polarity of Self-Renewing Divisions in Mammary Stem Cells. *Cell* 138, 1083–1095.

Claude, E., and Decottignies, A. (2020). Telomere maintenance mechanisms in cancer: telomerase, ALT or lack thereof. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 60, 1–8.

Claussin, C., and Chang, M. (2015). The many facets of homologous recombination at telomeres. *Microb. Cell* 2, 308–321.

Collavin, L., Lunardi, A., and Del Sal, G. (2010). P53-family proteins and their regulators: Hubs and spokes in tumor suppression. *Cell Death Differ.* 17, 901–911.

Coquard, R. (1997). Late effects of ionizing radiation on bone marrow. *Cancer/Radiotherapie* 1, 792–800.

Criqui, M., Qamra, A., Chu, T.W., Sharma, M., Tsao, J., Henry, D., Baryste-lovejoy, D., Arrowsmith, C.H., Winegarden, N., Lupien, M., et al. (2020). Telomere dysfunction cooperates with epigenetic alterations to impair murine embryonic stem cell fate commitment. *Elife*.

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

D’Oto, A., Tian, Q.-W., Davidoff, A.M., and Yang, J. (2016). Histone demethylases and their roles in cancer epigenetics. *J. Med. Oncol. Ther.* 1, 34–40.

Dan, J., Rousseau, P., Hardikar, S., Veland, N., Wong, J., Autexier, C., and Chen, T. (2017). Zscan4 Inhibits Maintenance DNA Methylation to Facilitate Telomere Elongation in Mouse Embryonic Stem Cells. *Cell Rep.* 20, 1936–1949.

Das, C., and Tyler, J.K. (2012). Histone exchange and histone modifications during transcription and aging. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1819, 332–342.

Decottignies, A., and d’Adda di Fagagna, F. (2011). Epigenetic alterations associated with cellular senescence: A barrier against tumorigenesis or a red carpet for cancer? *Semin. Cancer Biol.* 21, 360–366.

Deng, Y., Chan, S.S., and Chang, S. (2008). Telomere dysfunction and tumour suppression: The senescence connection. *Nat. Rev. Cancer* 8, 450–458.

Denise Aubé, and Karine Souffez (2016). LE VIEILLISSEMENT AU QUÉBEC.

Dolinoy, D.C., Huang, D., and Jirtle, R.L. (2007). Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development.

Donehower, L.A. (1996). The p53-deficient mouse: A model for basic and applied cancer studies. *Semin. Cancer Biol.* 7, 269–278.

Dozmorov, M.G. (2015). Polycomb repressive complex 2 epigenomic signature defines age-associated hypermethylation and gene expression changes. *Epigenetics* 10, 484–495.

Dunstan, H.M., Ludlow, C., Goehle, S., Cronk, M., Szankasi, P., Evans, D.R.H., Simon, J.A., and Lamb, J.R. (2002). Cell-Based Assays for Identification of Novel Double-Strand Break-Inducing Agents. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 94, 88–94.

El-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* 1, 45–49.

Eldridge, C.B., Allen, F.J., Crisp, A., Grandy, R.A., Vallier, L., and Sale, J.E. (2020). A p53-Dependent Checkpoint Induced upon DNA Damage Alters Cell Fate during hiPSC Differentiation. *Stem Cell Reports* 15, 827–835.

Erdmann, N., Liu, Y., and Harrington, L. (2004). Distinct dosage requirements for the maintenance of long and short telomeres in mTert heterozygous mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 6080–6085.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.

Evans, S.C., and Lozano, G. (1997). The Li-Fraumeni syndrome: An inherited susceptibility to cancer. *Mol. Med. Today* 3, 390–395.

Fairweather, D.S., Fox, M., and Margison, G.P. (1987). The in vitro lifespan of MRC-5 cells is shortened by 5-azacytidine-induced demethylation. *Exp. Cell Res.* 168, 153–159.

Feil, R., and Fraga, M.F. (2012). Epigenetics and the environment: Emerging patterns and implications. *Nat. Rev. Genet.* 13, 97–109.

Feng, X., Hsu, S.J., Kasbek, C., Chaiken, M., and Price, C.M. (2017). CTC1-mediated C-strand fill-in is an essential step in telomere length maintenance. *Nucleic Acids Res.* 45, 4281–4293.

Ferro, S.R., Mira, H., Flores, I., Taylor, K., Blasco, M. a, Ferrón, S.R., Marqués-Torrejón, M.A., Mira, H., Flores, I., Taylor, K., et al. (2009). Telomere Shortening in Neural Stem Cells Disrupts Neuronal Differentiation and Neuritogenesis and Isabel Farin. *Cell* 29, 14394–14407.

Feser, J., Truong, D., Das, C., Carson, J.J., Kieft, J., Harkness, T., and Tyler, J.K. (2010). Elevated Histone Expression Promotes Life Span Extension. *Mol. Cell* 39, 724–735.

Fioravanti, R., Stazi, G., Zwergel, C., Valente, S., and Mai, A. (2018). Six Years (2012–2018) of Researches on Catalytic EZH2 Inhibitors: The Boom of the 2-Pyridone Compounds. *Chem. Rec.* 1818–1832.

Fischer, N.W., Prodeus, A., Malkin, D., and Gariépy, J. (2016). P53 Oligomerization Status Modulates Cell Fate Decisions Between Growth, Arrest and Apoptosis. *Cell Cycle* 15, 3210–3219.

Flores, I., and Blasco, M.A. (2010). The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS Lett.* 584, 3826–3830.

Flores, I., Canela, A., Vera, E., Tejera, A., Cotsarelis, G., and Blasco, M.A. (2008). The longest telomeres: A general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev.* 22, 654–667.

Forrest, R.A., Swift, L.P., Rephaeli, A., Nudelman, A., Kimura, K.I., Phillips, D.R., and Cutts, S.M. (2012). Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1602–1612.

Fraga, M.F., and Esteller, M. (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet.* *23*, 413–418.

Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suñer, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J., et al. (2005). Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 10604–10609.

Fu, H., Tian, C. lei, Ye, X., Sheng, X., Wang, H., Liu, Y., and Liu, L. (2018). Dynamics of Telomere Rejuvenation during Chemical Induction to Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* *11*, 70–87.

Gardano, L., Pucci, F., Christian, L., Le Bihan, T., and Harrington, L. (2013). Telomeres, a busy platform for cell signaling. *Front. Oncol.* *3*, 146.

Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E., and Ramalho-Santos, M. (2011). Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 36–47.

Ghanim, G.E., Fountain, A.J., van Roon, A.M.M., Rangan, R., Das, R., Collins, K., and Nguyen, T.H.D. (2021). Structure of human telomerase holoenzyme with bound telomeric DNA. *Nature* *593*, 449–453.

Ghatak, D., Das Ghosh, D., and Roychoudhury, S. (2021). Cancer Stemness: p53 at the Wheel. *Front. Oncol.* *10*, 1–20.

Ghorbaninejad, Hosseini, S., and Eslaminejad, M.B. (2020). The importance of stem cell Senescence in Regenerative medicine.

Gong, F., and Miller, K.M. (2019). Histone methylation and the DNA damage response. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* *780*, 37–47.

González-Recio, O., Toro, M.A., and Bach, A. (2015). Past, present, and future of epigenetics applied to livestock breeding. *Front. Genet.* *6*, 1–5.

Gonzalo, S., Jaco, I., Fraga, M.F., Chen, T., Li, E., Esteller, M., and Blasco, M.A. (2006). DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in

mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 8, 416–424.

Gopinath, S.D., and Rando, T.A. (2008). Stem Cell Review Series: Aging of the skeletal muscle stem cell niche. *Aging Cell* 7, 590–598.

Goytisolo, F.A., Samper, E., Martín-Caballero, J., Fannon, P., Herrera, E., Flores, J.M., Bouffler, S.D., and Blasco, M.A. (2000). Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals. *J. Exp. Med.* 192, 1625–1636.

Greenberg, M.V.C., and Bourc'his, D. (2019). The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 590–607.

Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a Specific Telomere Terminal Transferase Activity in Tetrahymena Extracts.

Gu, B., and Zhu, W.G. (2012). Surf the Post-translational Modification Network of p53 Regulation. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 672–684.

Guarasci, F., D'Aquila, P., Montesanto, A., Corsonello, A., Bellizzi, D., and Passarino, G. (2019). Individual DNA Methylation Profile is Correlated with Age and can be Targeted to Modulate Healthy Aging and Longevity. *Curr. Pharm. Des.* 25, 4139–4149.

Hadad, N., Masser, D.R., Logan, S., Wronowski, B., Mangold, C.A., Clark, N., Otalora, L., Unnikrishnan, A., Ford, M.M., Giles, C.B., et al. (2016). Absence of genomic hypomethylation or regulation of cytosine-modifying enzymes with aging in male and female mice. *Epigenetics and Chromatin* 9, 1–20.

Hagarman, J.A., Motley, M.P., Kristjansdottir, K., and Soloway, P.D. (2013). Coordinate Regulation of DNA Methylation and H3K27me3 in Mouse Embryonic Stem Cells. *PLoS One* 8.

Han, S., and Brunet, A. (2012). Histone methylation makes its mark on longevity. *Trends Cell Biol.* 22, 42–49.

Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S.V., Klotzle, B.,

Bibikova, M., Fan, J.B., Gao, Y., et al. (2013). Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol. Cell* 49, 359–367.

Hannum et al., Guinnee, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S.V., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J.B., Gao, Y., et al. (2013). Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol. Cell* 49, 83.

Hao, L.Y., Armanios, M., Strong, M.A., Karim, B., Feldser, D.M., Huso, D., and Greider, C.W. (2005). Short telomeres, even in the presence of telomerase, limit tissue renewal capacity. *Cell* 123, 1121–1131.

Harley, C.B., Vaziri, H., Counter, C.M., and Allsopp, R.C. (1992). The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp. Gerontol.* 27, 375–382.

Harrington, L. (2012). Haploinsufficiency and telomere length homeostasis. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 730, 37–42.

Harrington, L., and Pucci, F. (2018). In medio stat virtus: Unanticipated consequences of telomere dysequilibrium. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 373.

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

He, Y., Selvaraju, S., Curtin, M.L., Jakob, C.G., Zhu, H., Comess, K.M., Shaw, B., The, J., Lima-Fernandes, E., Szewczyk, M.M., et al. (2017). The EED protein–protein interaction inhibitor A-395 inactivates the PRC2 complex. *Nat. Chem. Biol.* 2.

Heinemann, B., Nielsen, J.M., Hudlebusch, H.R., Lees, M.J., Larsen, D.V., Boesen, T., Labelle, M., Gerlach, L.O., Birk, P., and Helin, K. (2014). Inhibition of demethylases by GSK-J1/J4. *Nature* 514, E1–E2.

Hemann, M.T., Strong, M.A., Hao, L.Y., and Greider, C.W. (2001). The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107, 67–77.

Henkler, F., Stolpmann, K., and Luch, A. (2012). Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: bulky DNA adducts and cellular responses. *EXS 101*, 107–131.

Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Mol. Cell 14*, 501–513.

Herman Müller (1938). The remaking of chromosomes.

Herrera, E., Samper, E., Martín-Caballero, J., Flores, J.M., Lee, H.-W., Blasco, M.A., Herrera, E., and Samper, E. (1999). Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres.

Herrera, E., Martínez-A, C., and Blasco, M.A. (2000). Impaired germinal center reaction in mice with short telomeres. *EMBO J. 19*, 472–481.

Himmelstein, M.W., Boogaard, P.J., Cadet, J., Farmer, P.B., Kim, J.H., Martin, E.A., Persaud, R., and Shuker, D.E.G. (2009). Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: II. Overview of methods of identification and quantitation of DNA damage. *Crit. Rev. Toxicol. 39*, 679–694.

Hoffmann, I., Roatsch, M., Schmitt, M.L., Carlino, L., Pippel, M., Sippl, W., and Jung, M. (2012). The role of histone demethylases in cancer therapy. *Mol. Oncol. 6*, 683–703.

Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature 460*, 1132–1135.

Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol. 14*, R115.

Horvath, S., and Raj, K. (2018). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat. Rev. Genet. 19*, 371–384.

Hu, Z., Chen, K., Xia, Z., Chavez, M., Pal, S., Seol, J.H., Chen, C.C., Li, W., and Tyler, 168

J.K. (2014). Nucleosome loss leads to global transcriptional up-regulation and genomic instability during yeast aging. *Genes Dev.* 28, 396–408.

Huang, Y., Jeong, J.S., Okamura, J., Sook-Kim, M., Zhu, H., Guerrero-Preston, R., and Ratovitski, E.A. (2012). Global tumor protein p53/p63 interactome: Making a case for cisplatin chemoresistance. *Cell Cycle* 11, 2367–2379.

Huidobro, C., Fernandez, A.F., and Fraga, M.F. (2013). Aging epigenetics: Causes and consequences. *Mol. Aspects Med.* 34, 765–781.

Ito, T., Teo, Y.V., Evans, S.A., Neretti, N., and Sedivy, J.M. (2018). Regulation of Cellular Senescence by Polycomb Chromatin Modifiers through Distinct DNA Damage- and Histone Methylation-Dependent Pathways. *Cell Rep.* 22, 3480–3492.

Jacks, T., Remington, L., Williams, B.O., Schmitt, E.M., Halachmi, S., Bronson, R.T., and Weinberg, R.A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr. Biol.* 4, 1–7.

Jadhav, U., Nalapareddy, K., Saxena, M., O'Neill, N.K., Pinello, L., Yuan, G.C., Orkin, S.H., and Shivdasani, R.A. (2016). Acquired tissue-specific promoter bivalency is a basis for PRC2 necessity in adult cells. *Cell* 165, 1389–1400.

Jaskelioff, M., Muller, F.L., Paik, J.H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A.C., Sahin, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A., Cadiñanos, J., et al. (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* 469, 102–107.

Jaul, E., and Barron, J. (2017). Age-Related Diseases and Clinical and Public Health Implications for the 85 Years Old and Over Population. *Front. Public Heal.* 5, 1–7.

Jeltsch, A., Broche, J., and Bashtrykov, P. (2018). Molecular processes connecting DNA methylation patterns with DNA methyltransferases and histone modifications in mammalian genomes. *Genes (Basel)*. 9, 1–20.

Jones, A., and Wang, H. (2010). Polycomb repressive complex 2 in embryonic stem cells: An overview. *Protein Cell* 1, 1056–1062.

Jones, D.L., and Rando, T.A. (2011). Emerging models and paradigms for stem cell ageing. *Nat. Cell Biol.* *13*, 506–512.

Jung, M., and Pfeifer, G.P. (2015). Aging and DNA methylation. *BMC Biol.* *13*, 1–8.

Justesen, J., Stenderup, K., Ebbesen, E.N., Mosekilde, L., Steiniche, T., and Kassem, M. (2001). Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology* *2*, 165–171.

Kanayama, K., Chiba, T., Oshima, M., Kanzaki, H., Koide, S., Saraya, A., Miyagi, S., Mimura, N., Kusakabe, Y., Saito, T., et al. (2019). Genome-wide mapping of bivalent histone modifications in hepatic stem/progenitor cells. *Stem Cells Int.* *2019*.

Kane, A.E., and Sinclair, D.A. (2019). Epigenetic changes during aging and their reprogramming potential. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*

Kannappan, R., Matsuda, A., Ferreira-Martins, J., Zhang, E., Palano, G., Czarna, A., Cabral-Da-Silva, M.C., Bastos-Carvalho, A., Sanada, F., Ide, N., et al. (2017). p53 Modulates the Fate of Cardiac Progenitor Cells Ex Vivo and in the Diabetic Heart In Vivo. *EBioMedicine* *16*, 224–237.

Kar, A., Willcox, S., and Griffith, J.D. (2016). Transcription of telomeric DNA leads to high levels of homologous recombination and t-loops. *Nucleic Acids Res.* *44*, 9369–9380.

Kasinath, V., Beck, C., Sauer, P., Poepsel, S., Kosmatka, J., Faini, M., Toso, D., Aebersold, R., and Nogales, E. (2021). JARID2 and AEBP2 regulate PRC2 in the presence of H2AK119ub1 and other histone modifications. *Science (80-.)*. *371*.

Katsara, O., Mahaira, L.G., Iliopoulou, E.G., Moustaki, A., Antsaklis, A., Loutradis, D., Stefanidis, K., Baxevanis, C.N., Papamichail, M., and Perez, S.A. (2011). Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* *20*, 1549–1561.

Khan, A.A., Lee, A.J., and Roh, T.Y. (2015). Polycomb group protein-mediated histone modifications during cell differentiation. *Epigenomics* 7, 75–84.

Kibe, T., Osawa, G.A., Keegan, C.E., and de Lange, T. (2010). Telomere Protection by TPP1 Is Mediated by POT1a and POT1b. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1059–1066.

Kim, W., and Shay, J.W. (2018). Long-range telomere regulation of gene expression: Telomere looping and telomere position effect over long distances (TPE-OLD). *Differentiation* 99, 1–9.

Kirwan, M., and Dokal, I. (2009). Dyskeratosis congenita, stem cells and telomeres. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1792, 371–379.

Konze, K.D., Ma, A., Li, F., Baryshte-Lovejoy, D., Parton, T., MacNevin, C.J., Liu, F., Gao, C., Huang, X.P., Kuznetsova, E., et al. (2013). An orally bioavailable chemical probe of the lysine methyltransferases EZH2 and EZH1. *ACS Chem. Biol.* 8, 1324–1334.

Kopp, J.L., Ormsbee, B.D., Desler, M., and Rizzino, A. (2008). Small Increases in the Level of Sox2 Trigger the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* 26, 903–911.

Kowalczyk, M.S., Tirosh, I., Heckl, D., Rao, T.N., Dixit, A., Haas, B.J., Schneider, R.K., Wagers, A.J., Ebert, B.L., and Regev, A. (2015). Single-cell RNA-seq reveals changes in cell cycle and differentiation programs upon aging of hematopoietic stem cells. *Genome Res.* 25, 1860–1872.

Kozak, M.L., Chavez, A., Dang, W., Berger, S.L., Ashok, A., Guo, X., and Johnson, F.B. (2010). Inactivation of the Sas2 histone acetyltransferase delays senescence driven by telomere dysfunction. *EMBO J.* 29, 158–170.

Kraushaar, D.C., and Zhao, K. (2013). The epigenomics of embryonic stem cell differentiation. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 1134–1144.

Krauss, S.R., and de Haan, G. (2016). Epigenetic perturbations in aging stem cells.

Mamm. Genome 27, 396–406.

Kruidenier, L., Chung, C.W., Cheng, Z., Liddle, J., Che, K., Joberty, G., Bantscheff, M., Bountra, C., Bridges, A., Diallo, H., et al. (2012). A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. *Nature* 488, 404–408.

Kruse, J.-P., and Gu, W. (2012). Modes of p53 Regulation. *Jan-Philipp*. 100, 130–134.

Labrie, V., Buske, O.J., Oh, E., Jeremian, R., Ptak, C., Gasinas, G., Maleckas, A., Petereit, R., Avirbliene, A., Adamonis, K., et al. (2016). Lactase nonpersistence is directed by DNA-variation-dependent epigenetic aging. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 566–573.

Lan, X., Jörg, D.J., Cavalli, F.M.G., Richards, L.M., Nguyen, V., Vanner, R.J., Guilhamon, P., Lee, L., Kushida, M., Pellacani, D., et al. (2017). Fate mapping of human glioblastoma reveals an invariant stem cell hierarchy. *Nature* 549, 227–232.

de Lange, T. (2018). Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annu. Rev. Genet.* 52, annurev-genet-032918-021921.

Lansdorp, P.M. (2008). Telomeres , stem cells , and hematology. *Blood* 111, 1759–1766.

Larsson, L., Degens, H., Li, M., Salviati, L., Lee, Y. II, Thompson, W., Kirkland, J.L., and Sandri, M. (2019). Sarcopenia: Aging-related loss of muscle mass and function. *Physiol. Rev.* 99, 427–511.

Lavarone, E., Barbieri, C.M., and Pasini, D. (2019). Dissecting the role of H3K27 acetylation and methylation in PRC2 mediated control of cellular identity. *Nat. Commun.* 10, 1–16.

Lazzerini-Denchi, E., and Sfeir, A. (2016). Stop pulling my strings-what telomeres taught us about the DNA damage response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 364–378.

Leao, R., Lee, D., Figueiredo, A., Hermanns, T., Wild, P., Komosa, M., Lau, I., Mistry, M., Nunes, N.M., Price, A.J., et al. (2018). Combined genetic and epigenetic alterations of the TERT promoter affect clinical and biological behaviour of bladder cancer. *Int. J. Cancer.*

Lee, D.D., Leão, R., Komosa, M., Gallo, M., Zhang, C.H., Lipman, T., Remke, M., Heidari, A., Nunes, N.M., Apolónio, J.D., et al. (2019). DNA hypermethylation within TERT promoter upregulates TERT expression in cancer Find the latest version: DNA hypermethylation within TERT promoter upregulates TERT expression in cancer. *129*, 223–229.

Lee, H.W., Blasco, M.A., Gottlieb, G.J., Horner, J.W., Greider, C.W., and DePinho, R.A. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* *392*, 569–574.

Lee, K.H., Li, M., Michalowski, A.M., Zhang, X., Liao, H., Chen, L., Xu, Y., Wu, X., and Huang, J. (2010). A genomewide study identifies the Wnt signaling pathway as a major target of p53 in murine embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 69–74.

Lehnertz, B., Zhang, Y.W., Boivin, I., Mayotte, N., Tomellini, E., Chagraoui, J., Lavallée, V.P., Hébert, J., and Sauvageau, G. (2017). H3K27M/I mutations promote context-dependent transformation in acute myeloid leukemia with RUNX1 alterations. *Blood* *130*, 2204–2214.

Levine, A.J. (2020). P53: 800 Million Years of Evolution and 40 Years of Discovery. *Nat. Rev. Cancer* *20*, 471–480.

Li, Y., Zhang, M., Sheng, M., Zhang, P., Chen, Z., Xing, W., Bai, J., Cheng, T., Yang, F.C., and Zhou, Y. (2018). Therapeutic potential of GSK-J4, a histone demethylase KDM6B/JMJD3 inhibitor, for acute myeloid leukemia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *144*, 1065–1077.

Liao, H., Ji, F., Helleday, T., and Ying, S. (2018). Mechanisms for stalled replication fork stabilization: new targets for synthetic lethality strategies in cancer treatments. *EMBO Rep.* *19*, 1–18.

Lim, C.J., and Cech, T.R. (2021). Shaping human telomeres: from shelterin and CST

complexes to telomeric chromatin organization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 283–298.

Lim, U., and Song, M.A. (2018). DNA methylation as a biomarker of aging in epidemiologic studies. In *Methods in Molecular Biology*, (Humana Press Inc.), pp. 219–231.

Lin, T., and Lin, Y. (2017). P53 Switches Off Pluripotency on Differentiation. *Stem Cell Res. Ther.* 8, 44.

Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S.J., Murphy, M.E., Appella, E., and Xu, Y. (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol* 7, 165–171.

Liu, L., and Rando, T.A. (2011). Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *J. Cell Biol.* 193, 257–266.

Liu, H., Zhou, Y., Boggs, S.E., Belinsky, S.A., and Liu, J. (2007). Cigarette smoke induces demethylation of prometastatic oncogene synuclein- γ in lung cancer cells by downregulation of DNMT3B. *Oncogene* 26, 5900–5910.

Liu, L., Blasco, M.A., Trimarchi, J.R., and Keefe, D.L. (2002). An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Dev. Biol.* 249, 74–84.

Liu, L., Bailey, S.M., Okuka, M., Muñoz, P., Li, C., Zhou, L., Wu, C., Czerwiec, E., Sandler, L., Seyfang, A., et al. (2007). Telomere lengthening early in development. *Nat. Cell Biol.* 9, 1436–1441.

Liu, N., Yin, Y., Wang, H., Zhou, Z., Sheng, X., Fu, H., Guo, R., Wang, H., Yang, J., Gong, P., et al. (2019). Telomere dysfunction impairs epidermal stem cell specification and differentiation by disrupting BMP/pSmad/P63 signaling. *PLoS Genet.* 15.

Liu, Y., Snow, B.E., Hande, M.P., Yeung, D., Erdmann, N.J., Wakeham, A., Itie, A., Siderovski, D.P., Lansdorp, P.M., Robinson, M.O., et al. (2000). The telomerase reverse transcriptase is limiting and necessary for telomerase function in vivo. *Curr. Biol.* 10, 174

1459–1462.

Liu, Y., Kha, H., Ungrin, M., Robinson, M.O., and Harrington, L. (2002). Preferential maintenance of critically short telomeres in mammalian cells heterozygous for mTert. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 3597–3602.

Liu, Y., Yu, C., Daley, T.P., Wang, F., Cao, W.S., Bhate, S., Lin, X., Still II, C., Liu, H., Zhao, D., et al. (2018). CRISPR Activation Screens Systematically Identify Factors that Drive Neuronal Fate and Resource CRISPR Activation Screens Systematically Identify Factors that Drive Neuronal Fate and Reprogramming. *Cell Stem Cell* 1–14.

Lo, A.W.I., Sprung, C.N., Fouladi, B., Pedram, M., Sabatier, L., Ricoul, M., Reynolds, G.E., and Murnane, J.P. (2002). Chromosome Instability as a Result of Double-Strand Breaks near Telomeres in Mouse Embryonic Stem Cells. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 4836–4850.

Loh, Y.H., Wu, Q., Chew, J.L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., et al. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat. Genet.* *38*, 431–440.

Longhese, M.P. (2008). DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres. *Genes Dev.* *22*, 125–140.

López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* *153*, 1194.

Lovejoy, C.A., Li, W., Reisenweber, S., Thongthip, S., Bruno, J., de Lange, T., De, S., Petrini, J.H.J., Sung, P.A., Jasin, M., et al. (2012). Loss of ATRX, genome instability, and an altered DNA damage response are hallmarks of the alternative lengthening of Telomeres pathway. *PLoS Genet.* *8*.

Lu, A.T., Seeboth, A., Tsai, P.C., Sun, D., Quach, A., Reiner, A.P., Kooperberg, C., Ferrucci, L., Hou, L., Baccarelli, A.A., et al. (2019). DNA methylation-based estimator of telomere length. *Aging (Albany. NY).* *11*, 5895–5923.

Lu, F., Liu, Y., Jiang, L., Yamaguchi, S., and Zhang, Y. (2014). Role of Tet proteins in enhancer activity and telomere elongation. *Genes Dev.* 28, 2103–2119.

Lu, J., Tan, L., Li, P., Gao, H., Fang, B., Ye, S., Geng, Z., Zheng, P., and Song, H. (2009). All-trans retinoic acid promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells via multiple pathways. *BMC Cell Biol.* 10, 57.

Lustig, A.J. (2003). Clues to catastrophic telomere loss in mammals from yeast telomere rapid deletion. *Nat. Rev. Genet.* 4, 916–923.

Lynch, M.D., Smith, A.J.H., De Gobbi, M., Flenley, M., Hughes, J.R., Vernimmen, D., Ayyub, H., Sharpe, J.A., Sloane-Stanley, J.A., Sutherland, L., et al. (2012). An interspecies analysis reveals a key role for unmethylated CpG dinucleotides in vertebrate Polycomb complex recruitment. *EMBO J.* 31, 317–329.

M. Dawson (2017). The cancer epigenome: Concepts, challenges, and therapeutic opportunities Mark A. Dawson *Cancer. Science* (80-).

Maclaine, N.J., and Hupp, T.R. (2009). The regulation of p53 by phosphorylation: a model for how distinct signals integrate into the p53 pathway. *Aging (Albany. NY).* 1, 490–502.

Madabhushi, R., Pan, L., and Tsai, L.H. (2014). DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron* 83, 266–282.

Maimets, T., Neganova, I., Armstrong, L., and Lako, M. (2008). Activation of p53 by nutlin leads to rapid differentiation of human embryonic stem cells. *Oncogene* 27, 5277–5287.

Marcel, V., Dichtel-Danjoy, M.L., Sagne, C., Hafsi, H., Ma, D., Ortiz-Cuaran, S., Olivier, M., Hall, J., Mollereau, B., Hainaut, P., et al. (2011). Biological functions of p53 isoforms through evolution: Lessons from animal and cellular models. *Cell Death Differ.* 18, 1815–1824.

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

Margueron, R., and Reinberg, D. (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* *469*, 343–349.

Marión, R.M., López de Silanes, I., Mosteiro, L., Gamache, B., Abad, M., Guerra, C., Megías, D., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2017). Common Telomere Changes during In Vivo Reprogramming and Early Stages of Tumorigenesis. *Stem Cell Reports* *8*, 460–475.

Marión, R.M., Montero, J.J., de Silanes, I.L., Graña-Castro, O., Martínez, P., Schoeftner, S., Palacios-Fábrega, J.A., and Blasco, M.A. (2019). TERRA regulate the transcriptional landscape of pluripotent cells through TRF1-dependent recruitment of PRC2. *Elife* *8*, 1–32.

Marioni, R.E., Harris, S.E., Shah, S., McRae, A.F., von Zglinicki, T., Martin-Ruiz, C., Wray, N.R., Visscher, P.M., and Deary, I.J. (2016). The epigenetic clock and telomere length are independently associated with chronological age and mortality. *Int. J. Epidemiol.* *45*, 424–432.

Martello, G., and Smith, A. (2014). The Nature of Embryonic Stem Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 647–678.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *78*, 7634–7638.

Martínez, P., and Blasco, M.A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 161–176.

Martínez, P., and Blasco, M.A. (2015). Replicating through telomeres: A means to an end. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 504–515.

Martínez, P., Gómez-López, G., Pisano, D.G., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2016). A genetic interaction between RAP1 and telomerase reveals an unanticipated role for RAP1

in telomere maintenance. *Aging Cell* 15, 1113–1125.

Maslov, A.Y., Baron, T.A., Plunkett, R.K., and Pruitt, S.C. (2004). Neural Stem Cell Detection, Characterization, and Age-Related Changes in the Subventricular Zone of Mice. *J. Neurosci.* 24, 1726–1733.

Matsumoto, C., Jiang, Y., Emathinger, J., Quijada, P., Nguyen, N., De La Torre, A., Moshref, M., Nguyen, J., Levinson, A.B., Shin, M., et al. (2018). Short Telomeres Induce p53 and Autophagy and Modulate Age-Associated Changes in Cardiac Progenitor Cell Fate. *Stem Cells* 36, 868–880.

Mayle, A., Yang, L., Rodriguez, B., Zhou, T., Chang, E., Curry, C. V, Challen, G.A., Li, W., Wheeler, D., Rebel, V.I., et al. (2015). Dnmt3a loss predisposes murine hematopoietic stem cells to malignant transformation. *Blood* 125, 629–639.

McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics*.

Meshorer, E., Yellajoshula, D., George, E., Scambler, P.J., Brown, D.T., and Misteli, T. (2006). Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev. Cell* 10, 105–116.

Metsalu, T., and Vilo, J. (2015). ClustVis: A web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res.* 43, W566–W570.

Meznikova, M., Erdmann, N., Allsopp, R., and Harrington, L.A. (2009). Telomerase reverse transcriptase-dependent telomere equilibration mitigates tissue dysfunction in mTert heterozygotes. *DMM Dis. Model. Mech.* 2, 620–626.

Milanovic, M., Fan, D.N.Y., Belenki, D., Däbritz, J.H.M., Zhao, Z., Yu, Y., Dörr, J.R., Dimitrova, L., Lenze, D., Monteiro Barbosa, I.A., et al. (2018). Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* 553, 96–100.

Mirman, Z., Lottersberger, F., Takai, H., Kibe, T., Gong, Y., Takai, K., Bianchi, A., Zimmermann, M., Durocher, D., and De, T. (2019). 53BP1/Rif1/Shieldin counteract DSB resection through CST/Pola-dependent fill-in. *560*, 112–116.

Molofsky, A. V, Slutsky, S.G., Joseph, N.M., He, S., Pardal, R., Krishnamurthy, J., Sharpless, N.E., and Morrison, S.J. (2006). Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* *443*, 448–452.

Mondoux, M. a., and Zakian, V. a. (2006). Telomere Position Effect: Silencing Near the End.

Montero, J.J., López-Silanes, I., Megías, D., Fraga, M., Castells-García, Á., and Blasco, M.A. (2018). TERRA recruitment of polycomb to telomeres is essential for histone trimethylation marks at telomeric heterochromatin. *Nat. Commun.* *9*, 4–6.

Moretti, P., Freeman, K., Coodly, L., and Shore, D. (1994). Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencer and telomere-binding protein RAP1. *Genes Dev.* *8*, 2257–2269.

Morey, L., Santanach, A., and Di Croce, L. (2015). Pluripotency and Epigenetic Factors in Mouse Embryonic Stem Cell Fate Regulation. *Mol. Cell. Biol.* *35*, 2716–2728.

Mosteiro, L., Pantoja, C., de Martino, A., and Serrano, M. (2018). Senescence promotes in vivo reprogramming through p16INK4a and IL-6. *Aging Cell* *17*.

Mularoni, L., Sabarinathan, R., Deu-Pons, J., Gonzalez-Perez, A., and López-Bigas, N. (2016). OncodriveFML: A general framework to identify coding and non-coding regions with cancer driver mutations. *Genome Biol.* *17*, 1–13.

Muraki, K., Nyhan, K., Han, L., and Murnane, J.P. (2012). Mechanisms of telomere loss and their consequences for chromosome instability. *Front. Oncol.* *2*.

Nakai-Futatsugi, Y., and Niwa, H. (2016). Zscan4 Is Activated after Telomere Shortening in Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports* *6*, 483–495.

Nativio, R., Donahue, G., Berson, A., Lan, Y., Amlie-wolf, A., Toledo, J.B., Gosai, S.J., Gregory, B.D., Torres, C., John, Q., et al. (2018). Alzheimer ' s disease. *21*, 497–505.

Nera, B., Huang, H.S., Hendrickson, E.A., and Xu, L. (2019). Both the classical and alternative non-homologous end joining pathways contribute to the fusion of drastically shortened telomeres induced by TRF2 overexpression. *Cell Cycle* *18*, 880–888.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* *95*, 379–391.

Niwa, H., Miyazaki, J.I., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* *24*, 372–376.

North, B.J., and Sinclair, D.A. (2012). The intersection between aging and cardiovascular disease. *Circ. Res.* *110*, 1097–1108.

O'Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S.C., Surani, M.A., and Jenuwein, T. (2001). The Polycomb-Group Gene Ezh2 Is Required for Early Mouse Development. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 4330–4336.

O'Sullivan, R.J., Kubicek, S., Schreiber, S.L., and Karlseder, J. (2010). Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 1218–1225.

Obier, N., Lin, Q., Cauchy, P., Hornich, V., Zenke, M., Becker, M., and Müller, A.M. (2015). Polycomb Protein EED is Required for Silencing of Pluripotency Genes upon ESC Differentiation. *Stem Cell Rev. Reports* *11*, 50–61.

Odden, M.C., Coxson, P.G., Moran, A., Lightwood, J.M., Goldman, L., and Bibbins-Domingo, K. (2011). The impact of the aging population on coronary heart disease in the united states. *Am. J. Med.* *124*, 827–833.

Ogawa, K., Nishinakamura, R., Iwamatsu, Y., Shimosato, D., and Niwa, H. (2006).

Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **343**, 159–166.

Oh, G., Ebrahimi, S., Wang, S.-C., Cortese, R., Kaminsky, Z.A., Gottesman, I.I., Burke, J.R., Plassman, B.L., and Petronis, A. (2016). Epigenetic assimilation in the aging human brain. *Genome Biol.* **17**, 1–11.

Oh, G., Ebrahimi, S., Carlucci, M., Zhang, A., Nair, A., Groot, D.E., Labrie, V., Jia, P., Oh, E.S., Jeremian, R., et al. (2018). Cytosine modifications exhibit circadian oscillations that are involved in epigenetic diversity and aging. *Nat. Commun.* **9**, 1–11.

Oh, G., Koncevičius, K., Ebrahimi, S., Carlucci, M., Groot, D.E., Nair, A., Zhang, A., Kriščiūnas, A., Oh, E.S., Labrie, V., et al. (2019). Circadian oscillations of cytosine modification in humans contribute to epigenetic variability, aging, and complex disease 06 Biological Sciences 0604 Genetics. *Genome Biol.* **20**, 1–14.

Organisation mondiale de la Santé (2016). RAPPORT MONDIAL SUR LE VIEILLISSEMENT ET LA SANTÉ.

Orkin, S.H., and Hochedlinger, K. (2011). Chromatin connections to pluripotency and cellular reprogramming. *Cell* **145**, 835–850.

Ou, H.L., and Schumacher, B. (2018). DNA damage responses and p53 in the aging process. *Blood* **131**, 488–495.

Ozturk, S., Sozen, B., and Demir, N. (2014). Telomere length and telomerase activity during oocyte maturation and early embryo development in mammalian species. *Mol. Hum. Reprod.* **20**, 15–30.

Paspaliaris, V., and Kolios, G. (2019). Stem cells in Osteoporosis: From biology to new therapeutic approaches. *Stem Cells Int.* **2019**.

PCAWG Consortium (2020). Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature* **578**, 82–93.

de Pedro, I., Alonso-Lecue, P., Sanz-Gómez, N., Freije, A., and Gandarillas, A. (2018).

Sublethal UV irradiation induces squamous differentiation via a p53-independent, DNA damage-mitosis checkpoint. *Cell Death Dis.* 9.

Pereira, C.F., Piccolo, F.M., Tsubouchi, T., Sauer, S., Ryan, N.K., Bruno, L., Landeira, D., Santos, J., Banito, A., Gil, J., et al. (2010). ESCs require PRC2 to direct the successful reprogramming of differentiated cells toward pluripotency. *Cell Stem Cell* 6, 547–556.

Phi, L.T.H., Sari, I.N., Yang, Y.G., Lee, S.H., Jun, N., Kim, K.S., Lee, Y.K., and Kwon, H.Y. (2018). Cancer stem cells (CSCs) in drug resistance and their therapeutic implications in cancer treatment. *Stem Cells Int.* 2018.

Platt, J.M., Ryvkin, P., Wanat, J.J., Donahue, G., Ricketts, M.D., Barrett, S.P., Waters, H.J., Song, S., Chavez, A., Abdallah, K.O., et al. (2013). Rap1 relocalization contributes to the chromatin-mediated gene expression profile and pace of cell senescence. *Genes Dev.* 27, 1406–1420.

Pucci, F., Gardano, L., and Harrington, L. (2013). Short telomeres in ESCs lead to unstable differentiation. *Cell Stem Cell* 12, 479–486.

Reddington, J.P., Perricone, S.M., Nestor, C.E., Reichmann, J., Youngson, N.A., Suzuki, M., Reinhardt, D., Dunican, D.S., Prendergast, J.G., Mjoseng, H., et al. (2013). Redistribution of H3K27me3 upon DNA hypomethylation results in de-repression of Polycomb target genes. *Genome Biol.* 14, R25.

Ritschka, B., Storer, M., Mas, A., Heinzmann, F., Ortells, M.C., Morton, J.P., Sansom, O.J., Zender, L., and Keyes, W.M. (2017). The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev.* 31, 172–183.

Rodriguez, M., Rodriguez-Sabate, C., Morales, I., Sanchez, A., and Sabate, M. (2015). Parkinson's disease as a result of aging. *Aging Cell* 14, 293–308.

Rose, N.R., and Klose, R.J. (2014). Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*

1839, 1362–1372.

Rossi, D.J., Seita, J., Czechowicz, A., Bhattacharya, D., Bryder, D., and Weissman, I.L. (2007). Hematopoietic Stem Cell Quiescence Attenuates DNA Damage Response and Permits DNA Damage Accumulation During Aging. *Cell Cycle* 6, 2371–2376.

Röth, A., Vercauteren, S., Sutherland, H.J., and Lansdorf, P.M. (2003). Telomerase is limiting the growth of acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 17, 2410–2417.

Roy, S., Tomaszowski, K.H., Luzwick, J.W., Park, S., Li, J., Murphy, M., and Schlacher, K. (2018). p53 orchestrates DNA replication restart homeostasis by suppressing mutagenic RAD52 and POL θ pathways. *Elife* 7, 1–3.

Sabatier, L., Ricoul, M., Pottier, G., and Murnane, J.P. (2005). The loss of a single telomere can result in instability of multiple chromosomes in a human tumor cell line. *Mol. Cancer Res.* 3, 139–150.

Sagie, S., Toubiana, S., Hartono, S.R., Katzir, H., Tzur-Gilat, A., Havazelet, S., Francastel, C., Velasco, G., Chédin, F., and Selig, S. (2017). Telomeres in ICF syndrome cells are vulnerable to DNA damage due to elevated DNA:RNA hybrids. *Nat. Commun.* 8, 1–12.

Sah, V.P., Attardi, L.D., Mulligan, G.J., Williams, B., Bronson, R.T., and Jacks, T. (1995). A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat. Genet.* 10, 175–180.

Salam, N., Rane, S., Das, R., Faulkner, M., Gund, R., Kandpal, U., Lewis, V., Mattoo, H., Prabhu, S., Ranganathan, V., et al. (2013). T cell ageing: Effects of age on development, survival & function. *Indian J. Med. Res.* 138, 595–608.

Samper, E., Flores, J.M., and Blasco, M.A. (2001). Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in *Terc*^{-/-} mice with short telomeres. *EMBO Rep.* 2, 800–807.

Sanjana, N.E., Shalem, O., and Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening HHS Public Access Supplementary Material. *Nat Methods*

11, 783–784.

Lo Sardo, V., Ferguson, W., Erikson, G.A., Topol, E.J., Baldwin, K.K., and Torkamani, A. (2017). Influence of donor age on induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* *35*, 69–74.

Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A.H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* *10*, 55–63.

Schmid, P., Lorenz, A., Hameister, H., and Montenarh, M. (1991). Expression of p53 during mouse embryogenesis. *Development* *113*, 857–865.

Schwartz, J.L., Jordan, R., Liber, H., Murnane, J.P., and Evans, H.H. (2001). TP53-dependent chromosome instability is associated with transient reductions in telomere length in immortal telomerase-positive cell lines. *Genes Chromosom. Cancer* *30*, 236–244.

Schwörer, S., Becker, F., Feller, C., Baig, A.H., Köber, U., Henze, H., Kraus, J.M., Xin, B., Lechel, A., Lipka, D.B., et al. (2016). Epigenetic stress responses induce muscle stem-cell ageing by Hoxa9 developmental signals. *Nature* *540*, 428–432.

Sekulovic, S., Gylfadottir, V., Vulto, I., Gasparetto, M., Even, Y., Brookes, C., Smith, C., Eaves, C.J., Lansdorp, P.M., Rossi, F.M., et al. (2011). Prolonged self-renewal activity unmasks telomerase control of telomere homeostasis and function of mouse hematopoietic stem cells. *Blood* *118*, 1766–1773.

Sen, G.L., Webster, D.E., Barragan, D.I., Chang, H.Y., and Khavari, P.A. (2008). Control of differentiation in a self-renewing mammalian tissue by the histone demethylase JMJD3. *Genes Dev.* *22*, 1865–1870.

Setiaputra, D., and Durocher, D. (2019). Shieldin – the protector of DNA ends. *EMBO Rep.* *20*.

Sfeir, A., and De Lange, T. (2012). Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. *Science* (80-.). 336, 593–597.

Sfeir, A., Kosiyatrakul, S.T., Hockemeyer, D., MacRae, S.L., Karlseder, J., Schildkraut, C.L., and de Lange, T. (2009). Mammalian Telomeres Resemble Fragile Sites and Require TRF1 for Efficient Replication. *Cell* 138, 90–103.

Shah, P.P., Donahue, G., Otte, G.L., Capell, B.C., Nelson, D.M., Cao, K., Aggarwala, V., Cruickshanks, H.A., Rai, T.S., McBryan, T., et al. (2013). Lamin B1 depletion in senescent cells triggers large-scale changes in gene expression and the chromatin landscape. *Genes Dev.* 27, 1787–1799.

Shah, R.N., Grzybowski, A.T., Cornett, E.M., Johnstone, A.L., Dickson, B.M., Boone, B.A., Cheek, M.A., Cowles, M.W., Maryanski, D., Meiners, M.J., et al. (2018). Examining the Roles of H3K4 Methylation States with Systematically Characterized Antibodies. *Mol. Cell* 72, 162-177.e7.

Sharpless, N.E., and DePinho, R.A. (2002). p53: Good cop/bad cop. *Cell* 110, 9–12.

Shay, J.W., and Wright, W.E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, (European Association for Cardio-Thoracic Surgery), pp. 72–76.

Shay, J.W., and Wright, W.E. (2010). Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS Lett.* 584, 3819–3825.

Shi, Y., Wang, X.X., Zhuang, Y.W., Jiang, Y., Melcher, K., and Xu, H.E. (2017). Structure of the PRC2 complex and application to drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* 38, 963–976.

Shigeta, M., Ohtsuka, S., Nishikawa-Torikai, S., Yamane, M., Fujii, S., Murakami, K., and Niwa, H. (2013). Maintenance of pluripotency in mouse ES cells without Trp53. *Sci. Rep.* 3, 1–8.

Shufian, A., Ahmed, I., Sheng, M.H., Wasnik, S., Baylink, D.J., and Lau, K.-H.W. (2017). Effect of aging on stem cells. *World J Exp Med* 7, 1–10.

Siametis, A., Niotis, G., and Garinis, G.A. (2021). DNA Damage and the Aging Epigenome. *J. Invest. Dermatol.*

Siddiqui, M.S., François, M., Fenech, M.F., and Leifert, W.R. (2015). Persistent γ H2AX: A promising molecular marker of DNA damage and aging. *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 766, 1–19.

Simandi, Z., Laszlo, B., Poliska, S., Ruhl, R., and Nagy, L. (2010). Activation of retinoic acid receptor signaling coordinates lineage commitment of spontaneously differentiating mouse embryonic stem cells in embryoid bodies. *FEBS Lett.* 584, 3123–3130.

Smith, Z.D., and Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* 14, 204–220.

Smith, J.A., Ndoye, A.M.N., Geary, K., Lisanti, M.P., Igoucheva, O., and Daniel, R. (2010). A role for the Werner syndrome protein in epigenetic inactivation of the pluripotency factor Oct4. *Aging Cell* 9, 580–591.

Smogorzewska, A., and De Lange, T. (2002). Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J.* 21, 4338–4348.

Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M.R., Schnapp, G., and de Lange, T. (2000). Control of Human Telomere Length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1659–1668.

Song, S., and Johnson, F.B. (2018). Epigenetic mechanisms impacting aging: A focus on histone levels and telomeres. *Genes (Basel).* 9.

Song, Z., Wang, J., Guachalla, L.M., Terszowski, G., Rodewald, H.-R., Ju, Z., and Rudolph, K.L. (2010). Alterations of the systemic environment are the primary cause of impaired B and T lymphopoiesis in telomere-dysfunctional mice. *Blood* 115, 1481–1489.

Van Steensel, B., and De Lange, T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385, 740–743.

Van Steensel, B., Smogorzewska, A., and De Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401–413.

Stern, J.L., Paucek, R.D., Huang, F.W., Ghandi, M., Nwumeh, R., Costello, J.C., and Cech, T.R. (2017). Allele-Specific DNA Methylation and Its Interplay with Repressive Histone Marks at Promoter-Mutant TERT Genes. *Cell Rep.* 21, 3700–3707.

Stracker, T.H., and Petrini, J.H.J. (2011). The MRE11 complex: starting from the ends. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 1–7.

Stricker, S.H., Feber, A., Engström, P.G., Carén, H., Kurian, K.M., Takashima, Y., Watts, C., Way, M., Dirks, P., Bertone, P., et al. (2013). Widespread resetting of DNA methylation in glioblastoma-initiating cells suppresses malignant cellular behavior in a lineage-dependent manner. *Genes Dev.* 27, 654–669.

Stroik, S., Kurtz, K., and Hendrickson, E.A. (2019). CtIP is essential for telomere replication. *Nucleic Acids Res.* 47, 8927–8940.

Strong, M.A., Vidal-Cardenas, S.L., Karim, B., Yu, H., Guo, N., and Greider, C.W. (2011). Phenotypes in mTERT^{+/-} and mTERT^{-/-} Mice Are Due to Short Telomeres, Not Telomere-Independent Functions of Telomerase Reverse Transcriptase. *Mol. Cell. Biol.* 31, 2369–2379.

Stubbs, T.M., Bonder, M.J., Stark, A.K., Krueger, F., von Meyenn, F., Stegle, O., Reik, W., Bolland, D., Butcher, G., Chandra, T., et al. (2017). Multi-tissue DNA methylation age predictor in mouse. *Genome Biol.* 18, 68.

Su, D., Wang, X., Campbell, M.R., Song, L., Safi, A., Crawford, G.E., and Bell, D.A. (2015). Interactions of Chromatin Context, Binding Site Sequence Content, and Sequence Evolution in Stress-Induced p53 Occupancy and Transactivation. *PLoS Genet.* 11,

1004885.

Sun, D., Luo, M., Jeong, M., Rodriguez, B., Xia, Z., Hannah, R., Wang, H., Le, T., Faull, K.F., Chen, R., et al. (2014). Epigenomic profiling of young and aged HSCs reveals concerted changes during aging that reinforce self-renewal. *Cell Stem Cell* *14*, 673–688.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* *126*, 663–676.

Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres. *Curr. Biol.* *25*, 75–78.

Tanny, J.C., Dowd, G.J., Huang, J., Hiltz, H., and Moazed, D. (1999). An enzymatic activity in the yeast Sir2 protein that is essential for gene silencing. *Cell* *99*, 735–745.

Thomson, M., Liu, S.J., Zou, L.N., Smith, Z., Meissner, A., and Ramanathan, S. (2011). Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* *145*, 875–889.

Tompkins, D.H., Besnard, V., Lange, A.W., Wert, S.E., Keiser, A.R., Smith, A.N., Lang, R., and Whitsett, J.A. (2009). Sox2 Is Required for Maintenance and Differentiation of Bronchiolar Clara, Ciliated, and Goblet Cells. *PLoS One* *4*, e8248.

Toubiana, S., Gagliardi, M., Papa, M., Manco, R., Tzukerman, M., Matarazzo, M.R., and Selig, S. (2019). Persistent epigenetic memory impedes rescue of the telomeric phenotype in human ICF iPSCs following DNMT3B correction. *Elife* *8*, 1–28.

Townsley, D.M., Dumitriu, B., and Young, N.S. (2017). Bone marrow failure and the telomeropathies. *124*, 2775–2784.

Tutton, S., Azzam, G.A., Stong, N., Vladimirova, O., Wiedmer, A., Jessica, A., Beishline, K., Wang, Z., Deng, Z., Riethman, H., et al. (2015). Subtelomeric p53 binding prevents accumulation of DNA damage at human telomeres. 1–15.

Tyner, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu,

X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., et al. (2002). P53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415, 45–53.

Ungewitter, E., and Scrable, H. (2010). $\Delta 40p53$ controls the switch from pluripotency to differentiation by regulating IGF signaling in ESCs. *Genes Dev.* 24, 2408–2419.

Vaquero-Sedas, M.I., and Vega-Palas, M.Á. (2018). Targeting Cancer through the Epigenetic Features of Telomeric Regions. *Trends Cell Biol.* xx, 1–10.

Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R.C., Thomas, T.E., Harley, C.B., and Lansdorp, P.M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: Loss of telomeric DNA with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9857–9860.

Verma, S.K., Tian, X., Lafrance, L. V., Duquenne, C., Suarez, D.P., Newlander, K.A., Romeril, S.P., Burgess, J.L., Grant, S.W., Brackley, J.A., et al. (2012). Identification of potent, selective, cell-Active inhibitors of the histone lysine methyltransferase EZH2. *ACS Med. Chem. Lett.* 3, 1091–1096.

Vidal, M., and Starowicz, K. (2017). Polycomb complexes PRC1 and their function in hematopoiesis. *Exp. Hematol.* 48, 12–31.

Villasante, A., Piazzolla, D., Li, H., Gomez-lopez, G., Djabali, M., and Serrano, M. (2011). Epigenetic regulation of Nanog expression by Ezh2 in pluripotent stem cells. *Cell Cycle* 10, 1488–1498.

Villota-Salazar, N.A., Mendoza-Mendoza, A., and González-Prieto, J.M. (2016). Epigenetics: from the past to the present. *Front. Life Sci.* 9, 347–370.

Viré, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.M., et al. (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439, 871–874.

Voigt, P., Tee, W.W., and Reinberg, D. (2013). A double take on bivalent promoters. *Genes Dev.* 27, 1318–1338.

Wachter, E., Quante, T., Merusi, C., Arczewska, A., Stewart, F., Webb, S., and Bird, A. (2014). Synthetic CpG islands reveal DNA sequence determinants of chromatin structure. *Elife* 3, e03397.

Wagner, W., Horn, P., Bork, S., and Ho, A.D. (2008). Aging of hematopoietic stem cells is regulated by the stem cell niche. *Exp. Gerontol.* 43, 974–980.

Wang, A., Yue, F., Li, Y., Xie, R., Harper, T., Patel, N.A., Muth, K., Palmer, J., Qiu, Y., Wang, J., et al. (2015). Epigenetic Priming of Enhancers Predicts Developmental Competence of hESC-Derived Endodermal Lineage Intermediates. *Cell Stem Cell* 16, 386–399.

Wang, C.M., Tsai, S.N., Yew, T.W., Kwan, Y.W., and Ngai, S.M. (2010). Identification of histone methylation multiplicities patterns in the brain of senescence-accelerated prone mouse 8. *Biogerontology* 11, 87–102.

Wang, Q., Zou, Y., Nowotschin, S., Kim, S.Y., Li, Q. V., Soh, C.L., Su, J., Zhang, C., Shu, W., Xi, Q., et al. (2017). The p53 Family Coordinates Wnt and Nodal Inputs in Mesendodermal Differentiation of Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 20, 70–86.

Waterstrat, A., and Van Zant, G. (2009). Effects of aging on hematopoietic stem and progenitor cells. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 408–413.

Webley, K., Bond, J.A., Jones, C.J., Blaydes, J.P., Craig, A., Hupp, T., and Wynford-Thomas, D. (2000). Posttranslational Modifications of p53 in Replicative Senescence Overlapping but Distinct from Those Induced by DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* 20, 2803–2808.

Weng, M. wen, Lee, H.W., Park, S.H., Hu, Y., Wang, H.T., Chen, L.C., Rom, W.N., Huang, W.C., Lepor, H., Wu, X.R., et al. (2018). Aldehydes are the predominant forces inducing DNA damage and inhibiting DNA repair in tobacco smoke carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E6152–E6161.

Wilkinson, G.S., Adams, D.M., Haghani, A., Lu, A.T., Zoller, J., Breeze, C.E., Arnold, B.D., Ball, H.C., Carter, G.G., Cooper, L.N., et al. (2021). DNA methylation predicts age and provides insight into exceptional longevity of bats. *Nat. Commun.* 12.

Wilson, V., and Jones, P. (1983). DNA Methylation Decreases in Aging but Not in Immortal Cells. *Science* (80-.). 2, 1979–1980.

Wong, C.W., Hou, P.S., Tseng, S.F., Chien, C.L., Wu, K.J., Chen, H.F., Ho, H.N., Kyo, S., and Teng, S.C. (2010). Krüppel-like transcription factor 4 contributes to maintenance of telomerase activity in stem cells. *Stem Cells* 28, 1510–1517.

Wu, D., and Prives, C. (2018). Relevance of the p53-MDM2 axis to aging. *Cell Death Differ.* 25, 169–179.

Yan, H., Solozobova, V., Zhang, P., Armant, O., Kuehl, B., Brenner-Weiss, G., and Blattner, C. (2015). p53 Is Active in Murine Stem Cells and Alters the Transcriptome in a Manner That Is Reminiscent of Mutant p53. *Cell Death Dis.* 6, e1662.

Yang, G.-J., Ko, C.-N., Zhong, H.-J., Leung, C.-H., and Ma, D.-L. (2019). Structure-Based Discovery of a Selective KDM5A Inhibitor that Exhibits Anti-Cancer Activity via Inducing Cell Cycle Arrest and Senescence in Breast Cancer Cell Lines. *Cancers (Basel)*. 11, 92.

Yang, J., Guo, R., Wang, H., Ye, X., Zhou, Z., Dan, J., Wang, H., Gong, P., Deng, W., Yin, Y., et al. (2016). Tet Enzymes Regulate Telomere Maintenance and Chromosomal Stability of Mouse ESCs. *Cell Rep.* 15, 1809–1821.

Yang, L., Zha, Y., Ding, J., Ye, B., Liu, M., Yan, C., Dong, Z., Cui, H., and Ding, H.-F. (2019). Histone demethylase KDM6B has an anti-tumorigenic function in neuroblastoma by promoting differentiation. *Oncogenesis* 8, 3.

Yeung, F., Ramírez, C.M., Mateos-Gomez, P.A., Pinzaru, A., Ceccarini, G., Kabir, S., Fernández-Hernando, C., and Sfeir, A. (2013). Nontelomeric Role for Rap1 in Regulating Metabolism and Protecting against Obesity. *Cell Rep.* 3, 1847–1856.

Yu, J., Yuan, X., Sjöholm, L., Liu, T., Kong, F., Ekström, T.J., Björkholm, M., and Xu, D. (2018). Telomerase reverse transcriptase regulates DNMT3B expression/aberrant DNA methylation phenotype and AKT activation in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* *434*, 33–41.

Yuan, X., Ishibashi, S., Hatakeyama, S., Saito, M., Nakayama, J.I., Nikaido, R., Haruyama, T., Watanabe, Y., Iwata, H., Iida, M., et al. (1999). Presence of telomeric G-strand tails in the telomerase catalytic subunit TERT knockout mice. *Genes to Cells* *4*, 563–572.

Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., et al. (2008). Model-based Analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* *46*, 117–121.

Zhao, R., Xuan, Y., Li, X., and Xi, R. (2008a). Age-related changes of germline stem cell activity, niche signaling activity and egg production in *Drosophila*. *Aging Cell* *7*, 344–354.

Zhao, Y., Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., Zhang, Q., Xiang, C., Hou, P., Song, Z., et al. (2008b). Two Supporting Factors Greatly Improve the Efficiency of Human iPSC Generation. *Cell Stem Cell* *3*, 475–479.

Zheng, X., and Hu, G. (2012). Oct4GiP reporter assay to study genes that regulate mouse embryonic stem cell maintenance and self-renewal. *J. Vis. Exp.* *2000*, 2–6.

Zhou, S., Treloar, A.E., and Lupien, M. (2016). Emergence of the noncoding cancer genome: A target of genetic and epigenetic alterations. *Cancer Discov.* *6*, 1215–1229.

Zhu, J., Adli, M., Zou, J.Y., Verstappen, G., Coyne, M., Zhang, X., Durham, T., Miri, M., Deshapande, V., De Jager, P.L., et al. (2013). Genome-wide Chromatin State Transitions Associated with Developmental and Environmental Cues. *Cell* *152*, 642–654.