# Caractérisation phénotypique et moléculaire de déficiences humaines liées à des dysfonctions des télomères et / ou de la réparation de l'ADN

Tangui Le Guen

▶ **To cite this version:**

Tangui Le Guen. Caractérisation phénotypique et moléculaire de déficiences humaines liées à des dysfonctions des télomères et / ou de la réparation de l'ADN. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT : 2013PA05T092 . tel-01124184

**HAL Id: tel-01124184**
**https://theses.hal.science/tel-01124184**

Submitted on 6 Mar 2015

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

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

Université Paris V René Descartes

Ecole doctorale : B3MI

Spécialité « *Génome, épigénétique et destin cellulaire* »

**Thèse pour obtenir le grade de :**

**Docteur de l'Université Paris V René Descartes,**

***Présentée par***

**Tangui LE GUEN**

# Caractérisation phénotypique et moléculaire de déficiences humaines liées à des dysfonctions des télomères et / ou de la réparation de l'ADN

Soutenue publiquement le 29 novembre 2013 devant le jury composé de :

**Dr Ivan MATIC**, président, Faculté de médecine Cochin

**Pr Eric GILSON**, rapporteur, professeur à l'université Sophia-Antipolis - Nice

**Dr Filippo ROSSELLI** , rapporteur, Institut Gustave ROUSSY - Villejuif

**Dr Benoît ARCANGIOLI**, examinateur, Institut Pasteur - Paris

**Dr Jean-François RIOU**, examinateur, Muséum National d'Histoire Naturelle

**Dr Patrick REVY**, directeur de thèse, Hôpital Necker-Enfants Malades - Paris

Thèse réalisée au sein de l'équipe des Dr Jean-Pierre DE VILLARTAY & Patrick REVY « *Dynamique du génome et système immunitaire* »

Institut IMAGINE – INSERM U768 – Hôpital Necker-Enfants Malades – Paris

# REMERCIEMENTS

*Le temps d'une page, je souhaiterais adresser mes remerciements dans l'établissement de ce manuscrit de thèse à toutes les personnes qui y ont contribué plus ou moins directement.*

*J'adresse tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, Ivan Matic, Eric Gilson, Filippo Rosselli, Benoît Arcangioli, et Jean-François Riou, pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit et ma soutenance orale. J'apprécie beaucoup que des chercheurs d'un tel niveau aient pris du temps pour s'intéresser à ce travail de thèse, et m'enrichir d'idées, de remarques et de suggestions.*

*Bien entendu, je souhaite remercier mon directeur de thèse, Patrick. En juin 2010, à quelques jours des concours doctoraux, tu m'as accueilli dans ton groupe et permis de me lancer dans une nouvelle thématique ! Pendant ces 3 années passées ensemble, tu as m'a fait une confiance totale en me proposant de m'investir sur 2 projets très intéressants et prometteurs. Je crois que nous avons formé un duo efficace et l'expérience que j'ai emmagazinée, par ta vision et tes connaissances vraiment riches m'auront beaucoup fait grandir sicentifiquement parlant durant cette thèse. Je t'en suis très reconnaissant, j'ai beaucoup apprécié travailler pour toi et qui sait, nos routes se recroiseront peut être dans l'avenir …*

*Mes pensées vont également à Alain Fischer, directeur de l'unité, pour m'avoir permi de réaliser ce doctorat au sein de son prestigieux laboratoire, et ce dans de très bonnes conditions.*

*Je remercie les autres membres de l'équipe, en particulier Jean-Pierre, pour sa connaissance monstrueuse de la littérature, sa vision technique toujours très juste, et son sens de l'innovation. A Vincent mon éternel comparse du rire, à Marie (merci d'avoir relu cette thèse), aux autres actuels de l'équipe, Emilie, Sophie, Despina, Laetitia, Laurent ainsi qu'aux anciens de l'équipe que j'ai pu croiser en début de thèse et qui m'ont tous très bien facilité mes débuts, à savoir Gabriella, Laetitia, et Aurelien.*

*Je remercie mes camarades de bureau, le trio Manu, Claire, Stéphane ainsi que Sven. Merci également à tous les autres membres du bâtiment et de l'unité.*

*Le marathon de la thèse, sans le côté privé ne pourrait se faire convenablement, donc merci à tous mes amis les plus fidèles, Saïd, Pascal, Roth, Daniel, Karina, Sylvie, Jules, Chloé, Diane, Virgnie, Yoann, Julien, Alex, PM, Paul, Gilles, Anne-Flore, Elodie, Ju, Ashley, Ravina et à tous les autres que je n'ai pas la place de citer ici (dans une autre version peut être !).*

*A ma famille proche, mes parents, Nolwenn, Morgan, Maewenn, Ehouarn, Oanell, Marc.*

*Le meilleur pour la fin : Elvina, MERCI POUR TOUT, cette thèse t'appartient aussi !*

*Tangui, Octobre 2013*

# PLAN DE THESE

**SOMMAIRE DES FIGURES ET TABLES**

**RESUME / ABSTRACT**

**ACRONYMES ET ABREVIATIONS**

**INTRODUCTION**

**I/ Le système immunitaire, modèle d'étude de la dynamique du génome**

**A. La réparation de l'ADN dans le système immunitaire**

1. **Types d'altération de l'ADN**
   a) **Les agents chimiques et physiques sources de lésions**
   b) **Les ponts inter-brins**
   c) **Les cassures double brin**

2. **Détection des cassures double brin de l'ADN et activation des voies de signalisation**
   a) **La détection du dommage et le processus d'assemblage à la cassure**
   b) **Points de contrôle du cycle cellulaire**
   c) **De nombreuses modifications chromatiniennes**

3. **Mécanismes de réparation de l'ADN double brinn**
   a) **Le « *Non-Homologous End-Joining* »**
   b) **La Recombinaison Homologue**
   c) **Le « choix » du système de réparation des cassures double brin**
   d) **La réparation des ponts inter-brins de l'ADN**
   e) **Autres systèmes de prise en charge des lésions de l'ADN**

**B. Les télomères**

1. **Organisation des régions télomériques**
   a) **Découverte et généralités**
   b) **Une extrémité particulière dite « *G-overhang* »**
   c) **La structure en « *T-Loop* »**
   d) **La conformation de l'ADN « *G-quadruplex* »**
   e) **Organisation chromatinienne des régions télomériques**

2. **Le complexe télomérase**
   a) **La sous-unité catalytique**
   b) **La sous-unité de matrice ARN**

3. **Le complexe Shelterin**

a) TRF1
b) TRF2
c) RAP1
d) POT1
e) TPP1
f) TIN2

4. Autres facteurs interagissant / associés aux télomères
5. La particularité de la réplication aux télomères
6. La réparation au niveau des régions télomériques

II/ Immuno-déficiences humaines liées à des défauts de réparation de l'ADN

A. Dysfonction de réparation des ponts inter-brins : cas de l'anémie de Fanconi

B. Pathologies causées par des dysfonctions dans les mécanismes de réparation des dommages double brin

C. L'instabilité génomique à l'origine de la cancérogenèse

III/ Pathologies associées à des dysfonctions télomériques

A. La dyskératose congénitale et le syndrome Hoyeraal-Hreidarsson
   1. Tableau clinique de la DC et du HHS
   2. Gènes mutés responsables de DC et de HHS

B. Des mutations dans les facteurs intervenant aux télomères sont à l'origine d'autres formes syndromiques

C. La prédisposition aux cancers des patients atteints de DC

**OBJECTIFS**

**MATERIELS ET METHODES SUPPLEMENTAIRES**

**RESULTATS, DISCUSSION et PERSPECTIVES**

**CONCLUSIONS**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**ANNEXES : ARTICLES PUBLIES ET SOUMIS (1er auteur)**

# SOMMAIRES DES FIGURES ET TABLEAUX

**INTRODUCTION**
**Figure 1 :** Organisation chromosomique globale

**Figure 2 :** Dommages de l'ADN
a/ les sources de dommages de l'ADN  b/ les types de dommages de l'ADN

**Figure 3 :** Voie de réponse des dommages double brin de l'ADN (« *DNA Damage Response* »)

**Figure 4 :** Recrutement des protéines de signalisation aux sites de cassures double brin

**Figure 5 :** Le « *Non-Homologous End-Joining* » (NHEJ)

**Figure 6 :** a/ La « Recombinaison homologue » (RH)
b/ Schématisation simplifiée de la résolution lors de la RH

**Figure 7 :** L' « *Alternative End-Joining* » (a-EJ)

**Figure 8 :** Cycle cellulaire et choix d'utilisation des voies de réparations de l'ADN

**Figure 9 :** Le complexe Fanconi

**Figure 10 :** La voie de signalisation de Fanconi

**Figure 11 :** La voie de réparation des ponts interbrins

**Figure 12 :** Instabilité génétique et développement de cancer

**Figure 13 :** Les télomères

**Figure 14 :** Structure des télomères
a/ Boucle T (T-loop)  b/ Les « *G-quadruplex* »

**Figure 15 :** Le complexe de télomèrase

**Figure 16 :** Le complexe Shelterin

**Figure 17 :** La réplication terminale au niveau des télomères

**Figure 18 :** Télomères et réparation de l'ADN

**RESULTATS & DISCUSSION RTEL1**
***Table 1*** : Tableau des caractéristiques cliniques des patients P1, P2 et P3

***Table 2*** : Tableau des paramètres immuno-hématologiques des patients P1, P2, P3

***Figure 19 :*** Arbre phylogénétique des familles 1 et 2

**Figure 20 :** Mesure de la longueur des télomères par Southern-Blot

**Figure 21 :** FISH-quantitatif aux télomères

***Figure 22 :*** TRAP (« *Telomeric Repeat Amplification Protocol* »)

***Figure 23 :*** Immuno-fluorescence anti-53BP1 sur lymphoblastes T

***Figure 24 :*** Analyse des TIFs (« *Telomere-Induced Focis* »)

***Figure 25 :*** Sénescence cellulaire

***Figure 26 :*** Ponts d'anaphase

***Figure 27 :*** Analyse des aberrations télomériques par FISH

***Figure 28 :*** Analyse des anomalies aux télomères par co-FISH

***Figure 29 :*** Analyse génétique par « *Whole Exome Sequencing* » et « *Whole Genome Homozygosity Mapping* »

***Figure 30 :*** Ségrégation intra-familiale pour les 2 familles étudiées des mutations identifiées

***Figure 31 :*** Isoformes de RTEL1 majoritairement exprimées

***Figure 32 :*** Analyse par Western-Blot du niveau d'expression de la protéine RTEL1

***Figure 33 :*** Analyse conséquences structurales des mutations dans la protéine RTEL1

***Figure 34 :*** Analyse bio-informatique par identification de clusters hydrophiques

***Figure 35 :*** Tentative de complémentation fonctionnelle rétrovirale

***Figure 36 :*** Gels à 2 dimensions et TCA (« *T Circle Amplification* »)

***Figure 37 :*** Analyse du blocage en phase G2 / M après traitement à la mitomycine C

***Figure 38 :*** Analyse des foyers 53BP1 et des TIFs dans des fibroblastes télomérisés

***Figure 39 :*** Niveau d'expression protéique des 6 facteurs Shelterin chez les patients

**RESULTATS & DISCUSSION MYSM1**

***Table 3*** : Paramètres immuno-hématologiques du patient

***Figure 40 :*** Phylogénie de la famille et graphiques de courbes de croissance

***Figure 41 :*** Frottis de la moelle osseuse

***Figure 42 :*** Marquage des cellules mono-nucléaires de la moelle osseuse

***Figure 43 :*** Immunoscope des cellules T réceptrices de type α et β

***Figure 44 :*** Quantification du répertoire des TCR α et β.

***Figure 45 :*** Test de clonogénie après traitement à la mitomycine C ou à la phléomycine

***Figure 46 :*** Analyse de l'accumulation des cellules en phase G2 après mitomycine C

***Figure 47 :*** Test de la fonctionnalité par FACS des points de contrôle G1 / S et G2 / M

***Figure 48 :*** Evaluation de la fonctionalité de la voie de signalisation Fanconi par ubiquitination de FancD2 et de la phosphorylation de CHK1 et CHK2

***Figure 49 :*** Analyse génétique par « *Whole Genome Homozygosity Mapping* » et « *Whole Exome Sequencing* »

***Figure 50 :*** Séquençage direct de la mutation faux-sens du gène MYSM1 et prédiction de l'impact de la mutation

***Figure 51 :*** Immunofluorescence et analyse par Western-Blot du niveau d'expression de MYSM1

***Figure 52 :*** Mesure de la stabilité de constructions plasmidiques sauvages et mutées de MYSM1

***Figure 53 :*** Conséquences structurales de la mutation dans la protéine MYSM1

***Figure 54 :*** Quantification du niveau d'histone H2A mono-ubiquitinée par immunofluorescence

***Figure 55 :*** Complémentation fonctionnelle par mesure de l'avantage sélectif

***Figure 56 :*** Analyse bio-informatique du transcriptome réalisé sur puce Affymetrix

***Figure 57 :*** Test d'un panel de « *Small-Hairpin RNA* » dirigé contre MYSM1

***Figure 58 :*** Marquage des mononucléaires de la moelle osseuse après réversion génétique de MYSM1

***Figure 59 :*** Marquage par FACS des lymphocytes B et séquençage des marqueurs microsatellites pour vérification du pedigree familial

***Figure 60:*** Immunoscope post-réversion des immunoglobulines M et G

***Figure 61 :*** Evolution des valeurs des différentes populations immuno-hématologiques post-réversion

***Figure 62 :*** Séquençage du gène MYSM1 sur une population de lymphocytes B triés

***Figure 63 :*** Analyse de l'accumulation de lignées B-EBV en phase G2 après mitomycine C

***Figure 64 :*** Analyse par séquençage haut débit de la proportion d'allèle sauvage et muté dans les différentes populations hématopoïétiques

***Figure 65 :*** Observation de la présence des foyers 53BP1 post-irradiation gamma dans les fibroblastes primaires.

***Figure 66 :*** Observation de la présence des foyers 53BP1 après traitement à la mitomycine C dans les fibroblastes primaires.

***Figure 67 :*** Micro-irradiation dans les cellules U-2-OS d'une construction NBS1-GFP

***Figure 68 :*** Test de micro-irradiation dans les cellules U-2-OS après surexpression de constructions MYSM1

***Figure 69 :*** Analyse de plasmide linéarisé par le « *Non-Homologous End-Joining* ».

***Figure 70 :*** Southern-Blot des télomères et mesure de la sénescence

***Figure 71 :*** Analyse des TIFs

***Figure 72 :*** Evaluation des aberrations télomériques par FISH

***Figure 73 :*** « Pull-down » aux télomères

## TITRE DE LA THESE

**Caractérisation phénotypique et moléculaire de déficiences humaines liées à des dysfonctions des télomères et / ou de la réparation de l'ADN.**

## RESUME

Le maintien de l'intégrité du génome est essentiel pour la survie cellulaire et la propagation de l'information génétique. Une mauvaise prise en charge des dommages de l'ADN et / ou une aberration de la maintenance de l'intégrité des télomères - les extrémités des chromosomes linéaires - provoquent chez l'homme des pathologies associées à une instabilité génétique. Ainsi, des dysfonctions télomériques sont à l'origine de la Dyskératose Congénitale (DC), et de sa forme rare et sévère, le Syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson (HHS). Les DC et HHS se caractérisent principalement par une insuffisance médullaire progressive, des défauts développementaux et une prédisposition à développer des cancers. Par ailleurs, de nombreux syndromes associant déficits immunitaires et anomalies développementales sont causés par des défauts de réparation de l'ADN (cas de déficits immunitaires sévères, de l'Anémie de Fanconi (FA), de l'ataxie télangiectasie (AT), etc …).

Au cours de ce travail, nous avons réalisé une étude phénotypique et génétique de patients atteints de deux pathologies aux caractéristiques cliniques distinctes. Ce travail de thèse a permis :

i) d'une part d'identifier des mutations de *RTEL1* chez 3 patients atteints de HHS, décrivant ainsi une nouvelle cause moléculaire de cette pathologie. L'analyse des cellules de ces patients a révélé le rôle crucial que joue RTEL1 sur la stabilité du génome et le maintien des télomères dans des cellules humaines.

ii) d'autre part, d'identifier un défaut en *MYSM1*, une histone déubiquitinase, dans un nouveau syndrome immuno-hématologique associé à des défauts de réparation de l'ADN présentant certaines similitudes avec l'anémie de Fanconi. Cette étude démontre pour la première fois, qu'outre son rôle dans la régulation transcriptionnelle, MYSM1 participe également aux mécanismes de réparation des lésions de l'ADN.

## MOTS CLES

**Télomère - Dommages de l'ADN - Réparation de l'ADN - Instabilité génomique - Déficit immunitaire - Dyskératose congénitale - Syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson.**

## TITLE OF THESIS

**Phenotypic and molecular characterization of human deficiencies resulting from telomere dysfunctions and / or DNA repair defect.**

## ABSTRACT

Maintaining genome integrity is essential for cell survival and propagation of the genetic information. Improper management of DNA damages and / or aberrations in maintenance of telomere - the ends of linear chromosomes - causes humans disorders associated with genetic instability. Thus, in humans, telomere dysfunction causes Dyskeratosis Congenita (DC), and its rare and severe form, Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome (HHS). DC and HHS are mainly characterized by progressive bone marrow failure, developmental defects and predisposition to cancer. In addition, many syndromes involving immunodeficiency and developmental abnormalities are caused by defects in DNA repair (e.g. severe immune deficiencies, Fanconi Anemia (FA), Ataxia Telangiectasia (AT),…).

In this work, we performed a phenotypic and genetic study of patients with two syndromes presenting distinct clinical features. This work permitted:

i) on one hand, to identify RTEL1 mutations in patients with HHS and describe a new molecular cause of this disease. The analysis of patients' cells revealed the crucial role for RTEL1 in genome stability and telomere maintenance in human cells.

ii) on the other hand, to identify mutations in MYSM1, a histone deubiquitinase, in a new immuno-hematological syndrome associated with defects in DNA repair and sharing some similarities with Fanconi anemia. This study demonstrates for the first time that, in addition to its role in transcriptional regulation, MYSM1 is required to cope with DNA damages.

## KEY WORDS

**Telomere – DNA damages – DNA repair – Genomic instability – Immuno- deficiencies – Dyskeratosis congenita – Hoyeraal-Hreidarsson syndrome.**

# ABREVIATIONS ET ACRONYMES

## A

a-EJ : *Alternative-End Joining*
ALT : *Alternative Lenghtening of Telomeres*
AT : Ataxie Télangiectasie
ATR : *AT and Rad3 related*

## B

BER : *Base Exchange Repair*
BFB : *Breakage Fusion Bridge cycle*
BIR : *Break Induced Replication*
boucle D : boucle de Déplacement
BRCA1 : *BReast CAncer Type 1 Protein*

## C

c-NHEJ : Voie classique ou « canonique » du « *Non-Homologous End-Joining* »
CDC25a : *Cell Division Cycle homolog 25 A*
CDK2 : *Cyclin Dependant Kinase 2*
CDK1 : *Cyclin Dependant Kinase 1*
CFU-GM : progéniteurs Granulo-Monocytaires de la Moelle
CHK1 : *CHeckpoint Kinase 1*
CHK2 : *CHeckpoint Kinase 2*
CSR : *Class Switch Recombination*
CtIP : *C Terminus-binding protein-Interacting Protein*
CTC1 : *Conserved Telomere Component 1*

## D

DBSR : *Double-Strand Break Repair*
DC : Dyskératose Congénitale
DEB : Diépoxybutane
DDR : *DNA Damage Response*
DNA-PKcs : *DNA Protein-Kinase catalytic subunit* (ou facteur PRKDC)

## E

ERCC1 : *Excision Repair Cross-Complementing 1*
ES : *Embryonic Stem cells*

## F

FA : Anémie de Fanconi
FAN1 : *Fanconi-Associated Nuclease 1*

FEN1 : *Flap structure-specific ENdonucléase 1*
FRAP : *Fluorescence Recovery After Photobleaching*
FISH : *Fluorescence In-Situ Hybridization*

## G

GGR : *Global Genome Repair*

## H

HHS : *Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome*
HJ : jonctions de Holliday (dHJ : double jonctions de Holliday)
hnRNPA1 : *Heterogenous Nuclear RNP protein A*
HP1 : *Heterochromatin Protein 1*
HSC : *Hematopoeitic Stem Cells*

## I

ICL : *Interstrand-Crosslinks*
IPS : *Induced Pluripotent Stem cells*

## J

## K

KOMP : *Knock-Out Mouse Project*

## L

## M

MDC1 : *Mediator of DNA-damage Checkpoint 1*
MEFs : *Mouse Embryonic Fibroblasts*
MMC : *MitoMycine C*
MMR : *Mismatch Repair*
MMEJ ou MHEJ : *Microhomology Mediated End-Joining*
MPP : *Multi-Potent Progenitors*
MRE11 : *Meiotic Recombination Homolog 11*
MSH2 : *MutS-protein Homolog 2*

## N

NBS1 : *Nijmegen Breakage Syndrome* 1
NER : *Nucleotide Exchange Repair*
NHEJ : *Non-Homologous End-Joining*
NK : *Natural Killer cell*
NOP10 : *Nucleolar Protein 10*

## O

OTUs : *Ovarian Tumor Proteases*

## P

PCNA : *Proliferating Cell Nuclear Antigen*
PHA : *PhytoHemAgglutinin* (ou phasine)
PIKK : *Phosphatidyl Inositol 3-Kinase-like Kinase*
PNKP : *PolyNucleotide Kinase 3' end Phosphatase*
POT1 : *Protection of Telomeres 1*

## Q

## R

RAP1 : *Repressor and Activator Protein 1 ou TERF2IP*
RH : Recombinaison Homologue
RIF1 : *Rap1-Interacting Factor 1*
RING : *Reality Interested Novel Gene*
RMI1-2 : *RecQ-Mediated genome Instability*
RNF8 : *RiNg Finger protein 8*
RPA : *Replication factor A*
RTEL1 : *Regulator of Telomere Elongation 1*

## S

SHM : *Somatic Hyper-Mutation*
SSA : *Single-Strand Annealing*
SDSA : *Synthesis-Dependant Strand Annealing*
SSBR : *Single Strand Break Repair*
STN1 : *Suppressor of cdc ThirteeN 1*
SSA : *Single Strand Annealing*
siARN : *Small Interferent RNA*

## T

TLS : Synthèse Trans-Lésionnelle

TCA : *T Circle Amplification*
TCAB1 : *Telomerase CAjal Body 1*
TEN1 : *Telomeric pathway with STN1*
TERRA : *TElomeric-Repeat containing RNA*
TIFs : *Telomere-Induced Foci*
TINF2 : *TERF1-interacting Nuclear Factor 2*
TPP1 : *TIN2-interacting protein*
TRF2 : *Telomere Repeat binding Factor 2*
TRAP : *Telomere Repeat Amplification Protocol*

## U

UCHs : *Ubiquitin C-terminal Hydrolases*
USPs : *Ubiquitin-Specific Proteases*

## V

## W

## X

XLF : « *XRCC4-Life Factor* » (ou facteur Cernunnos)

## Y

## Z

# INTRODUCTION

## I/ Le système immunitaire, modèle d'étude de la dynamique du génome

La cellule est le siège d'une dynamique du génome permanente. Le maintien de l'intégrité du génome est crucial pour la survie des cellules et pour le bon fonctionnement de l'organisme. Dans les cellules eucaryotes, de nombreux facteurs permettent une surveillance générale garantissant la fidélité et la stabilité génomique. Lorsque des lésions de l'ADN surviennent, se met alors en place un recrutement de facteurs spécialisés dans la détection, la signalisation et la prise en charge de la réparation du matériel génétique. Ces facteurs doivent être parfaitement fonctionnels pour éviter l'émergence d'anomalies pouvant provoquer certaines pathologies. Les extrêmités chromosomiques qui constituent les télomères, sont des régions devant être correctement préservées. Le maintien de leur structure et de leur longueur est un processus clé, puisque des aberrations dans les régions télomériques sont à l'origine de pathologies fréquemment associées à des signes de vieillissement prématuré.

L'hématopoïèse comporte quatre compartiments : l'ensemble des cellules souches hématopoïétiques dérivent en progéniteurs, en précurseurs, puis en cellules matures. En effet, à partir des cellules souches hématopoïétiques (« *Hematopoeitic Stem Cells* », HSC) aux capacités d'auto-renouvellement, le système hématopoïétique se différencie en progéniteurs multi-potents (« *Multi-Potent Progenitors* », MPP), puis en progéniteurs lymphoïdes multi-potents (« *Multi-Lymphoïd Progenitors* », MLP) et progéniteurs myéloïdes communs (« *Common Myeloïd Progenitors* », CMP), pour générer finalement des cellules et effecteurs matures, à savoir les lignées lymphocytaires (lymphocytes B, T et « *Natural Killer* », NK), les lignées myéloïdes (granulocytes, monocytes / macrophages, cellules dentritiques, plaquettes (mégakaryocytes) et cellules sanguines rouges (érythrocytes)) ***(Rossi et al., 2008) (Doulatov et al., 2012) – Curr Opi Immunol 2010 –***). Les cellules lymphoïdes permettent l'émergence des lymphocytes T issus du thymus, et des lymphocytes B provenant de la moelle osseuse. Le système immunitaire est ainsi composé de différents types d'organe, de cellules, et de

composés moléculaires qui coopèrent pour agir contre les infections, les cellules anormales, ou encore les antigènes étrangers.

Les cellules souches hématopoïétiques et toutes les lignées qui en sont issues, formant le système immuno-hématopoïétique, ont la particularité d'avoir une haute capacité proliférative et de pouvoir subir un nombre important d'étape de différenciation cellulaire. Cette dynamique peut être à l'origine de problèmes de réplication (car source de stress réplicatif), et d'un raccourcissement accéléré des régions terminales chromosomiques, les télomères. De ce fait, des dommages aléatoires de l'ADN interviennent inévitablement au cours de la maturation cellulaire importante lors du développement lymphoïde ainsi qu'au cours de la réponse immunitaire. Le rôle du système immunitaire est essentiel pour la survie, puisqu'un déficit immunitaire combiné sévère (« DICS ») caractérisé par une absence complète de lymphocytes B et T est fatal s'il n'est pas pris en charge par une greffe de moelle osseuse ou la thérapie génique.

Le système immuno-hématopoïétique apparaît donc comme un organe privilégié pour l'étude des événements moléculaires liés à la réparation de l'ADN et à la physiologie des télomères. Identifier de nouveaux facteurs qui pourraient intervenir plus ou moins directement dans la réparation de l'ADN et dans la bonne fonctionnalité des télomères est une question majeure : des dysfonctionnements de ces mécanismes peut en effet engendrer la survenue de pathologies rares et sévères, ainsi que de cancers.

### A. La réparation de l'ADN dans le système immunitaire

Au cours de son développement, le système immunitaire fait intervenir des réarrangements « programmés » de l'ADN, car certaines lésions ont lieu naturellement au cours de processus physiologiques *(Alt et al., 2013)*. D'autres lésions dites « accidentelles »,

sont dùes à des facteurs extérieurs chimiques ou physiques, mais ne sont pas propres au système immunitaire *(Goodarzi and Jeggo, 2013)*. Les modifications du génome au sein du système immunitaire sont finement régulées pour permettre les réarrangements de l'ADN dans les lymphocytes *(Bednarski and Sleckman, 2012)* et dans les cellules souches. Ainsi, trois mécanismes physiologiques spécifiques au développement du système immunitaire, sont basés sur des cassures double brin de l'ADN : la recombinaison V(D)J *(Blackwell et al., 1986) (Davis and Bjorkman, 1988) (Dudley et al., 2005) (Krangel, 2009)*, la commutation de classes des chaînes lourdes des immunoglobulines (« *Class Switch Recombination* » dite CSR, ou commutation isotypique) *(Davis and Bjorkman, 1988) (Stavnezer et al., 2010)*, et les hyper-mutations somatiques des régions variables des immunoglobulines (« *Somatic Hyper-Mutation* », SHM) *(Tonegawa, 1983) (Di Noia and Neuberger, 2007)*. Ces modifications physiologiques de l'ADN nécessitent des voies de réparation de l'ADN efficaces, et sont essentielles pour la production de molécules (les TCR et les immunoglobulines) pouvant interagir avec une quasi-infinité de structures (les antigènes). Par ailleurs, le maintien des cellules souches pluripotentes de la moelle osseuse ainsi que les phases de prolifération cellulaire intense mentionnées ci-dessus, nécessitent une « gestion » efficace des télomères et de la réplication. Enfin, des aberrations faisant suite à des dysfonctions dans la réparation, peuvent conduire à des translocations dites oncogéniques dans les lignées lymphocytaires *(Gostissa et al., 2011)*.

### 1. Types d'altération de l'ADN

L'organisation structurale de l'ADN au sein même des chromosomes est particulièrement précise (***Figure 1***). Présents dans le noyau, les chromosomes sont le support de l'information génétique, et sont compactés en un double brin hélicoïdal d'ADN. Le double brin est super-enroulé autour d'un octamère d'histones (2 exemplaires de chacune des 4 histones suivantes :

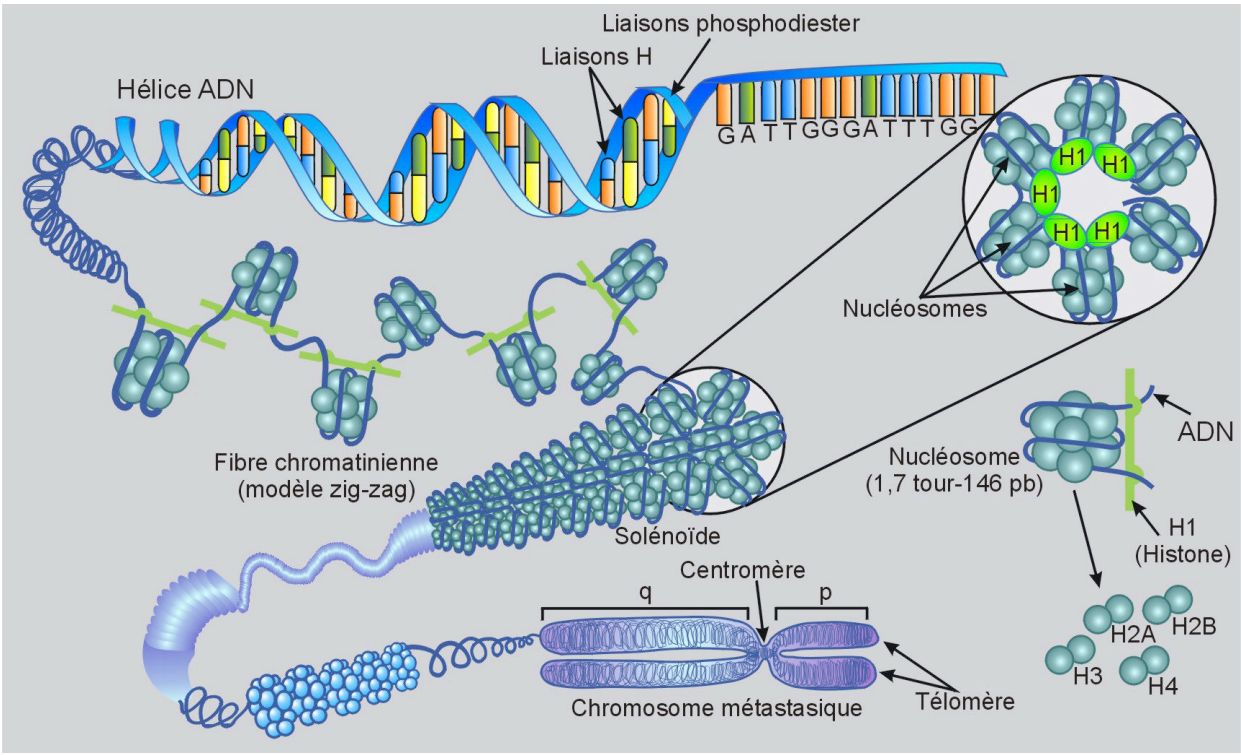



***Figure 1 :*** **Organisation chromosomique globale.**

La structure du chromosome est réalisée en échelle inversée progressive (des éléments les plus grands aux plus petits). Les 23 paires de chromosomes, présents dans le noyau, sont particulièrement compactés lors de la métaphase. La double hélice d'ADN est enroulée autour d'un octamère d'histone (constitué des dimères d'histones H2A – H2B – H3 – H4). Les appariements de bases nucléotidiques A-T et G-C lient les 2 brins. Dans sa partie terminale, correspondant aux télomères, le double brin est surplombé d'une région simple brin sortante,. L'octamère d'histone est détaillé : le nucléosome, unité de base de la fibre chromatinienne, correspond à 147 paires de bases nucléotidiques super-enroulées autour des 8 histones.

H2A, H2B, H3 et H4). Cette structure ADN-protéines constitue le nucléosome (1er niveau de compaction), unité d'organisation de base de la chromatine correspondant à 146 paires de bases d'ADN enroulées autour des histones *(Kornberg and Lorch, 1999)*. Enfin, un simple brin sortant est présent à l'extrémité des télomères. La structure chromatinienne basale permet à l'ADN de se protéger au maximum des lésions, car le double brin est enfoui dans l'architecture nucléosomique. Néanmoins au cours de certains processus spécialisés, tels que la transcription ou la réplication, le double brin devient particulièrement fragile puisqu'il n'est plus enroulé autour des histones : cet état correspond à l'euchromatine, forme relâchée adoptée lors de la transcription. Au contraire, l'hétérochromatine correspond à l'état le plus condensé inactif transcriptionnellement. Il a été estimé que l'ADN d'une cellule pouvait subir plusieurs dizaines de milliers de cassures par jour *(Lindahl and Barnes, 2000)*, dont environ 10 cassures double brin par cellule à chaque division *(Haber, 1999)*. Les ruptures de brins se produisent entre les bases pyrimidiques, les plus sensibles, ou les bases puriques d'un même brin. L'échec de la réparation peut conduire à une distribution inégale du matériel génétique au cours de la division cellulaire *(Papamichos-Chronakis and Peterson, 2013)*, à l'instabilité génomique, et éventuellement au développement de tumeurs malignes.

### a) Les agents chimiques et physiques sources de lésions

Les dommages peuvent être classés en 2 catégories : les lésions endogènes (ayant lieu au sein même du système cellulaire), et les lésions exogènes (dûes à des facteurs extérieurs) *(Hoeijmakers, 2001)*.

Ainsi au cours de différents processus cellulaires, des dommages endogènes non programmés peuvent intervenir (***Figure 2 a***). Ils sont considérés comme physiologiques et font suite à des blocages de fourches et erreurs de réplication, à l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (dits « ROS », produits par les mitochondries et libérés au sein du noyau) *(Berquist*

*and Wilson, 2012)*, à la présence d'agents alkylants (à l'origine d'une liaison covalente entre eux et un ou plusieurs groupements carboxyles de l'ADN), ou à des réactions spontanées ciblant l'ADN (cas de l'hydrolyse, de la déamination de l'uracile ou de la dépurination créant des sites abasiques). Des mésappariements de base (A-G, T-C) ou des insertions et délétions peuvent aussi survenir lorsque les polymérases font des erreurs (par exemple, ajout du mauvais nucléotide en face du brin en cours de réplication). Le processus de transcription a aussi été démontré comme une cause endogène émergente de lésions de l'ADN *(Khobta and Epe, 2012)*. Les lésions rencontrées par la fourche de réplication ou le dysfonctionnement d'enzymes engagées dans le réplisome (qui contient l'ensemble des acteurs de la réplication) engendrent des cassures de l'ADN. Une des causes majeures des cassures a ainsi lieu au cours de la réplication, lorsque la fourche rencontre par exemple un ADN structuralement non conforme (telle que la présence de ponts inter-brins ou intra-brin) ou non réparé, ce qui conduit à un arrêt de fourche et à une réplication localement interrompue *(Pfeiffer et al., 2000) (Lehmann and Fuchs, 2006)*. Par ailleurs, les premiers stades de développement tumorigéniques sont associés au stress réplicatif induisant une instabilité génomique *(Bartkova et al., 2005) (Gorgoulis et al., 2005)* et l'apparition de dommages oxydatifs qui peuvent être causés par les ROS *(Nishikawa, 2008) (Sallmyr et al., 2008)*. Le stress réplicatif peut conduire à une situation de sénescence réplicative due à une trop grande accumulation de dommages de l'ADN (entre autres), ou à l'apoptose *(Mallette et al., 2007)*. Le stress réplicatif peut aussi s'expliquer par l'activation d'oncogène induisant « l'hyper-réplication » (la même origine de réplication étant fonctionnelle plusieurs fois au cours d'une phase S donnée) *(Di Micco et al., 2006)*, ou par la présence d'un déséquilibre au sein du pool des nucléotides indispensables à la synthèse d'ADN *(Bester et al., 2011)*.

Pour ce qui est des causes exogènes, on peut énumérer notamment les rayonnements ionisants X ou gamma (irradiation), les rayons ultraviolets (UV A, B ou C), les agents

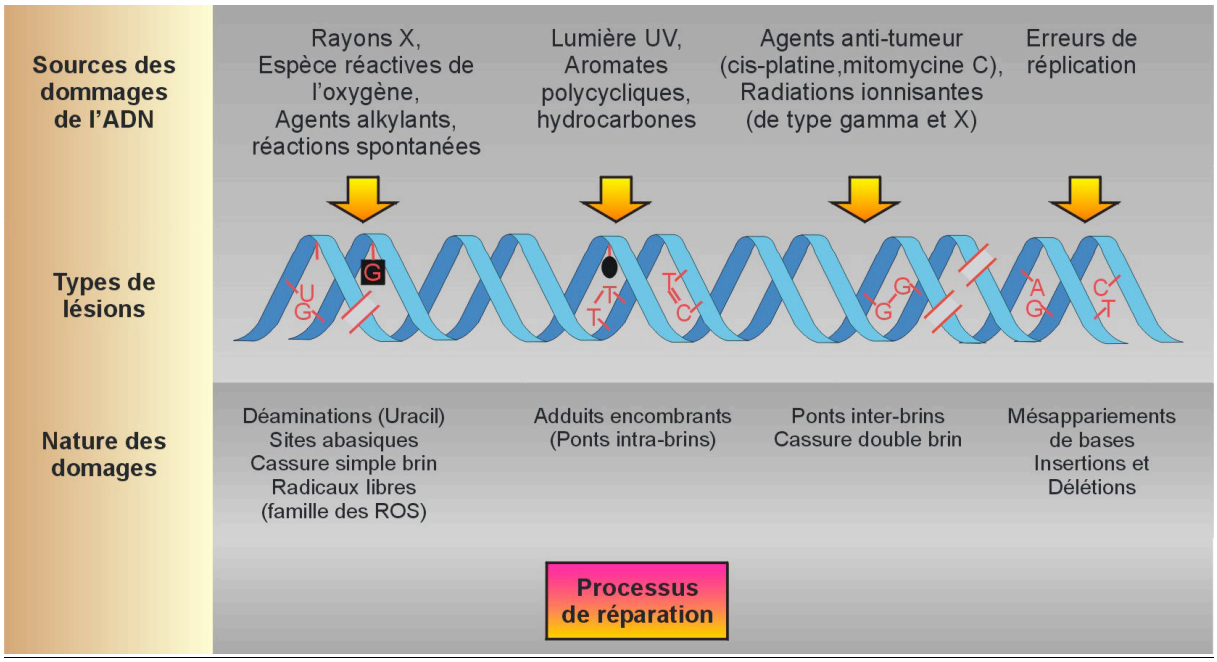



***Figure 2 a :*** **Types d'altérations de l'ADN et leurs conséquences sur la structure double brin.**

a/ Les sources de dommages de l'ADN (exogènes ou endogènes) sont variées et sont classées en différentes catégories dans le tableau, suivant les lésions qu'elles induisent sur la double hélice d'ADN. Il se met finalement en place une réponse appropriée, suivant la nature des dommages, via des processus spécifiques de réparation de l'ADN.

chimiques radiomimétiques ou pontants, les inhibiteurs de polymérase et de topoisomérases, ou bien encore des molécules chimiques extérieures libérant des ROS.

En conséquence, l'ensemble de ces sources endogènes ou exogènes peuvent induire des lésions de nucléotides, des cassures simple ou double brin, des mésappariements de bases, et des « pontages » intra- ou inter-brins (***Figure 2 b***). Peu importe l'origine de la lésion, les systèmes de réparation utilisés pour la résolution sont dépendants de la nature du dommage. Pourtant, bien que l'on distingue très précisément chaque type de lésion, un dommage donné peut en fait être pris en charge par une ou plusieurs voies de réparation ***(Friedberg, 1995)***.

### b) Les ponts inter-brins

Des modifications chimiques peuvent affecter les liaisons existant entre les bases de l'ADN. C'est le cas des ponts inter-brins (également dénommés « adduits » ou « *Interstrand-Crosslinks* », ICL) qui consistent en un lien covalent entre les 2 brins de l'ADN, génèrant des distorsions prononcées de la double hélice. La conséquence directe est que la réplication est rendue impossible : le « réplisome » ne peut plus progresser, car les brins ne peuvent plus être séparés, ce qui engendre un blocage de la fourche ***(Deans and West, 2011)***. La formation des ponts entre les 2 brins de l'ADN se fait suite à la présence de sels de platine (dont le cisplatine notamment) ou d'agents alkylants, bien qu'une fraction seulement des adduits initialement créés, génèrent ces ponts. Parmi les drogues génotoxiques, on peut citer la mitomycine C (MMC) (***Figure 2 b***) ou le diépoxybutane (DEB) qui induisent ce type de structure aberrante. Si celle-ci est maintenue et non réparée, cela favorise l'émergence d'une cassure simple brin puis double brin en lésion secondaire, lors de la réplication. Les dommages de l'ADN s'accumulent très rapidement dans le cas de mise en présence de ces agents. Les adduits ont des conséquences sur l'organisation fine de la chromatine, en particulier le bon agencement

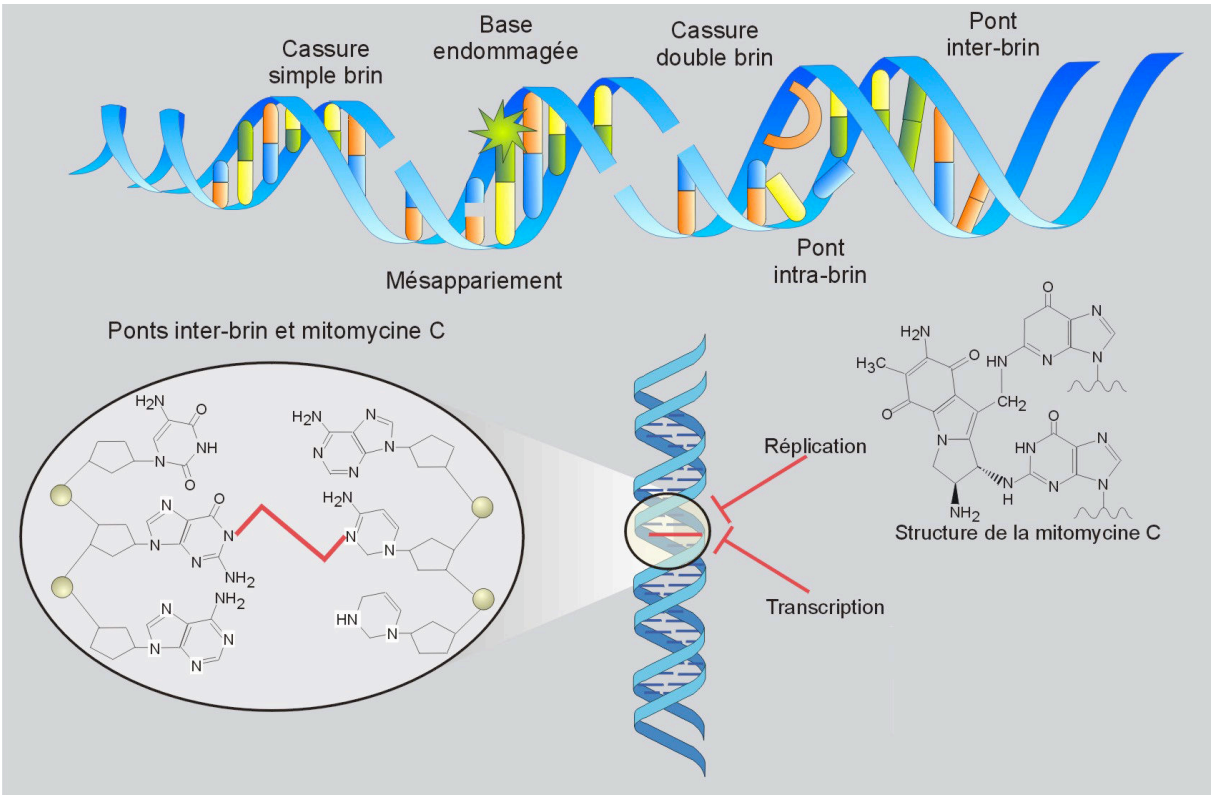



***Figure 2 b :*** **Types d'altérations de l'ADN et leurs conséquences sur la structure double brin.**

b/ Structure chimique des ponts interbrins générés par des traitements de génotoxiques, tels que la mitomycine C.

des nucléosomes. D'autres processus sont directement dérégulés, comme la division cellulaire (car difficulté lors du dédoublement des deux brins), la transcription (pouvant être interrompue au niveau de l'alkylation) mais cela peut aussi affecter et modifier le réseau de protéines interagissant avec l'ADN, tels que les facteurs de transcription, les hélicases, etc ... Le mauvais déroulement de ces évènements est le point de départ vers l'engagement des cellules atteintes dans la voie d'apoptose dépendante de P53. De ce fait, une voie de réparation particulière, dite « *ICL-Repair »* est dédiée à la bonne résolution de ces pontages.

Parmi les facteurs exogènes, un agent pontant sera utilisé au cours de ce travail de thèse : la mitomycine C (notée MMC), issue de *Streptomyces caespitosus* appartenant à une famille d'antibiotiques, utilisées notamment dans des thérapeutiques anti-cancer. Cette drogue génotoxique induit l'apparition de ponts inter-brins, dont la réparation nécessite la génération au final de cassures double brin et fait intervevenir une voie de réparation particulière: la voie Fanconi (détaillée ci-après).

### a) Les cassures double brin

Les cassures double brin de l'ADN se produisent au niveau des liaisons intra-brins entre nucléotides adjacents, et affectent les 2 brins complémentaires. L'origine précise de ces lésions peut être variée (***Figure 2 b***). Les cassures programmées endogènes, créées au cours de la recombinaison V(D)J, de la CSR, et de la recombinaison méïotique ***(Keeney and Neale, 2006)*** sont de type double brin. Les cassures accidentelles, comme c'est le cas lors de l'irradiation ionisante, ou lors de l'arrêt et de l'effondrement des fourches de réplication, sont également des ruptures complètes du duplex. Parmi les facteurs exogènes générant des cassures double brin de l'ADN, nous utiliserons au cours de ce travail une drogue génotoxique : la phléomycine, qui appartient à la famille d'antibiotiques du type bléomycine

issue de *Streptomyces verticillus*, et qui est à l'origine de nombreuses ruptures double brin de l'ADN. En effet, cette drogue se lie et s'intercale entre les bases de l'ADN, conduisant à la destruction de la double hélice environnante.

Ce type de cassures est celui aux conséquences les plus drastiques pour la cellule car perturbant la continuité de la molécule d'ADN, ce qui explique la nécessité très rapide de mobilisation d'un système de réparation. Potentiellement, elles peuvent être initiatrices de la mort cellulaire et d'un panel d'altération génétique telles que des aberrations chromosomiques (cassures et pertes de chromosomes non-réparés, translocations) ***(Bassing et al., 2003)*** (Celeste et al., 2002) ***(Franco et al., 2006) (Callen et al., 2007)***, des délétions plus ou moins grandes ou encore une perte d'hétérozygotie ***(Moynahan and Jasin, 1997)***. A plus long terme, des déficiences dans une des voies de la réparation des cassures double brin, sont à l'origine d'instabilité génomique globale, et de la carcinogenèse.

### 2. Détection des cassures double brin de l'ADN et activation des voies de signalisation

A la suite d'une lésion de l'ADN et une fois que la détection a eu lieu, il existe plusieurs possibilités pour la cellule eucaryote : la mise en place de la réparation de l'ADN, l'engagement dans la voie de l'apoptose (ou mort programmée), la sénescence (un état irréversible d'arrêt de division cellulaire en phase G0), et dans certains cas la sur-régulation de la division cellulaire aux conséquences délétères (et donc une transformation des cellules en tumeur progressive, et cancer). Cette réponse cellulaire aux dommages de l'ADN inclue donc l'arrêt du cycle cellulaire à l'aide de l'activation des points de contrôle du cycle. Dans le cas de la réparation, la cellule s'engage vers un enchaînement de processus complexes qui doivent se dérouler dans une fenêtre de temps réduite : c'est la réponse des dommages de l'ADN (dite « *DNA Damage Response* », ou DDR). Le réseau de réponse mobilisé

s'accompagne par le ralentissement ou le blocage total du cycle. En effet, la cellule endommagée voit sa prolifération être totalement contrôlée jusqu'à ce que la réparation soit traitée. Le but final est donc de maintenir la survie après une prise en charge efficace des altérations de l'ADN, et d'éviter ainsi l'adressage vers l'apoptose ou la transmission aux cellules filles après réplication de dommages de l'ADN. La lésion représente donc le point de départ d'un processus d'assemblage coordonné à la cassure. L'activation de la signalisation de dommages qui s'en suit est indispensable pour permettre dans un second temps, la réorganisation chromatinienne et la mobilisation des systèmes de réparation de l'ADN.

### a) La détection du dommage et le processus d'assemblage à la cassure

Chronologiquement, la cassure est le point de départ de la cascade de signalisation et représente un « stimulus » détecté par un ou plusieurs « senseur(s) », au niveau même du dommage. Il s'agit de protéines qui viennent se lier sur l'ADN rompu, et signalent la présence d'une cassure double brin. Tout d'abord, le complexe MRN formé des facteurs MRE11 (« *Meiotic Recombination Homolog 11* ») / RAD50 / NBS1 (« *Nijmegen Breakage Syndrome 1* ») ***(van den Bosch et al., 2003)***, représente le senseur de la cassure (correspondant au 1$^{er}$ niveau de détection), et se lie à l'ADN pour la protection des extrémités nouvellement libres. Après reconnaissance de la cassure, un signal est transduit via des protéines kinases. Les facteurs ATM (« *Ataxia Telangiectasia Mutated* ») ***(Savitsky et al., 1995) (Shiloh and Ziv, 2013)*** et ATR (« *ATm and Rad3 related* ») ***(Cimprich and Cortez, 2008)***, appartenant à la famille PIKK (« *Phosphatidyl Inositol 3-Kinase-like Kinase* »), vont guider cette cascade. Ces 2 kinases bien que distinctes, ont en partie des fonctions semblables. En effet, ATR est mobilisé dans un large éventail de cassures, en particulier les cassures simples brin, survenant au cours de la phase S ***(Dart et al., 2004)*** du cycle cellulaire (cas du décrochage et du blocage

des fourches de réplication) ou suite aux rayonnements UV. L'activation d'ATR nécessite la présence de sa sous-unité régulatrice ATRIP (« *ATR-Interacting Protein* ») ***(Cortez et al., 2001)***, pour permettre l'interaction avec la protéine RPA (« *Replication factor A* ») ***(Zou and Elledge, 2003)*** qui recouvre l'extrêmité simple brin de l'ADN rompu ou de la fourche de réplication. ATM est engagé principalement suite à des lésions double brin générées par des agents tels que les radiations ionisantes ***(Jongmans et al., 1996) (Xu and Baltimore, 1996)***, et phosphoryle de nombreux substrats cibles impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la réparation (***Nussenzweig et al., 2010***). La kinase ATM est présente sous forme d'homodimère inactif dans la cellule. Elle s'active par auto-phosphorylation ***(Bakkenist and Kastan, 2003***), devenant un monomère capable d'initier une cascade d'activation d'autres facteurs par phosphorylation. MRN interagit via la partie C-terminale de NBS1 avec la kinase ATM et est du même coup phosphorylé ***(Lee and Paull, 2005)***. ATM a d'autres substrats dont l'histone variant H2A.X, qui devient (majoritairement) phosphorylée sur sa serine 139 à proximité de la cassure, prenant ainsi un état noté γH2A.X ***(Rogakou et al., 1998) (Burma et al., 2001)***. Cette étape initiale de phosphorylation ciblée de l'histone H2A.X est indispensable pour la propagation de la DDR ***(Celeste et al., 2003)*** vers le 2$^{e}$ niveau de la signalisation. Un des premiers médiateurs de la réparation, le facteur MDC1 (« *Mediator of DNA-damage Checkpoint 1* ») ***(Stewart et al., 2003)*** reconnaît directement γH2A.X ***(Stucki et al., 2005)***, et est phosphorylé par ATM ***(Matsuoka et al., 2007)***. De plus, deux ubiquitines ligases de type E3 viennent aux dommages, RNF8 (« *RiNg Finger protein 8* ») ***(Mailand et al., 2007)*** et RNF168 ***(Doil et al., 2009)*** et poly-ubiquitinent l'histone H2A.X et la forme γH2AX, propageant ainsi la transduction du signal ***(Huen et al., 2007)***. Ces histones 2A ubiquitinées vont permettre le recrutement aux dommages d'un autre médiateur, le facteur 53BP1 (aussi appelée TP53BP1) afin d'amplifier la signalisation ***(Sakasai and Tibbetts, 2008)***. RAP80 (« *Receptor Associated Protein 80* ») possède également un rôle essentiel à travers son

domaine de liaison ubiquitine, pour le recrutement du médiateur BRCA1 (« *BReast CAncer Type 1 Protein* ») qui va pouvoir se focaliser à la cassure ***(Sobhian et al., 2007)***. Ceci a lieu en même temps que l'arrivée des partenaires de RAP80 à la cassure double brin - à savoir Abraxas ***(Wang et al., 2007)*** et les autres membres du complexe, BRCC36-BRCA1–NBA1 formant ainsi un « complexe BRCA1-A » ***(Wang and Elledge, 2007) (Wang et al., 2009)*** (***Figure 3***).

Deux autres kinases, les sérine-thréonine kinases CHK1 (« *CHeckpoint Kinase 1* ») et CHK2 (« *CHeckpoint Kinase 2* ») vont ensuite être phosphorylées, respectivement par ATR ***(Liu et al., 2000)*** et ATM ***(Ahn et al., 2000)***, pour transduire la signalisation émise par les médiateurs (H2A.X, MDC1, 53BP1 et BRCA1). L'ensemble du recrutement de ces médiateurs est donc régit par cette signalisation kinase dépendante. Enfin, le 3$^{e}$ niveau de la DDR est de faciliter l'accumulation et l'activation de bon nombre d'effecteurs (dont Cdc25, CDK, les cyclines et p53) afin de moduler la transcription, ou bien encore la progression du cycle cellulaire ***(Bartek and Lukas, 2003)***, pour faciliter le déroulement des événements de réparation des dommage de l'ADN.

De plus, la prise en charge de l'ADN lésé se manifeste par des inductions transcriptionnelles et des modifications post-traductionnelles de facteurs de la réparation ou de facteurs des points de contrôles du cycle cellulaire ***(Lowndes and Murguia, 2000) (Polo and Jackson, 2011)***. Ces modifications protéiques font partie intégrante de la réponse aux dommages. Les modifications post-traductionnelles, dont font partie les mécanismes d'ubiquitination et de déubiquitination ont ainsi un rôle très important. La famille d'enzymes spécialisées, correspondant aux déubiquitinases (« DUB »), cible de nombreuses protéines à déubiquitiner. Dans les cellules humaines, il y en a près de 80 ***(Nijman et al., 2005)*** qui sont divisées en 5 familles suivant leur mécanisme d'action et la phylogénie ***(Al-Hakim et al., 2010)***. Il y a une sous-famille de protéases dont font partie les OTUs (« *Ovarian Tumor*

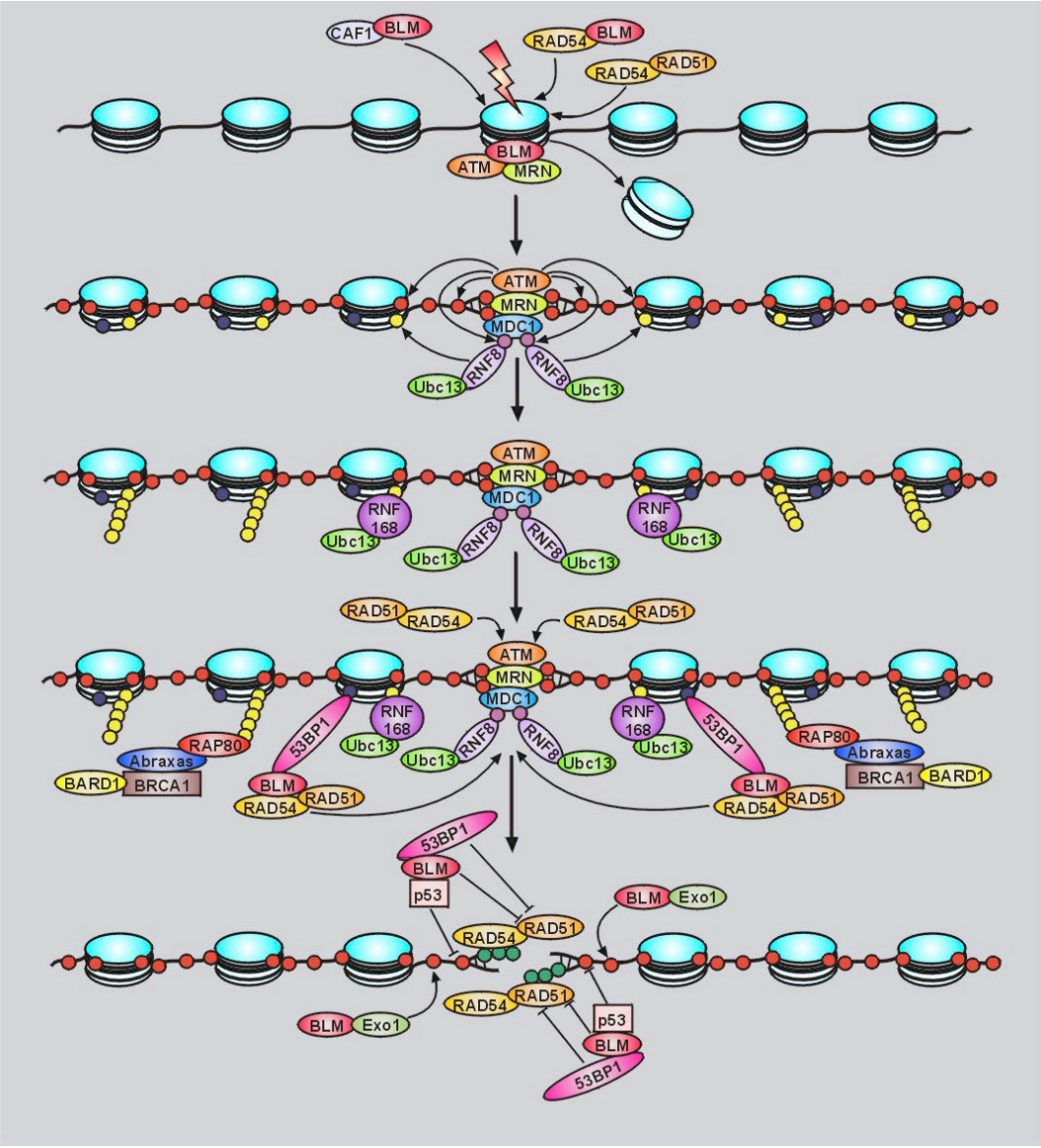



***Figure 3 :*** **Cascade de recrutement des facteurs de réparation de l'ADN à la cassure double brin.**

Après détection et signalisation d'un dommage double brin dans les cellules de mammifères, il y a orchestration de toute une cascade de recrutement de protéines à la cassure : ceci conduit à la formation d'un « foci » macromoléculaire. Le complexe MRN initie la 1ère étape de reconnaissance et de protection des extrêmités libres, et favorise le recrutement de la kinase ATM qui s'active en retour par auto-phosphorylation. S'en suit une éjection de l'octamère d'histone au niveau du site de cassure, et une phosphorylation par ATM de l'histone variant H2A.X environnant (qui prend un état noté gH2A.X). Cela induit une réorganisation chromatinienne localisée et l'amplification du signal de dommages de l'ADN aux nucléosomes voisins. Le médiateur de la réparation MDC1 est ainsi recruté à la cassure par reconnaissance de gH2A.X et phosphorylé par ATM. L'ubiquitine ligase de type E3, RNF8 (qui reconnaît MDC1 phosphorylé) assure l'ubiquitination de l'histone 2A, modification chromatinienne qu'une autre ubiquitine ligase E3 RNF168 est capable de détecter. RNF168 polymérise des chaînes d'ubiquitination, reconnues par le complexe RAP80 – Abraxas – BRCA1 et BARD1. Enfin, le médiateur 53BP1 reconnaît également les histones modifiées par ubiquitination ou acétylation, et participe ainsi à la signalisation de lésions de l'ADN.

*Proteases* »), les UCHs (« *Ubiquitin C-terminal Hydrolases* »), les USPs (« *Ubiquitin-Specific Proteases* »), et les Josephin. La 2e sous-famille rassemble les métalloprotéases à doigt de zinc (JAMM/MPN+).

La redistribution des composants des voies de signalisation et de réparation (enzymes, protéines adaptatrices, marqueurs chromatiniens) qui intervient au sein du noyau de l'ADN endommagé ***(Lisby et al., 2004) (Lukas and Bartek, 2004)*** se caractérise par le recrutement massif de facteurs au niveau de la cassure. Cet assemblage d'un complexe macromoléculaire aux sites de lésions de l'ADN est appelé « foci » ***(Rogakou et al., 1999)***.

### b) Points de contrôle du cycle cellulaire

La régulation du cycle cellulaire est la 1ère réponse dans une situation de dommages de l'ADN (***Figure 4***). Les évènements liés aux points de contrôle du cycle cellulaire expliquent le ralentissement ou le blocage temporaire dans la progression du cycle, suite à la détection d'une lésion, et ce jusqu'à sa résolution ***(Zhou and Elledge, 2000) (Khanna and Jackson, 2001)***. Dès que l'ADN cassé a été religué, le blocage du cycle cellulaire est alors levé, et la prolifération de la cellule peut reprendre normalement. Néanmoins, les mécanismes doivent avoir lieu rapidement, car si le blocage engendre une activation prolongée du point de contrôle incriminé, et que la cellule est en réalité incapable de réparer, celle-ci est emmenée dans le programme de mort cellulaire par apopotose ***(Rich et al., 2000)*** ou en arrêt irréversible, appelé sénescence ***(Schmitt, 2003)***.

ATM influence l'intégralité des points de contrôle du cycle cellulaire puisqu'il est en mesure de cibler de très nombreux facteurs clés à l'aide de la kinase effectrice CHK2, alors que ATR joue un rôle tout aussi important mais avec la kinase spécifique CHK1 ***(Smith et al., 2010)***.

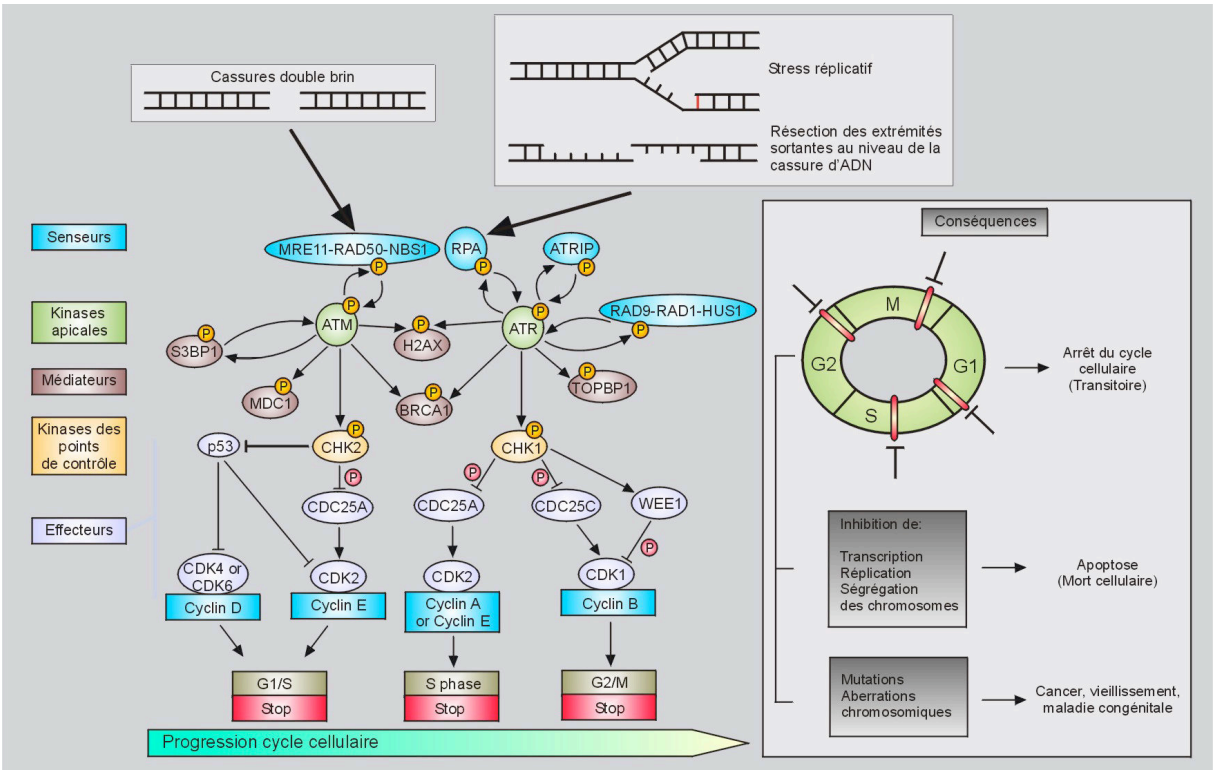



***Figure 4 :*** **Activation des points de contrôle du cycle cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN chez les mammifères.**

A la suite d'une cassure double brin ou d'un stress réplicatif (blocage ou effondrement de la fourche), se met en place une cascade de signalisation. Celle-ci est organisée en différents niveaux : tout d'abord des senseurs détectent la lésion de l'ADN pour l'activation de la signalisation : c'est le cas du complexe MRN, de RPA, ou d'ATRIP. Puis les kinases ATM et ATR sont recrutées et phosphorylées, et activent des médiateurs cibles (H2A.X, MDC1, BRCA1, 53BP1) par phosphorylation. Ce 2e niveau de la cascade permet de cibler la phosphorylation des kinases des points de contrôle du cycle cellulaire CHK1 et CHK2. Ces kinases inhibent l'effecteur spécifique de chacun des points de contrôles du cycle cellulaire (G1 / S, intra-S et G2 / M), à savoir la phosphatase CDC25 (A ou C). Les cyclines dépendantes des kinases (CDK1, 2, 4 et 6) bloquent finalement la progression du cycle cellulaire grâce à cette activation des points de contrôle. La voie dépendante de p53 est aussi capable d'influencer le point de contrôle G1 / S, par l'activation de p21Waf1 qui induit le blocage du cycle. Globalement, l'arrêt réversible du cycle cellulaire rend possible les mécanismes de réparation de l'ADN. Mais en cas de dysfonction dans la réponse aux dommages ou de lésions trop délétères, la cellule s'engage soit vers la voie de l'apoptose (ou mort cellulaire programmée), soit il y a une augmentation significative des aberrations chromosomiques (à l'origine d'un vieillissement accéléré, de cancers ou de maladies congénitales).

Le point de contrôle avant l'entrée en phase S, dit G1 / S, est prépondérant pour le maintien de chaque cellule, et dépendant de P53. En effet, il permet le « choix » du devenir cellulaire : soit la cellule débute la réplication immédiatement, soit celle-ci est retardée, soit il y a entrée en phase de quiescence G0. Ce passage est souvent dénommé le « point de restriction », dans la mesure où une grande majorité des cellules ne survivent pas à cette transition vers la phase S. Cela évite donc la réplication d'un ADN endommagé et les risques associés à la translocation chromosomique. Dans les cellules normales, P53 est inactif car dégradée suite à sa liaison avec la protéine MDM2. Certaines protéines contrôles du cycle cellulaire – ATM, CHK1, CHK2 – phosphorylent P53 ***(Banin et al., 1998) (Canman et al., 1998)*** à proximité et dans la région qui lie l'ubiquitine ligase MDM2, ce qui a pour conséquence d'inhiber l'interaction P53 / MDM2 et la dégradation de P53. L'activation de p53 par phosphorylation fait suite à l'effet de différents carcinogènes, tels que les UV, les oncogènes, diverses drogues ou autres substances qui cible l'ADN et le sensibilise. P53 va alors induire l'inhibiteur de cycline dépendant de kinase, $p21^{Waf1}$. CHK2 participe également au point de contrôle G1 / S indépendamment de p53 ***(Chehab et al., 2000)***, en phosphorylant la phosphatase CDC25A (« *Cell Division Cycle homolog 25 A* »), qui est alors dégradée et ne peut donc plus activer CDK2 (« *Cyclin Dependant Kinase 2* ») et la cycline E.

Le passage intra-S a pour effecteurs ATR et CHK1 ***(Feijoo et al., 2001)***, qui contrôlent l'intégrité du simple brin néo-synthétisé, et interviennent si il y a blocage de fourches de réplication. MDC1 est requis au cours de ce point de contrôle ***(Goldberg et al., 2003)***. Il valide ou non, l'entrée de la cellule en phase S. Il s'en suit une inhibition des origines de réplication environnantes, et un redémarrage de la fourche incriminée après résolution ***(Seiler et al., 2007) (Grallert and Boye, 2008)***. CDC25A et sa cible CDK2 sont inactivés par CHK1. En général, un arrêt avant ou durant la phase S, c'est à dire lors des

transitions G1 / S ou intra-S, se manifestent par l'inhibition d'activité de la kinase CHK2, qui est indispensable pour la progression de la phase S *(Falck et al., 2002)*.

Enfin, la transition G2 / M se fait par l'intervention essentielle de BRCA1 qui active CHK1 et régule la transition G2 / M suite aux dommages *(Yarden et al., 2002)*. L'arrêt à la transition G2 / M est dû aux inhibitions successives médiées par ATR-BRCA1 *(Zhu and Dutta, 2006)* de la phosphatase CDC25C *(Blasina et al., 1999)* et de sa cible, la cycline CDK1 (« *Cyclin Dependant Kinase 1* »). Dans cette situation, les cellules s'accumulent progressivement en G2, suite aux dommages qui ont pu survenir.

Ainsi, la voie ATR / CHK1 apparaît comme la principale alternative pour réagir aux dommages de l'ADN et aux problèmes de réplication, alors que la voie médiée par ATM / CHK2 aurait un rôle auxiliaire spécifiquement en réponse aux cassures double brin de l'ADN *(Bartek and Lukas, 2003)*. La conséquence globale d'arrêt du cycle cellulaire doit permettre à la cellule de mettre en place les mécanismes de réparation des cassures de l'ADN et empêcher que celles-ci se propagent aux cellules filles *(Kastan and Bartek, 2004)*.

### c) De nombreuses modifications chromatiniennes

L'état chromatinien de la cellule est sujet à de constantes modifications et adaptations, que ce soit au cours de la transcription, au cours de la réplication mais aussi au cours de la voie de réponse des dommages à l'ADN. En effet, des régions inaccessibles de la chromatine peuvent être victimes de cassures. Les modifications structurales du double brin qui découlent de la détection de la région affectée sont immédiates. Cet événement de remaniement chromatinien très localisé fait partie de la cascade de signalisation de la cassure *(Cohn and D'Andrea, 2008) (Lukas et al., 2011)*. Cela va faciliter l'accumulation des protéines de la réparation et des facteurs des points de contrôle au niveau de ces régions endommagées (***Figure 4***).

L'ADN subit de nombreuses adaptations chromatiniennes, dont la méthylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, l'acétylation, et la sumoylation. Pour promouvoir le déclenchement de la réparation et éviter l'instabilité génomique, l'addition de composés en état monomérique ou multimérique, participe à la signalisation d'une zone de dommage. Les cassures de l'ADN ont pour conséquences directes des modifications de structure de la chromatine : on relève ainsi un relâchement très localisé de la fibre chromatinienne à proximité de la lésion, qui conduit indirectement à un déplacement de nucléosomes, et aussi à une éjection ou dégradation d'histones constituant l'habituel octamère *(Ayoub et al., 2009)*. La modification ciblée de l'histone H2A.X environnante est capable de réguler la structure chromatinienne d'un site flanquant un dommage d'ADN, en stabilisant la relaxation. Comme déjà évoqué précédemment, la nouvelle forme γH2A.X signale à la cellule la présence d'une cassure, et ce sur une région s'étendant sur plus d'un mégabase *(Rogakou et al., 1999)*. Des agrégats de γH2A.X sont constitués au sein des régions qui doivent être ciblées par la machinerie de réparation et sont détectables par immunofluorescence (l'accumulation entraînant la formation de « foci » γH2A.X). La réponse aux dommages de l'ADN inclut aussi un important changement d'acétylation (l'histone variant H2A.Z, H3 et H4) au niveau de la zone de lésion *(Fernandez-Capetillo and Nussenzweig, 2004) (Murr et al., 2006)*.

Ce remaniement profond et la modification de l'état de la chromatine participent donc à la signalisation des cassures. L'accessibilité des facteurs dédiés à la réparation étant compliquée, du fait de l'organisation très régulière de l'ADN en nucléosomes, il y a également une nécessité de modification de la compaction de la chromatine. C'est pourquoi, pour faciliter le programme de réponse aux dommages, on constate une relaxation générale des régions chromatiniennes avoisinantes. Le but final est d'exposer à la machinerie de réparation une région habituellement enfouie dans la fibre chromatinienne. L'acétylation ciblées des histones permet la médiation de la relaxation chromatinienne *(Downey and Durocher, 2006)*. Ceci fait

appel à l'action de « remodeleurs », comme c'est le cas du complexe SWI / SNF qui joue un rôle dans la réparation du double brin *(Chai et al., 2005a)*. L'effet de relaxation chromatinienne va être amplifié grâce à la coopération d'autres remodeleurs, dont CHD4, INO80, NuA4, p400 et Tip60 *(Price and D'Andrea, 2013)*.

Le recrutement du médiateur MDC1 est en conséquence facilité, et il recrute à son tour RNF8 et RNF168 pour induire l'ubiquitination des histones H2A au niveau des lysines 63 (qui seront soit mono- ou soit poly- ubiquitinées en chaîne) *(Doil et al., 2009) (Bekker-Jensen and Mailand, 2011)*. Idem pour l'autre médiateur qu'est 53BP1, qui apparaît comme un détecteur bivalent du « code histone » modifié par méthylation et ubiquitination suite à la signalisation des dommages *(Fradet-Turcotte et al., 2013)*. Dans le cas de cassures double brin, il est considéré qu'il existe un « code histone » spécifique de la région affectée *(van Attikum and Gasser, 2005) (Escargueil et al., 2008)*. Une fois la cassure résolue, le retour de γH2A.X à une forme H2A.X est indispensable pour la restructuration chromatinienne. Celui-ci peut être réalisé par échange d'histone ou par des phosphatases tels que PP2A, PP6A ou WIP1 *(Chowdhury et al., 2005) (Cha et al., 2010)*. Enfin, les zones flanquantes des dommages sont des régions réprimées transcriptionnellement *(Groth et al., 2007)*. Cette inhibition de la transcription semble en partie médiée par la forme mono-ubiquitinée de l'histone H2A. L'état de la chromatine va pouvoir influencer le système de réparation mis en jeu, et dans le cas d'une lésion donnée de l'ADN, cela peut orienter le choix d'utilisation d'un système plutôt qu'un autre. Il a été notamment démontré qu'en réponse à diverses sources de stress, la chromatine subit des altérations (sans qu'il y ait toutefois une cassure de l'ADN) conduisant à l'activation et l'auto-phosphorylation de la kinase ATM.

### 3. Mécanismes de réparation de l'ADN double brin

Deux grandes voies sont mobilisées dans les cellules eucaryotes pour la prise en charge des cassures double brin de l'ADN (« *Double Strand Breaks Repair* », DSBR) : la recombinaison homologue (RH) et le "nonhomologous end-joining" (NHEJ). La RH repose sur une extension basée sur une homologie de séquences ***(Heyer et al., 2010)***. Au cours de l'évolution des eucaryotes supérieurs, un autre système très sophistiqué a émergé ayant pour caractéristique, la jointure des 2 extrêmités libres suite à la cassure double brin : le « *Non-Homologous End-Joining* » (NHEJ) ***(Lieber, 2010)***. Enfin, une dernière voie a été mise en évidence récemment : il s'agit de la voie alternative de jonction des extrêmités endommagées ou « *Alternative-End Joining* » (a-EJ). L'ensemble de ces mécanismes est finement régulé, et puisqu'ils possèdent tous le même substrat (à savoir la cassure double brin), il existe une certaine compétition entre eux. En effet, ils n'interviennent pas au même moment du cycle cellulaire ***(Sonoda et al., 2006)*** ***(Mao et al., 2008b)***, c'est-à-dire que le choix de l'une ou l'autre voie est influencée par la phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule : ce phénomène est appelé « choix de réparation du double brin de l'ADN ». L'efficacité des systèmes de réparation décroît globalement jusqu'à la mitose, phase qui est la plus sensible aux dommages de l'ADN. L'autre paramètre qui guide ce choix est l'efficacité de la résection nucléolytique 5' vers 3' des terminaisons ADN, suivant qu'elle soit activée ou non. Enfin, le recrutement correct et séquentiel des protéines directement impliquées dans chaque voie de réparation de l'ADN aux sites de dommage est une étape pré-requise pour le retour d'un ADN intègre ***(Kim et al., 2005)***. L'importance vitale de la réparation s'illustre par le degré de complexité des voies mises en jeu, et par les nombreuses étapes et facteurs qui les articule.

### a) Le « *Non-Homologous End Joining* »

La voie de réparation des extrêmités non-homologues est le système de secours pour l'intégrité de l'ADN le plus utilisé chez les eucaryotes et s'avère être particulièrement conservé au cours de l'évolution. Celui-ci est actif tout au long du cycle cellulaire et est favorisé lorsque la cellule est en phase G0 / G1 et en début de phase S, du fait de l'absence de séquences homologues portées par les chromatides sœurs. Ce mécanisme est particulièrement rapide, efficace mais infidèle. Cela résulte en de fréquentes délétions, substitutions, petites insertions, et parfois même des translocations qui se produisent entre différentes parties du génome coupées qui vont être liées de manière aberrante par ce processus.

La voie classique ou « canonique » (c-NHEJ) dépendant de Ku70 et Ku80 et se déroule en plusieurs étapes (***Figure 5***). L'hétéro-dimère Ku va se lier sous forme d'anneau sur l'ADN double brin rompu, sans aucune spécificité de séquence *(Walker et al., 2001)*, pour permettre de maintenir les 2 extrêmités du duplex ADN en vue de la future ligation. Les facteurs Ku tout d'abord et les autres protéines qui se chargent par la suite au niveau de la cassure double brin, viennent ainsi former une barrière structurale agissant physiquement et fonctionnellement contre la dégradation de l'ADN par les enzymes nucléolytiques environnantes. La sous-unité catalytique de DNA-PKcs (« *DNA Protein-Kinase catalytic subunit* » ou PRKDC) est aussi une sérine / thréonine kinase de la famille des PIKK *(Hartley et al., 1995)* tout comme le sont ATM et ATR. DNA-PKcs est recrutée par un domaine partagé en C-terminal avec Ku80, ce qui forme l'holoenzyme DNA-PK désormais activée *(Gell and Jackson, 1999; Singleton et al., 1999)*, et crée une synapse. DNA-PKcs apparaît comme le médiateur de la réparation du double brin non homologue et le régulateur du NHEJ *(Meek et al., 2007)*. DNA-PKcs est capable de s'auto-phosphoryler *(Chan and Lees-Miller, 1996)* et va assurer la phosphorylation de nombreuses autres protéines cibles. DNA-PK est une véritable plateforme dans la cascade de recrutement qui va suivre. De plus, les structures

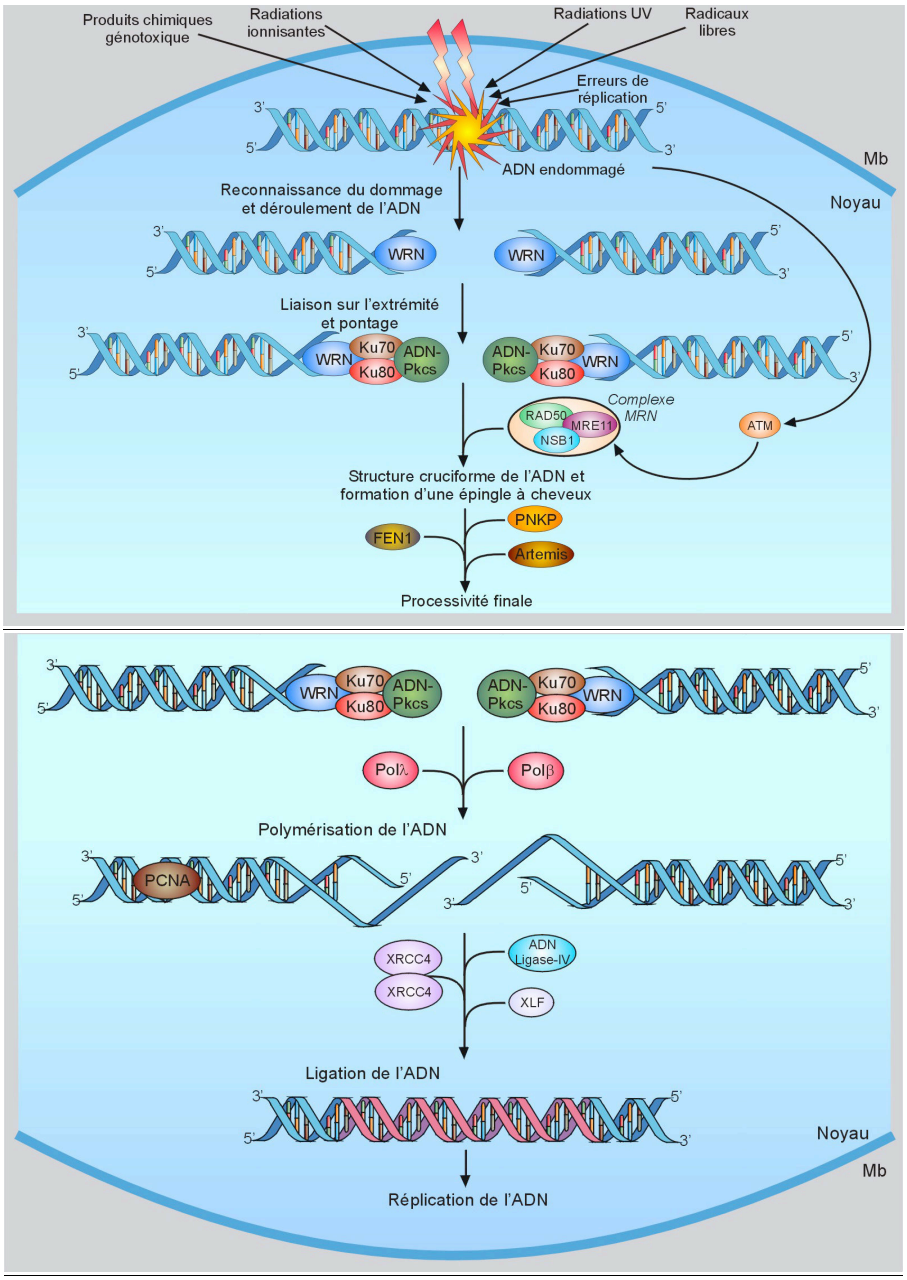



***Figure 5 :*** **Déroulement de la réparation classique d'extrêmités non-homologues (« *Classical - Non-Homologous End-Joining* », c-NHEJ) chez les mammifères.**

Suite à la cassure double brin, le dommage est reconnu par le dimère Ku70 / Ku80 (ou complexe Ku) qui vient se fixer sur l'ADN formant ainsi une structure en anneau. C'est une barrière structurale protectrice de l'extrêmité du double brin libre. La sous-unité catalytique DNA-PKcs est recrutée par le complexe Ku ce qui constitue le complexe DNA-PK activé, après auto-phosphorylation. DNA-PK est une véritable plateforme de recrutement pour la suite du NHEJ, qui maintient les extrêmités au sein d'une « synapse ». Puis, des étapes de traitement des extrêmités terminales se mettent en place pour la future ligature : PNKP, FEN1 et Artemis assurent ces modifications. Les polymérases Pol mu et Pol lambda vont ensuite agir pour la polymérisation de l'ADN. L'étape finale peut avoir lieu : la ligation directe des extrêmités est assurée par le complexe ADN Ligase IV / XRCC4 / XLF-Cernunnos, dont le recrutement est favorisé par DNA-PK.

d'ADN terminales doivent être correctement traitées et nettoyées pour l'obtention d'extrêmités chimiquement et physiquement compatibles pour que la ligation puisse se faire. Cela nécessite des terminaisons 3'OH et 5'P générées par la kinase-phosphatase PNKP (« *PolyNucleotide Kinase 3' end Phosphatase* » ou PNK) bi-fonctionnelle ***(Bernstein et al., 2009)***. On peut également suivre au niveau du complexe DNA-PK, le recrutement spécifique de facteurs dont l'activité conduit à des extrêmités d'ADN de nature compatible. Ceci est assuré par les endonucléases FEN1 (« *Flap structure-specific ENdonucléase 1* ») ***(Shibata and Nakamura, 2002)*** et Artemis (SNM1C ou DCLRE1C) ***(Moshous et al., 2003) (Ma et al., 2002)***. Les deux ADN polymérases, Pol mu ***(Andrade et al., 2009)*** et Pol lambda ***(Lee et al., 2004)*** peuvent alors intervenir pour l'étape de polymérisation de séquence. PNKP, qui interagit avec XRCC4 (« *X-Ray Cross Complementation 4* ») ***(Mani et al., 2010)***, va promouvoir l'interface nouvellement modifiée à l'étape de ligation. En effet, l'ensemble composé de la ligase spécifique du NHEJ, l'ADN Ligase IV ***(Grawunder et al., 1997)*** en complexe avec XRCC4 ***(Sibanda et al., 2001)*** auxquels s'ajoute le facteur Cernunnos (ou « *XRCC4-Life Factor* », XLF) ***(Ahnesorg et al., 2006) (Buck et al., 2006)*** vont former le second complexe du NHEJ, dit « complexe de ligature », dont le recrutement est favorisé par DNA-PK ***(Drouet et al., 2005)***. Cernunnos et XRCC4 peuvent former des filaments, potentiellement nécessaires pour aligner les deux extrêmités du duplex ADN, rendant possible la ligation ***(Ropars et al., 2011) (Hammel et al., 2011)*** par jonction directe des deux brins de l'ADN. Une fois que l'ADN a retrouvé son intégrité, les 2 complexes du c-NHEJ se détachent du double brin nouvellement reconstitué. On notera pour conclure que cette voie de réparation intervient aussi dans le processus critique du développement du système lymphoïde, la recombinaison V(D)J : ce processus ne sera pas détaillé car ne faisant pas l'objet de ce travail de thèse.

D'autre part, des études ont révélé la présence de voies additionnelles dans les processus de jonctions des extrêmités *(Mladenov and Iliakis, 2011)*, qui exploitent notamment les courtes homologies présentes dans les régions flanquantes de la cassure. Le c-NHEJ est présenté comme un mécanisme indépendant de la résection. Néanmoins, il existe dans les cellules une troisième voie de réparation de l'ADN dite « non-canonique », « back-up », et le plus souvent qualifiée d'« alternative », dont le mode d'action n'est pas totalement caractérisé (***Figure 6***). Cette jonction alternative des extrêmités (dite a-EJ) *(Audebert et al., 2004) (Yan et al., 2007) (Soulas-Sprauel et al., 2007)* repose sur une étape initiée par la résection *(Yun and Hiom, 2009)*. L'a-EJ, contrairement au c-NHEJ, est lent et encore plus source d'erreur. Cette composante est en effet hautement mutagène et très peu fidèle car elle passe par une résection de plusieurs paires de bases. Cette voie génère des délétions, des réarrangements chromosomiques oncogéniques telles que les translocations, caractéristiques abondamment observées dans les lignées cancéreuses *(Simsek and Jasin, 2010)*. En premier lieu, la cassure double brin est liée par le complexe MRN *(Xie et al., 2009)* et fait appel à l'activité de la protéine PARP1 *(Wang et al., 2006)*. Grâce à ces facteurs, la longueur de la résection 5' – 3' par la résectase CtIP (« *C Terminus-binding protein-Interacting Protein* ») va être finement contrôlée. Puis une micro-homologie (mais pas toujours) conduit à l'alignement des brins et à la génération d'extrêmité ADN 3' sortante (Flap), fragment d'ADN qui va être excisé (sous l'action du complexe XPF / ERCC1). Les cassures simple brin restantes vont être religuées par le complexe ADN Ligase I ou III alpha / XRCC1 *(Wang et al., 2005) (Boboila et al., 2012)*. Cela aboutit à une perte significative de séquences et donc d'information.

Enfin, très proche du mécanisme de l'a-EJ a été décrit le « *Microhomology Mediated End-Joining* » (MMEJ ou MHEJ) *(Liang et al., 2005) (Katsura et al., 2007) (McVey and Lee, 2008)* (***Figure 7***), sachant que les deux systèmes restent étroitement imbriqués *(Decottignies,*

*2013)*. Il se réalise au cours de la phase S et est indépendant du complexe Ku. Le MMEJ génère des délétions après réparation et est source de variation génétique chez l'homme. De ce fait, les cellules semblent être réfractaires à ce système de réparation et l'active que lorsque le NHEJ est indisponible ou inadapté. Il repose sur l'utilisation de séquences de 5 à 25 pb complémentaires pour l'alignement des 2 brins cassés, ce qui correspond à du « micro-SSA » (« *Single Strand Annealing* »). Les séquences non homologues sont supprimées et les nucléotides manquants sont insérés.. La ligation a lieu bien que les brins soient globalement incompatibles, mais cela est rendu possible grâce à la présence de microhomologies. Les facteurs spécifiques de cette voie de prise en charge, sont PARP1, XRCC1, Ligase I / III alpha et Mre11 *(Liang et al., 2008) (Xie et al., 2009)*.

### b) La recombinaison homologue

La recombinaison homologue est le second processus le plus utilisé par les cellules humaines (***Figure 7 a***). C'est un système particulièrement fidèle qui a lieu majoritairement après la réplication de l'ADN (lors de la transition S / G2, et donc en fin de phase S et phase G2), puisqu'une chromatide sœur est disponible pour servir de matrice *(Johnson and Jasin, 2000)* lors de la recherche de séquences identiques. Ce système apparaît comme un processus relativement lent *(Mao et al., 2008a)* dans la mesure où pas moins de six étapes distinctes doivent se succéder. La recombinaison homologue est initiée par la résection des extrêmités terminales de l'ADN double brin rompu de l'extrêmité sortante 5' en direction du 3' pour obtenir un simple brin complémentaire (ssDNA) à extension 3' sortante (ou « queue 3' »). Cette étape est assurée par les nucléases et les hélicases de l'ADN. L'activité nucléase semble se faire en deux sous-étapes et être modulée par le complexe MRN. En effet, BRCA1 (« *BReast CAncer type 1 susceptibility Protein* »), médiateur de la recombinaison homologue

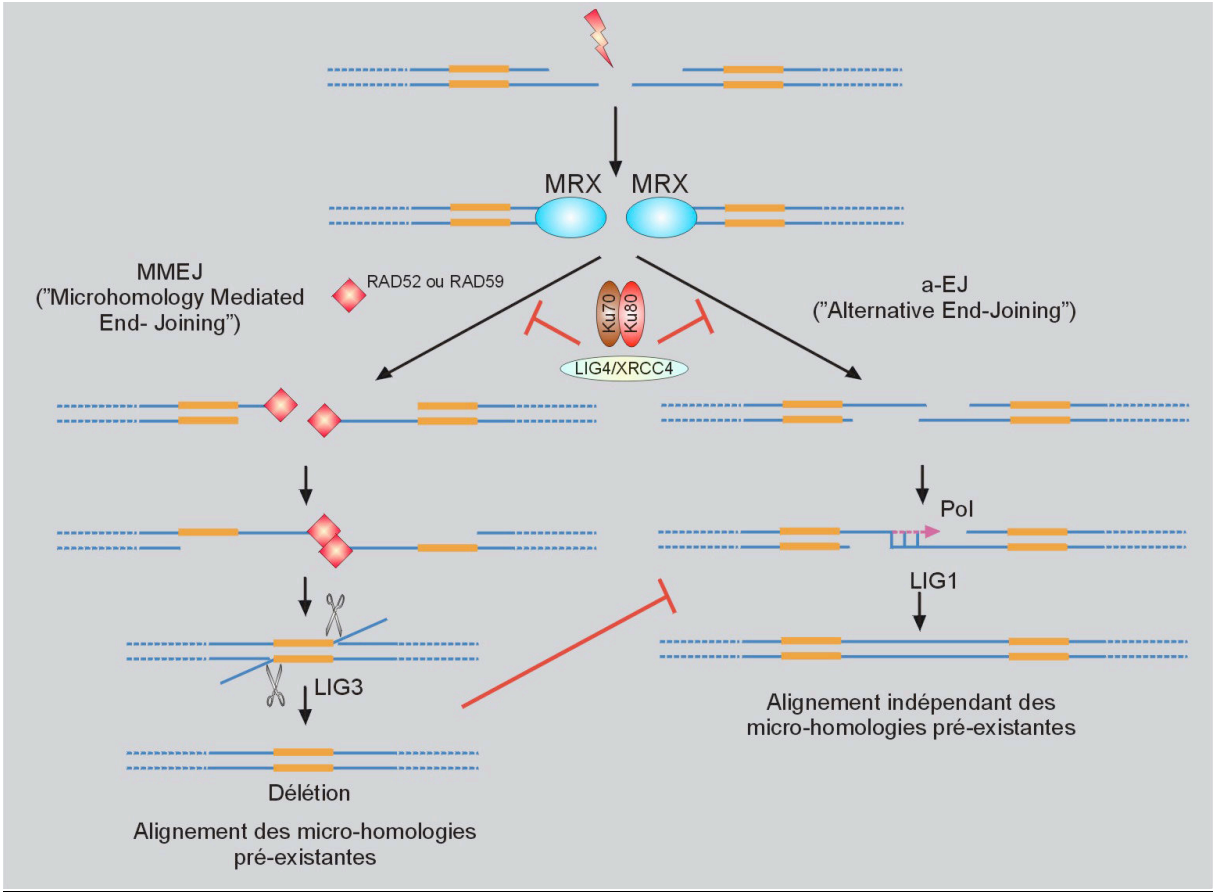



***Figure 6 :*** **Schématisation simplifiée des voies annexes de la réparation des cassures double brin de l'ADN par jonction des extrêmités libres dans les cellules de mammifères.**

Tout d'abord, le complexe MRN vient couvrir les extrêmités d'ADN. Puis la cellule peut s'orienter vers 2 voies particulières. L'une, repose sur le « *Microhomology Mediated End-Joining* » (MMEJ), qui assure l'appariement au niveau de micro-homologies de séquences pré-existantes (en orange) à proximité de la zone de cassure. La ligation finale est assurée par un mécanisme proche du « micro-SSA » («*Micro-Single Strand Annealing* »). Cette voie fait intervenir notamment l'ADN Ligase III ce qui résulte au final en des délétions importantes. L'autre voie opérante est l'a-EJ (« *Alternative End-Joining* »), qui ne nécessite pas de séquences micro-homologues et dont l'acteur essentiel est l'ADN Ligase I. L'ADN polymérase garantie une synthèse à partir du brin matrice disponible grâce à l'alignement indépendamment des micro-homologies environnantes.

Habituellement, la réparation médiée par le c-NHEJ prédomine grâce au complexe Ku et à l'ADN Ligase IV (XRCC4), ce qui inhibe l'activation de ces voies de réparation secondaires.

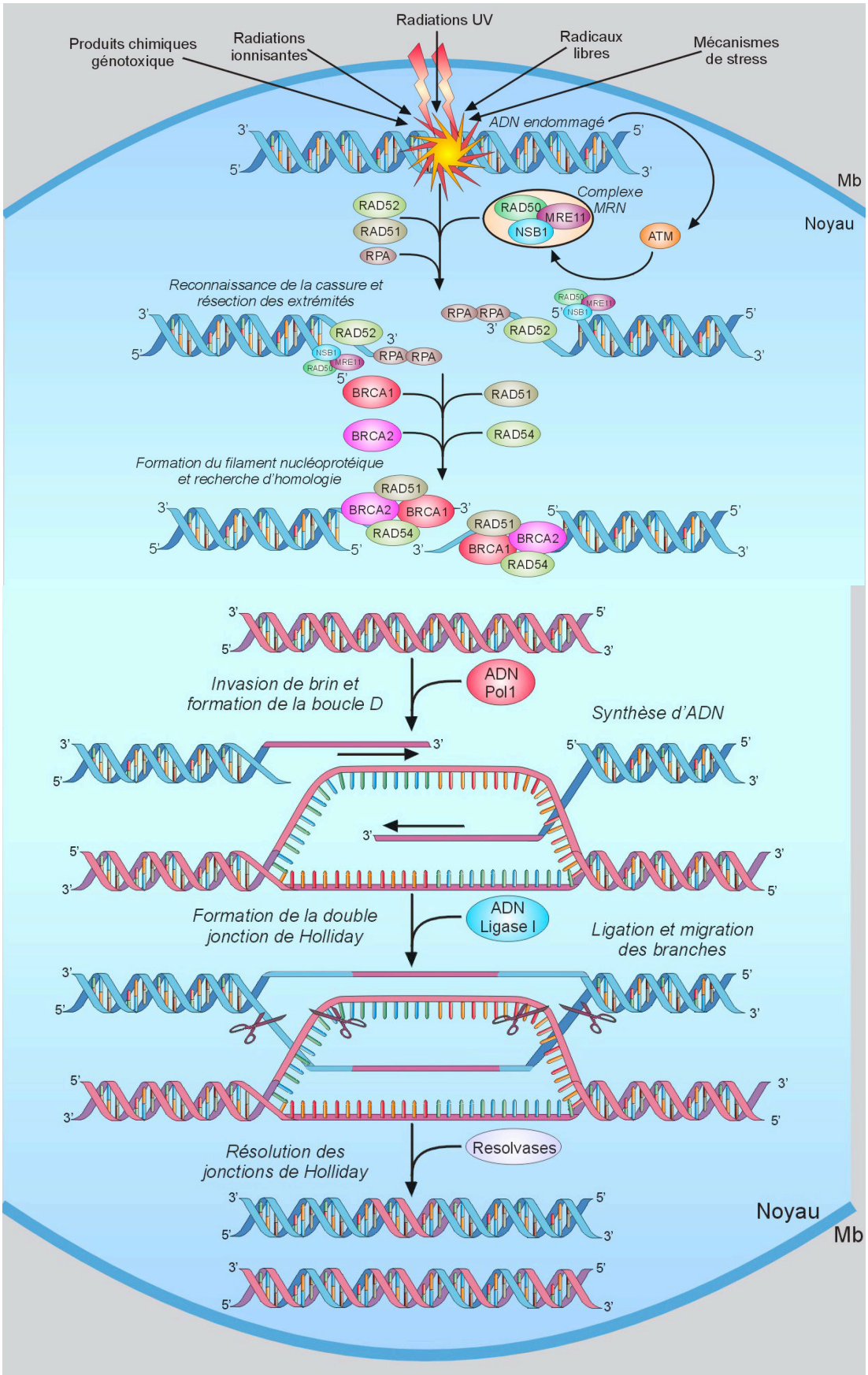



***Figure 7 a/*** : **Déroulement de la Recombinaison Homologue (RH) chez les mammifères.**

Suite à différentes sources générant des cassures double brin de l'ADN, les étapes suivantes se succèdent chronologiquement : (i) reconnaissance du dommage par le complexe MRN et résection des extrêmités terminales de l'ADN coupé, pour générer une queue simple brin 3', (ii) chargement sur le simple brin sortant de RPA (iii) formation d'un mono-filament Rad51 à l'aide de Rad52 qui assure le déplacement de RPA, (iv) recherche d'homologie de séquence à l'aide de Rad54, puis invasion du simple brin pour la formation d'un hétéro-duplex d'ADN avec des jonctions de Holliday (dHJ) de part et d'autres (la boucle D), (v) synthèse d'ADN par l'ADN polymérase I, grâce à l'utilisation de la matrice portée par le brin homologue avant la migration des branches et la ligation par l'ADN Ligase I, et enfin (vi) résolution conformationnelle de la boucle constituée temporairement à l'aide de résolvases, générant ou non des crossing-over lors de la séparation des brins.

possède un domaine BRCT rendant possible les interactions avec des protéines phosphorylées. BRCA1 s'hétéro-dimérise avec son co-facteur BARD1 (« *BRCA1 Associated Ring Domain 1* ») qui possède un domaine RING ***(Wu et al., 1996)***, conférant au complexe BRCA1 / BARD1 une activité E3 ubiquitine-ligase. Ainsi, ils ubiquitinent directement la nucléase CtIP (à activité exonucléasique de 3' vers 5') ***(Yu et al., 2006)*** qui va coopérer avec le complexe MRN pour initier la résection du double brin ***(Limbo et al., 2007)***. Puis, l'exonucléase 1 (Exo1) ou le complexe BLM / DNA2 ***(Nimonkar et al., 2011)***, à activité exonucléasique 5' vers 3' assurent l'élongation du brin 3' sortant pour obtenir une longue extrêmité sortante. L'excès de simple brin qui est produit à cette étape doit être rapidement protégé. C'est pourquoi RPA (« *Repair Protein A* »), vient rapidement se charger sur ce simple brin afin de stabiliser cette structure très particulière en interaction avec Rad52 ***(Park et al., 1996)***, ce qui active la kinase ATR. BRCA2, médiateur de la recombinaison homologue, interagit avec la recombinase Rad51, et favorise son recrutement sur ce même simple brin sortant, pour constituer un filament nucléoprotéique (spécifiquement au cours de cette phase) ***(Tashiro et al., 1996)***. Cela se fait suite au déplacement progressif de RPA, médié par BRCA2, et par un mécanisme dynamique de nucléation, guidé par l'hydrolyse de l'ATP. La cycline kinase Cdk1 est importante après l'étape d'invasion de brin et avant la néo-synthèse de brin ***(Ira et al., 2004)***. L'invasion du nucléo-filament Rad51 dans la synapse de réparation (correspondant à l'hétéro-duplex d'ADN) requiert une séquence homologue intègre portée par le brin complémentaire. C'est Rad54, protéine de la famille Swi2 / Snf2, qui va chercher cette séquence homologue et également la rendre accessible au brin envahissant. Celui-ci catalyse la migration des branches qui a lieu entre les deux brins, c'est-à-dire que Rad51 chargé est ôté sous l'action de Rad54 au niveau de l'appariement homologue (refs). Des protéines hélicases participent à cette réaction d'échange. C'est le cas des hélicases de la famille RecQ, qui contribuent largement à la stabilité globale du génome. Outre leur rôle

majeur dans la progression des fourches de réplication, elles participent également à la stabilité du génome lorsque les fourches sont bloquées via la prévention de formation d'intermédiaire de recombinaison aberrants, voire la résolution de ceux-ci. On peut citer BLM, WRN, RECQ1, RECQ5, et Rad54. Grâce à leurs coopérations, la synthèse d'ADN à partir de cette nouvelle matrice démarre à ce moment-là à l'extrêmité de ce brin 3' envahissant (refs). Une fois la synthèse terminée, la seconde terminaison du brin est capturée pour former un intermédiaire de recombinaison homologue avec le croisement des brins correspondant à deux jonctions de Holliday de part et d'autre d'une boucle D (dite « boucle de déplacement »). Des endonucléases et des résolvases sont en mesure de dissoudre cette structure hétéro-duplex de l'ADN, une fois que la réaction d'échange et la synthèse réparatrice a eu lieu. Parmi les facteurs capables d'intervenir pour dissocier ces jonctions des brins, il y a la nucléase GEN1 (« *Gen ENdonuclease homolog 1* ») qui fonctionne par clivage, de même que l'hétéro-dimère MUS81 / EME1 (« *Essential Meiotic Endonuclease 1* »), appartenant à la famille des nucléases XPF, et enfin SLX4 (refs). Ces résolvases contribuent à la résolution de la double jonction de Holliday faisant partie de la voie du « *Double-Strand Break Repair* » (DBSR). Ces structures peuvent être résolues en générant ou non des crossing-over.

D'autres voies peuvent être mobilisées pour la réalisation de la RH : le « *Synthesis-Dependent Strand Annealing* » (SDSA) et le « *Single-Strand Annealing* » (SSA). L'étape de génération du simple brin, ainsi que le chargement de la protéine RPA, restent les étapes clés similairement à la RH avec jonction de Holliday. Mais dans le cas du SDSA, la réaction procède au déplacement du brin, à l'alignement du simple brin nouvellement étendu au niveau de l'autre terminaison cassée, et enfin à l'élongation par synthèse avant la ligation. Le SSA lui, nécessite la présence de répétitions directes des deux côtés de la cassure. La protéine RAD51 n'intervient pas, et les structures d'ADN débordantes lors du rapprochement du

double brin rompu sont ensuite excisées. Il existe donc dans les cellules une certaine complexité des systèmes de réparation de l'ADN avec des interconnexions entre les voies et les protéines qui interviennent dans une ou plusieurs voies (***Figure 7 b***).

### c) Le « choix » du système de réparation des cassures double brin

Suite au signalement d'un dommage et à la cascade de signalisation, une très fine régulation est mise en place en amont de la réparation, afin de guider la cellule vers l'utilisation de l'un ou l'autre système de prise en charge des lésions double brin. C'est la notion de « choix de réparation des terminaisons » *(Symington and Gautier, 2011) (Chapman et al., 2012)*. Jusqu'à très récemment, il était admis que seule la phase du cycle cellulaire et la nature de la résection guidaient ce choix (***Figure 8***). Par exemple en phase G1 la réalisation de la RH est empêchée, ce qui signifie que le NHEJ voire le MMEJ sont mobilisés. Bien que le système du NHEJ reste encore possible, la RH est en revanche grandement favorisée si la cellule est en cours de progression S vers G2. On relève donc bel et bien les restrictions qui se mettent en place suivant l'état du cycle cellulaire. La résection de l'ADN 5' – 3' revêt donc une importance particulière, puisque de ce processus dépend la RH et la répression du NHEJ. Au cours de la réparation du double brin, le complexe MRN qui est le senseur de la RH est donc tout d'abord mobilisé dans les étapes les plus précoces de la signalisation des dommages. La fixation directe en anneau de l'hétéro-dimère Ku70 / Ku80 sur l'ADN protège de la résection par les exonucléases, ce qui implicitement favorise l'orientation de la réparation vers le c-NHEJ en réprimant la RH *(Pierce et al., 2001)*. Ku est aussi le balanceur de l'intervention de l'une ou de l'autre voie du NHEJ, et se retrouve au sommet du choix. L'a-EJ est ainsi réprimée par l'hétéro-dimère Ku. Suivant la taille de la résection, si elle est courte par exemple, alors seul le c-NHEJ se programme. Mais une plus longue résection met en

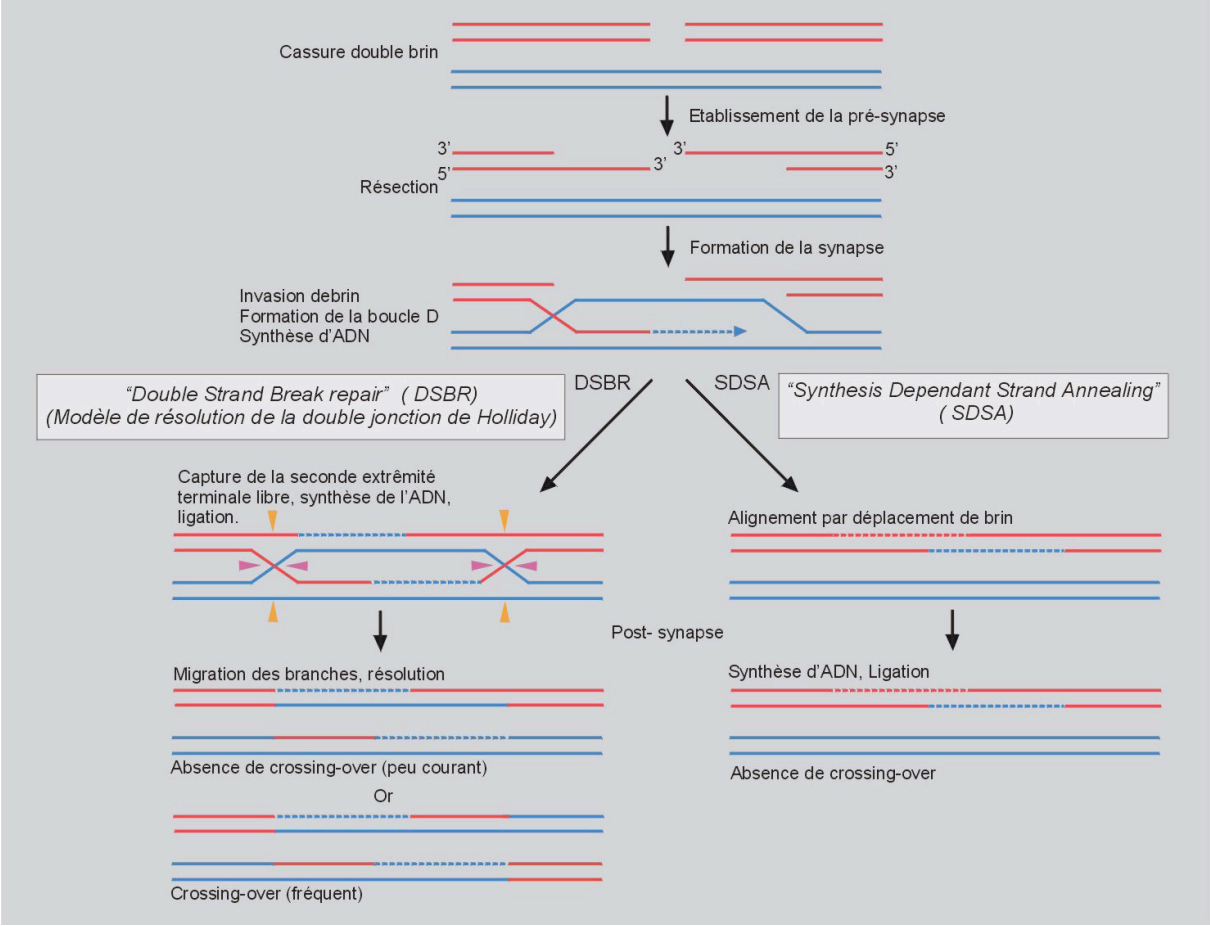



***Figure 7 b/ :*** **Schématisation simplifiée des conséquences finales de la recombinaison homologue sur la séquence chromosomique.**

L'établissement de la « pré-synapse » se fait suite aux étapes de résection de l'ADN. Puis la formation de la « synapse » est consécutive à la migration des branches au sein d'une boucle D. A cette étape, 2 choix sont possibles : l'orientation vers le « *Double-Strand Break Repair* » (DSBR) qui permet la capture de la seconde extrêmité, pour constituer une double jonction de Holliday (dHJ). Après synthèse de l'ADN et ligation, la résolution finale de la dHJ génère des crossing-over ou non – l'orientation vers le « *Synthesis-Dependent Strand Annealing* » (SDSA) qui fonctionne par alignement après déplacement de brin, puis synthèse d'ADN et ligation sans crossing-over.

compétition l'a-EJ et la RH, même si pour que la RH puisse s'initier, cela dépend également de l'activation d'un certain nombre de facteurs, et en particulier du chargement de Rad51 sur le simple brin de l'ADN *(Grabarz et al., 2012)*.

Récemment, quatre facteurs ont été démontrés comme jouant un rôle critique dans ce choix de voies de réparation en orientant le système vers un type de réparation : 53BP1, RIF1 (« *Rap1-Interacting Factor 1* »), BRCA1 et CtIP. Les suppresseurs de tumeurs que sont 53BP1 et BRCA1 viennent rapidement enrichir la cassure et s'y focaliser et orienter la « décision » de mobilisation des facteurs du NHEJ ou de la RH, respectivement. En effet, 53BP1, grâce à ses interactions avec la chromatine environnante d'une cassure, favorise la mise en place du NHEJ (*Dimitrova et al., 2008*). Ce médiateur de la réparation vient rapidement se fixer au niveau de l'ADN endommagé, c'est à dire au sein même des foyers macromoléculaires en quantité importante et ce, indépendemment du stade du cycle cellulaire. De ce fait, en se chargeant au niveau des structures qui doivent être prises en charge pour la religature, celui-ci bloque l'accessibilité à d'autres protéines. 53BP1 inhibe ainsi l'étape initiatrice de deux des voies de réparation (la RH et l'a-EJ) : la résection, puisque les exonucléases spécifiques n'ont pas accès à la queue 5' libre, bloquant la progression vers la partie nucléotidique 3' plus interne. La stabilisation constitutive de 53BP1 aux foyers de cassures augmente significativement le c-NHEJ *(Bunting et al., 2010)*. Récemment, des études ont démontré l'importance de RIF1 dans la coopération d'action avec 53BP1, en particulier dans la protection et le contrôle de la résection *(Di Virgilio et al., 2013) (Zimmermann et al., 2013) (Chapman et al., 2013)*. Au contraire, BRCA1 est l'antagoniste du NHEJ médié par 53BP1, et il contrôle positivement la RH *(Moynahan et al., 1999)*. BRCA1 est capable d'enlever le médiateur 53BP1, afin d'initier la résection en générant des queues libres d'ADN. Il agit en étroite collaboration avec CtIP *(Yun and Hiom, 2009)*, qui a besoin d'être phosphorylé pour être actif. La résection induit le démarrage de la RH et le blocage du NHEJ. Il existe donc un

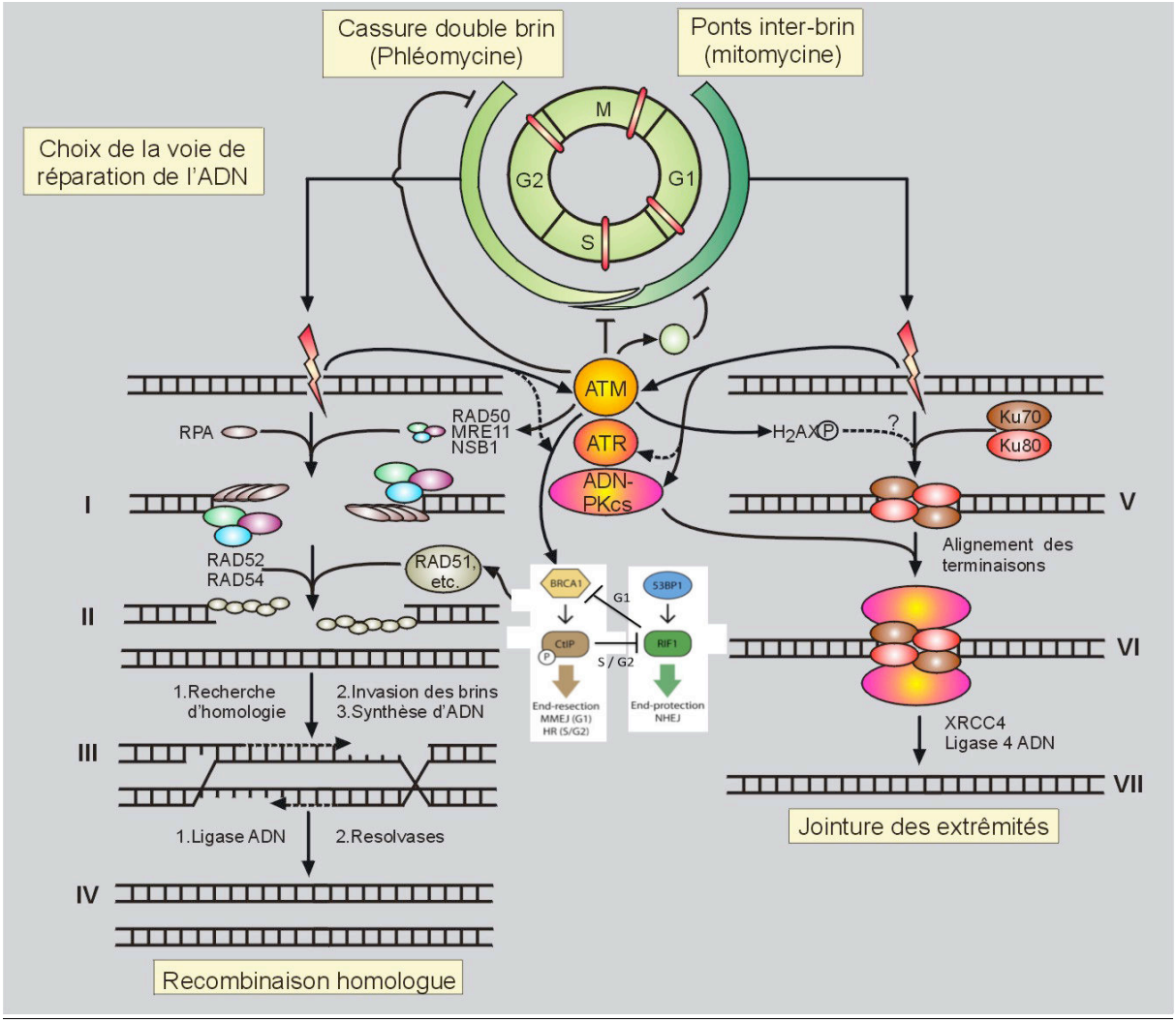



***Figure 8 :*** **« Choix » de réparation des terminaisons double brin dans les cellules de mammifères.**

Cette décision d'engagement vers la voie du RH ou du NHEJ est finement régulée. La phase du cycle cellulaire oriente l'activation d'une des 2 voies de réparation double brin. Lors de la progression de la fin de phase S vers le début de phase M, la RH est favorisée puisque les 2 chromatides sœurs sont disponibles, en particulier pour l'étape de recherche d'homologie. Le complexe senseur MRN se fixe sur les extrêmités terminales du double brin rompu et assure la promotion de la résection par les exonucléases, générant le simple brin 3'. L'activation d'un certain nombre d'acteurs de la RH est ensuite nécessaire, en particulier le chargement de Rad51 sur le simple brin. En revanche, lorsque les cellules se trouvent en phase G1 et début de S (et donc qu'il y a une absence de chromatides sœurs), c'est le NHEJ qui s'engage : le complexe Ku70 / Ku80 forme l'anneau protecteur de la résection, point de départ de la voie du NHEJ. Récemment, de nouvelles coopérations en amont du choix de voies de réparation ont été décrites : 53BP1 et RIF1 assurent le blocage de la résection ce qui permet l'activation du NHEJ, alors que BRCA1 et CtIP favorisent la RH.

circuit dépendant du cycle cellulaire, et de l'action des duos de facteurs 53BP1 / RIF1 et BRCA1 / CtIP *(Escribano-Diaz et al., 2013)*. Ceux-ci contribuent à l'équilibre très spécifique pour l'engagement de la réparation vers le NHEJ ou vers la RH.

Par ailleurs, d'autres acteurs clés des différentes voies de réparation des cassures double brin ont aussi leur importance pour guider le choix. C'est le cas de MDC1 qui accélère le NHEJ suite à la transduction du signal en phase G1 par ATM, et la résection qui débute en phase G2 *(Dimitrova and de Lange, 2006)*. PARP1 *(« Poly-ADP Ribosylation Protein 1 »)* apparaît également en amont de la cascade du choix *(Haince et al., 2008)*. L'histone H2A.X (et ses modifications), le niveau global d'acétylation chromatinien *(Tang et al., 2013)*, DNA-PKcs et ATM *(Geuting et al., 2013)* influencent également les deux voies *(Shrivastav et al., 2008)*. Enfin récemment, il a été démontré que le recrutement des remodeleurs de la chromatine (tels que les enzymes INO80, SWR-C, NuA4, SWI / SNF, et RSC), est dépendant du cycle cellulaire et du choix de la voie de réparation : il est finement couplé à la RH, et inhibe le NHEJ *(Bennett et al., 2013)*. C'est donc une véritable compétition qui se déroule indépendamment du cycle cellulaire.

### d) La réparation des ponts inter-brins de l'ADN

La réparation des adduits ou ponts inter-brins dépend là aussi largement de la phase du cycle cellulaire dans laquelle la cellule est engagée *(Deans and West, 2011)*. Ainsi, si le pont se forme en phase G0-G1, le système fait appel à une voie de réparation composite qui réquisitionne des protéines intervenant habituellement dans trois grandes voies différentes : BRCA1 de la voie RH, MSH2 (appartenant au complexe MutS-alpha) de la voie du MMR (« *MisMatch Repair* »), et enfin ERCC1 / XPF de la voie du NER (« *Nucleotide Excision Repair* ») *(Fink et al., 1996) (Zhao et al., 2009)*. Tout d'abord, c'est grâce à une partie du

système de réparation du MMR que se ferait l'étape de reconnaissance de la lésion inter-brin, à l'aide de la nucléase SLX4 *(Svendsen et al., 2009)*. En effet, la détection de l'anomalie structurale, déclenche le recrutement d'endonucléases et d'autres complexes. ERCC1 / XPF semble jouer le rôle d'endonucléase dans la réparation des adduits inter-brins. Les principales étapes de la voie ICL sont les suivantes : reconnaissance de l'anomalie structurale puis excision du brin contenant la liaison covalente par ERCC1 / XPF (ou une autre protéine de la famille XPF / MUS81). Les structures intermédiaires de recombinaison de l'ADN sont probablement résolues par les mêmes protéines que dans la voie RH ou par ERCC1 / XPF.

Au contraire, si la réplication est active et que les ponts sont induits en phase S (précoce ou tardive), la cellule fait appel au mécanisme de la voie de réparation Fanconi (***Figure 9***) pour leur résolution. Suite à des études génétiques par complémentation fonctionnelle notamment, quinze gènes ont été identifiés *(Niedernhofer et al., 2005)* comme appartenant au groupe de complémentation Fanconi : FancA, FancB, FancC, FanDl (également connu sous le nom de BRCA2 impliqué dans le cancer du sein), FancD2, FancE, FancF, FancG, FancI, FancJ (BRIP1), FancL, FancM, FancN (PALB2), FancO (Rad51C) et FancP (SLX4). Le « complexe FA core », composé par sept d'entre eux (FancA, FancB, FancC, FancE, FancF, FancG et FancL), agit en étroite collaboration avec cinq autres protéines (FAAP20, FAAP24, FAAP100, MHF1, et MHF2). La fonction de ce complexe "core" est de cibler la protéine FancD2 pour la mono-ubiquitiner *(Kennedy and D'Andrea, 2005) (Kim and D'Andrea, 2012) (Sale, 2012).* L'hypothèse que ces facteurs agiraient au sein d'une même voie métabolique a donc été confirmée avec FancD2, qui est le gène parmi les quinze le plus conservé au cours de l'évolution. Cette voie est indispensable au maintien de l'intégrité du génome puisqu'elle intervient directement dans la prise en charge des ponts inter-brins. Qu'ils soient générés de manière endogène (par blocage imprévu de la fourche de réplication) ou exogène (à cause d'agents pontants de l'ADN), ils sont résolus par le complexe FA. Le

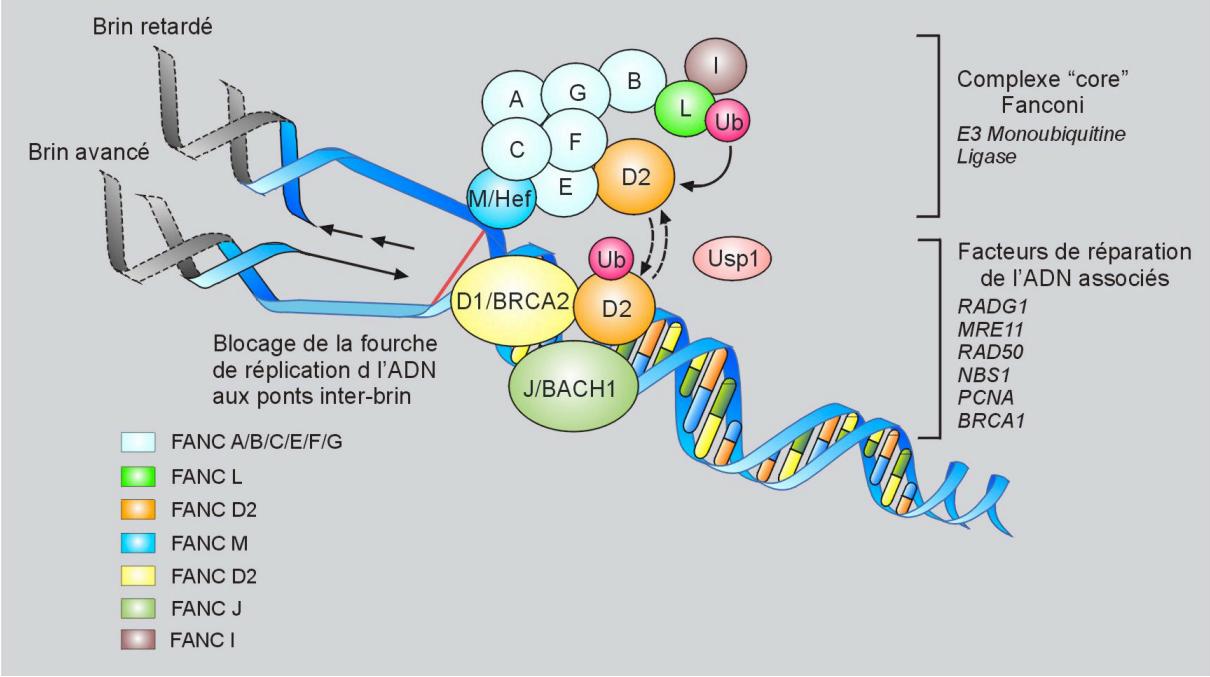



***Figure 9 :*** **Les facteurs du complexe Fanconi.**

15 facteurs ont été identifiés comme agissant au sein de la même voie de signalisation Fanconi, après des approches génétiques et des études par groupe de complémentation : FancA, FancB, FancC, FanDl (ou BRCA2), FancD2, FancE, FancF, FancG, FancI, FancJ (ou BRIP1), FancL, FancM, FancN (ou PALB2), FancO (ou Rad51C) et FancP (ou SLX4). Le « complexe FA core » est composé par 7 d'entre eux : FancA, FancB, FancC, FancE, FancF, FancG et FancL.

système - via les hélicases - est incapable de dérouler correctement l'ADN au niveau des ponts rencontrés, puisqu'une liaison covalente persiste au niveau du pont. Le complexe Fanconi (***Figure 10***) va permettre de protéger l'ADN et d'éviter que la fourche s'effondre. La signalisation de réparation Fanconi coordonne trois processus intervenant habituellement dans des voies de réparations distinctes. Pour éliminer la présence des ponts entre les brins de l'ADN, les facteurs de trans-lésions, du mécanisme du NER et de la recombinaison homologue collaborent (***Figure 11***).

En effet, les membres du complexe FA core activent FancL à activité ubiquitin-ligase. Le Fa core est stabilisé par la présence de la protéine accessoire FAAP100 ***(Ling et al., 2007)***. L'ADN translocase FancM, protéine appartenant à la famille des endonucléases ERCC1 / XPF ayant une structure spécifique des protéines de liaison à l'ADN interagit avec la protéine FAAP24 afin de constituer un hétéro-dimère ***(Ciccia et al., 2007)***. Celui-ci devient actif et stable, reconnaît alors le pont inter-brin ce qui entraîne le recrutement du complexe FA core ***(Kim et al., 2008)***. Il va ainsi mono-ubiquitiner ses deux cibles FancD2 ***(Matsushita et al., 2005)*** / FancI ***(Smogorzewska et al., 2007)*** et permettre leur fixation en amont de la fourche de réplication au niveau du duplex ADN. Cette ubiquitination très ciblée et le maintien de cette forme modifiée (car mono-ubiquitinée) au sein même de la chromatine de la région avec fourche bloquée, va faciliter le recrutement et l'interaction de FancD2 avec une nucléase et une polymérase spéciale sous forme de foci. Ainsi, c'est la nucléase FAN1 (« *Fanconi-Associated Nuclease 1* ») ***(Kratz et al., 2010) (MacKay et al., 2010)*** et l'ADN polymérase Pol v, aussi connue en tant que POL N ***(Moldovan et al., 2010)***, qui activent en coopération le métabolisme de synthèse trans-lésionnelle (« TLS »). La TLS requiert la mono-ubiquitination des facteurs associés lors de la réplication, en particulier de PCNA (« *Proliferating Cell Nuclear Antigen* »). Ce type de polymérase a la capacité de passer outre les ponts de l'ADN, par un système de « bypass », qui permet de poursuivre la progression normale du réplisome.

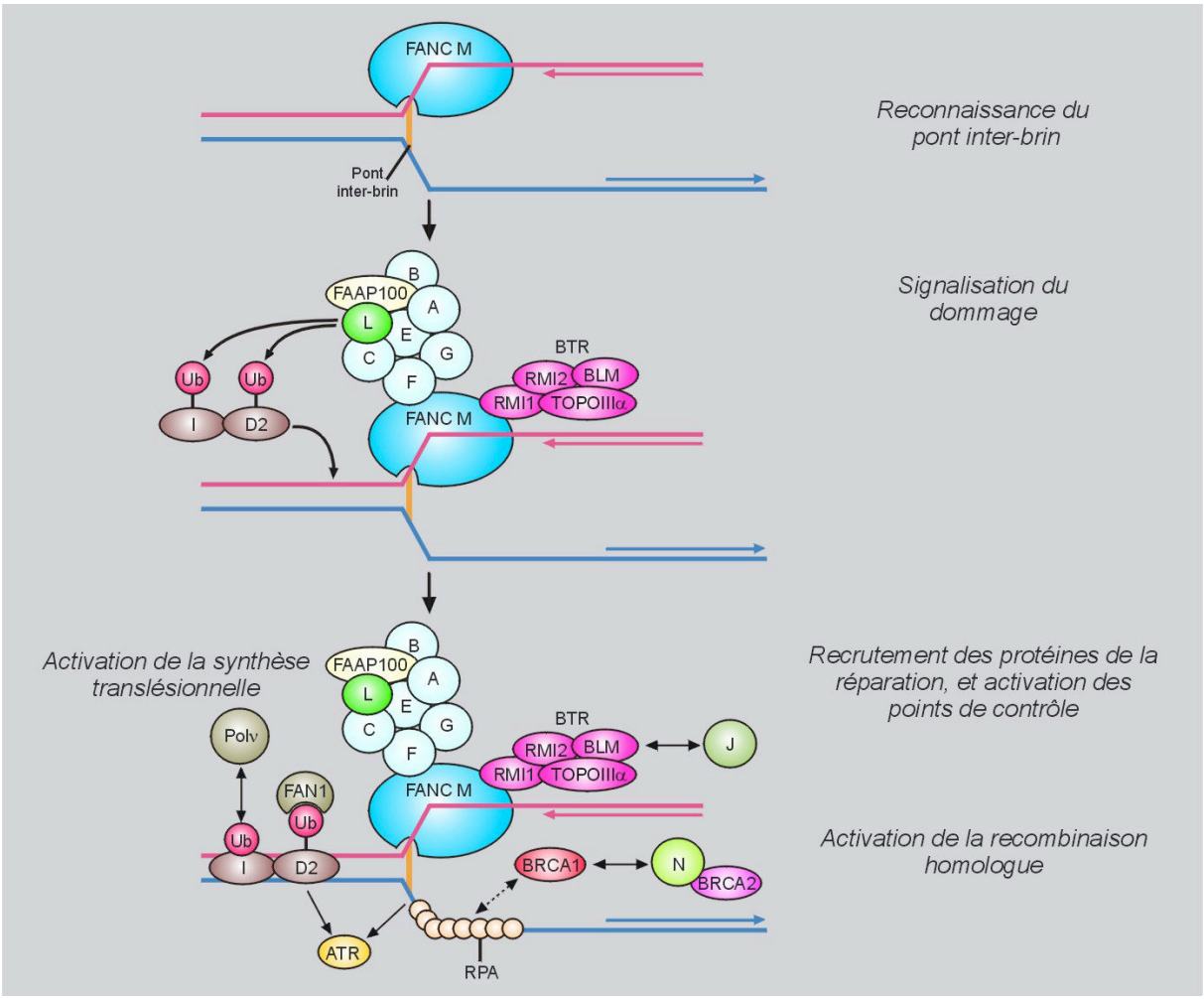



***Figure 10 :*** **Activation de la voie de signalisation Fanconi.**

La reconnaissance d'une structure particulière au cours de la phase S, le pont interbrin, active la signalisation Fanconi en mobilisant l'ensemble des 15 facteurs décrits précédemment. L'ADN translocase FancM assure la reconnaissance du pont, évite l'effondrement de la fourche et entraîne le recrutement du complexe core Fanconi, stabilisé par un facteur accessoire FAAP100. FancL qui appartient au FA core, est une ubiquitine ligase de type E3 assurant la mono-ubiquitination du dimère FancD2 – FancI. En conséquence, FancD2 et FancI parviennent à se fixer sur le double brin d'ADN en amont de la fourche de réplication bloquée topologiquement. FancM recrute également en parallèle des protéines de la réparation, et d'activation des points de contrôle : c'est le cas du complexe « BTR », composé de l'hélicase BLM, de la topoisomérase 3a et de RMI1/2, qui vont permettre l'activation de la cascade de signalisation ATR-CHK1. Les facteurs BRCA1 et BRCA2 vont orienter la stabilisation de la fourche bloquée pour réguler le mécanisme de la RH. De même, la mono-ubiquitination ciblée de FancD2 favorise le recrutement d'ADN polymérases, requis pour l'activation de la synthèse translésionnelle, et de nucléases, nécessaires pour l'incision du pont inter-brin.

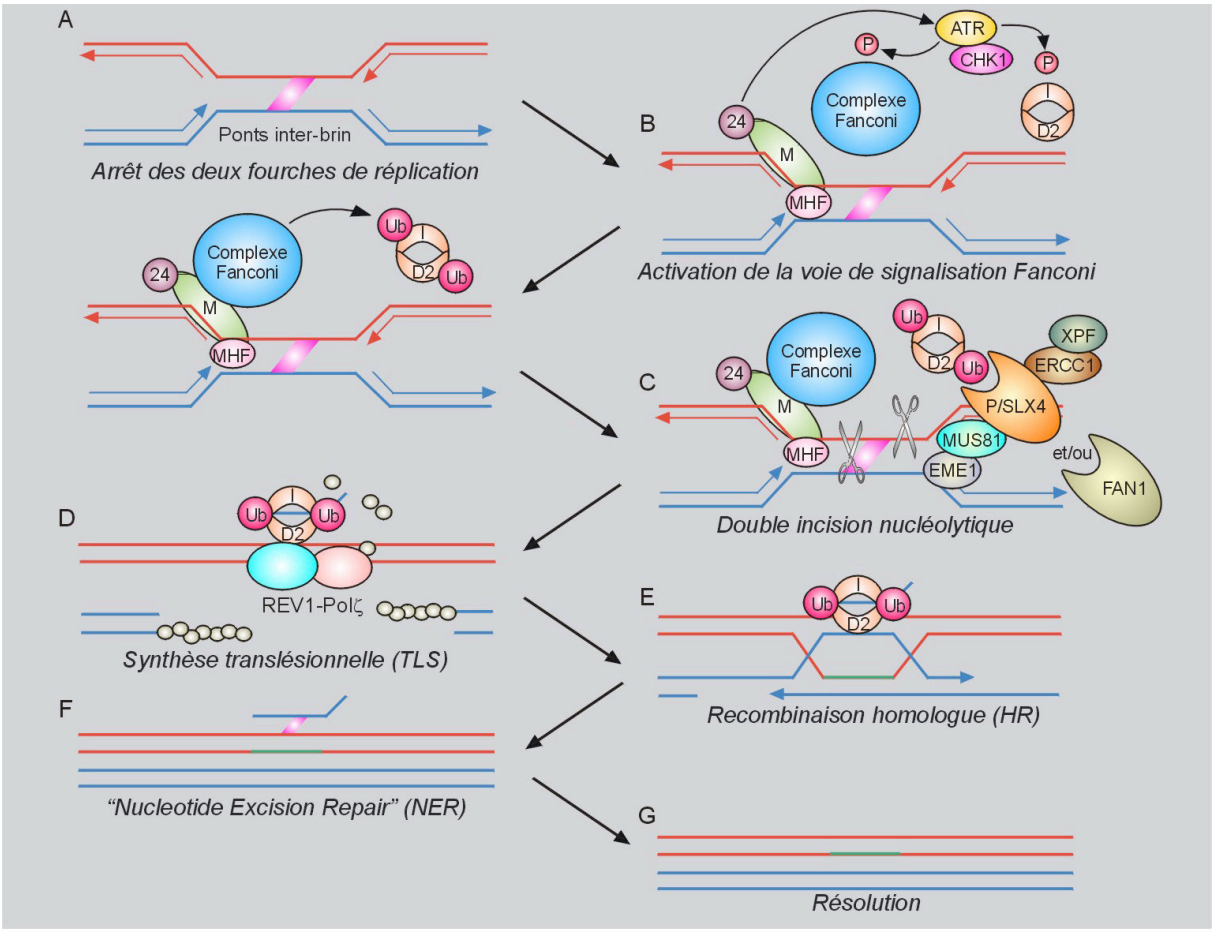



***Figure 11 :*** **Réparation des ponts interbrins de l'ADN lors de la phase S, après activation de la signalisation Fanconi.**

En phase S, les fourches bi-directionnelles convergent et sont bloquées topologiquement par la présence d'un lien covalent établi entre les 2 brins de l'ADN. La voie de signalisation Fanconi est activée suite à la reconnaissance du pont interbrin, au recrutement du complexe FA core au niveau de la région lésée, et à la mono-ubiquitination du dimère FancD2-FancI. Cette activation est initiatrice des étapes de réparation du pont. FancD2 mono-ubiquitinée est une plateforme de recrutement de nucléases, pour la coordination de la double incision nucléolytique dans la région flanquante au pont. Cette incision est assurée par les dimères de nucléases ERCC1 – XPF (ERCC4) et MUS81 – EME1 qui intéragissent avec la nucléase SLX4 (FancP), ainsi que la Flap endonucléase FAN1. Une cassure double brin de l'ADN est ainsi générée. L'étape de synthèse translésionnelle permet de passer outre cette rupture de continuité du double brin de l'ADN, sous l'action d'ADN polymérases telles que REV1 et Pol ζ. Les mécanismes de recombinaison homologue médient l'invasion du simple brin protégé par Rad51 pour la recherche d'homologie, l'établissement d'une double jonction de Holliday et la résolution des intermédiaires de recombinaison. L'étape finale mobilise les mécanismes du NER, hydrolysant les nucléotides précédemment excisés. La réplication peut finalement de nouveau avoir lieu.

Néanmoins, cela s'accompagne par une baisse de la fidélité suite à l'action de la polymérase TLS. FAN1 a une activité flap-endonucléase et coupe l'ADN du côté 5' de la boucle de réplication. Outre cette endonucléase, il existe trois autres hétérodimères de nucléases MUS81 / EME1 (3' Flap), XPF-ERCC4 / ERCC1 (5' Flap) et SLX1 / SLX4 (endonucléase spécifique de structure), tous réquisitionnés suivant la phase du cycle cellulaire, et la structure à résoudre. Par ailleurs, FANCM recrute également le complexe déficient dans le cas du syndrome de Bloom (dit « BTR »), composé de la topoisomérase III alpha, des RMI1-2 (« *RecQ-Mediated genome Instability* ») ***(Meetei et al., 2003)***. L'ensemble de ces événements fait partie de l'étape de signalisation du dommage du pont inter-brin. Le dernier stade est l'activation des points de contrôle et en parallèle la focalisation des protéines de la réparation. La cascade RPA – ATR – Chk1 est fonctionnelle et la recombinaison homologue avec la coopération du complexe BRCA1 et BRCA2 va permettre de gérer cette fourche interrompue et de redonner à l'ADN une organisation de sa double hélice classique et stable.

### e) Autres systèmes de prise en charge des lésions de l'ADN

Parmi les autres systèmes de réparation, on peut citer les mécanismes qui permettent de prendre en charge des lésions simple brin (« *Single Strand Break Repair* », SSBR). Suivant le contexte cellulaire, ces lésions sont résolues par le système le plus approprié parmi les trois processus suivants, tous basés sur l'excision : la réparation de mésappariements (« *Mismatch Repair* » dite MMR) ***(Edelbrock et al., 2013)***, la réparation par excision de nucléotide (« *Nucleotide Exchange Repair* » dite NER – composé de deux sous-sytèmes distincts, le GGR ou « *Global Genome Repair* » et le TCR dit « *Transcription Coupled Repair* ») (***Sertic et al., 2012)***, et la réparation par excision de base (« *Base Exchange Repair* » dite BER) ***(Wilson and Bohr, 2007)***. Les travaux au cours de la thèse n'ont pas porté sur des lésions de

ce type, de ce fait les protéines engagées dans ces voies de signalisation et le détail de leurs rôles n'est pas abordé dans cette introduction. On peut néanmoins préciser que la recombinaison entre les chromatides sœurs d'un chromosome, permet à la réplication de redémarrer lorsqu'une fourche s'est temporairement stoppée. Cela fait appel à un mécanisme semblable au BIR (« *Break Induced Replication* ») ***(Llorente et al., 2008)***. Le redémarrage d'une fourche évite ainsi la survenue de signaux d'instabilité génomique.

Pour conclure, de très nombreux facteurs cités dans cette section, et donc engagés dans le DDR global, se retrouvent en fait à l'interface avec d'autres processus clés, essentiels pour la survie de la cellule. C'est le cas de la dynamique des « 3R » - avec la réplication, la recombinaison et la réparation - ou bien encore la transcription, tous étroitement liés, et qui sont grandement influencés et régulés dans les zones qui ont subit des lésions de l'ADN.

### B. Les télomères

Les télomères sont des terminaisons spécialisées, situées à l'extrêmité des chromosomes linéaires chez les eucaryotes. Ils sont ainsi impliqués dans un éventail de fonctions très larges, car participant au devenir cellulaire, à l'organisation chromatinienne et à la protection des terminaisons chromosomiques (structure de type ADN-protéines), pour éviter des fusions entre télomères et la dégradation par des enzymes les ciblant *(Blackburn, 1994) (Zakian, 1995)*. Ceux-ci sont formés de répétitions non codantes de motifs de six paires de base TTAGGG chez les mammifères. L'homéostasie télomérique est un processus clé pour que ces régions soient conservées au cours de la vie cellulaire. Ils adoptent de ce fait une conformation particulière, spécifique des terminaisons chromosomiques, alors que des protéines associées assurent également par leur fixation, la protection des deux brins télomériques *(de Lange, 2005)*. D'autres structures secondaires stables et complexes situées aux télomères font obstacle à la machinerie de réplication. A cause des difficultés de réplication de ces régions, il y a un raccourcissement progressif de la taille des télomères au fil des divisions cellulaires. Pour contrer ce phénomène d'attrition télomérique, un complexe unique ajoute des séquences télomériques. L'ensemble de ces phénomènes contribue au maintien de la longueur des télomères, à la stabilité de ces régions ainsi que du génome, et enfin à la capacité proliférative des cellules *(Greider, 1996)*. Dans le cas de dysfonctions télomériques, les terminaisons sont reconnues comme des cassures double brin, car la répression habituelle de la signalisation des dommages de l'ADN n'est plus opérationnelle. Les aberrations spécifiques aux télomères sont ainsi sources de diverses formes pathologiques chez l'homme.

## 1. Organisation des régions télomériques

### a) Découverte et généralités

L'identification des régions situées à l'extrêmité des chromosomes linéaires chez les eucaryotes, a eu lieu en 1931 par Hermann Muller (*Comm Woods Hole 1938*) et Barbara McClintock *(McClintock, 1941)*. En 1965, Hayflick découvre qu'il existe une capacité de division des cellules humaines en culture d'environ 50 fois, avant qu'elles n'entrent en état de sénescence. Cette observation correspond à la « limite de Hayflick » et met en exergue la capacité proliférative limitée des cellules somatiques différenciées *(Hayflick, 1965)*. En 1971, Alekseï Olovnikov, émet pour la première fois l'hypothèse qu'il existe une corrélation entre cette capacité proliférative limitée des cellules et la perte progressive de séquences télomériques. Par la suite, des études chez *Tetrahymena* et la levure ont démontré que l'extrêmité des chromosomes est constituée de répétitions d'hexanucléotides formant l'unité télomérique *(Blackburn et al., 1978) (Ya et al., 1979) (Szostak et al., Cell 1982) (Blackburn et al., 1984)*. Chez les vertébrés, les motifs TTAGGG (*Moyzis et al., 1988) (Cross et al., 1989*) et sa séquence complémentaire CCCTAA forment des structures répétitives (*Blackburn et al., 1991*) mesurant chez l'homme de 5 à 15 kb suivant l'âge des individus. Il est à noter qu'il existe néanmoins une très forte hétérogénéité entre cellules, entre chromosomes d'un même individu, et entre différentes populations (*Lansdorp et al., 1996 – Londono-Vallejo et al., 2001*), ce qui sous-entend que la régulation de la taille des télomères est en partie contrôlée génétiquement (*Graakjaer et al., 2006*). Au cours de chaque division cellulaire, les télomères sont sujets à un phénomène d'érosion jusqu'à atteindre une taille critique déclenchant l'entrée en sénescence de la cellule ou la mort cellulaire (***Figure 12***). La sénescence permet l'inhibition de la génération de cellules dites « immortalisées » aux capacités prolifératives illimitées du fait du maintien des télomères à une taille fonctionnelle. De ce fait, le développement des tumeurs cancéreuses est lui aussi bloqué grâce à ces

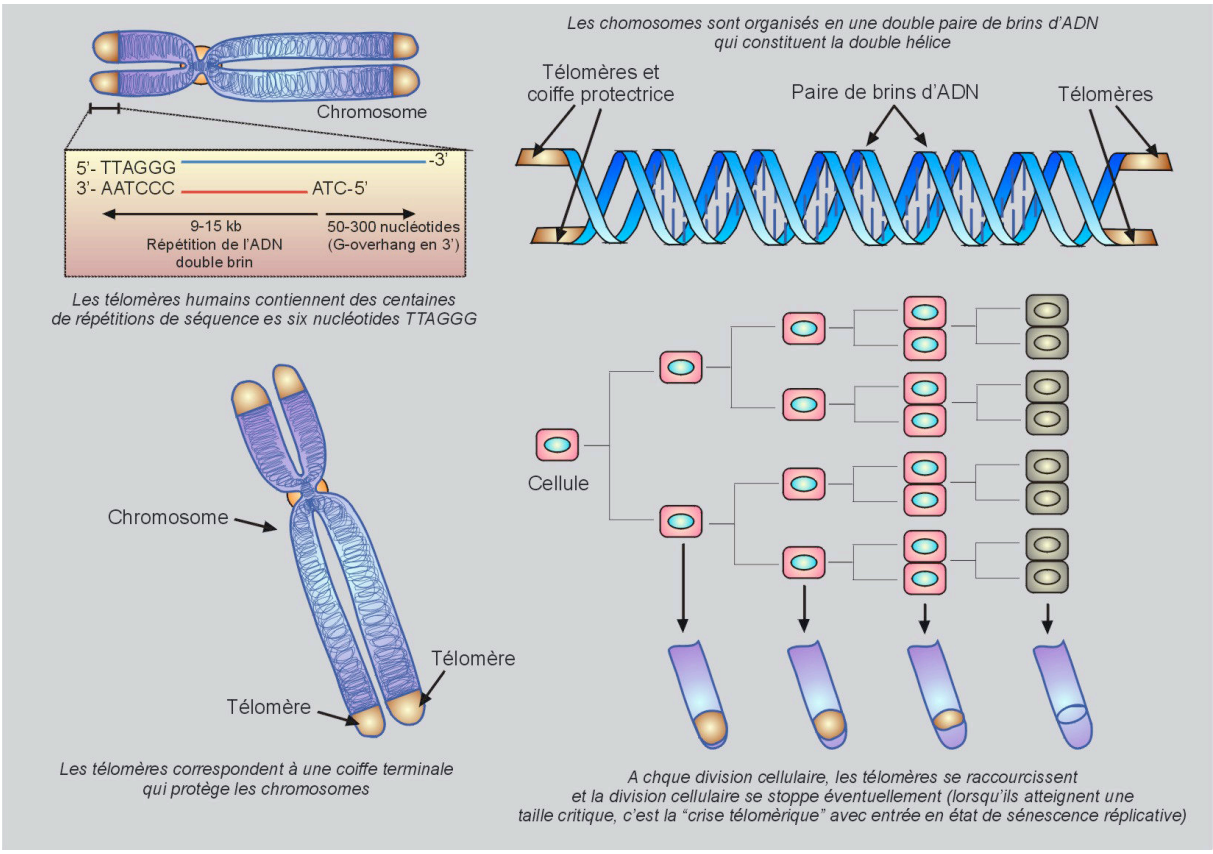



***Figure 12 :*** **Généralités sur les télomères des mammifères.**

Les chromosomes sont organisés en une paire de brins d'ADN qui constitue la double hélice. A l'extrêmité des chromosomes se situent des régions spécialisées, les télomères. Les télomères contiennent des centaines de répétitions de séquences des six nucléotides TTAGGG. Cette extrémité d'ADN peut être détectée en tant que cassure double brin et être la cible inappropriée d'enzymes nucléases ou de la machinerie de réparation de l'ADN. C'est pourquoi, les télomères sont composés d'une coiffe protectrice afin de garantir leur maintien et leur intégrité. A chaque division cellulaire, les télomères se raccourcissent et la division cellulaire se stoppe éventuellement lorsqu'ils atteignent une taille critique : c'est l'attrition télomérique ou état de « crise », entraînant l'entrée en sénescence réplicative.

véritables horloges biologiques, qui régissent le devenir des cellules : c'est la « théorie télomérique du viellissement ».

Grâce à leur structure particulière, les télomères ne sont pas l'objet d'un recrutement inapproprié de facteur de la réparation de l'ADN ou bien la cible d'enzymes pouvant contribuer à sa dégradation. Les télomères posent en l'état deux problèmes majeurs pour les cellules eucaryotes : la réplication des extrêmités couplée à l'élongation pour la conservation des régions, et la protection de ces régions. C'est pourquoi, l'organisation conformationnelle des télomères est complexe et très précise, et ce pour garantir son maintien et son état fonctionnel pour la cellule.

### b) Une extrémité particulière dite « G-overhang »

L'extrêmité du télomère est formée d'une extension simple brin 3' riche en G, qui s'étend sur 50 à 500 nucléotides *(Chai et al., 2005b)*. Elle constitue une protrusion en « G-overhang » *(Makarov et al., 1997) (Wright et al., 1997)* ***(Figure 13 a)***. Cette queue libre riche en G serait le résultat d'une résection exonucléasique du brin riche en C de 5' vers 3', durant la réplication. Apollo / SNM1B (DCLRE1B), qui possède une activité exonucléase 5' vers 3', contribue à la formation de ce G-overhang *(Wu et al., 2010)* et à la protection du brin meneur de la réplication *(Lam et al., 2010)*, et agirait en collaboration avec le complexe MRN *(Chai et al., 2006)*. Le maintien de ce G-overhang est indispensable à la bonne protection des télomères, à savoir le repliement, et l'accessibilité des différents acteurs de l'homéostasie télomérique, ainsi qu'à l'action de la télomérase.

### c) La structure en « T-Loop »

Le G-overhang peut être séquestré au sein d'une structure très particulière, ce qui permet de masquer cette extrêmité. Il a été montré que les télomères pouvaient se conformer de façon semblable à un lasso, appelée la boucle T, en se repliant sur eux-même pour maintenir leur intégrité *(Griffith et al., 1999)*. Schématiquement, le G-overhang en 3' envahit le duplex télomérique, ce qui constitue au niveau du site du brin d'invasion une seconde boucle de type D (« *displacement* », par déplacement). Cette dernière possède donc une portion « triple brin » maintenue par deux jonctions de Holliday de part et d'autre, ce qui la rend particulièrement stable (***Figure 13 a***). Malgré tout, cette boucle T peut subir des phénomènes d'excision, notamment lors de la résolution des jonctions de Holliday par les résolvases *(Wang et al., 2004)* ce qui génère des cercles T extra-chromosomiques *(Compton et al., 2007)*.

### b) La conformation en ADN « G-quadruplex »

Du fait de son contenu répété riche en G et C, l'ADN télomérique est capable de se conformer en structures secondaires dont l'unité de base est le G-quartet, dans lequel quatre résidus guanosines sont donneurs et accepteurs au sein d'une liaison hydrogène entre paire G-G . Ceux-ci sont capables de s'empiler pour constituer le « G-quadruplex » (***Figure 13 b***). Ces structures très particulières font obstacle à la progression des fourches de réplication *(Tang et al., 2008)* car elles sont difficiles à résoudre par les enzymes hélicases telles que WRN *(Crabbe et al., 2004)*, BLM *(Sfeir et al., 2009)*, RTEL1 *(Vannier et al., 2012)*, PIF1 *(Paeschke et al., 2013)*, ChIR1, DNA2 (*Lin W, EMBO J 2013*) ou encore celles de la famille RecQ *(Ghosh et al., 2012)*. Les quadruplexes situés aux télomères semblent également perturber l'élongation assurée par TERT / TERC *(Zahler et al., 1991) (Wang et al., 2011)*.

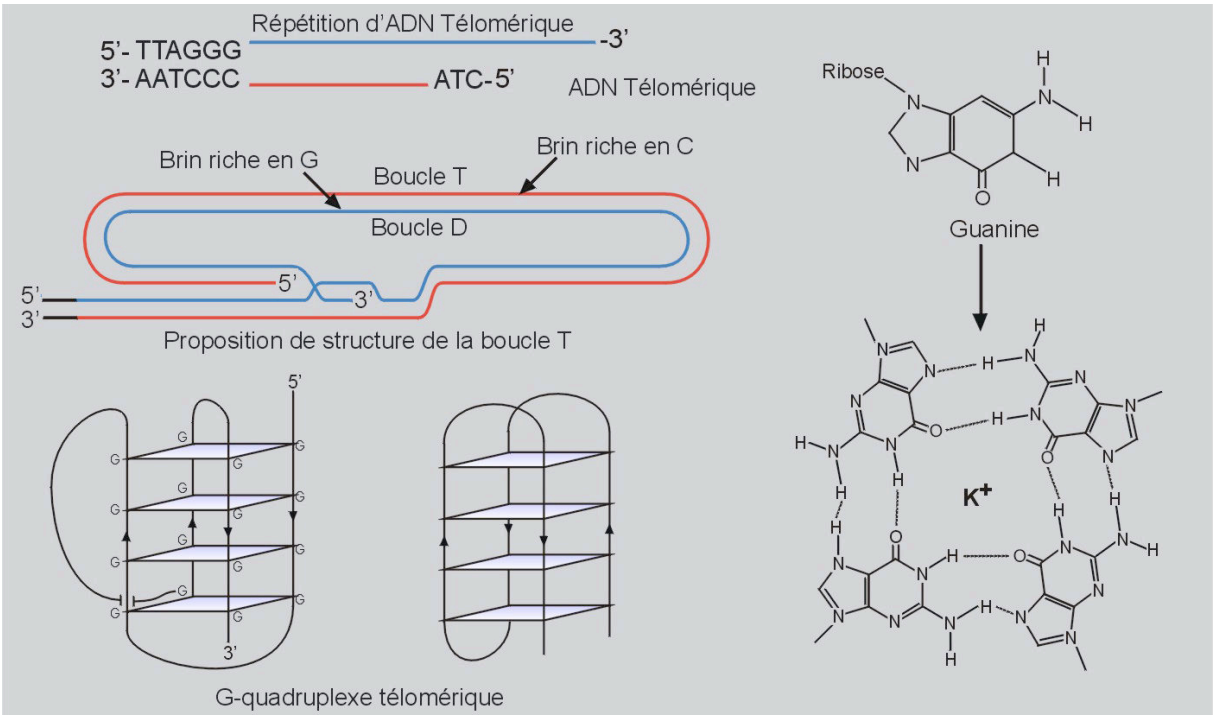



***Figure 13 :*** **Structure et organisation conformationnelle des télomères humains.**

**a/** Représentation linéaire des télomères, composés de répétitions de bases de 4 à 15 kb. Le brin riche en G s'étend en 3' par un surplomb simple brin long de 50 à 500 nucléotides, correspondant au « G-overhang ». Les télomères peuvent adopter une conformation semblable à un lassot pour protéger ce G-overhang, par repliement au sein d'une « boucle T ». Le G-overhang envahit le duplex télomérique pour constituer au niveau du site d'invasion, une portion triple brin dite « boucle D ».

**b/** Représentation de l'assemblage des guanines entre elles, formant une structure télomérique en « G-quadruplex », dû à l'empilement de l'unité de base, le G-quartet.

### c) Organisation chromatinienne des régions télomériques

La lien qui existe entre la régulation de la taille des télomères et le « statut épigénétique » des télomères est crucial *(Blasco, 2007)*. Ainsi les modifications chromatiniennes aux télomères sont constantes. La chromatine télomérique est organisée autour de nucléosomes plus espacés *(Lejnine et al., 1995)*. Néanmoins, les répétitions (TTAGGG)n ont été montrées comme étant de mauvaises matrices pour l'assemblage en nucléosome, la chromatine télomérique se distinguant des autres régions non-télomériques *(Tommerup et al., 1994)*. A l'état basal, l'hétérochromatine télomérique est enrichie de marques d'histone répressives par tri-méthylation (me3) de H3K9 et H4K20 *(Garcia-Cao et al., 2004) (Gonzalo et al., 2006)*, et de façon concomitante enrichie de marques activatrices, telle que l'acétylation des histones H3 et H4 *(Benetti et al., 2007)*. Elles dépendent directement de la longueur télomérique, puisque leurs niveaux baissent simultanément en cas de raccourcissement *(Marion and Blasco) (Varela et al., 2011)*. Les télomères sont en fait enrichis en marques épigénétiques régulatrices *(Blasco, 2007)*, qui sont caractéristiques de l'hétérochromatine *(McCord and Broccoli, 2008)*, comme par exemple HP1 (« *Heterochromatin Protein 1* »). Les paralogues de la famille HP1 (isoformes α, β et γ chez les mammifères), sont un groupe de protéines non-histone qui jouent un rôle dans l'organisation hétérochromatinienne *(Nielsen et al., 2001)* et dans l'activation de la transcription des régions super-enroulées. Elles sont aussi indispensables à la résection de l'ADN à proximité des sites de cassures de l'ADN et au cours de la réparation par homologie, en particulier, dans les fonctions de réparation directe par le HDR (« *Homology Directed Repair* »), à savoir via la RH ou le SSA *(Soria and Almouzni, 2013)*. Enfin, HP1 intervient dans la stabilité des télomères *(Canudas et al., 2011)*. L'élongation de la longueur télomérique, s'accompagne d'une augmentation simultanée de la tri-méthylation de l'histone H3K9 télomérique, et de l'HP1 résiduelle *(Arnoult et al., 2012)*. Certaines méthyltransférases (de l'ADN ou d'histone), sont ainsi capables de modifier la

chromatine télomérique, influençant par la même occasion la régulation de la taille des télomères *(Garcia-Cao et al., 2004) (Gonzalo et al., 2006)* et certaines des fonctions assurées par ces régions, comme la répression de la recombinaison *(Gonzalo et al., 2006) (Benetti et al., 2007)*. Des déacétylases d'histone comme SIRT6 contribuent à la maintenance du télomère *(Michishita et al., 2008) (Tennen et al., 2011)*. Enfin, la télomérase est aussi capable de moduler la chromatine via la voie Wnt *(Park et al., 2009)*.

Dans le cas de télomères dysfonctionnels, la structure chromatinienne est modifiée. L'histone H2A.X est ainsi phosphorylée, et le niveau de l'histone H4K20me2 est au-dessus de la situation normale, ce qui est semblable à la situation des régions d'ADN ayant subi des cassures *(O'Sullivan and Karlseder, 2010)*.

## 2. Le complexe télomérase

Au cours des divisions cellulaires dans les fibroblastes primaires humains, le raccourcissement des télomères est inéluctable *(Harley et al., 1990)*. Découverte il y a plus de 25 ans chez *Tetrahymena* *(Greider and Blackburn, 1985)*, l'enzyme ribonucléoprotéique télomérase contre le processus de raccourcissement en synthétisant *(Morin, 1989)* et en liant de nouvelles séquences d'ADN télomérique, en utilisant le 3'OH du G-overhang comme substrat. De nombreuses protéines impliquées aux télomères sont capables de réguler son action *(Smogorzewska and de Lange, 2004)*. La limitation de la prolifération dans les cellules somatiques permet de prévenir le développement de tumeurs benignes et malignes, du fait de la réduction de taille progressive des télomères. En effet, la présence de télomères trop courts oriente la cellule vers un état de sénescence réplicative permettant de stopper sa division *(Karlseder et al., 2002)*. La sénescence réplicative est un mécanisme qui limite le nombre potentiel de doublement de population, ce qui représente un mécanisme suppresseur de

tumeur *(de Lange and Jacks, 1999)*. En effet, selon la limite de Hayflick, les cellules dérivées de tissus embryonnaires ne sont capables de se diviser qu'une cinquantaine de fois environ. Les cellules qui continuent malgré cette limite à se diviser, perdent leur protection télomérique et entre dans un stade appelé « crise ». Lorsque les télomères atteignent une taille dite « critique », ils ne sont dès lors plus protégés par le complexe Shelterin (un complexe protéique dédié à la conformation et à la protection des télomères, voir ci-après), et deviennent cibles de la machinerie de réparation de l'ADN *(de Lange, 2002)*. Les fonctions de protection habituelle des télomères sont alors abolies et la cellule devient particulièrement sujette à des manifestations d'instabilité chromosomique massive : il est ainsi courant d'observer des fusions télomériques, qui ne sont pas réparables par la cellule somatique, ce qui force l'engagement vers une mort cellulaire programmée ou vers un processus de BFB (« *Breakage Fusion Bridge cycle* ») responsable de remaniements génétiques et de transformation cellulaire (*Murnane, 2006)*. Dans certains cas, la télomérase peut être réexprimée et permettre l'immortalisation cellulaire, mécanisme impliqué dans les cancers. Ainsi environ 85% des cellules cancéreuses expriment de façon aberrante la télomérase. Au contraire dans les cellules souches, les cellules germinales, les lignées de progéniteurs cellulaires, les cellules T et les cellules B activées, la perte de taille des télomères est contrée par l'activité normale de la télomérase.

### a) La sous-unité catalytique

Le complexe télomérase est constitué d'une sous-unité catalytique (« *Human TElomerase Reverse Transcriptase* », hTERT) de 127 kilos-Dalton (kDa). Elle contient des motifs catalytiques conservés de transcriptase réverse *(Lingner et al., 1997) (Nakamura et al., 1997)*. La réplication de l'ADN étant semi-conservative, l'activité de la télomérase est

essentielle pour assurer le maintien de la taille des télomères. Les héxanucléotides sont ajoutés à la suite du brin 3' riche en G issue de la réplication du brin retard (dit « lagging strand »). La régulation de l'expression de hTERT confère la spécificité cellulaire de l'activité télomérase.

### b) La sous-unité de matrice ARN

La seconde sous-unité du complexe télomérase est une matrice ARN (« *Human Telomerase RNA component* » dite hTERC ou hTR), qui fournit la matrice nucléotidique pour la synthèse de ces répétitions. Associée à hTERC, la dyskérine est une pseudo-uridine synthétase ***(Heiss et al., 1998)***, appartenant à la famille des ribonucléoprotéines (RNP) à boîte H / ACA. La sous-unité hTERC possède aussi un motif du type H / ACA ***(Mitchell et al., 1999)***. La dyskérine fait partie intégrante du complexe télomérase ***(Cohen et al., 2007)*** et permet la stabilisation de hTERC. Certains facteurs contribuent à la processivité de la télomérase puisque hTERC s'associe avec le domaine de liaison ARN porté par les protéines NHP2, NOP10 (« *Nucleolar Protein 10* ») et GAR1. Cette interaction trimérique renforce la stabilité de hTERC et favorise l'action du complexe télomérase. Le complexe dit « H / ACA RNP » est donc composé d'une molécule ARN, et des quatre protéines conservées : la dyskérine, GAR1, NHP2 et NOP10 (***Figure 14***). Des études ont démontré l'intervention de ce complexe dans la maintenance télomérique, mais également dans l'épissage des ARN pré-messagers, et dans la biogenèse des ribosomes ***(Meier, 2006)***. Les 2 sous-unités de la télomérase forment un complexe, assemblé dans le noyau au sein des corps de Cajal. Puis, le facteur TCAB1 (« *Telomerase CAjal Body 1* ») facilite le trafic des composants de la télomérase vers les corps de Cajal, afin d'apporter l'holoenzyme assemblée directement aux télomères pour assurer sa fonction d'élongation ***(Venteicher et al., 2009)***. Les ATPases pontine RUVBL1 et

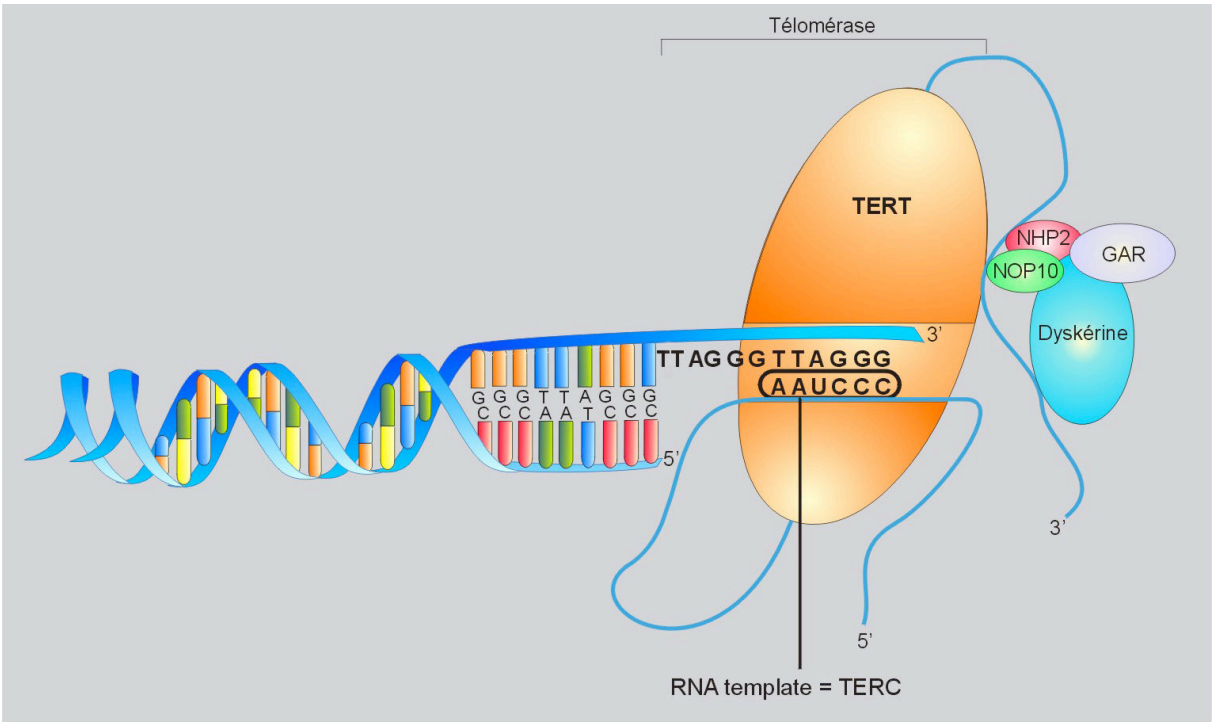



***Figure 14 :*** **Description du complexe télomérase.**

La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique organisé en une structure dimérique. La sous-unité catalytique correspondant à la transcriptase inverse hTERT, est associée à la sous-unité matrice ARN hTERC : l'holo-enzyme activée permet l'ajout des motifs télomériques pour contrer le raccourcissement de ces régions terminales chromosomiques. Un certain nombre de facteurs accessoires permet la régulation et l'efficacité optimale du complexe télomérase : c'est le cas de la dyskérin (DKC1), GAR1, NHP2, NOP10.

la reptine RUVBL2 agissent en coopération pour favoriser l'assemblage de l'holoenzyme télomérase et permettre son activité *(Venteicher et al., 2008)*. Le complexe télomérase est finement régulé et agit essentiellement durant la phase S du cycle cellulaire *(Tomlinson et al., 2006)*. Au cours des dernières années, des travaux ont proposé puis démontré que la télomérase a d'autres rôles que celui limité au télomères : en particulier dans la réponse des dommages de l'ADN, dans le remodelage de la chromatine après dommages *(Masutomi et al., 2005) (Park et al., 2009)* ou bien encore dans la régulation de la transcription de cellules souches impliquées dans le développement folliculaire *(Sarin et al., 2005)*. La télomérase a un rôle dans la gestion du G-overhang, ce qui représente un élément de transition entre la protection télomérique et la nécessité de maintenir une taille viable des télomères *(Jacob et al., 2003)*. L'accessibilité et la régulation de la télomérase au niveau des régions terminales sont des éléments encore flous et en pleine exploration.

Les télomères, bien que non codants, sont actifs transcriptionnellement (comme l'hétérochromatine d'ailleurs), puisque des ARN télomériques avec la répétition UUAGGG sont générés : il s'agit des TERRA (« *TElomeric-Repeat containing RNA* ») *(Azzalin et al., 2007)*. Leur transcription médiée par l'ARN polymérase II, est initiée à partir des régions sous-télomériques qui précèdent les terminaisons chromosomiques (*Porro, MCB 2010*). Leur niveau de transcription est régulé au cours du cycle cellulaire, et la localisation des TERRA aux télomères est finement modulée par la machinerie des ARN non codants. Un facteur fait le pont entre l'ADN télomérique et la télomérase : il s'agit de hnRNPA1 (« *Heterogenous Nuclear RNP protein A* »), qui a en outre un rôle dans la biogenèse des transcrits ARN. Les TERRA d'une part, et hnRNPA1 avec POT1-RAP1 d'autre part, agissent en synergie afin de déplacer le facteur RPA déjà chargé sur le simple brin télomérique suite à la réplication de l'ADN, et aident à la maintenance et à la fonction des régions terminales *(Flynn et al., 2011) (Redon et al., 2010)*.

Dans de nombreuses progressions tumorales, la télomérase est réactivée dans des tissus où son expression est habituellement réprimée (ce qui est le cas de la majorité des cellules somatiques tumorales). Bien que tardive, cette réexpression est la clé de l'envahissement des tumeurs. La réactivation constitutionnelle de la télomérase dans les cellules tumorales facilite la division accélérée, tout en stabilisant le génome. Les cellules acquièrent alors une capacité infinie de prolifération propre à l'immortalisation (les télomères n'étant plus victimes du phénomène d'érosion), tout le contraire des cellules somatiques au temps de doublement limité ***(Artandi and DePinho, 2010)***. L'association entre une activité télomérase constitutive et le développement de cellules immortelles et cancéreuses a été démontré ***(Kim et al., 1994)***.

Une partie des cellules font néanmoins appel à un système alternatif de maintien de la taille des télomères, dénommé « *Alternative Lenghtening of Telomeres* » (dit ALT) ***(Bryan et al., 1997)***. Celui-ci est basé sur la recombinaison homologue entre extrêmités télomériques (l'une sert de matrice pour l'autre). Cela permet à la cellule d'échapper à l'attrition et à la sénescence qui peut découler de la forte prolifération tumorale. En réponse à l'activation de l'ALT, se met en place un remodelage important de la chromatine télomérique ***(Atkinson et al., 2005)***. Ce remodelage de l'architecture habituelle permettrait de maintenir le phénotype de l'ALT activé. L'induction du mécanisme de l'ALT semble être directement corrélé à la perte d'activité du facteur ATRX (protéine impliquée dans le remodelage chromatinien) ***(Bower et al., 2012)***.

### 3. Le complexe Shelterin

A cette architecture télomérique de haute complexité, s'ajoute une « coiffe protectrice » : elle est composée de plusieurs facteurs, qui agissent en synergie pour conserver l'intégrité des télomères. Le complexe Shelterin est ainsi formé de six facteurs que sont POT1, TIN2, TPP1,

TRF1, TRF2, et RAP1. Ils constituent le télosome *(Liu et al., 2004) (Palm and de Lange, 2008) (Xin et al., 2008)*, qui « coiffe » l'extrêmité chromosomique. Seuls TRF1 et TRF2 interagissent avec les séquences télomériques double brin alors que POT1 interagit avec le simple brin G-overhang. La stabilité des chromosomes et la viabilité des cellules dépendent étroitement de la bonne fixation du complexe Shelterin le long de chaque télomère *(de Lange, 2005)*. De plus, ce complexe est capable de réprimer les voies de signalisation de la RH, du c-NHEJ, et de l'a-EJ, d'inhiber les kinases ATM et ATR *(Denchi and de Lange, 2007)* (*Sfeir and de Lange, 2012)*, et donc tout type de réactions de réparation inaproppriées au niveau des télomères. Le complexe Shelterin permet également de bloquer la résection (par les enzymes exonucléases telles que Exo1, CtIP, ou BLM). Le télosome est donc une véritable plateforme qui interagit avec un certain nombre d'autres facteurs dans un but conjoint de maintenance et de protection. Le télosome participe également à la structuration en boucle des télomères ainsi qu'à l'activité et le recrutement de la télomérase aux télomères (***Figure 15***).

### a) TRF1

TRF1 (« *Telomere Repeat binding Factor 1* ») a été la 1ère protéine d'attachement au double brin télomérique à être identifiée *(Zhong et al., 1992)*. Il possède d'une part dans sa partie N-terminale un domaine TRFH, et d'autre part dans sa partie C-terminale un domaine SANT / Myb pour l'interaction avec le double brin télomérique. TRF1 est un suppresseur de l'élongation des télomères et est donc impliqué dans les mécanismes qui stabilisent la longueur *(van Steensel and de Lange, 1997)*. TRF1 est également requis dans la prévention des problèmes de réplication aux télomères. Cette shelterin est cruciale dans l'efficacité de duplication du brin télomérique, puisqu'elle empêche le blocage des fourches. En son absence, la voie de la kinase ATR est activée car phosphorylée en phase S, et un phénotype de

fragilité télomérique s'installe *(Sfeir et al., 2009)*. Son rôle ultime serait le recrutement d'hélicase de l'ADN, incluant RTEL1, BLM, et d'autres hélicases de la famille RecQ ou apparentée, capables de résoudre les structures pour la progression des fourches de réplication *(Vannier et al., 2012)*.

### b) TRF2

TRF2 (« *Telomere Repeat binding Factor 2* ») possède aussi un domaine TFRH caractéristique *(Chen et al., 2008)* qui permet son homo-dimérisation. Ensemble, TRF1 et TRF2 sont en mesure de se lier avec le duplex télomérique *(Bianchi et al., 1997) (Bilaud et al., 1997) (Broccoli et al., 1997)*. TRF2 est un régulateur de la longueur télomérique *(Smogorzewska et al., 2000)*, mais a avant tout un rôle protecteur *(Houghtaling et al., 2004)*. TRF2 favorise l'assemblage de la boucle T en se fixant à proximité du G-overhang *(Stansel et al., 2001)*, et TRF2 contribue à la stabilité et la protection des jonctions de Holliday nouvellement formées *(Poulet et al., 2009)*. TRF2 inhibe la dégradation du G-overhang, et est le répresseur principal de la signalisation ATM qui médie le NHEJ *(Celli and de Lange, 2005)*. TRF2 protège les télomères des fusions terminales par une réparation inappropriée *(van Steensel et al., 1998)*. Sans cette inhibition assurée par TRF2, les télomères sont reconnus comme des cassures double brin, ce qui contribue à l'accumulation des facteurs de réparation de l'ADN comme 53BP1 et gH2A.X, et à l'activation de la kinase ATM *(Celli and de Lange, 2005)*, puis à la fusion des télomères par un mécanisme dépendant du NHEJ. TRF2 a une capacité de recrutement et d'interaction avec bon nombre de facteurs externes aux Shelterin, à savoir Apollo *(Chen et al., 2008)*, ERCC1/XPF *(Zhu et al., 2003)*, Ku70 *(Song et al., 2000)*, les hélicases BLM et WRN *(Opresko et al., 2002)*, la polymerase béta et

l'endonucléase FEN1 *(Muftuoglu et al., 2006)*, ou bien encore CHK2 *(Buscemi et al., 2009)* et SLX4 *(Wilson et al., 2013)*.

### c) RAP1

RAP1 (« *Repressor and Activator Protein 1* ») est très conservé parmi les orthologues, et possède plusieurs domaines distincts BRCT, RCT et Myb. Son partenaire est TRF2, qui lui permet d'être recruté aux télomères *(Li et al., 2000)*. RAP1 inhibe le NHEJ *(Bae and Baumann, 2007)*, ainsi que les processus de recombinaison homologue *(Sfeir et al., 2010)*. La présence de RAP1 dans le télosome permet donc d'inactiver la réponse aux dommages dépendant d'ATM et d'ATR.

### d) POT1

POT1 (« *Protection of Telomeres 1* ») possède un domaine conservé particulier de liaison oligonucléotide / oligosaccharide (dit « *OB fold* ») situé dans la partie N-terminale *(Baumann and Cech, 2001)*. Les deux protrusions en boucle forment ainsi un clamp pour l'attachement à l'ADN simple brin télomérique TTAGGGTTAG *(Lei et al., 2003)*, et un second clamp qui protège l'extrémité 3' sortante du G-overhang *(Lei et al., 2004)*. Il participe à la régulation négative de l'élongation par la télomérase *(Loayza and De Lange, 2003)*, ainsi que le contrôle de la résection du simple brin. POT1 protège également l'extrêmité chromosomique de la voie inappropriée de réponse aux dommages à l'ADN dépendante d'ATR, et une recombinaison homologue aberrante aux télomères : en cas de déficience *in vitro*, on relève une activation de ces processus *(Wu et al., 2006)*. POT1 rend impossible l'interaction de RPA aux régions

télomériques simple brin, qui est habituellement le facteur primordial se chargeant sur l'ADN simple brin.

### e) TPP1

TPP1 (« *TIN2-interacting protein* » ou PTOP) recrute POT1 ***(Ye et al., 2004)*** et interagit avec sa partie C-terminale et avec TIN2. TPP1 et POT1 s'hétéro-dimérisent par leur domaine OB fold, ce qui induit l'augmentation d'affinité de POT1 pour l'ADN télomérique simple brin ***(Liu et al., 2004)***. TPP1 est crucial pour l'interaction avec la télomérase et son recrutement aux télomères (***Wang et al., 2007) (Xin et al., 2007)*** puisque son absence dans les MEFs ou chez une souris déficiente, entraîne une diminution de taille des télomères et une baisse d'affinité de TERT aux télomères ***(Tejera et al., 2010)***. TPP1 se connecte avec le complexe CST (OBFC1 / Stn1), nécessaire pour la résection du brin sortant 3' ***(Chen et al., 2012)***. Enfin, outre son rôle de modulateur de l'élongation et du maintien des télomères, TPP1 réprime la signalisation des dommages de l'ADN médiée par ATR.

### f) TIN2

TIN2 (« Terf1-Interacting Nucler factor 2 ») permet de faire le pont par ses interactions directes simultanément avec TRF1 et TRF2 ***(Ye et al., 2004)*** grâce à une domaine TRFH et par son recrutement de l'hétéro-dimère TPP1 / POT1 ***(Ye et al., 2004) (O'Connor et al., S 2006) (Takai et al., 2011)***. TIN2 est un modulateur de la tankyrase PARP1 lors du contrôle de la longueur télomérique par TRF1 (***Ye et al., 2004***). TIN2 participe également à la régulation de la taille des télomères (***Kim et al., 1999***) et de la réplication télomérique via son interaction avec HP1a (***Canudas et al., 2011***).

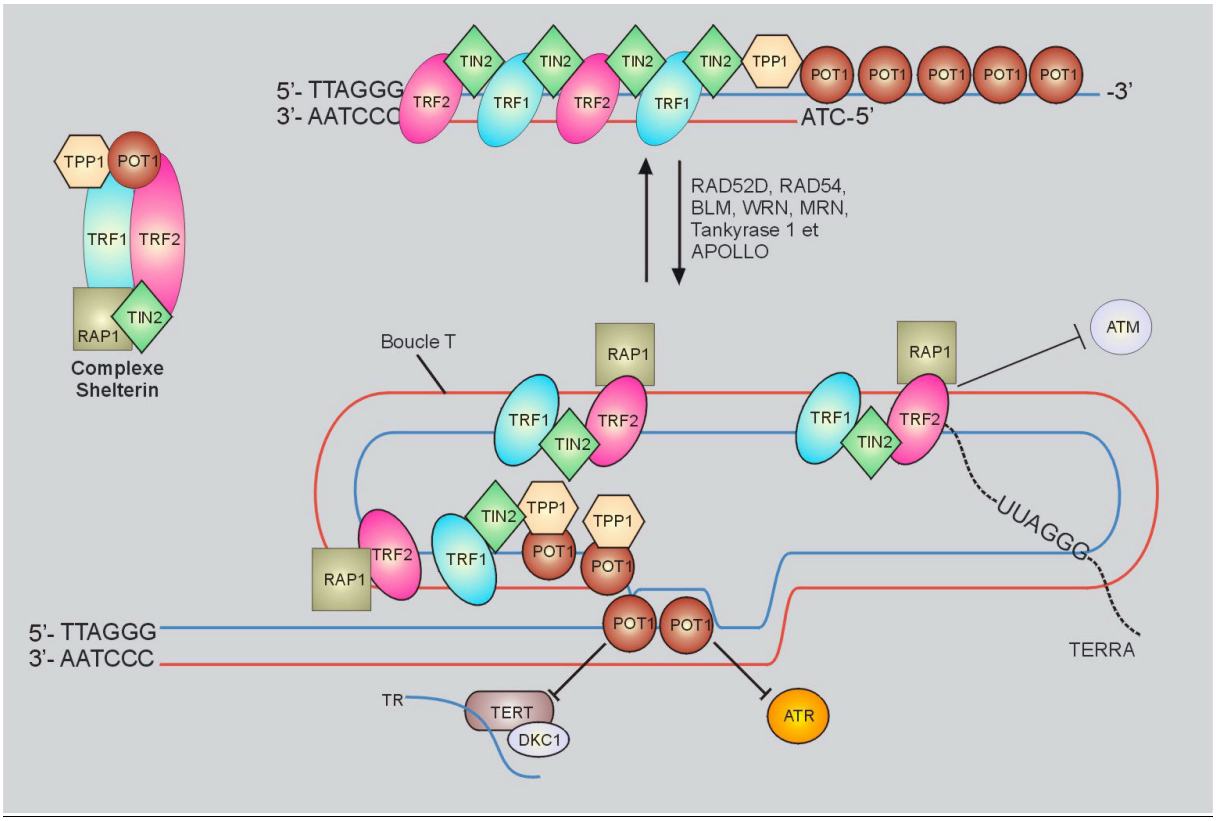



***Figure 15 :*** **Le complexe Shelterin, garant de la maintenance télomérique.**

Le complexe Shelterin ou « télosome » est composé de 6 facteurs télomériques dédiés à la protection et à la maintenance des télomères : il s'agit des facteurs TRF1, TRF2, POT1, TIN2, TPP1, RAP1. Les Shelterin sont organisés au niveau de la boucle T télomérique, TRF1 et TRF2 étant directement liés au duplex télomérique alors que POT1 est spécifiquement lié au G-overhang simple brin. Les télomères, bien que non-codants, sont actifs transcriptionnellement, et génèrent les TERRA, des ARN télomériques portant la répétition UUAGGG.

### 4. Autres facteurs interagissant / associées aux télomères

Un nombre croissant de facteurs a été démontré comme étant associées, souvent transitoirement, aux télomères, avec des rôles accessoires au complexe Shelterin ou télomérase *(Palm et al., 2008)*. L'exonucléase Apollo est impliquée dans la réparation des ponts inter-brins ainsi que dans la protection du brin avancé lors de la réplication *(Lenain et al., 2006) (Van Overbeek et al., 2006) (Bae et al., 2008) (Wu et al., 2010) (Touzot et al., 2010)*. D'autre part, le complexe trimérique CST *(Wellinger et al., 2009)*, composé de l'ADN polymérase α (dite primase), du facteur accessoire à la primase CTC1 (« *Conserved Telomere maintenance Component 1* »), et du sous-complexe STN1 (« *Suppressor of cdc Thirteen 1* ») / TEN1 (« *TElomeric pathways in association with STN1, Number 1* »), est retrouvé au niveau de près de 10 à 20% des télomères et participe au maintien des extrêmités *(Miyake et al., 2009) (Surovtseva et al., 2009)*. Bien que peu de choses soient connus sur le complexe CST, il a été suggéré que STN1 interagit avec TPP1, dans le but de réguler la taille des télomères en s'associant au G-overhang *(Wan et al., 2009) (Gilson et al., 2010)*. Bien que les télomères adoptent des structures dédiées à l'inactivation des voies de réparation de l'ADN, des études ont démontré que les composants des machineries de réparation (impliqués en particulier au niveau des cassures double brin) mais aussi de la recombinaison, de la réplication terminale ou encore du remodelage chromatinien font partie intégrante de la stabilité télomérique, et sont essentiels pour l'efficacité de fonctions des télomères. Les protéines de la famille Ku (Ku70 et Ku80) ont été démontrées *in vivo* en tant que composant des télomères *(Hsu et al., 1999)*. La DNA-PKcs (« *DNA-dependent Protein Kinase* ») possède une fonction dans la coiffe télomérique (*Gilley et al., 2001*). Le complexe MRN (dont Mre11) est associé avec TRF2 suivant la phase du cycle (*Zhu et al., 2000*). Parmi les ADP rybosylase, PARP1 est un régulateur de la taille des extrêmités (*Beneke et al., 2008*). Le complexe ERCC1 / XPF est une endonucléase interagissant avec TRF2. RIF1 et RIF2 sont capables d'interagir avec RAP1

(*Shi et al., 2013*). RAD51D, habituellement réquisitionné au cours de la réparation, a un rôle clé dans la protection des régions terminales (*Tarsounas et al., 2004*). Par ailleurs, on dénote deux tankyrases : TANK1 et TANK2 (qui sont des protéines PARP modificatrices ciblant TRF1) (*Kim et al., 2004*). Le gène Pinx1 agit en tant qu'inhibiteur de la télomérase (*Soohoo et al., 2011*). Enfin, on peut aussi citer l'importance de certaines topoisomérases réquisitionnée lors de la réplication, telle que la topoisomerase II (*Ye et al., 2010*).

## 5. La particularité de la réplication aux télomères

La réplication des parties terminales chromosomiques représente un problème majeur pour les cellules (*Gilson et al., 2007*). La réplication entière de la partie la plus distale du brin retardé (ou fragments d'Okazaki) à partir du brin parental (*Watson et al., 1972*) ne peut se faire, ce qui s'accompagne d'un raccourcissement télomérique, résultat d'un problème de réplication terminale et de processivité. En effet, les polymérases conventionnelles sont incapables de synthétiser l'extrêmité télomérique, du fait de la richesse en guanine, des répétitions de bases et des nombreuses barrières topologiques (boucle T, boucle D, double jonctions de Holliday et G-quadruplexes). De plus, il ne peut pas y avoir de fixation de la primase à la toute extrêmité. Une seule origine de réplication est présente dans les régions sous/sub-télomériques, ce qui signifie qu'une seule fourche est capable de progresser en direction de la fin des télomères : la réplication au niveau des télomères est donc unidirectionnelle *(Sfeir et al., 2009) (Suram et al., 2012*). Cela rend les arrêts de fourche par blocage ou effondrement particulièrement délétères, car aucune fourche convergente ne peut assurer la réplication de l'ADN situé en aval de la fourche bloquée. D'autre part, la structure quaternaire et le repliement très particulier des régions télomériques nécessitent l'action de facteurs spécialisés dans la résolution de ces structures et le dépliement pour obtenir un double brin linéaire (*De Lange et*

*al., 2009*). Ainsi, le brin riche en G, correspondant au brin retardé de la réplication, est dépendant d'une bonne efficacité de ces facteurs, car il tend à former ces structures secondaires. Plusieurs hélicases sont ainsi dévolues dans la résolution d'ADN-G4 comme BLM et RTEL1 (*Sfeir et al., 2009*), ainsi que dans le déroulement de la boucle D (et par conséquent de la boucle T) comme l'hélicase WRN qui assure la bonne réplication du brin retardé (*Crabbe et al., 2004) (Opresko et al., 2009*) (***Figure 16***). L'étape finale de la réplication des télomères est la reconstitution du surplomb du G-overhang, préliminaire à la réorganisation structurale et chromatinienne du télomère, pour l'efficacité d'élongation par la télomérase.

### 6. La réparation au niveau des régions télomériques

Le raccourcissement excessif des télomères ou bien la perte de l'efficacité de protection, engendrent des télomères dysfonctionnels. Ceux-ci activent les voies de réparation de l'ADN ce qui initie l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence ou l'apoptose (*d'Adda di Fagagna et al., 2004*). Ces processus d'élimination des cellules dysfonctionnelles permettent de ne pas faciliter l'émergence de cellules cancéreuses Mais, les télomères démasqués ou déprotégés sont sources plus globalement d'instabilité génomique (*O'Sullivan et al., 2010*). Près de six voies différentes finement régulées à savoir ATM, ATR, le c-NHEJ, l'a-EJ, la RH et la résection, peuvent être activées à tout moment si il y a des télomères dysfonctionnels (*Sfeir et al., 2012*) (***Figure 17***). Dans le cas d'une déprotection, les télomères peuvent être amenés à fusionner entre chromosomes via le NHEJ. L'attrition télomérique favorise également les problèmes de réplication terminale. L'ensemble de ces évènements peut être considérés comme les marqueurs de l'instabilité génomique, qui est l'un des résultats des problèmes aux télomères.

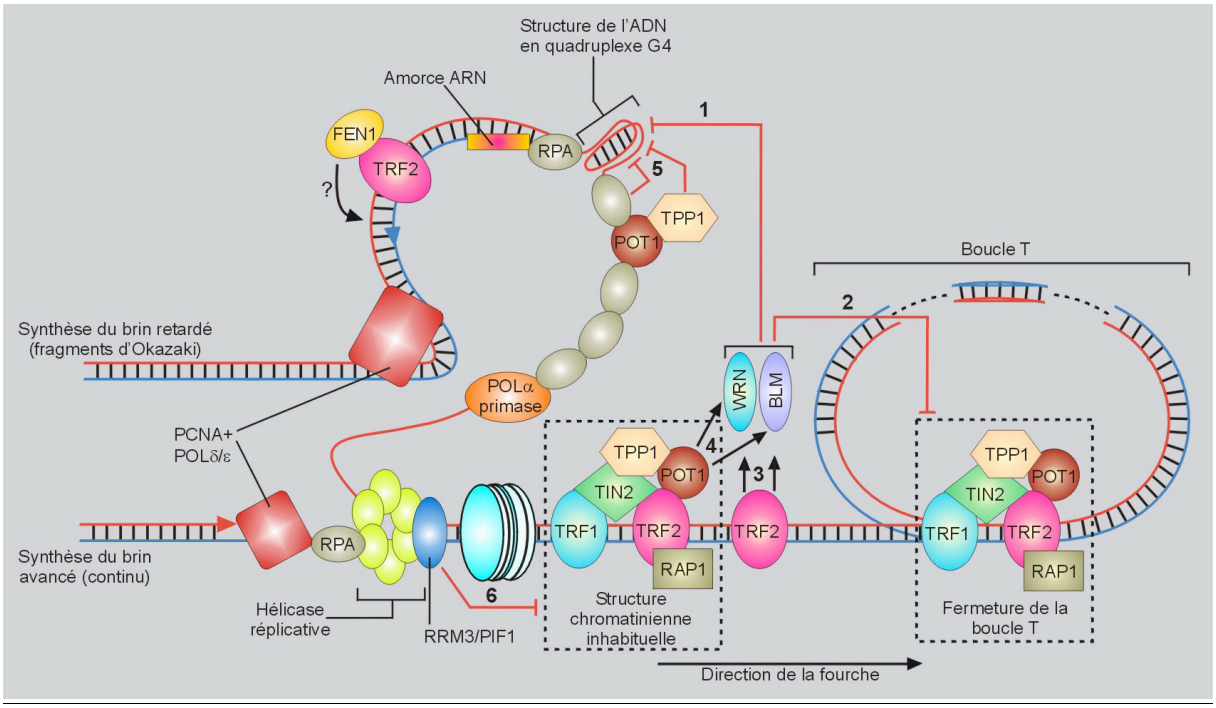



***Figure 16 :*** **La réplication terminale au niveau des télomères, dans les cellules de mammifères.**

C'est un mécanisme très particulier du fait de la conformation adoptée par les télomères (contenu riche en G, G-quadruplex, boucle T, boucle D, double jonction de Holliday, structure hétérochromatinienne). La progression de la fourche de réplication est donc rendue difficile. Les ADN hélicases ont une fonction importante pour rendre les télomères linéaires : les hélicases WRN, BLM et RTEL1 permettent la résolution et la dissociation des structures télomériques secondaires, pour un dépliement complet de la boucle T. TRF2 et POT1 sont directement engagés dans le recrutement de ces enzymes. RPA et POT1, spécifiquement attachés aux séquences télomériques simple brin, participent également à la résolution des G-quadruplexes.

TRF2 bloque la signalisation ATM (*Karlseder et al., 2004*) alors que POT1 régule négativement la signalisation ATR (*Churikov et al., 2006*). Les deux Shelterin agissent donc indépendamment et spécifiquement sur chacune des deux voies de signalisation dépendante d'ATM ou d'ATR (*Denchi et al., 2007*). Ces inhibitions empêchent la reconnaissance des télomères dysfonctionnels en tant qu'extrémité rompue, ce qui rend impossible la fusion des télomères par le NHEJ. Par ailleurs, TRF2 coopère avec RAP1 en tant que répresseur du c-NHEJ aux télomères (*Bae et al., 2007*). Les facteurs du dimère Ku peuvent également inhiber l'a-EJ et la réparation par homologie, dans les régions télomériques (*Sfeir et al., 2012*). MRN joue aussi un rôle important aux télomères déprotégés (*Deng et al., 2009*), ainsi que 53BP1 qui promeut le NHEJ aux télomères dysfonctionnels (*Dimitrova et al., 2008*). Enfin, récemment a été démontré l'importance de RIF1 aux télomères, notamment par sa capacité d'homéostasie télomérique (*Shi et al., 2013*).

Par ailleurs, la cascade de signalisation des télomères endommagés est similaire aux régions non-télomériques, dans la mesure où il y a présence notamment de foyers gH2A.X et 53BP1 aux télomères, cette co-localisation correspondant aux TIFs (« *Telomere dysfunction-Induced Focis* ») *(Takai et al., 2003)*. Cependant, des études récentes suggèrent que les activations générées par les télomères dysfonctionnels, seraient distinctes de la voie de réponse aux dommages de l'ADN *(Dimitrova et al., 2009) (Rai et al., 2010) (Cesare AJ, Mol Cell 2013)*.

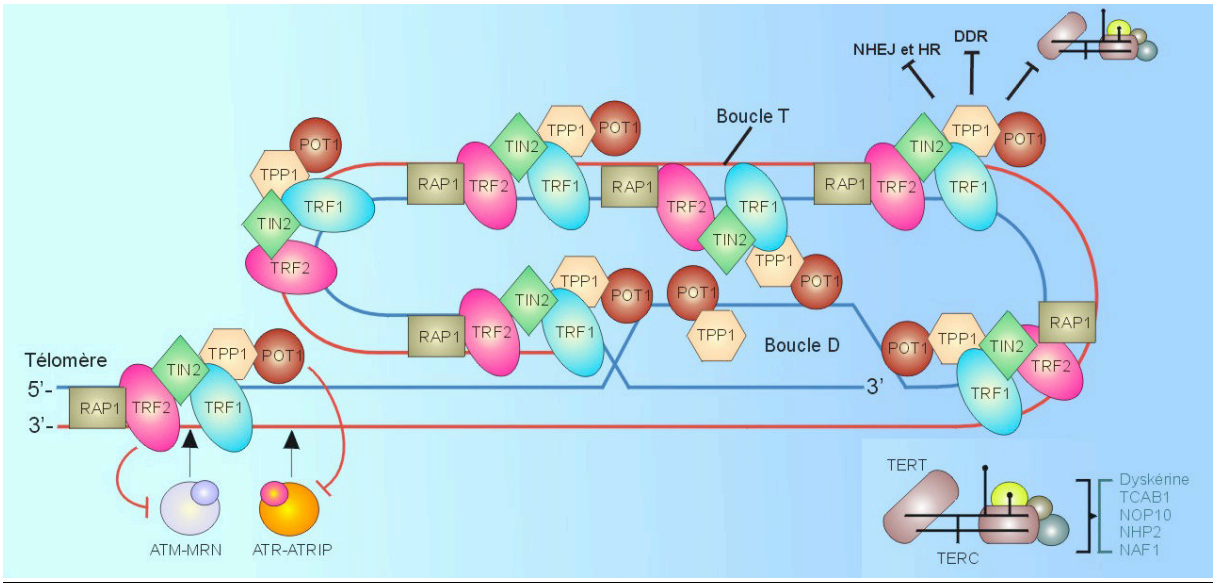



***Figure 17 :*** **Relation paradoxale entre les télomères et les voies de réparation de l'ADN.**

Les facteurs Shelterin impliqués dans la protection télomérique ont aussi un rôle clé dans l'inhibition des 2 grandes voies de réparation des cassures double brin, le NHEJ et la RH. TRF2 inhibe directement la kinase ATM, ce qui lui confère un rôle de répresseur du NHEJ. POT1 réprime la kinase ATR par sa fixation sur le simple brin 3', ce qui assure l'inactivation du NHEJ. Via la boucle T, le complexe MRN et le complexe Ku70 / Ku80 ne peuvent respectivement pas initier la RH et le NHEJ.

## II/ Immuno-déficiences humaines liées à des défauts de réparation de l'ADN

La détection, la signalisation, et la réparation des dommages de l'ADN sont des processus biologiques essentiels pour garantir la survie cellulaire, l'intégrité du matériel génétique, et l'homéostasie globale de l'organisme. Une mauvaise prise en charge des cassures double brin de l'ADN est extrêmement dommageable pour la cellule, la tumorigenèse pouvant en résulter (*Jeggo et al., 2007*). Plus globalement, les aberrations de réparation de l'ADN sont associées à des pathologies humaines fréquemment associées à des défauts immunologiques, développementaux, neurologiques, un appauvrissement en cellules souches, une infertilité. Ces maladies se caractérisent aussi souvent par un vieillissement accéléré, une instabilité génétique et la survenue de tumeurs cancéreuses malignes *(Callen et al., 2007) (Jackson et al., 2009) (McKinnon et al., 2009).*

### A. Dysfonction de réparation des ponts inter-brins : cas de l'anémie de Fanconi

L'anémie de Fanconi est une maladie à transmission autosomique récessive découverte il y a plus de 40 ans (*Fanconi et al., 1967*). C'est un syndrome marqué par une grande hétérogénéité phénotypique, qui induit une forte variabilité clinique. Cliniquement, les patients présentent une insuffisance médullaire progressive conduisant à une aplasie, des défauts développementaux (petite taille, nombreuses malformations congénitales, microcéphalie) ainsi qu'une prédisposition accrue au cancer élevée (*Rosenberg et al., 2003) (Alter et al., 2003*). Les cancers majoritairement rencontrés dans les anémies de Fanconi sont les leucémies myéloïdes aigües, les hémopathies malignes (*Butturini et al., 1994*), et les cancers squameux. L'anémie de Fanconi est également caractérisée par une sensibilité cellulaire accrue aux agents pontants, démontrant la fonction de cette voie dans la résolution des ponts inter-brins. Le tableau clinique est aussi associé à une hétérogénéité génétique.

Les mutations dans l'un des treize gènes du complexe (hormis SLX4 et Rad51C) conduisent à la pathologie de l'anémie de Fanconi. Des analyses cytogénétiques permettent d'aiguiller le diagnostic clinique, à partir de prélèvement sanguin, ou à partir du développement de lignées fibroblastiques issues de biopsies cutanées des individus. Le test de cassures chromosomiques induits par des agents pontants (comme le diépoxy-butadiène, dit « DEB », ou la MMC) est couramment utilisé pour diagnostiquer des FA. On recherche tout d'abord sur des étalements métaphasiques, la présence de cassures chromosomiques spontanées. Mais c'est surtout l'augmentation très nette de ces cassures après traitement à la MMC ou au DEB qui doit être relevée, ces agents étant considérés comme « cassants ». Les aberrations chromosomiques des patients Fanconi s'avèrent donc être très élevées suite à l'induction de ponts inter-brins qui ne sont pas correctement gérés par les cellules. En effet, il est courant de détecter des figures chromosomiques tri-radiales et tétra-radiales caractéristiques, dont l'apparition est secondaire aux cassures (***Auerbach et al., 1988***). Un chromosome radial correspond à la recombinaison aberrante entre bras de chromosomes non-homologues. Une déficience de la signalisation Fanconi se traduit donc directement par ce type de chromosome, dont la génération reste encore inconnue bien que cela fasse suite à une cassure double brin.

De plus, certaines études ont mis en évidence un phénomène très rare, puisque dans certains cas, le test de cassure apparaît normal dans le sang contrairement aux fibroblastes. Ceci peut être la conséquence d'une réversion génétique qui a lieu dans les cellules souches hématopoïétiques : il s'agit de « mosaïcisme somatique » (***Waisfisz et al., 1999***) ou bien de réversion phénotypique dont l'origine moléculaire n'a pas été clairement identifiée (***Lo Ten Foe et al., 1997***). D'autre part, les agents pontants entraînent une hyper-sensibilité accrue des cellules Fanconi, dûe à un défaut de survie. L'accumulation des cellules en phase G2 / M est aussi une caractéristique supplémentaire du phénotype cellulaire des patients (***Ceccaldi et al., 2011***). Cela traduit des anomalies du cycle cellulaire avec une non-réparation des lésions en

phase S, ce qui résulte en un blocage lors du point de contrôle G2 / M. Enfin pour tenter de cibler le défaut de la signalisation Fanconi, dans le core ou dans l'un des facteurs associés, le contrôle de la bonne ubiquitination de FancD2 (*Alpi et al., 2009*) par Western-Blot est réalisé dans des cellules soumises à des agents pontants. Cette approche peut aussi donner des informations sur les formes syndromiques de FA avec réversion génétique, ou bien avec atténuation (*Gregory et al., 2001*). Il a été récemment démontré que l'aplasie médullaire observée chez les patients FA était associée à une augmentation des dommages ADN dans les cellules souches hématopoïétiques et une activation de l'apoptose dépendante de p53 (*Ceccaldi et al., 2012*).

### B. Pathologies causées par des dysfonctions dans les mécanismes de réparation des dommages double brin

Des anomalies génétiques de facteurs clés de la réparation des cassures double brin, conduisent à des formes syndromiques avec une immuno-déficience et atteinte des cellules hématopoïétiques (outre l'anémie de Fanconi donc), des anomalies développementales et une instabilité génomique (*Kerzendofer et al., 2009*) : c'est le cas de l'Ataxie Télengiectasie, du syndrome de Bloom, du syndrome de Nijmegen, du syndrome Riddle, des déficits immunitaires combinés sévères (« *Severe Combined Immuno-Deficiency* » ou SCID).

L'Ataxie Télengiectasie (« *Ataxia-Telengiectasie* », dit A-T) est une maladie à transmission autosomique récessive, caractérisée par une neurodégénération progressive, un déficit immunitaire, une sensibilité aux radiations, une instabilité chromosomique et une propension à développer des cancers lymphoïdes (*Lavin et al., 1997*). Le facteur ATM est le gène causal de cette maladie avec des mutations bi-alléliques (*O'Driscoll et al., 2003*).

Le syndrome de Bloom est caractérisé par une instabilité génétique (dont un fort taux d'échange entre chromatides sœurs), par des anomalies de la peau, ainsi qu'une immunodéficience modérée et une forte prédisposition aux cancers (*Bloom et al., 1954*). C'est

l'hélicase de la famille RecQ, BLM, qui en est responsable par transmission autosomique récessive (*Ellis et al., 1995*).

Le syndrome de cassure de Nijmegen (« *Nijmegen Breakage Syndrome* » dit NBS) (*Veemaes CM, Acta Paediatr Scand*), est une maladie autosomique récessive dûe à des mutations dans le gène NBS1, composant du complexe trimérique MRN (*Carney et al., 1995*). Cette déficience génère de l'instabilité chromosomique, un déficit immunitaire, des anomalies développementales, une microcéphalie, une radio-sensibilité ainsi qu'une susceptibilité au cancer.

Le syndrome de Riddle (« *Radiosensitivity, Immunodeficiency, Dysmorphic features, and LEarning Difficulties* ») est causé par des mutations dans la protéine RNF168 (*Stewart et al., 2009*), causant une immunodéficience modérée et une radio-sensibilité, avec des caractéristiques dysmorphiques (*Stewart et al., 2007*).

D'autres désordres affectent directement des facteurs impliqués dans la voie du NHEJ. C'est le cas des mutations de l'ADN Ligase 4, associée à un syndrome avec immunodéficience, radiosensibilité, retard de développement et microcéphalie (*Buck et al., 2006) (O'Driscoll et al., 2001) (Riballo et al., 1999*). Des patients atteints de RS-SCID (« *RadioSensitivity-Severe Combined Immuno-Deficiency* ») dû à un défaut en Artemis (*Moshous et al., 2001*) présentent une recombinaison V(D)J altérée, une immuno-déficience, ainsi qu'une sensibilité accrue aux radiations, les lymphomes se développant dans les phases finales (seulement dans le cas de mutations hypomorphes) (*Moshous et al., 2003*). Une dysfonction de Cernunnos / XLF est à l'origine d'une forme de SCID marquée par une réduction de l'efficacité du NHEJ, une recombinaison V(D)J affectée, une hypersensibilité aux radiations ionisantes et une microcéphalie (*Buck et al., 2006*). Enfin, plus récemment une déficience en DNA-PK (*Van der Burgh et al., 2009*) a été décrite chez des patients RS-SCID (*Woodbine et al., 2013*).

### C. L'instabilité génomique à l'origine de la cancérogenèse

Les déficits dans les systèmes de réparation des cassures double brin, qui sont les plus toxiques pour une cellule, sont à l'origine de prédisposition aux cancers (***Figure 18***). En effet, cela conduit à une instabilité du génome et à des réarrangements chromosomiques qui sont deux caractéristiques des tumeurs cancéreuses. Le développement des cancers et des hémopathies malignes (dont les leucémies et les lymphomes) est donc très largement associé à des dysfonctionnements des voies de réparation des lésions de l'ADN. De plus, le système hématopoïétique qui subit ces dommages de l'ADN non réparés, voit son pool de cellules être progressivement déplété avec l'apoptose qui se met en place (*Nijnik et al., 2007*) comme c'est le cas des patients FA (*Ridet et al., 1997*). La prolifération constante et répétée du peu de cellules souches hématopoïétiques restantes, peut conduire à une sélection rapide de clones tumorigènes. Les transplantations allogéniques des cellules hématopoïétiques (HSCT) sont jusqu'à présent la seule thérapie curative pour les patients atteints de ce type de syndromes tels l'anémie de Fanconi ou des défauts en Artémis et en Cernunnos (*Gluckman et al., 1989) (van der Burg et al., 2006) (Faraci M et al., 2009*). Ces cellules pluripotentes induisant des progéniteurs hématopoïétiques fonctionnels, ce qui représente l'alternative thérapeutique actuellement (*MacMillan et al., 2011*). Enfin, la thérapie génique est en cours de développement pour des syndromes causés par des défauts en Artemis et facteurs de Fanconi, ce qui constitue une alternative prometteuse.

Paradoxalement, les facteurs de la réponse aux dommages de l'ADN constituent des cibles privilégiées dans l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques, et notamment pour le design de nouvelles molécules. Les cellules cancéreuses vont être spécifiquement affectées par une stratégie de létalité synthétique dans la mesure où les cellules oncogéniques prolifèrent dans un contexte de stress réplicatif et de hauts taux de ROS libérés (*Curtin et al., 2012) (Liu et al., 2013*). D'autres types d'inhibiteurs ciblant les facteurs de la réparation de

l'ADN, tels que les PARP, la DNA-PK, la famille des kinases PIKK, le complexe ERCC1 / XPF (*McNeil et al., 2012)* (*Bouwman et al., 2012*) ou bien encore les histones déacétylases (*Groselj et al., 2013) (Grant S et al., 2012*) sont utilisés en combinaison à la radiothérapie (induisant les cassures double brin) (*Kaliberov et al., 2012*). La télomérase est aussi une cible privilégiée des traitements anti-cancéreux, du fait de sa réactivation systématique dans les tissus tumoraux.

D'autre part, de nombreux agents exogènes, correspondant à des drogues génotoxiques, sont utilisés dans les stratégies de chimiothérapies anti-tumeurs. Les chimiothérapies basées sur l'utilisation d'adduits sont les formes les plus appliquées pour les traitements des cancers, bien que les radio-thérapies soient aussi très employées. De nouvelles stratégies apparaissent actuellement, et basées sur la régulation de l'expression de protéines impliquées dans la signalisation ou la réparation des dommages de l'ADN : elles reposent sur l'utilisation de microARNs, ce qui laisse entrevoir leur potentiel dans les thérapies anti-cancer (*Wang et al., 2013*).

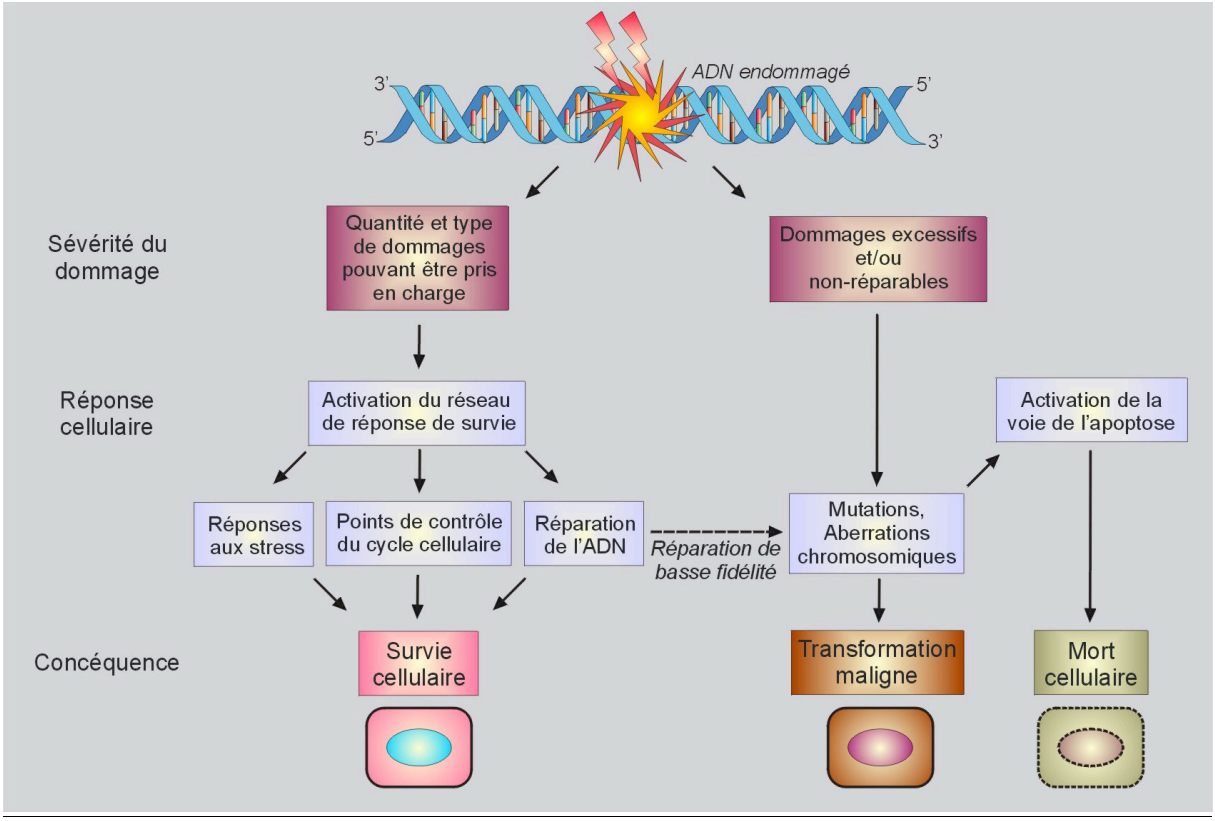



***Figure 18 :*** **L'instabilité génétique promeut le développement de cancers.**

Lorsque la quantité et le type de dommages de l'ADN peuvent être correctement pris en charge, la cellule survit suite à l'activation de la signalisation de réponse. Cette réponse inclue la détection, l'arrêt du cycle cellulaire et une bonne efficacité de réparation. En revanche, si le nombre et la gravité des dommages de l'ADN sont excessifs, ou bien si la réparation de l'ADN est peu efficace (du fait d'une dysfonction de systèmes de réparation), les conséquences pour la cellule sont drastiques. Les cellules peuvent s'orienter dans la voie apoptotique ou être victimes d'instabilité génomique (avec mutations et aberrations chromosomiques), ce qui conduit respectivement à la mort cellulaire ou à la transformation maligne.

## III / Pathologies associées à des dysfonctions télomériques

La maintenance des régions télomériques est cruciale chez l'homme. En effet, au cours des quinze dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence des déficiences dites « télomèropathies » causées par des mutations dans des facteurs impliqués dans la biologie des télomères. En particulier, deux déficiences sont directement associées à des anomalies de la longueur, de protection ou de réplication des télomères. Des mutations dans certains des facteurs télomériques ont ainsi été identifiées et décrites dans le cas de la dyskératose congénitale (notée DC) d'une part, et dans son variant rare et sévère d'autre part, le syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson (notée HHS) (*Calado et al., 2008) (Calado et al., 2009*).

### A. La dyskératose congénitale et le syndrome Hoyeraal-Hreidarsson

La dyskératose congénitale est un syndrome rare multi-systémique avec notamment un défaut de la moelle osseuse. Elle a été diagnostiquée pour la première fois en 1906 (*Zinsser et al., 1906*), et est reconnue en tant qu'entité pathologique une vingtaine d'années plus tard (*Engman – Cole, Arch Derm Syph Suppl 1926 & 1930*). C'est une maladie génétique dont la transmission peut être liée au chromosome X (OMIM : 305 000), autosomique dominante (OMIM : 127 550), ou bien autosomique récessive (OMIM : 224 230) (*Dokal et al., 2011*). Son incidence sur la population générale est estimée à 1 / 1 000 000 (*Mason et al., 2011*).

#### 1. Tableau clinique de la DC et du HHS

La dyskératose congénitale a longtemps reposé sur la triade de symptômes muco-cutanés suivants apparaissant dès l'enfance : une pigmentation réticulaire anormale de la peau, une leucoplasie orale et une dystrophie des ongles. L'identification de mutations génétiques pour

près de 60% des patients atteints de DC, a favorisé la compréhension des causes moléculaires et l'étiologie de la maladie. Suivant le gène impliqué, certaines spécificités du tableau clinique sont mieux définies. La maladie est causée tout d'abord par une déficience précoce et profonde de la moelle osseuse à l'origine d'anomalies de développement du système immunitaire et d'insuffisance médullaire, cause majeure de décès chez les patients (environ 60 à 70 %). Viennent ensuite dans de nombreux cas des complications pulmonaires (10 à 15 %) et des tumeurs malignes (10 %) (***Dokal et al., 2000***). La plupart des patients DC ont une lymphopénie globale (***Revy et al., 2000) (Knudson et al., 2005***). Les malades décèdent en moyenne vers 30 ans suite au déficit immunitaire causé par l'aplasie, ou aux cancers. Il existe beaucoup d'autres symptômes qui sont relevés par les cliniciens lors des diagnostics : ils observent notamment des atteintes organiques très sévères, la présence d'un retard de développement, d'un vieillissement accéléré, ainsi que d'une prédisposition accrue au développement de cancer. Les critères de diagnostic de la DC exige à ce jour la présence de deux des quatre signes majeurs (pigmentation anormale, dystrophie ongulaire, leucoplasie, et insuffisance médullaire), ainsi que deux autres caractères dits « somatiques ». Les patients ont couramment un raccourcissement marqué de la taille des télomères, très en-dessous de la normale pour leur âge, et comparé à des contrôles sains. Mais, ceci n'est pas toujours vrai, car certains cas de DC ont mis en avant des tailles de télomères normales (***Walne et al., 2012***). De plus, on relève un phénomène d'anticipation de la maladie dans le cas des DC à transmission autosomique dominante (DC-AT). En effet, la sévérité de la pathologie est de plus en plus grave génération après génération (symptômes plus précoces et caractéristiques phénotypiques plus sévères), pour ces formes de DC liées à des mutations dans l'un des composants du complexe télomérase (***Vulliamy et al., 2004***).

Finalement, la DC se subdivise en trois groupes au niveau de sa présentation clinique. Ainsi, à côté de la forme de DC classique, il existe des variants sévères : le syndrome de Hoyeraal-

Hreidarsson, et le syndrome de Revesz. Enfin, il y a plusieurs variants dits « cryptiques » en l'occurrence l'anémie aplastique, la myélodysplasie, la fibrose pulmonaire, et la leucémie myéloide aigüe.

Ainsi, le syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson (MIM : 300 240) est une forme congénitale moins rencontrée et beaucoup plus grave cliniquement que la DC (*Hoyeraal et al., 1970) (Hreidarsson*). Les patients meurent en général au cours de leur 1ère décennie suite à leur déficit immunitaire. Le syndrome HHS associe au moins quatre des six caractéristiques suivantes : une immunodéficience sévère due à un défaut précoce de la moelle osseuse, une aplasie médullaire, un retard de croissance intra-utérin, un retard de développement global anténatal, une microcéphalie, une hypoplasie cérébelleuse, ainsi qu'une absence de lymphocytes B (*Hoyeraal et al., 1988) (Hreidarsson) (Revy et al., 2000*).

### 2. Gènes mutés responsables de cas de DC et de HHS

Les gènes mutés sont impliqués dans les processus de maintenance télomérique, et sont donc retrouvés dans le complexe télomérase, et dans le complexe Shelterin qui coiffe le télomère. A ce jour, les différentes études publiées ont mis en évidence des déficiences humaines dans huit (voire 9) gènes mobilisés dans la biologie des télomères (la maintenance et la protection par coiffe). Tout d'abord pour la transmission liée à l'X (MIM 305000), on retrouve des mutations de DKC1 codant la protéine dyskérine *(Heiss et al., 1998)*. Pour ce qui est des formes autosomiques dominantes, des mutations hétérozygotes ont été identifiées dans le composant TERC (*Vulliamy et al., 2001*). C'est une découverte cruciale, car pour la 1ère fois cela démontrait le lien direct existant entre la DC, la biologie des télomères et la télomérase. Les premiers patients diagnostiqués étaient atteints d'une forme cryptique de la DC, à savoir l'anémie aplastique (*Vulliamy et al., 2002*) et la myélodysplasie (*Yamaguchi et al., 2003*). Par ailleurs, des mutations dans la sous-unité TERT ont également été répertoriées peu de

temps après, avec une large variabilité dans la présentation clinique des patients (*Vulliamy et al., 2005) (Yamaguchi et al., 2005*). Une des Shelterin, TIN2, présente aussi des cas de déficience avec mutations hétérozygotes dominantes (*Savage et al., 2008) (Walne et al., 2008) (Touzot et al., 2011*). Enfin des formes autosomiques récessives ont mis en exergue l'implication d'autres gènes, spécialement dans le complexe RNP H / ACA. Des variations homozygotes dans le gène NOP10 (*Walne et al., 2007*) ont été caractérisées, ainsi que des mutations bi-alléliques de NHP2 (*Vulliamy et al., 2008*). A ce jour, il n'a jamais été recensé de défaut dans le composant GAR1 de ce complexe RNP H / ACA. Très récemment, l'identification de mutations bi-alléliques dans le gène TCAB1 (*Zhong et al., 2011*) a été décrite. L'absence de cette enzyme participant au trafic de la télomérase, engendre un mauvais assemblage de l'holo-enzyme et un mauvais adressage de la télomérase ce qui empêche l'élongation des télomères. Dernièrement, des mutations de CTC1 appartenant au complexe télomérique CST ont été décrites dans des cas de DC (*Keller et al., 2012*).

A ce jour, il existe huit gènes responsables de DC : TERC, TERT, DKC1, TIN2, NOP10, NHP2, TCAB1 et CTC1. A cela s'ajoute un 9$^{e}$ gène potentiel, dont la fonction n'a toujours pas été élucidée, et dont le lien avec les télomères n'a à ce jour pas été documenté : il s'agit du gène USB1 (« *U6 SnRNA Biogenesis 1* ») codé par C16Orf57 (*Walne et al., 2010*).

Les causes moléculaires identifiées à ce jour pour le HHS, mettent en cause certains facteurs de la maintenance télomérique comme pour la DC. Les gènes impliqués semblent aussi jouer des rôles ailleurs qu'aux télomères, ce qui est probablement la raison de la sévérité clinique observée. Parmi eux, des mutations de la dyskérine DKC1 (*Knight et al., 1999*) et de la Shelterin TIN2 ( ) ont été répertoriées. Une étude réalisée au laboratoire a démontré l'importance du facteur Apollo dans la maintenance télomérique notamment au cours de la réplication. Une déficience humaine due à un mauvais épissage du transcrit codant Apollo, est ainsi à l'origine d'un cas de HHS (*Touzot et al., 2010*). Par ailleurs, parmi notre cohorte de

patients, certains cas de HHS présentent des tailles de télomères normales comparativement à leur âge et à des contrôles pédiatriques (*Touzot et al., 2012*). Cette étude tend à nuancer le dogme établi, et démontre que les télomères des patients HHS ne sont pas systématiquement courts (*Touzo et al., 2012*), et que des défauts de protection des télomères (indépendamment de leurs tailles) peuvent être à l'origine de ces pathologies.

### B. Des mutations dans les facteurs intervenant aux télomères sont à l'origine d'autres formes syndromiques

Des mutations de hTERT et hTERC sont retrouvées chez des patients atteints de fibroses pulmonaires idiopathiques (*Armanios et al., 2007*), qui est un des variants de la DC. Le facteur CTC1 est lui aussi responsable d'autres formes pathologiques lorsqu'il est déficient : le syndrome Coats Plus a été détaillé (*Anderson et al., 2012*). Les patients présentent des télomères courts, ainsi que des foyers γH2A.X augmentés spontanément et un métabolisme de l'ADN affecté sans doute au cours de la réplication. Par ailleurs, d'autres mutations de CTC1 engendrent des microangiopathies rétiniennes (*Keller et al., 2012*). Pour conclure, très récemment, une étude portant sur une cohorte de patients atteints de leucémie lymphoblastoïde chronique (dit « LLC » - *Lin et al., 2010*) avec télomères de taille critique, montre l'implication des mutations dans POT1 dans le développement de ces formes cancéreuses malignes (*Ramsay et al., 2013*). Enfin, des mutations dans le promoteur de TERT (induisant une surexpression aberrante de ce gène) sont à l'origine de la génération de mélanomes (*Huang & Horn, Science 2013*) et d'autres types de cancers (*Killela et al., 2013) (Vinagre et al., 2013*).

### C. La prédisposion aux cancers des patients atteints de DC

Chez l'homme, l'instabilité génomique qui résulte d'aberrations aux télomères, est le point de départ du développement de cancer et de pathologies associées à un vieillissement précoce et accéléré (*Hanahan et al., 2001) (Aguilera et al., 2008*). Ainsi, de nombreuses formes de déficiences télomériques conduisent à de l'instabilité chromosomique et génomique importante, générant des tumeurs (*P Martinez et al., 2011*). Les individus atteints de DC ont une incidence de risque de cancers estimée à onze fois plus importante comparée à la population générale.

Cibler la télomérase pour inhiber son action dans les tumeurs, représente une stratégie thérapeutique importante dans le traitement de la carcinogenèse. En terme d'action, et dans le cas de développement de tumeurs, la télomérase est plus à même de cibler aléatoirement les télomères appartenant à des cellules en phase S (*Zhao et al., 2009*). Malgré tout, les thérapies anti-télomérase génère l'activation de l'ALT et une adaptation mitochondriale dans les formes cancéreuses (*Hu et al., 2012*).

## Axes de recherche du laboratoire et objectifs de la thèse :

Notre équipe procède à l'analyse des situations pathologiques, caractérisées par des déficits immunitaires variés associant de profondes lymphopénies et / ou aplasies médullaires précoces à d'autres troubles du développement (tels que la microcéphalie, ou des anomalies cranio-faciales par exemple) et l'éventuelle apparition de lymphomes ou leucémies inhabituelles chez l'enfant. Le tableau clinique de ces patients évoque des aberrations de la fonction télomérique (cas de la dyskératose congénitale et du syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson) et / ou de la réparation d'ADN (cas de l'anémie de Fanconi notamment). Chez ces patients, des études phénotypiques et génétiques sont entreprises afin de mieux caractériser le défaut moléculaire et d'identifier les causes génétiques de ces pathologies.

Définir avec précision les acteurs de la réponse des dommages de l'ADN et du maintien du matériel télomérique est particulièrement important afin de comprendre leur mode d'action et d'évaluer les interactions fonctionnelles entre les différentes voies de réparation. De nombreuses études récentes ont montré les relations qui existent entre les processus de prise en charge de l'ADN rompu et la physiologie des télomères. De fait, certains défauts génétiques de la réparation de l'ADN se traduisent par des anomalies télomériques comme il a pu être observé au laboratoire dans le cas d'un défaut du facteur Apollo.

Ainsi au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé à trois patients atteints de HHS et un patient ayant certaines caractéristiques cliniques similaires au HHS, et d'autres signes phénotypiques originaux.

# MATERIELS

# &

# METHODES

# SUPPLEMENTAIRES

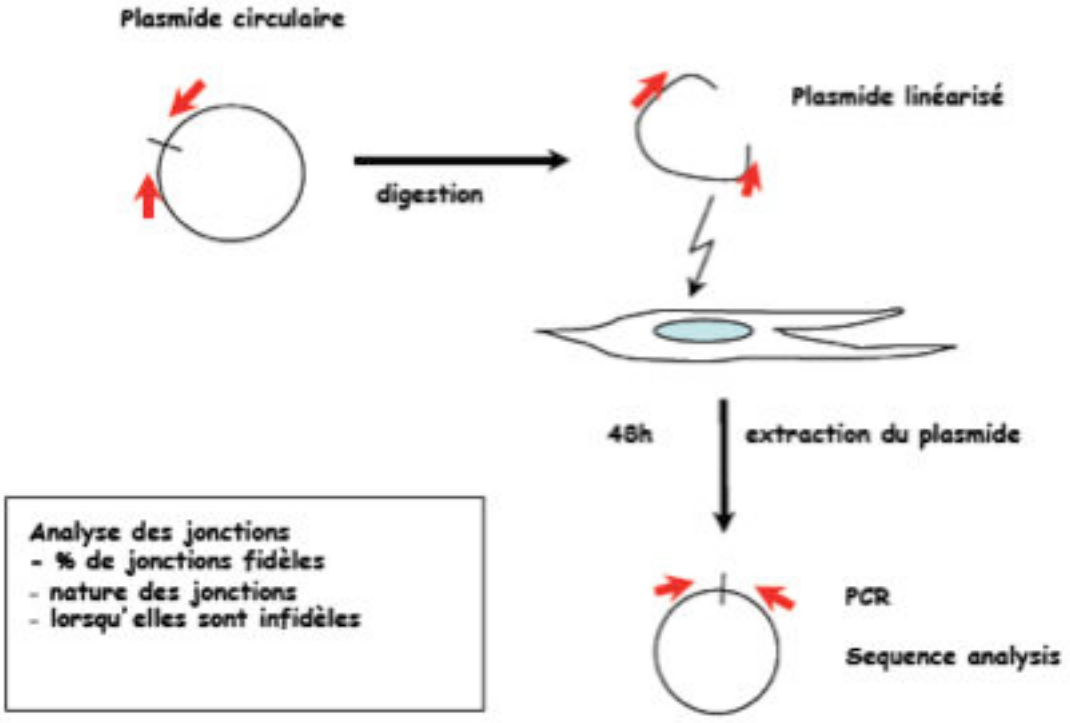
**# Amplification des cercles T (« *T Circle Amplification* »)**

L'amplification des ADN extra-télomériques issus des boucles T excisées, se fait suivant le protocole de *(Vannier, 2012)*. Les ADN génomiques sont préalablement extraits des blastes T activés et des fibroblastes primaires transformés par le SV40. La double digestion de l'ADNg (1 µg) se fait sur la nuit à partir des enzymes Hinf 1 / Rsa 1.

**# Gel de télomères à 2 dimensions**

La migration sur gel à 2 dimensions des télomères digérés se fait suivant le protocole de *(Wang RC et al., Cell 2004)*. A partir de 30 µg d'ADN génomique, la double digestion télomérique se fait par le cocktail enzymatique Hinf1 / Rsa1, comme pour le TRF et le TCA.

**# Test de réparation de plasmide linéarisé par le « *Non-Homologous End-Joining* » et séquençage haut-débit**



Les plasmides circulaires sont digérés par coupure enzymatique. La transfection transitoire de Ce plasmide linéarisé est électroporé dans les fibroblastes de patients puis 48h après la transfection, l'ADN plasmidique est extrait. Celui-ci est amplifié à partir d'oligonucléotides, flanqués d'un bar-code, et passé en séquençage haut débit (IonTorrent PGM, Life Technologies). Les bar-codes permettent de retrouver toutes les séquences provenant d'un échantillon pour procéder à l'analyse des jonctions : on mesure le taux de fidélité de la relication par la voie de réparation du NHEJ, la nature des jonctions, et la taille des délétions.

**# Micro-irradiation laser (« *laser-foci* ») en direct**

Des cellules U-2-OS sont transfectées avec une construction NBS1-GFP (protéine de fusion). 48h après la transfection, les cellules sont ensemencées sur des supports quadrillés appropriés (Ibidi, BioValley), permettant la localisation précise des cellules par coordonnées. Après une nuit d'adhésion, l'analogue de base BrdU est ajouté à 10 µM pour sensibiliser l'ADN des cellules. La technologie du FRAP (« *Fluorescence Recovery After Photobleaching* ») est détournée afin de micro-irradier avec un faisceau laser UV (plusieurs passages sur la même zone), une cellule positive car fluorescente en GFP. Le suivi en temps réel du recrutement de la protéine NBS1 aux cassures a lieu par vidéomicroscopie confocale.

**# « *Pull-down* » aux télomères**

Des vecteurs spécialement designés comportant 12 répétitions de séquences télomériques ou de séquences aléatoires (dites « *scramble* ») sont amplifiés par des oligonucléotides associés à la biotine. Le produit PCR obtenu est donc biotinylé. Puis l'on procède aux étapes de co-immunoprécipitation avec des billes avidine, et la mise en présence des extraîts cellulaires totaux, transfectés préalablement avec un vecteur d'expression MYSM1 sauvage étiqueté Flag.

# RESULTATS

# et

# DISCUSSION

## RESULTATS

- ***Les tableaux cliniques et immuno-hématologiques des patients répondent au syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson***

Nous avons mené l'exploration de trois patients dans deux familles non-liées et non consanguines (*figure 19*), l'une avec un frère et une sœur atteints (notés P1 et P2), et la 2nde avec une fille atteinte (notée P3), dont le tableau clinique et immuno-hématologique était très comparable (*tables 1 et 2*). A ce jour, 2 patients sont morts suite à des infections pulmonaires sévères (P1 et P2), respectivement à 4 et 18 mois, preuve de la gravité de la maladie.

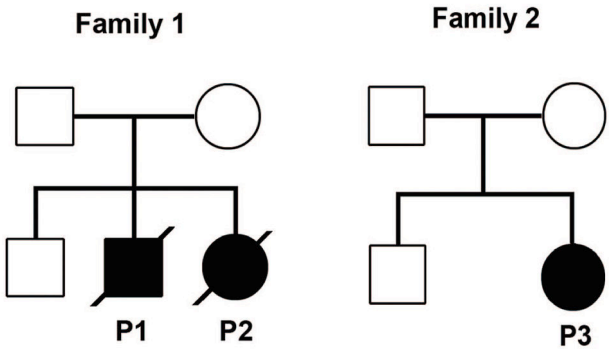



***Figure 19 :*** Arbre phylogénétique des familles 1 et 2 (patients P1, P2 et P3). Les patients P1 et P2 sont décédés à 4 et 18 mois respectivement. La patiente P3 est âgée actuellement de 4 ans.

Nés prématurés, ces patients ont présenté une immuno-déficience (due à une insuffisance médullaire), une hypogammaglobulinémie progressive, des signes de délai du développement (en particulier un retard de croissance intra-utérin et une hypotrophie), ainsi que des défauts neurologiques dont l'hypoplasie cérébelleuse et la microcéphalie. Ces patients répondent au tableau clinique du HHS. La sévérité des valeurs immuno-hématologiques est caractérisée par

une lymphopénie affectant principalement les cellules B, et par une pancytopénie progressive (réduction du nombre de globules rouges et blancs ainsi que des plaquettes).

| | Patient 1 * | Patient 2 * | Patient 3 |
|---|---|---|---|
| **Sex** | Male | Female | Female |
| **Consanguinity** | No | No | No |
| **Developmental features** | | | |
| **IUGR** | Yes | Yes | Yes |
| **Prematurity** | 27 WG | 27 WG | 29 WG |
| **Hypotrophy** | Yes (< 2nd percentile) | Yes (< 2nd percentile) | Yes (< 2nd percentile) |
| **Dysmorphy** | No | Yes | Yes |
| **Bone marrow failure** | Yes | Yes | Yes |
| **Immunodeficiency** | Yes | Yes | Yes |
| **Neurological features** | | | |
| **Microcephaly** | Yes (< 2nd percentile) | Yes (< 2nd percentile) | Yes (< 2nd percentile) |
| **Cerebellar hypoplasia** | Yes | Yes | Yes |
| **Other** | No | No | Corpus Callosum dysmorphy |
| **Gastrointestinal features** | Oral leukoplakia<br>Inflammatory colitis | No | Oral leukoplakia<br>Inflammatory pancolitis<br>Oesophageal stenosis |
| **Skin features** | Nail dystrophy<br>Sparse hair | NA | Nail dystrophy |
| **Outcome** | Death at 4y of age<br>after severe infection | Death at 18 months of age<br>after severe infection | Alive<br>5y old |

***Table 1 :*** Tableau des caractéristiques cliniques des patients P1, P2 et P3.

| | Patient 1* | Patient 2* | Patient 3 |
|---|---|---|---|
| **Age at diagnosis** | **3 years** | **6 months** | **2 years** |
| White Cell Count - $\times 10^9$/L | 1.7 (6–17.0) | 5.9 (6-17.5) | 2.4 (6–17.0) |
| Polymorphonuclear Neutrophils - $\times 10^9$/L | 0.8 (1.5-8.5) | 2.3 (1.5-8.5) | 1.4 (1.5-8.5) |
| Lymphocyte - $\times 10^9$/L | 0.4 (2-8) | 2 (2-8) | 1.5 (2-8) |
| Haemoglobin - g/dL | 7.9 (11.5-13.5) | 11.9 (11.5-13.5) | 9.3 (11.5-13.5) |
| Platelets $\times 10^9$/L | 101 (150-500) | 220 (150-500) | 77 (150-500) |
| T Cells— % (normal range) | | | |
| CD3+ | 93 (56-75) | 89 (49-76) | 95 (56–75) |
| CD4+ | 66 (28–47) | 69 (31-56) | 60 (28–47) |
| CD8+ | 23 (16–31) | 16 (12-24) | 19 (16–31) |
| CD4+CD45RA+CD31+ | NA | 65 (60-72) | 44 (57–65) |
| B-cell CD19+ cells - % | 0.1 (14–33) | 0 (14-37) | 3 (14–33) |
| Natural killer CD56+CD16+ cells - % | 2 (3–14) | 9 (3-15) | 2 (3–14) |
| T-cell proliferation— $\times 10^3$ cpm | | | |
| PHA | 47 (>50) | 235 (>50) | 63 (>50) |
| Tetanus Toxoid | 9 (>10) | NA | 14 (>10) |
| Serum Immunoglobulins level: g/L | | | |
| IgG | 2.24 (3.35 – 6.23) | < 0.4 (3.35 -6.23) | 1.92 (4.82 - 8.96) |
| IgA | 0.13 (0.27-1.06) | < 0.1 (0.27 - 0.86) | 0.15 (0.33 – 1.22) |
| IgM | < 0.04 (0.48-1.43) | < 0.25 (0.48 – 1.36) | < 0.20 (0.5 – 1.53) |

* P1 and P2 are siblings

For all values, normal range or normal thresholds are indicated in brackets. PHA, Phytohemagglutinin; NA, not available.

***Table 2 :*** Tableau des paramètres immuno-hématologiques des patients P1, P2, P3.

Nous avons pu développer des lignées fibroblastiques pour les patients P1 et P2 à partir de biopsies cutanées. En revanche, il nous a été impossible de développer des lignées de fibroblastes à partir de 3 différentes biopsies provenant de la patiente P3. De ce fait dans la suite de ce travail, les expériences de caractérisation phénotypique ont été effectuées à partir de lymphocytes T activés à la PHA (« *PhytoHemAgglutinin* » ou phasine) et maintenus en interleukine-2 (IL-2), correspondants à des blastes T.

- ***Les télomères des patients ont des tailles anormalement basses***

Les tests cellulaires couramment effectués au laboratoire permettent de caractériser le phénotype cellulaire des patients et de définir la nature de la dysfonction télomérique rencontrée : soit il existe des problèmes au niveau de la taille des télomères (pouvant

notamment impliquer le complexe télomérase), soit les aberrations ont lieu au niveau de la maintenance et de la protection télomérique assurée notamment par les facteurs du complexe Shelterin.

Tout d'abord à partir de l'ADN génomique extrait des cellules sanguines des 3 patients, une approche par Southern-Blot a permis d'estimer la taille des télomères (*figure 20*). Dans les 2 familles, on constate que les patients présentent des télomères anormalement courts (5,6 kb à 7 kb) en comparaison à leurs parents et frère sain respectifs, ainsi que des contrôles pédiatriques ***(Touzot et al., 2012)***.

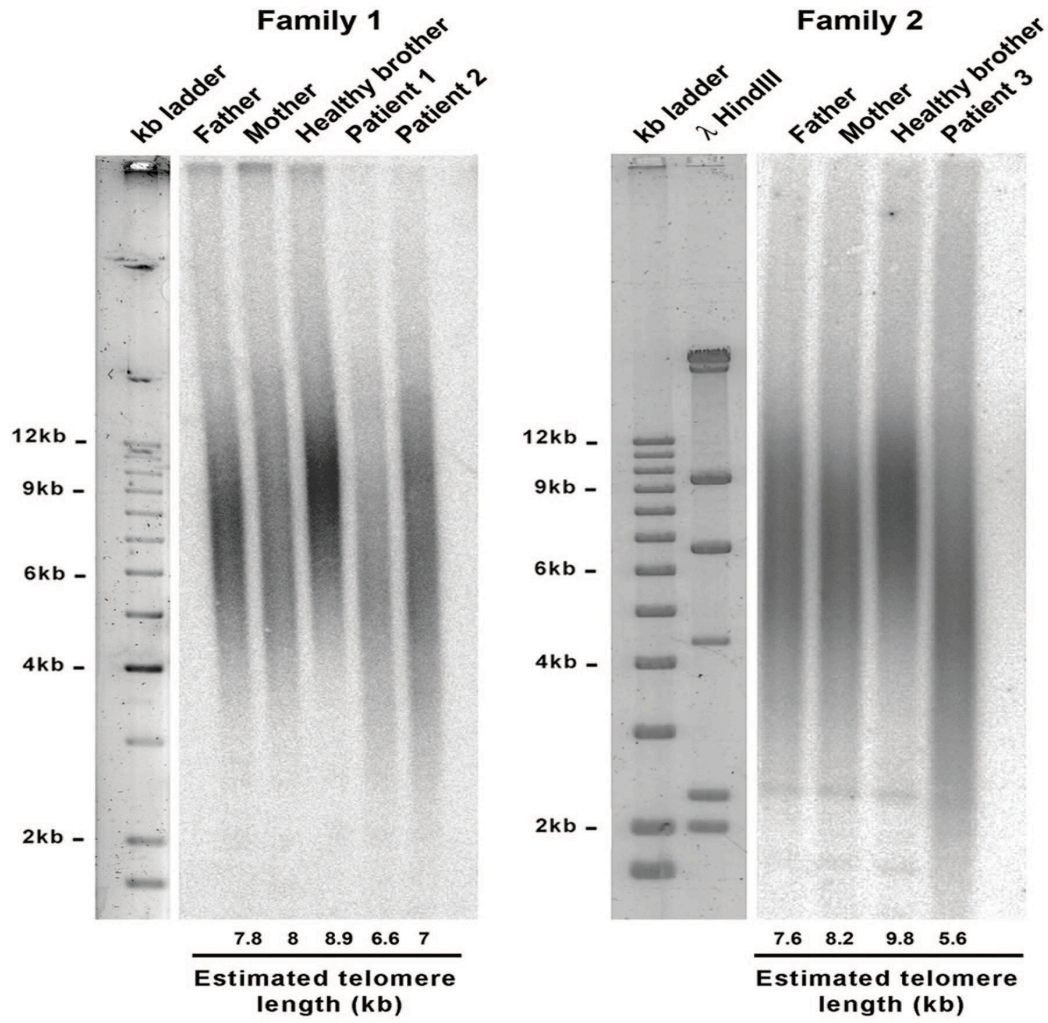



***Figure 20 :*** Mesure de la longueur des télomères par Southern-Blot à partir de l'ADN génomique provenant du sang des patients et de leurs familles respectives, en utilisant une sonde télomérique radioactive (P32) riche en G.

A ce stade de l'étude, ces premiers résultats suggèrent une déficience dans le maintien des télomères, entraînant un raccourcissement accéléré. Pour confirmer ce résultat, une 2nde approche de mesure de la taille des télomères a été entreprise par FISH (« Fluorescence In-Situ Hybridization ») aux télomères dans les fibroblastes et les blastes, avec une sonde télomérique dont le spectre d'émission est dans le rouge (*figure 21*). Le FISH quantitatif a permis de confirmer une taille moyenne des télomères anormalement basse chez les 3 patients étudiés, et ce dans 2 types cellulaires différents.

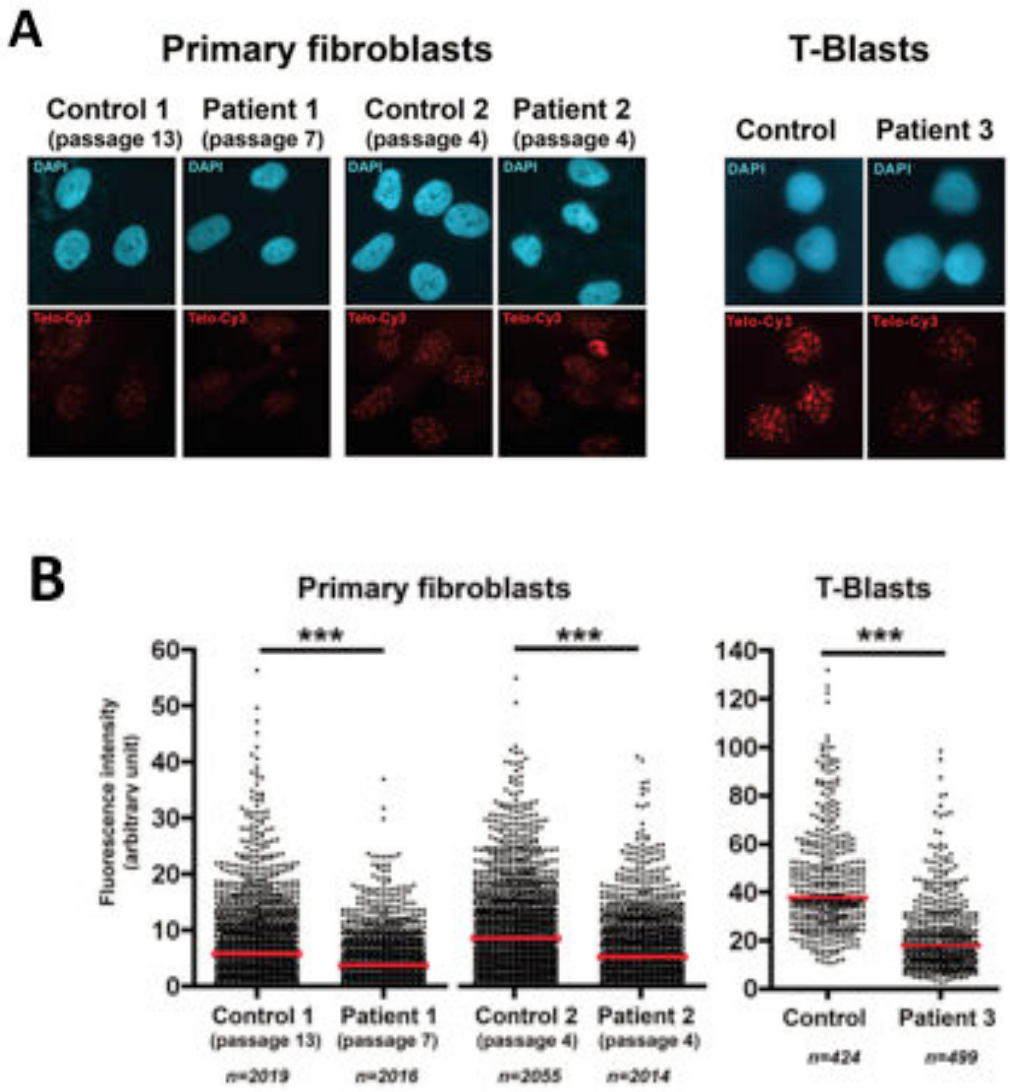



***Figure 21 :*** **a/** FISH aux télomères réalisé à partir des fibroblastes primaires et des lymphoblastes T des 3 patients. Les noyaux sont marqués au DAPI, la sonde télomérique étant spécifique du brin G et couplé à la Cyanine 3.
**b/** Quantification de l'intensité des signaux télomériques visibles et retranscrite dans les plots, $p < 0,0001$ (***).

Ensuite, l'activité du complexe télomérase a été évaluée *in-vitro* par la technique de TRAP (« *Telomere Repeat Amplification Protocol* ») (*figure 22*). L'expression de la télomérase est limitée aux lignées de cellules souches ou à certaines populations dont les lymphocytes T activés. De ce fait, nous avons pu tester cette activité à partir des blastes T de la patiente P3. En comparaison à des cellules contrôles et à des fibroblastes transformés par le SV40 et transduits par un vecteur permettant l'expression ectopique de hTERT, l'activité télomérase apparaît intègre chez la patiente P3. Le « profil en échelle » qui correspond à l'addition du motif télomérique de 6 paires de bases et le contrôle d'amplification interne à 36 bp sont distincts. Par conséquent, l'analyse par TRAP excluait un défaut d'un facteur nécessaire à l'activité télomérase. En revanche, ce test ne permet pas d'exclure un défaut d'un facteur nécessaire à la bonne activité de la télomérase aux télomères.

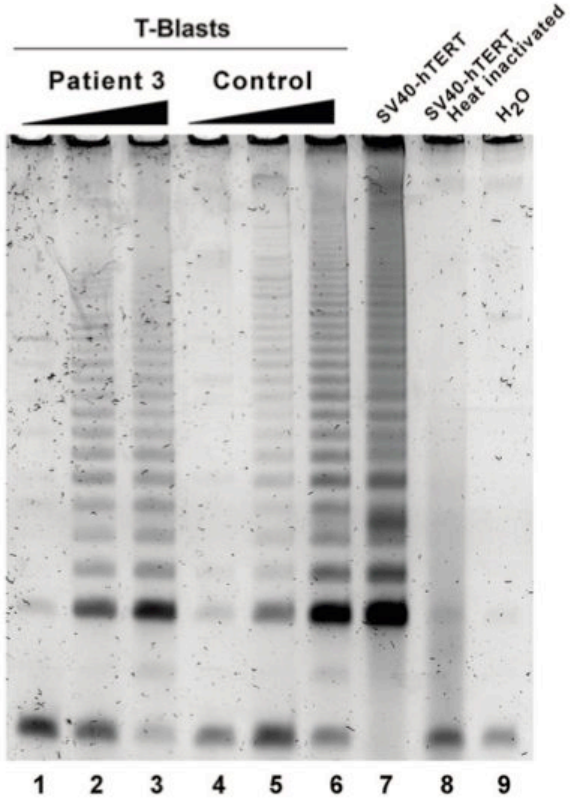
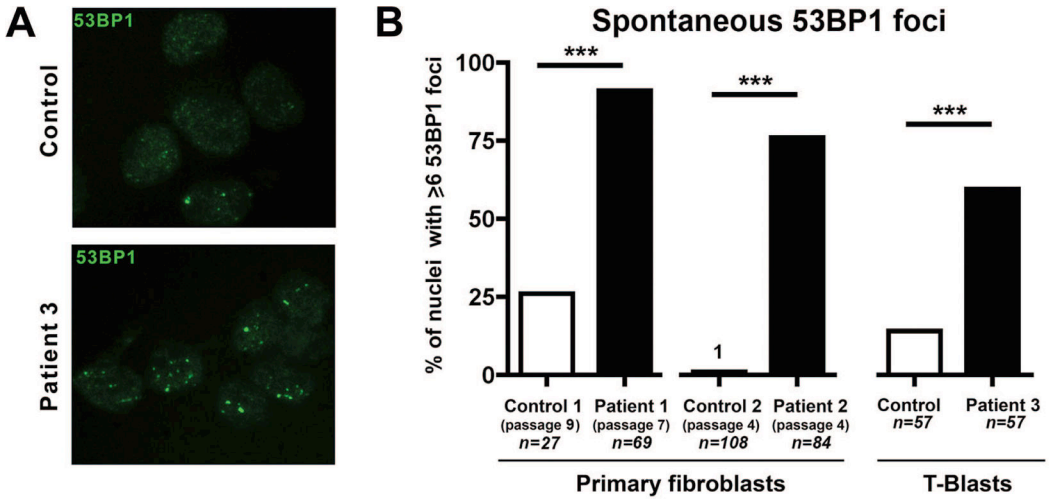



***Figure 22 :*** TRAP (« *Telomeric Repeat Amplification Protocol* ») réalisé sur des doses croissantes d'extraits totaux (10 ng, 100 ng et 1 ug) provenant de blastes T activés d'un donneur sain et du patient P3. Des fibroblastes transformés avec l'antigène grand T SV40 et hTERT sont utilisés comme contrôles positifs, alors que l'inactivation par chauffage à haute température sert de contrôle négatif.

❖ ***<u>De nombreux signes d'instabilité génomique sont relevés dans les cellules des patients</u>***

L'analyse des cellules a été poursuivie pour documenter leurs phénotypes. Des expériences d'immuno-fluorescence pour détecter le médiateur de la réparation 53BP1, tendent à démontrer que les cellules des patients sont sujettes de façon spontanée à un nombre important de cassures de l'ADN (*figure 23*). En effet, cela se traduit par une augmentation significative de foci 53BP1 aux sites de dommages que ce soit dans les fibroblastes primaires ou dans les blastes T. Ce nombre important de foyers 53BP1 spontanés est le signe d'une instabilité génomique probablement associé à une réplication altérée.




**<u>Figure 23 :</u> a/** Immuno-fluorescence sur lymphoblastes T après cytospin et marquage du médiateur 53BP1 en vert. **b/** Un nombre important de foci 53BP1 est présent dans les cultures de fibroblastes et de blastes T en cours de prolifération (état endogène) car statistiquement significatifs.

Afin de voir si les foyers 53BP1 étaient particulièrement localisés dans des régions télomériques, nous avons étudié la co-localisation de 53BP1 et d'une sonde télomérique (*figure 24*). La localisation de 53BP1 au télomère est signe de dysfonction télomérique et est nommé TIFs (« *Telomere dysfunction-Induced Foci* »). Les fibroblastes des patients P1 et P2 ont révélé une augmentation significative des TIFs. En revanche, la présence de TIFs n'a pas été observée dans les blastes du patient P3. Ceci peut s'expliquer par le type cellulaire

différent analysé et les procédures de marquages, comme cela a été décrit par un autre laboratoire *(Kirwan et al., 2008).*

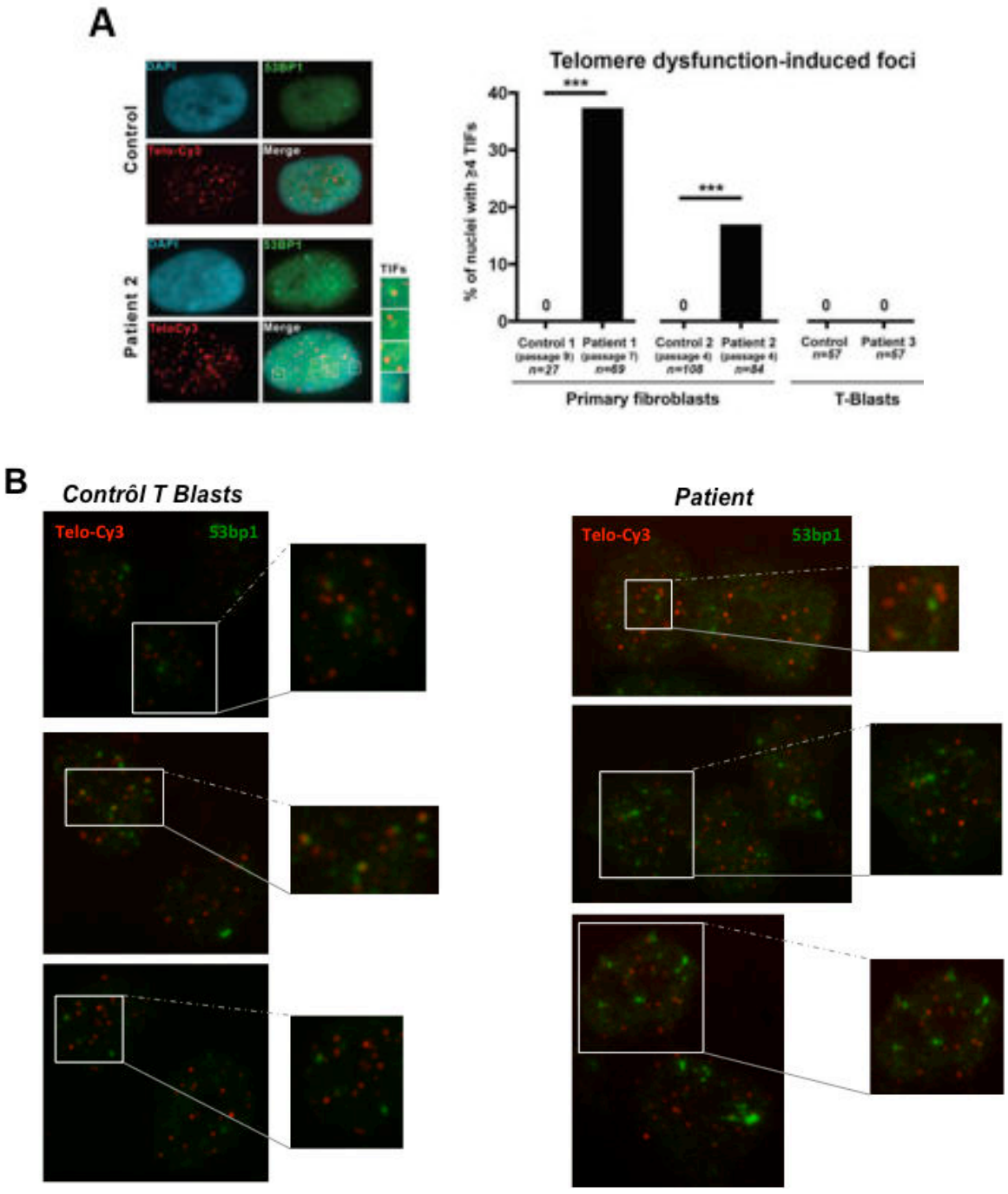



***Figure 24 :*** **a/** Analyse des TIFs (« *Telomere Induced Focis* ») dans les cellules de patients P1 et P2. **b/** Absence de co-localisation entre 53BP1 et la sonde TTAGGG-Cyanine 5 dans les blastes T de la patiente P3.

Les dysfonctions télomériques provoquent une sénescence prématurée. C'est pourquoi le taux de sénescence a été évalué dans les fibroblastes primaires des patients P1 et P2 (*figure 25*) à des passages précoces. La détection par mesure de l'activité béta-galactosidase à pH acide, marqueur de la sénescence dans les cellules humaines ***(Dimri et al., 1995)***, fait apparaître une augmentation significative de la sénescence des cellules des patients.

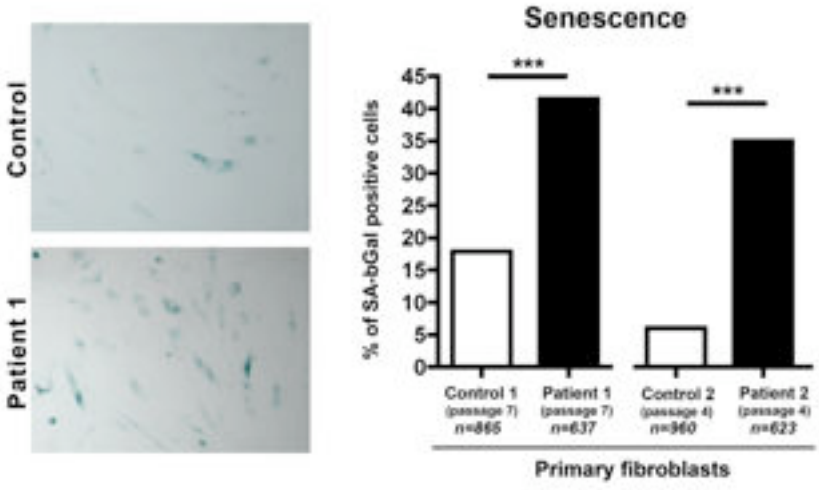



***Figure 25 :*** Taux de sénescence cellulaire des fibroblastes primaires de P1 et P2 mesurée par l'activité Beta-galactosidase à pH acide. Les cellules sénescentes apparaissent en bleu comparativement aux cellules vivantes non-colorées.

Par ailleurs, un autre événement original a été observé dans les cellules des patients (*Figure 26*). On relève en effet, le maintien entre certaines cellules marquées au DAPI (marqueur de l'ADN) après division, d'un défaut de séparation du matériel génétique. Ces structures particulières correspondent à des ponts d'anaphase. Il est à noter que des signaux télomériques persistent dans les ponts d'anaphase des cellules de P3. La quantification permet de conclure que cet événement, résultant d'une instabilité génomique au cours de la mitose, est augmenté de façon significative dans les cellules de P1 et P2.

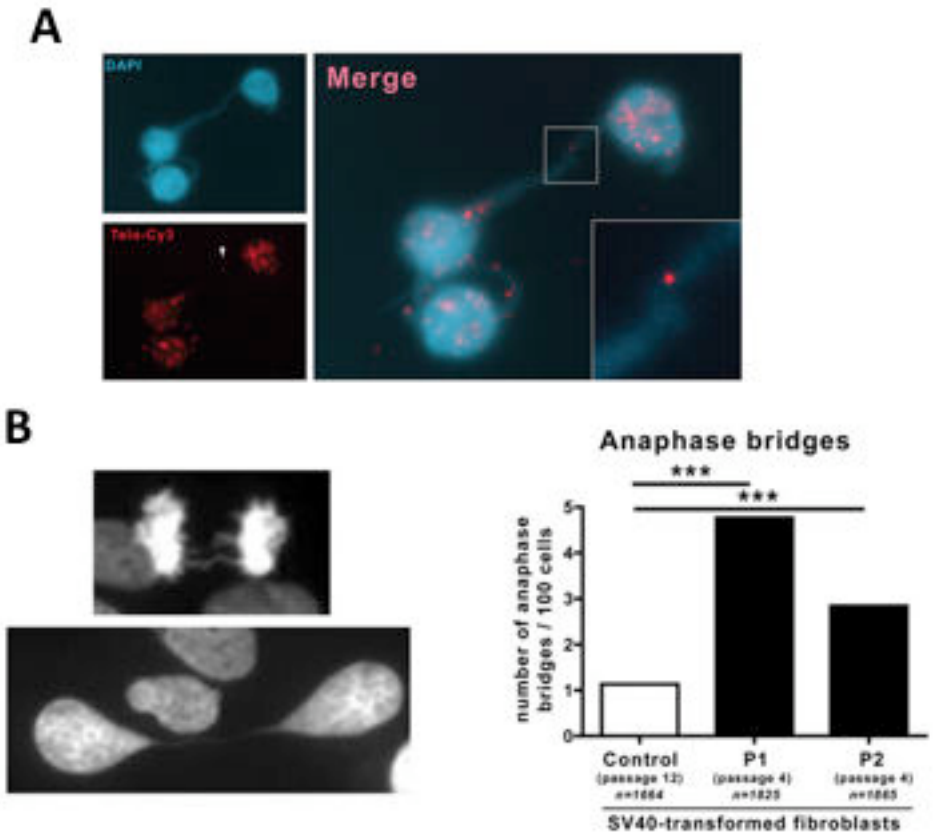



**Figure 26 :** **a/** Observation d'un pont d'anaphase reliant deux cellules et marquage in-situ avec une sonde télomérique rouge à partir des lymphoblastes T de P3.
**b/** Présence de ponts dans les fibroblastes primaires de P1 et P2, dont la quantification met en évidence une augmentation très significative.

❖ ***Certaines anomalies affectent l'intégrité des télomères***

Ayant observé des signes de dysfonction télomérique (TIFs) dans les cellules de patients, nous avons procédé à du FISH aux télomères sur chromosomes bloqués en métaphase, pour évaluer la présence d'aberrations télomériques. Les analyses par FISH permettent de relever les anomalies télomériques présentes dans les cellules des patients (*Figure 27*). Deux évènements apparaissent ainsi significativement augmentés, à savoir la perte sèche de télomères célibataires et les délétions terminales caractérisées par l'absence de la sonde télomérique sur les deux chromatides sœurs. Les autres signes d'aberrations répondant à une fragilité télomérique et pouvant être détectés par cette approche (signaux interstitiels, signaux

multi-télomériques) ne sont pas significativement augmentés chez les patients. On conclut donc que le défaut génétique semble affecter l'intégrité des télomères.

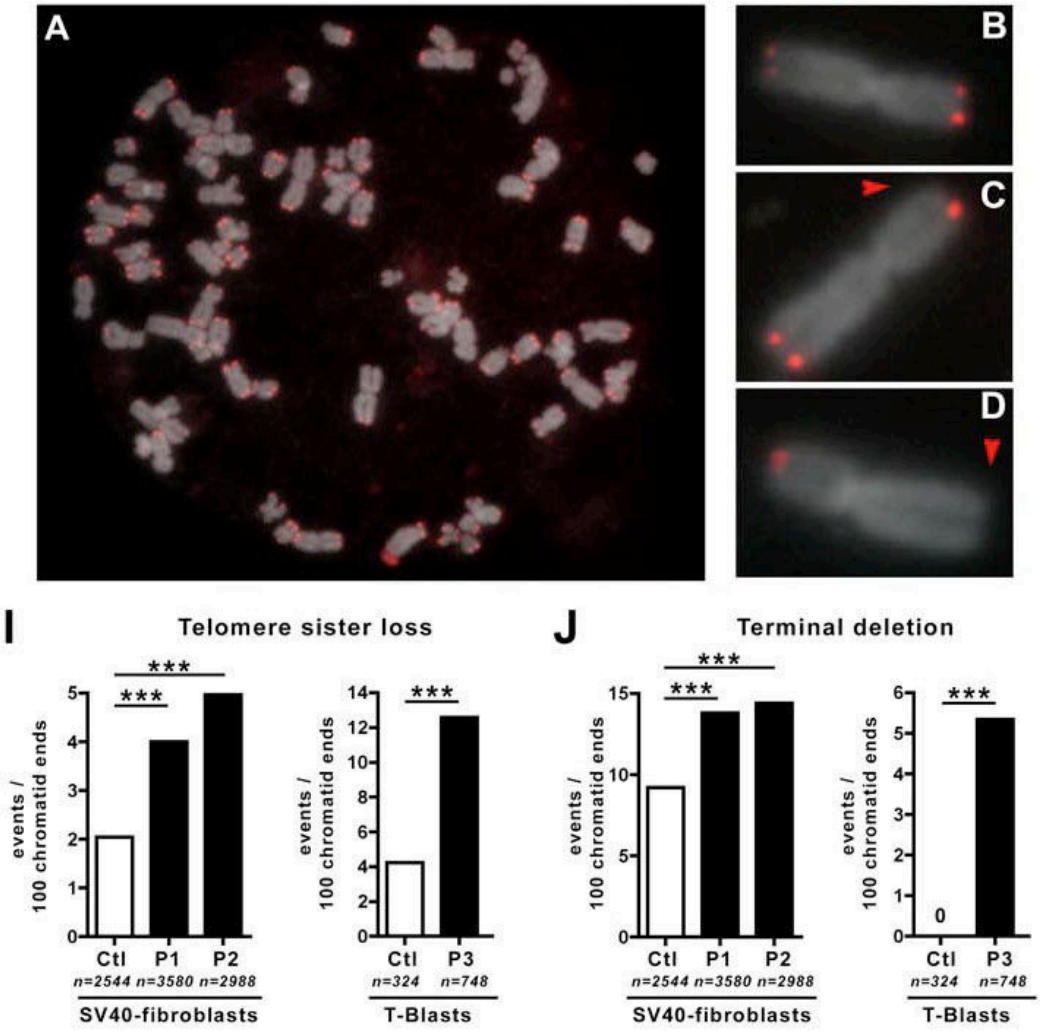



***Figure 27 :*** **a/** Analyse par FISH des aberrations télomériques détectées. Un chromosome normal (**b**) possède une sonde télomérique à chacune des 4 chromatides. La perte télomérique simple (**c**) et la délétion terminale (**d**) sont relevées significativement dans les cellules de P1, P2 et P3 (**i** et **j**).

Pour préciser la nature des aberrations télomériques présentes dans les cellules des patients, nous avons procédé à du co-FISH (« *Chromosome Orientation-FISH* ») permettant de distinguer les chromatides issues de la réplication grâce à 2 sondes télomériques spécifiques de chacun des brins (*figure 28*). La sonde verte riche en guanine est spécifique du brin avancé

(dit « *leading* » ou continu) de la réplication alors que la sonde rouge riche en cystéine est spécifique du brin retardé (dit « *lagging* »). On confirme par cette approche l'augmentation des délétions terminales et des pertes sèches d'une seule chromatide pour l'ensemble des patients. Le co-FISH permet aussi de préciser que les pertes de télomères célibataires affectent majoritairement le brin avancé comparé au brin retardé. De plus, il apparaît un échange de chromatides sœurs du brin avancé co-localisant avec le brin retardé et vice-versa, pour 2 des 3 patients (P2 et P3), ce qui suggère une hausse des événements de recombinaison homologue aux télomères, appelée T-SCE (« *Telomere-Sister Chromatid Exchange* »).

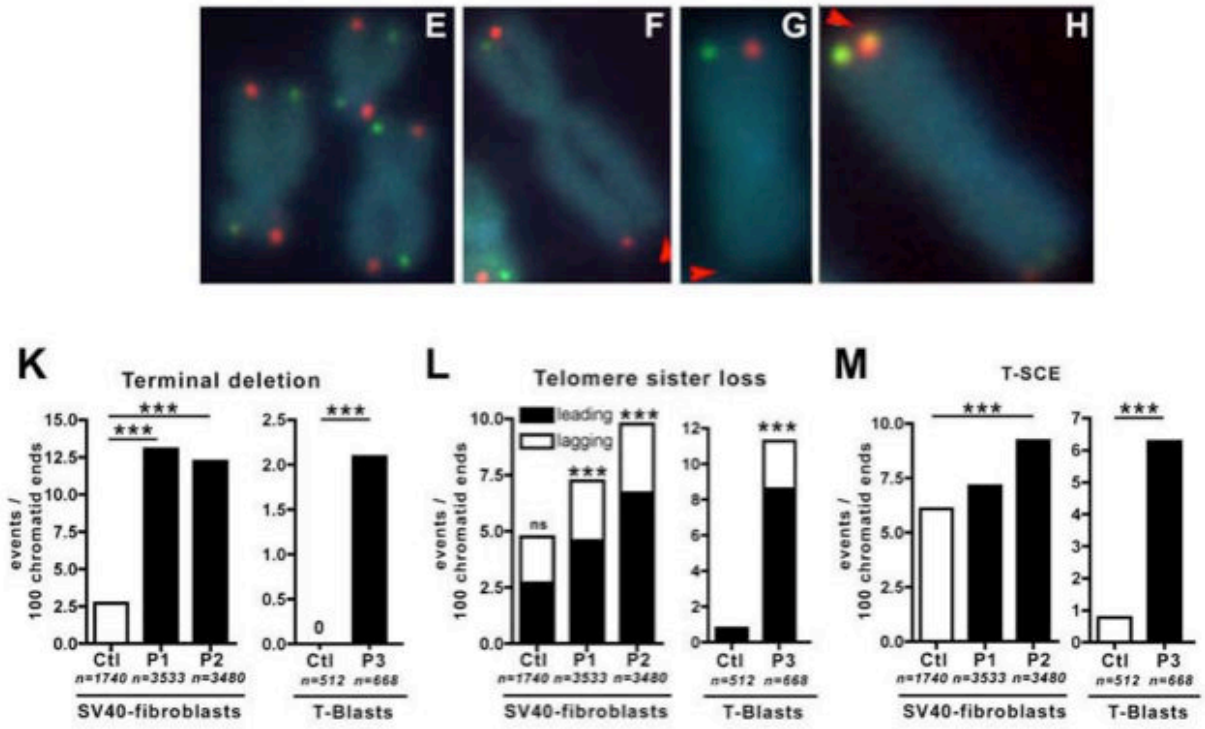



***Figure 28 :*** Analyse des anomalies aux télomères détectées par co-FISH. Un chromosome normal (**e**) présente les 2 sondes sur chacune des chromatides sœurs. La quantification des délétions simples (**f**), des délétions terminales (**g**) et des échanges télomériques entre chromatides sœurs (**h**) est reporté dans les histogrammes (**k**, **l** et **m**). La nature des pertes simples de télomères est précisée (**l**, brin avancé ou brin retardé).

❖ ***L'analyse génétique identifie des mutations hétérozygotes composites dans le gène RTEL1***

Afin d'identifier la cause moléculaire responsable de ce phénotype particulier, une approche génétique a été entreprise en combinant l'analyse de ségrégation intra-familiale à partir de marqueurs SNPs (WGHM) dans la famille 1 avec une technique haut-débit de séquençage complet de l'exome (WES) (*figure 29*). L'exome a permis d'identifier près de 10 000 gènes portant des variants nucléotidiques. Les filtres utilisés permettent successivement de conserver uniquement les régions co-ségrégeant avec la maladie ainsi que les gènes avec variants nucléotidiques, absents des banques de données d'accès publique (dbSNP, « *Exome Variant Server* », 1 000 Genomes, et la base d'exome de Necker). L'hypothèse d'une transmission autosomique récessive a révélé des variants génétiques non décrits dans un gène candidat fort : « *Regulator of Telomere ELongation helicase 1* » ou RTEL1, qui est une hélicase de l'ADN.

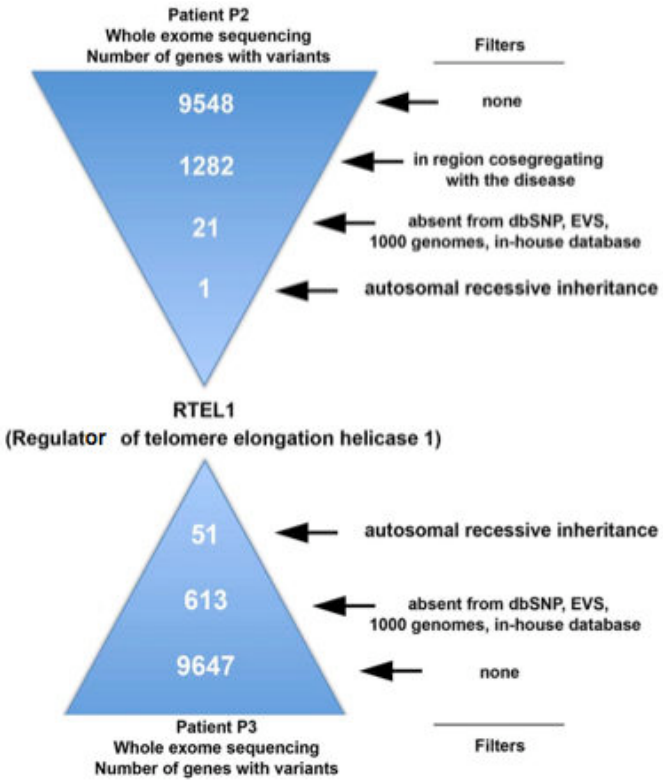



***Figure 29 :*** Analyse génétique par « *Whole Exome Sequencing* » et « *Whole Genome Homozygosity Mapping* » des différents patients. Les stratégies des différentes hypothèses et filtres appliqués sont précisés.

Ce candidat paraissait particulièrement intéressant puisque le gène codant Rtel est présent dans une région régulant la taille des télomères différentiellement chez deux espèces de souris *Mus musculus* et *Mus spretus* ***(Zhu et al., 1998) (Ding et al., 2004)***. Le séquençage direct du gène a été effectué afin de valider les mutations identifiées par WES (*figure 30*). Il s'agit de mutations dites « hétérozygotes composites » faux-sens puisqu'il y a présence de mutations différentes sur les deux allèles des patients (provenant de chacun des parents) : des mutations hétérozygotes dans l'exon 24 c.2097C>G (p.I699M) transmise par la mère, et dans l'exon 34B c.3730T>C (p.C1244R) transmis par le père, pour les patients P1 et P2 ; des mutations hétérozygotes dans l'exon 25 c.2233G>A (p.V745M) transmis par la mère et IVS24 +5G dans un site accepteur d'épissage transmis par le père du patient P3.

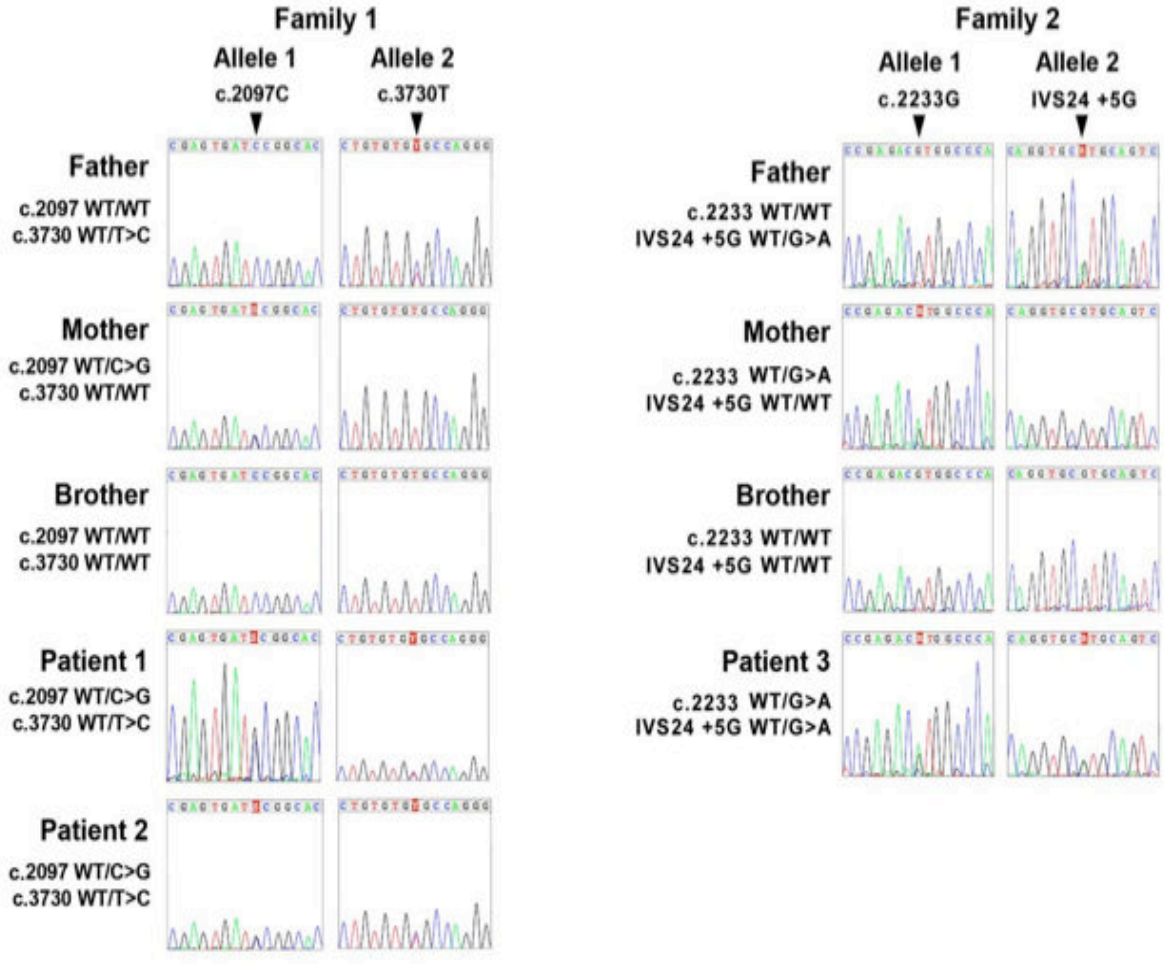



***Figure 30 :*** Ségrégation intra-familiale pour les 2 familles étudiées. Des mutations faux-sens hétérozygotes composites sont retrouvées pour P1, P2 et P3 ainsi qu'une mutation sur un site accepteur d'épissage pour le patient P3.

Dans les bases de données, six isoformes de RTEL1, générées par épissage alternatif, sont répertoriées (existantes et prédictives). Par des approches de RT-PCR et de détection par Western-Blot, deux d'entre elles apparaissent majoritairement epxrimées dans des lignées humaines couramment utilisées (HEK-293T) (*figure 31*). L'épissage alternatif génère ainsi l'isoforme n°6 longue de 1300 acides aminés alors que l'isoforme 2 est constituée de 1219 acides aminés. L'exon noté « 34b » diffère entre les 2 variants de RTEL1.

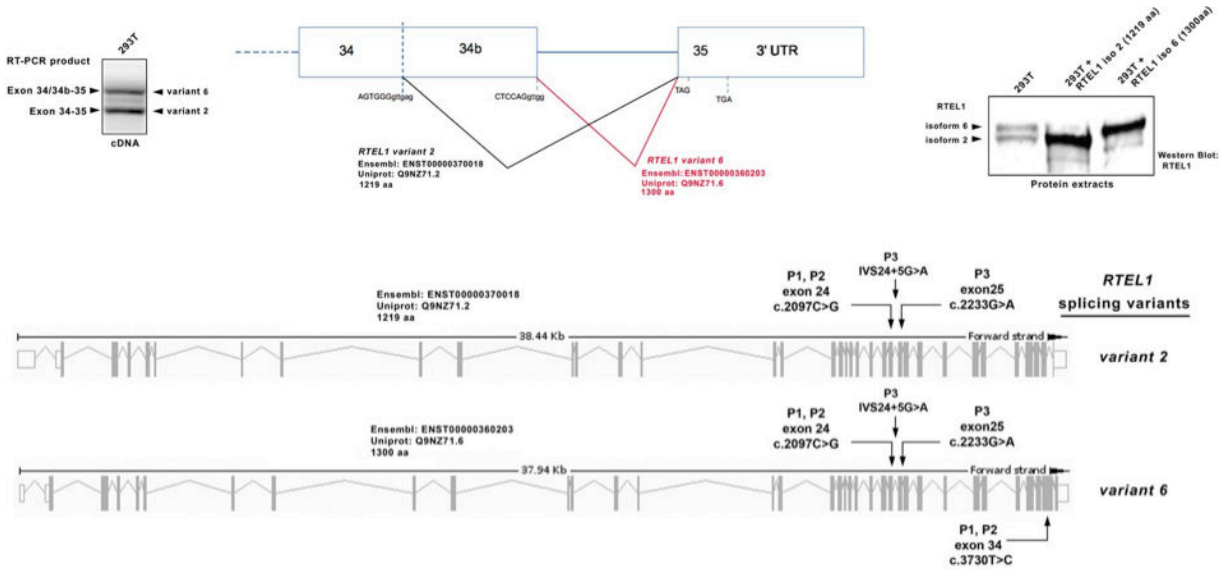



***Figure 31 :*** Isoformes majoritaires de RTEL1 exprimées dans des lignées humaines (HEK-293T) issus de l'épissage alternatif. L'analyse se fait à partir d'amplification d'ADN complémentaire par RT-PCR, et à partir de la détection des formes présentes dans des lysats protéiques comparativement à une sur-expression de construction des 2 isoformes identifiées.

Afin d'estimer les conséquences des mutations sur l'expression de la protéine, des lysats protéiques provenant des cellules des trois patients ont été préparés et soumis à un Western-Blot avec une détection directe du niveau endogène de la protéine RTEL1 (*figure 32*). Une très nette baisse de l'expression protéique est mise en évidence dans les blastes T de la patiente P3, alors qu'on relève une diminution moins prononcée dans les fibroblastes transformés des patients P1 et P2. La forme courte de RTEL1 semblerait plus affectée.

Néanmoins, ce résultat suggère la persistance d'une forme résiduelle mutée dans les cellules des patients HHS.

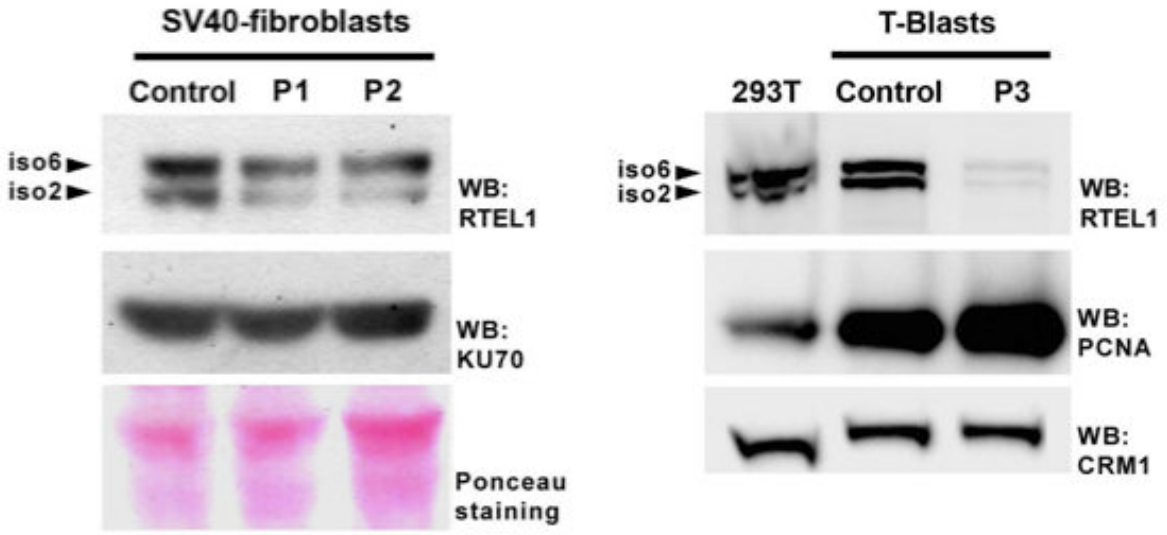



***Figure 32 :*** Analyse par Western-Blot du niveau d'expression de la protéine RTEL1 chez les patients mutés. PCNA, puis KU70 et CRM1 sont respectivement utilisés en tant que contrôles de prolifération des blastes T et en tant que contrôle de niveau de charge protéique.

Ces expériences d'exploration phénotypique et moléculaire permettent donc de conclure que les mutations identifiées dans le facteur RTEL1 semblent être hypomorphes, conduisant au développement de ces cas de HHS.

- ***Les études structurales permettent de caractériser de nouveaux domaines au sein de la protéine RTEL1***

Des prédictions bioinformatiques par le logiciel Polyphen-2 déterminent que les mutations caractérisées sont probablement dommageables. Les analyses structurales mettent en évidence que les mutations sont situées à des positions pour lesquelles on trouve des mutations responsables de différents syndromes (le syndrome « *Xeroderma Pigmentosum* », XP – le syndrome de Cockayne, CS – et enfin la « *TrichoThioDystrophy* », TTD) dans XPD, un membre de la même famille de protéines (*figure 33*).

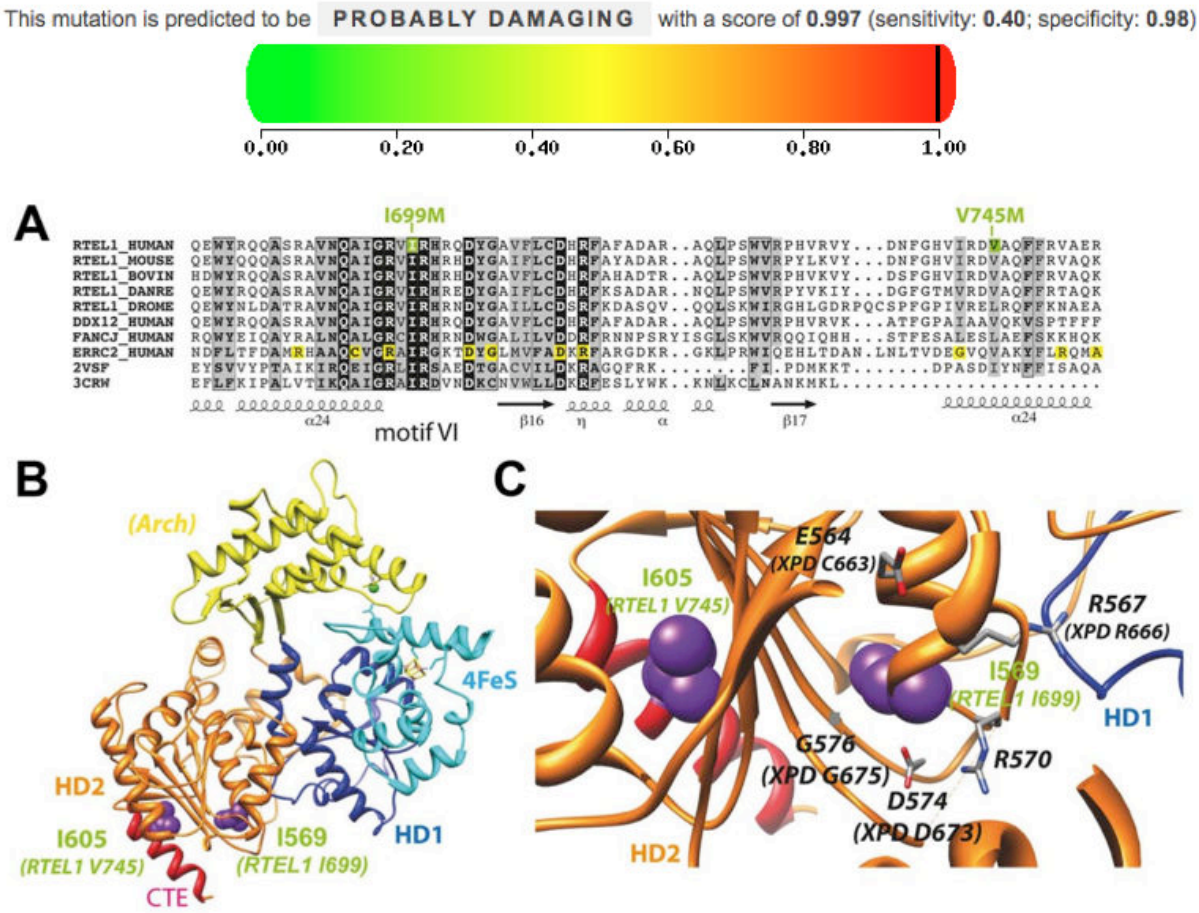



***Figure 33 :*** a/ Les prédictions bio-informatiques de l'impact des mutations sont « hautement dommageables » avec un score entre 0,967 et 1 (cas de la mutation c.2233G>A). b/ Analyse structurale de la protéine RTEL1 en alignement avec les différents orthologues de l'homme, avec les mutations I699M et V745M apparaissant dans le cœur catalytique de l'enzyme. Ces études sont faites par analogie avec les protéines de la famille XPD.

Outre les domaines connus tel que le domaine 4Fe(S), les domaines HD1 et HD2, et les deux boîtes PIP, l'analyse structurale par l'approche de regroupement de clusters hydrophobes (« *Hydrophobic Cluster Analysis* ») (*figure 34*), a permis de mettre en évidence l'existence de deux nouveaux motifs. Il s'agit tout d'abord d'un domaine dit RING (« *Reality Interested Novel Gene* »), spécifique de l'isoforme de 1300 aa, dont l'activité serait soit d'ubiquitiner des substrats cibles dont la nature reste à déterminer, soit d'interagir avec d'autres facteurs. Le

second motif caractérisé est composé de deux domaines « Harmonin » en tandem, probablement impliqué dans la structuration d'une plateforme d'interaction avec d'autres facteurs, là aussi à identifier.

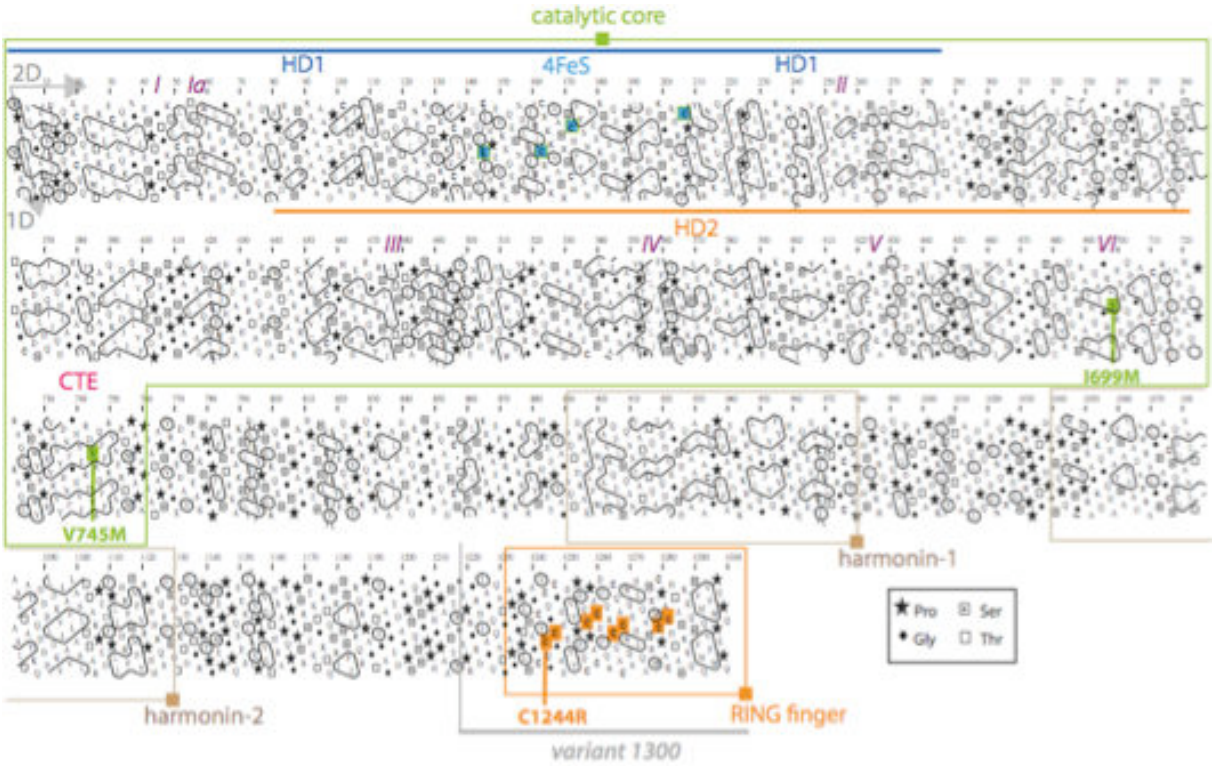



***Figure 34 :*** Analyse bio-informatique et structurale par identification de clusters hydrophiques (méthode dite « *Hydrophobic Cluster Analysis* » notée HCA), mettant en évidence dans la partie C-terminale de l'isoforme longue de RTEL1, un nouveau domaine sans doute engagé dans l'ubiquitination de protéines cibles, dit RING (« *Reality Interesting New Gene* »), ainsi que de 2 domaines harmonin, aux fonctions inconnues.

### ❖ *La surexpression de RTEL1 est toxique pour les cellules des patients*

Les défauts phénotypiques et moléculaires mis en évidence par différentes approches expérimentales dans les cellules de patients apparaissent être causées par les mutations identifiées dans le gène RTEL1. Néanmoins, pour valider fonctionnellement l'implication de cette hélicase de l'ADN dans ces formes de déficiences humaines, des expériences de complémentation par surexpression ectopique de la forme sauvage de RTEL1 ont été réalisées (*Figure 35*). Les vecteurs d'expressions utilisés sont des constructions rétrovirales comportant

une cassette de sélection à la puromycine. Malheureusement, ces tentatives ont échoué à plusieurs reprises. On peut voir que la simple transduction rétrovirale d'un vecteur vide conduit à une mortalité marquée des fibroblastes de patients, révélant la grande fragilité de ces cellules. De plus, la transduction des différents vecteurs exprimant la forme entière de RTEL1 sauvage, avec ou sans un domaine de déstabilisation (utilisé pour réduire le niveau d'expression de RTEL1), engendre une mortalité très prononcée aussi bien dans les cellules contrôles que celles du patient. Ces résultats indiquent que la surexpression de RTEL1 dans les cellules humaines est donc extrêmement toxique. Par conséquent, les expériences de complémentation fonctionnelle n'ont pu être réalisées dans les cellules de patients.

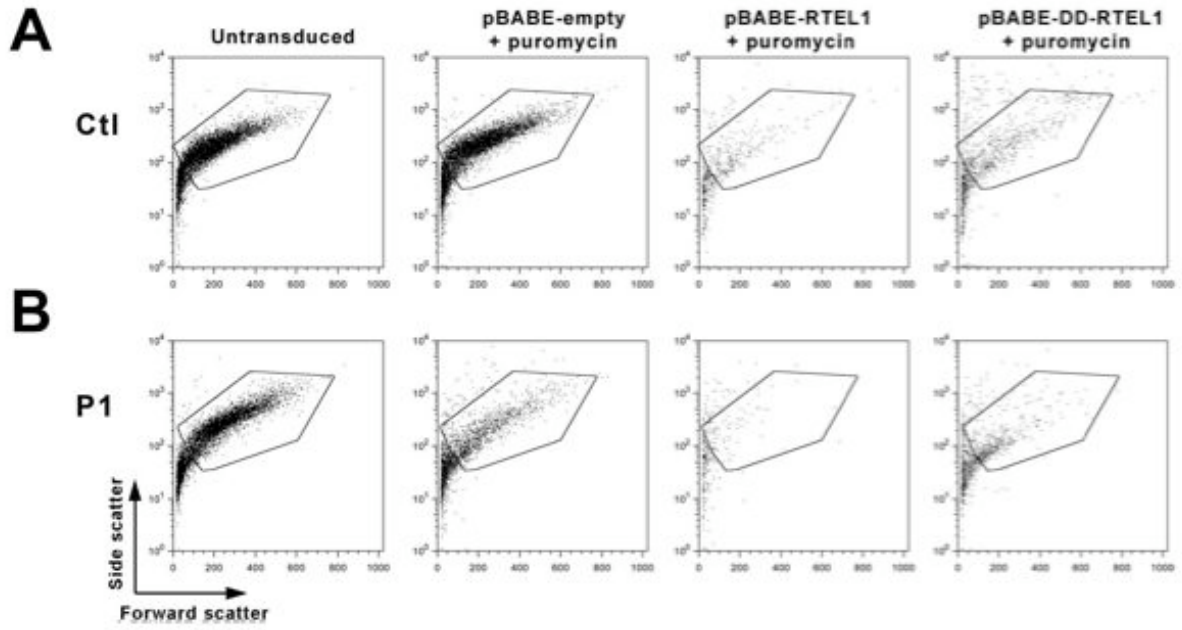



***Figure 35 :*** Tentative de complémentation fonctionnelle avec surexpression ectopique de vecteurs rétroviraux exprimant la forme sauvage de RTEL1 dans les fibroblastes primaires d'un contrôle (**a**) et du patient P1 (**b**).

Par ailleurs, des études fonctionnelles menées dans les modèles du ver nématode *Caenorhabditis elegans*, ainsi que dans les MEFs (« *Mouse Embryonic Fibroblasts* ») et les cellules souches embryonnaires ES (« *Embryonic Stem cells* ») de la souris « *Knock-Out* » conditionnelle ont permis de préciser certaines fonctions de RTEL1. *In-vitro*, cette hélicase

agit en tant qu' « anti-recombinase » homologue en dissociant les structures intermédiaires de la recombinaison comme la boucle D *(Barber et al., 2008)* et intervient dans la régulation de la fréquence des recombinaisons méïotiques *(Youds et al., 2010)*. De plus, la prise en charge de la réparation de certaines lésions de l'ADN requiert la présence de RTEL1 *(Barber et al., 2008) (Uringa et al., 2011) (Uringa et al., 2012)*. Il a été aussi démontré que RTEL1 était un acteur crucial dans la régulation et la maintenance de la longueur des télomères chez la souris *(Uringa et al., 2011)*. Enfin, dernièrement, il a été proposé que RTEL1 pouvait permettre le dépliement de la boucle T au cours de la réplication des télomères. En effet, une déficience en RTEL1 dans les MEFs ou dans des cellules humaines inactivées pour RTEL1 par ARN interférents, provoque l'excision des boucles T par des endonucléases dont SLX4, générant des cercles T *(Vannier et al., 2012)*. Enfin, des polymorphismes chez l'homme dans des régions non codantes de RTEL1 sont associés au développement de cancers dont des gliomes sévères *(Wrensch et al., 2009) (Egan et al., 2011) (Liu et al., 2010)*, ce qui peut être mis en parallèle au développement de tumeurs hépatiques chez les souris transgéniques Rtel1 *(Wu et al., 2012)*, les défauts de cette hélicase de l'ADN pouvant être à l'origine d'une susceptibilité aux cancers.

- ***Le raccourcissement des télomères des patients n'est pas associé à une augmentation des cercles T générés par l'excision des boucles T***

L'importance de cette hélicase de l'ADN dans le déroulement des régions télomériques au cours de la réplication terminale a été évoquée. Cet aspect est à l'heure actuelle débattu et fait l'objet de controverse. En effet, des études effectuées à partir de fibroblastes embryonnaires de souris déficientes démontrent qu'il y a une augmentation de l'excision inappropriée des boucles T au cours de la réplication, mécanisme assuré par certaines endonucléases, notamment SLX4 *(Vannier et al., 2012)*. Ces excisions de boucles sont à l'origine de

formation de cercles T, qui peuvent être amplifiées par une polymérase particulièrement robuste et processive, la phi29 : cette approche expérimentale correspond à la technique dite du TCA (« *T Circle Amplification* »). Une autre approche permet de discriminer la taille des télomères et leur conformation, à partir d'ADN génomique : il s'agit de gel à 2 dimensions. Contrairement à ce qui avait été rapporté par Vannier et col. en utilisant la technique de TCA, Uringa et col. ne retrouvent pas d'augmentation de cercles T en utilisant le gel 2D à partir d'ADN de cellules souches embryonnaires (ES) invalidées pour RTEL1 ***(Uringa et al., 2011)***. Afin de savoir si les cellules humaines déficientes en RTEL1 présentaient une augmentation de cercles T, nous avons réalisé ces mêmes études (*figure 36*). Que ce soit dans des fibroblastes SV40 ou dans une population de lymphocytes T activés, et peu importe l'approche expérimentale, l'augmentation de ces cercles T n'a pas été observée dans les cellules de patients. Par conséquent dans nos mains, les pertes télomériques sur 1 ou 2 chromatides, observées dans les cellules RTEL1 mutées, ne sont pas associées à la détection de cercles T.

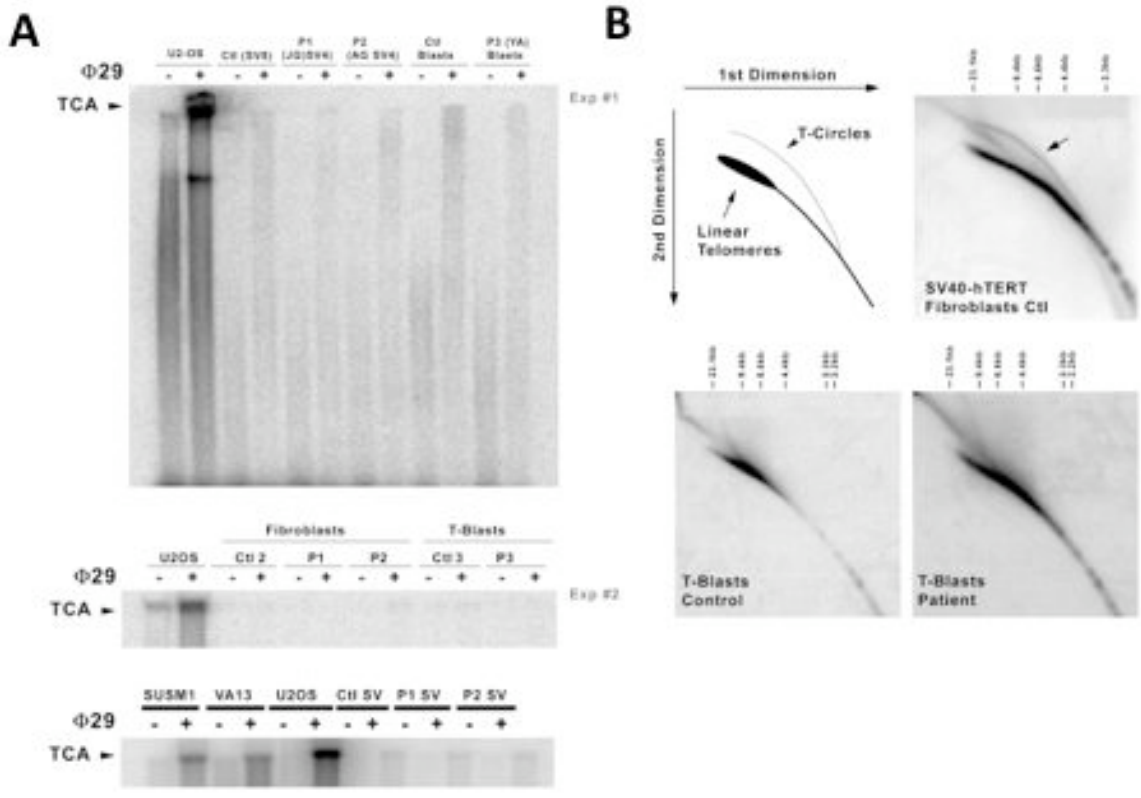


***Figure 36 :*** **a/** « *T circle Amplification* » par utilisation de la polymérase processive Phi29 et migration sur gel d'agarose.
**b/** Gels à 2 dimensions à partir d'ADN génomique de blastes T activés en comparaison à des fibroblastes contrôles transformés par le SV40.

❖ ***Une déficience en RTEL1 est à l'origine de défauts de réparation de l'ADN***

Enfin, un dernier aspect a été investigué : la prise en charge des lésions de l'ADN dans les cellules de patients (*figure 37*). Après traitement des cellules à la MMC, la répartition des cellules au cours du cycle cellulaire (par marquage à l'iodure de propidium pour connaître le contenu 2n et 4n d'ADN) est mesurée. Cette approche montre que les fibroblastes des patients s'accumulent en phase G2, phénotype caractéristique des cellules Fanconi, qui présentent un défaut de prise en charge des ponts inter-brins générés par la MMC.

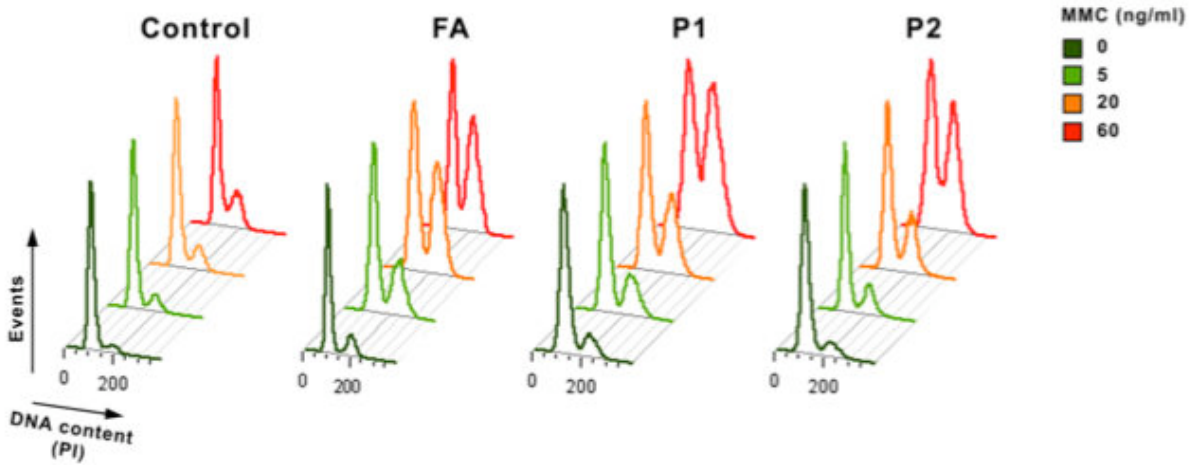



***Figure 37 :*** Analyse G2 / M des fibroblastes primaires des patients RTEL1 en comparaison à un contrôle et à un patient avec une anémie de Fanconi.

- ***Les mutations décrites dans le gène RTEL1 sont associées à différentes formes de déficiences humaines***

RTEL1 est donc un gène participant à la stabilité télomérique chez l'homme. Avec les études de 4 autres laboratoires indépendants publiées également cette année *(Walne et al., 2013) (Ballew et al., 2013a) (Ballew et al., 2013b) (Deng et al., 2013)*, RTEL1 apparaît désormais comme l'un des 8 gènes à vérifier lors du diagnostic clinique des cas de DC ou HHS. Cette identification suggère la nécessité de revenir sur d'anciens patients DC et HHS accumulés dans les nombreuses cohortes et aux causes moléculaires jusqu'alors inconnues, mais dont les tableaux cliniques et phénotypiques seraient similaires aux patients RTEL1 décrits. La portée de ce travail serait de systématiser le séquençage du gène lors des étapes de diagnostic clinique. Parmi les 40 % de DC pour lesquels des études ont été publiées sans cause génétique, reprendre ces patients et séquencer le gène RTEL1 pourrait permettre d'identifier de nouvelles mutations et éventuellement des domaines inconnus affectés au sein de la protéine. Les mutations décrites chez nos 3 patients (et les 15 autres patients DC et HHS recensés à ce jour), semblent être hypomorphes. En effet, bien que le phénotype des patients déficients en RTEL1 est sévère, il n'est pas létal contrairement au modèle KO murin, qui est létal au cours de l'embryogénèse *(Ding et al., 2004) (Wu et al., 2012)*. Bien qu'il y ait moins de protéines RTEL1 chez les patients pour lesquels a eu lieu la mesure par Western-Blot, la protéine résiduelle mutée conserverait peut être certaines fonctionnalités (renforçant le trait hypomorphe des mutations).

De plus, les tentatives de complémentation *in-vitro* menées dans les fibroblastes ou les blastes T activés, par surexpression ectopique d'une forme sauvage de RTEL1, n'ont pas donné de résultats exploitables. Différents vecteurs ont pourtant été générés, certains sous contrôle de

promoteur relativement faible, tout en possédant pour certaines constructions un marqueur de sélection, ou un domaine déstabilisant RTEL1 (l'ajout d'un ligand, le « Shield 1 » garantissant la non-dégradation de la protéine, pour contrôler son expression dite conditionnelle). Grâce à la présence d'une cassette de résistance à la puromycine, il nous a été possible d'obtenir une population pure de cellules effectivement transduites. Mais à la suite de ces stratégies de surexpression lentivirale ou rétrovirale, nous concluons que la surexpression de RTEL1 dans les cellules humaines a un effet extrêmement toxique. Cette toxicité est observée aussi bien dans les cellules déficientes en RTEL1 que dans les cellules contrôles, et se manifeste par une très forte mortalité. De plus, nous avons rencontré des difficultés pour effectuer les transductions virales (y compris avec un vecteur vide), du fait de l'extrême fragilité des cellules des patients. Cette observation a déjà été relevée par d'autres équipes *(Vannier et al., 2012) (Deng et al., 2013)*, ce qui tend à démontrer que RTEL1 pourrait être finement régulé, et qu'au dessus d'un certain seuil, cela déclencherait un engagement vers les voies de l'apoptose ou de sénescence réplicative.

Bien que non répertoriées, on peut envisager que des mutations plus délétères de RTEL1 seraient non viables chez l'homme. Par ailleurs, des polymorphismes dans des régions non-codantes - sont associés à l'apparition de cancers (de type hépatiques, gliomes etc ...) *(Wrensch et al., 2009) (Liu et al., 2010)*. Ceci permet d'établir un parallèle avec un modèle murin transgénique pour RTEL1 qui développe également des tumeurs *(Wu et al., 2012)*. A partir d'une souris KO conditionnelle ou transgénique pour RTEL1, il pourrait être intéressant de comparer les caractéristiques sur le plan immunologique, et de relever une éventuelle déficience similaire aux patients DC / HHS.

- ***Le mode d'action précis de RTEL1 aux télomères reste source de débat***

Bien que ses rôles d'anti-recombinase - lors de la méïose et pour gérer les intermédiaires de recombinaison - et de désassembleur de la boucle D soient acceptés, sa fonction précise reste à l'heure actuelle controversée. En effet, plusieurs laboratoires (SJ Boulton, PM Lansdorp, I Dokal, P Revy, Y Tzfaty) ont procédé à la détection des cercles T qui pourraient être excisés au niveau des régions télomériques, en cas de défaut de RTEL1. En s'appuyant sur différents types cellulaires provenant de la souris ou de l'homme (MEFs, cellules ES, fibroblastes, sang), et par 2 approches différentes (gel à migration bi-dimensionnelle, ou amplification des cercles T par polymerase), les résultats divergent. Ainsi, à partir des cellules murines, des auteurs démontrent une nette augmentation de la détection de ces cercles, et mettent en évidence que la nucléase SLX4 entre autres, facilite l'excision de ces structures ***(Vannier et al., 2012)***. A l'inverse dans les cellules souches embryonnaires, ainsi que pour certains patients HHS décrits ***(Uringa et al., 2012) (Deng et al., 2013) (Le Guen, données non publiées)***, la détection par gel 2D ne permet pas d'observer une augmentation des cercles T. De même, en utilisant une polymérase particulièrement robuste et processive, la Phi29, l'amplification des cercles par TCA (« *T Circle Amplification* ») révèle une augmentation du signal chez certains patients ***(Walne et al., 2013)***, alors que par cette même approche, nous n'avons pas observé de TCA dans les cellules de patients. Cela peut être dû soit à des différences de détection des 2 approches expérimentales (notion de seuil), soit aux types de mutations différentes du gène RTEL1 parmi les patients, qui n'auraient pas les mêmes conséquences cellulaires. Indépendamment de l'excision des boucles T, on peut envisager qu'un défaut de RTEL1 pourrait stabiliser ou induire la formation de boucle T. Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons entamé une collaboration avec l'équipe d'Eric LE CAM (Institut Gustave ROUSSY – UMR8126 – Villejuif), pour estimer la fréquence de

boucles T présentes dans des fibroblastes contrôles et de patients, par microscopie électronique à transmission (« MET »).

- ***L'éventuelle relation de RTEL1 avec le complexe télomérase***

Les résultats obtenus à partir des fibroblastes télomérisés après l'expression ectopique de la sous-unité catalytique hTERT (*figure 38*), sont similaires aux données générées dans ces mêmes fibroblastes transformés par l'antigène grand T. La similarité de phénotype entre les 2 types cellulaires conforte l'idée que les caractéristiques cellulaires et moléculaires des patients étudiés, sont dues aux mutations de RTEL1. La télomérase hTERT ne permet pas de restaurer des télomères fonctionnels. La régulation de la taille des télomères reste un mécanisme dont le mode d'action est encore largement méconnu. Compte tenu de la taille très réduite des télomères chez les patients, il n'est pas évident que ces anomalies de taille ne soient causées que par les pertes télomériques observées dans les cellules RTEL1 déficientes. On ne peut en effet pas exclure que RTEL1 puisse participer directement ou indirectement à la régulation de l'activité de la télomérase aux télomères. Cette hypothèse a par ailleurs été proposée chez la souris *(Uringa et al., 2012)*.

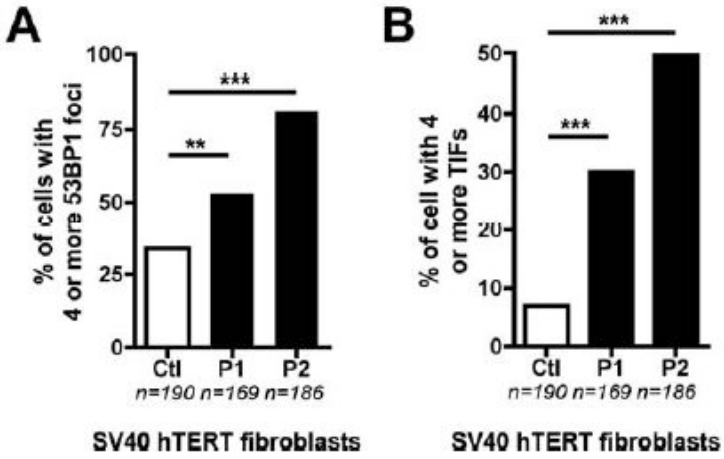



***Figure 38 :*** Analyse des foyers 53BP1 spontanés et des TIFs dans des fibroblastes exprimant stablement hTERT, provenant d'un contrôle et des patients P1 et P2. A/ Analyse quantitative des cellules ayant au moins 4 ou plus foyers 53BP1 par noyau compté. B/ Pourcentage de co-localisation entre les foyers 53BP1 et une sonde télomérique, correspondant aux TIFs dans les noyaux d'un individu contrôle et des patients.

- ***La connexion entre RTEL1 et les facteurs du télosome***

L'une des études démontrant l'implication de RTEL1 dans le HHS *(Deng et al., 2013)*, met en évidence des interactions entre RTEL1 et la Shelterin TRF1. En effet, des études de co-immunoprécipitation apporte la preuve que RTEL1 interagit avec TRF1, comme le suggérait déjà de précédents travaux *(Sfeir et al., 2009)*. RTEL1 pourrait avoir un rôle pour évincer les facteurs accrochés sur l'ADN télomérique, au moment du dépliement de la boucle T. TRF1 et RTEL1 pourraient donc interagir hors de la phase de réplication terminale, ce qui permettrait à RTEL1 d'être déjà ancré aux télomères. Nous avons pu tester le niveau d'expression des facteurs Shelterin dans les cellules des patients déficients en RTEL1, afin de mesurer une éventuelle influence de régulation par RTEL1 sur ce complexe (*figure 39*). L'analyse par Western-Blot indique qu'un défaut en RTEL1 n'a pas d'impact sur l'expression de chacune des Shelterin.

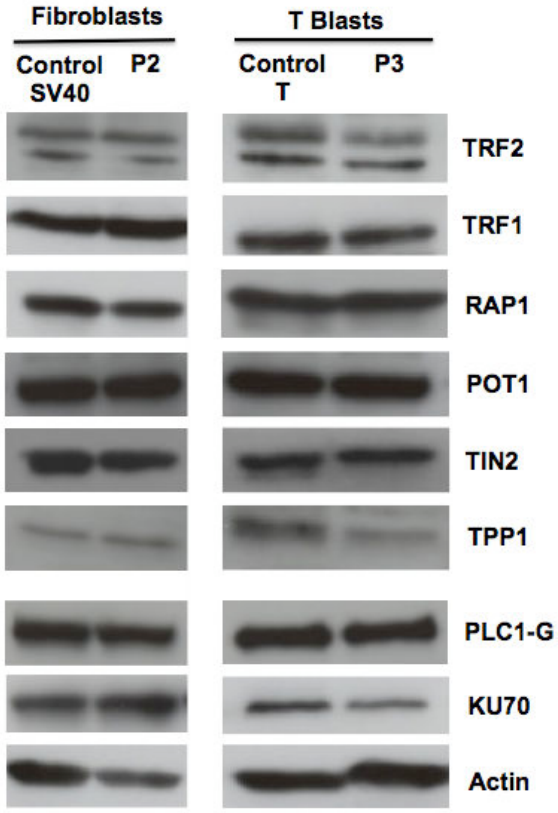



***Figure 39 :*** Niveau d'expression protéique des 6 facteurs Shelterin, dans des fibroblastes transformés SV40 et blastes T activés de contrôles et des patients P2 et P3. Les détections de PLC1-g, Ku70 et de l'actine servent de contrôles de charge.

Des études plus approfondies sur la localisation de RTEL1 au cours du cycle cellulaire, par des approches de synchronisation cellulaire et d'immunofluorescence pourront être tentées à l'aide de l'anticorps dirigé contre RTEL1, développé par le laboratoire d'Arturo LONDONO-VALLEJO (Institut Curie, UMR3244). Dans la même idée, poursuivre les expériences biochimiques de co-immunoprécipitation de RTEL1 avec les autres membres du complexe Shelterin, pourrait nous donner des indications sur sa relation et sa présence au niveau du complexe protecteur des télomères.

- ***RTEL1, « balanceur » ou acteur directement impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN ?***

Il sera important de poursuivre les investigations sur l'engagement de RTEL1 au cours des processus de réparation de l'ADN. En effet chez les patients déficients, les résultats obtenus au laboratoire suggèrent que les cellules ne gèrent plus correctement la réparation de certains dommages de l'ADN. Ceci se traduit entre autre par une sensibilité accrue aux agents génotoxiques (la MMC et dans une moindre mesure la phléomycine), et par un blocage des cellules non-réparées en transition G2 / M après traitement à la MMC. Préciser son intervention au cours des voies de la RH et du NHEJ, ou peut être même de son implication dans le choix d'utilisation des voies de réparation, est un objectif important. Des résultats préliminaires indiquent qu'un substrat de réparation de cassures franches du double brin d'ADN est réparé préférentiellement par l'utilisation des micro-homologies environnantes (MMEJ) au détriment du NHEJ, dans les cellules déficientes en RTEL1 comparativement aux cellules sauvages. De même, avec un autre type de substrat permettant d'évaluer la fréquence de réparation par conversion génique (« *Gene Conversion* » dit GC, via le processus du « *Single Strand Annealing* » ou SSA), une augmentation de ce type de réparation a été observée dans un contexte RTEL1 déficient. Cela corrobore le rôle anti-recombinase décrit

pour RTEL1 dans les autres organismes modèles. De plus, certaines explorations des échanges entre chromatides sœurs par RH en niveau endogène ***(Ballew et al., 2013a) (Le Guen, données non publiées)***, montrent que quelques mutations favorisent la génération d'échanges entre chromatides soeurs dans un contexte de déficience de cette hélicase. Ces données renforceraient l'importance de RTEL1, également à l'échelle du génome. Par ailleurs, il a été démontré que la protéine murine était capable de colocaliser avec 53BP1 et FancD2. Etant donné l'effet toxique de la surexpression de RTEL1 dans les fibroblastes des patients, des stratégies avec des constructions de RTEL1 sauvage et muté en fusion avec des tags fluorescents, n'apparaissent pas être les meilleures stratégies. De ce fait, une approche par microscopie confocale détectant RTEL1 endogène, sera prioritairement mise en place. Pour analyser le mode de fonctionnement de RTEL1 dans la réparation de l'ADN, des expériences de micro-irradiation laser en microscopie confocale (dits « *laser-foci* ») pourraient permettre d'une part de mettre en évidence un éventuel recrutement direct de RTEL1 aux sites de dommages, et d'autre part un retard ou une absence de « focalisation » de RTEL1 aux dommages au sein des cellules de patients mutés. La très nette baisse d'efficacité de prise en charge des dommages de l'ADN pourrait être accompagnée d'un retard dans la signalisation post-détection de la cassure double brin, ou peut être d'une mauvaise localisation de RTEL1. De plus, nous avons pu obtenir des fibroblastes embryonnaires de souris (« *Mouse Embryonic Fibroblasts* » ou MEFs), provenant du laboratoire de Simon J. BOULTON (Cancer Research Center, Londres UK), dont le gène RTEL1 peut être délété de façon conditionnelle en exprimant la recombinase Cre. Cela permettra de comparer l'implication de RTEL1 dans la réponse aux dommages de l'ADN entre les cellules humaines et murines en utilisant les mêmes tests.

- ***L'implication de RTEL1 au cours de la réplication des télomères***

Par ailleurs, l'association de foci spontanés 53BP1 et d'une sonde télomérique, ainsi que les échanges de chromatides sœurs aux télomères (visibles par des analyses de co-FISH), sont le reflet de problèmes de réplication affectant majoritairement le brin avancé de la réplication. Cela suggère une fonction de RTEL1 au cours de la réplication. Cette hélicase permettrait l'avancée optimale du réplisome au niveau du brin avancé, en ayant un rôle plus ou moins direct dans cette progression. RTEL1 pourrait revêtir un rôle de garant de la réplication en intervenant en cas de problème réplicatif, comme par exemple lorsque les fourches sont bloquées ou effondrées. Les structures aberrantes seraient donc résolues par RTEL1 pour permettre le redémarrage du réplisome. De plus, la présence de motifs PIP dans la partie C-terminale de RTEL1, permettant l'interaction avec PCNA (impliqué directement dans la réplication notamment), tend à suggérer une coopération directe de RTEL1 avec PCNA au cours de la réplication. Celle-ci pourrait être cyclique avec une haute affinité au cours de l'avancée du réplisome, en particulier au cours de la réplication télomérique. Par les analyses en co-FISH, on note néanmoins une absence de signes relatifs à la fragilité télomérique, puisque nous ne relevons pas de présence de signaux télomériques multiples, de signaux interstitiels ou bien encore de fusion télomérique ou entre chromosomes voisins. Les régions télomériques étant difficiles à répliquer, RTEL1 aurait aussi un rôle à jouer lors du déroulement des quadruplexes riches en guanine au niveau de l'ADN télomérique. La résolution de ces structures tridimensionnelles faciliterait la progression du réplisome. Afin d'évaluer l'implication de RTEL1 au cours de la réplication, nous réaliserons par exemple, un essai basé sur la technique de peignage moléculaire. Grâce à l'incorporation au cours de la réplication des analogues de bases IdU et CldU, on peut analyser différents paramètres de réplication (mesure de la vitesse des fourches, des distances inter-origine, présence de fourches asymétriques ***(Mokrani-Benhelli et al., 2012)***. L'ajout d'un stress réplicatif exogène,

comme l'hydroxyurée ou l'aphidicoline, pourra permettre d'analyser l'implication de RTEL1 au cours de ces processus.

- ***De nouveaux domaines de RTEL1 aux rôles encore inconnus***

La forme longue de RTEL1 possède 2 motifs PIP dans la partie C-terminale de la protéine qui encadrent le domaine RING que nous avons identifié. Ceci suggère que RTEL1, via son domaine RING, par analogie avec celui présent dans la protéine BMI-1, pourrait avoir des activités de transfert d'ubiquitine vers des substrats cibles à identifier. Pour vérifier l'éventuelle activité d'ubiquitination de RTEL1, une approche expérimentale par expression de RTEL1 et de domaines de RTEL1 en fusion avec la GST (« *Glutathione S-Transferase* ») va pouvoir être mise en place, afin de réaliser des analyses d'ubiquitination *in-vitro*. De plus, de par la proximité des domaines PIP et RING, des activités coordonnées ou dépendantes de ces 2 types de domaines n'est pas à exclure. Par ailleurs, en collaboration avec I. CALLEBAUT (*UPMC, Université Paris VI*), nous avons pu identifier la présence de deux autres motifs particuliers, dits « Harmonin », susceptibles de permettre des interactions avec des protéines à identifier (***Faure G, Proteins – 2013, in press***). L'utilisation des domaines couplés à la GST pourra également permettre de réaliser des « *GST pull-down* » afin d'identifier des interactants. D'autre part, il y a prédominance de 2 isoformes de RTEL1 dans les cellules humaines, l'isoforme longue (1300 acides aminés) diffère de la forme plus courte (1219 aa) par le RING et les PIP. Vu l'identité de séquence qu'il existe entre les 2 isoformes, l'activité hélicase apparaît conservée, de même que le signal d'import nucléaire, et les Harmonin. En revanche, l'éventuelle activité d'ubiquitination et l'intéraction avec PCNA est spécifique de l'isoforme longue. Enfin, un motif répété BRCA2 a été récemment identifié dans une autre isoforme (1400 aa) prédictive. L'interaction entre RTEL1 et BRCA2 pourrait avoir lieu au cours de la recombinaison homologue. Globalement, cela suggère des

spécificités d'action différentes pour chacune des isoformes identifiées. Des surexpressions de chacune des isoformes sauvages ou mutées dans les domaines identifiés, ou bien des stratégies d'ARN interférence ciblant l'une ou l'autre des isoformes, pourraient permettre de conclure (la surexpression me parait compromise e-étant donné la toxicité de RTEL1 surexprimé).

- ***L'importance des hélicases de l'ADN dans la stabilité du génome***

De très nombreuses hélicases de l'ADN ont une fonction essentielle dans la stabilité et la maintenance du génome, et ce grâce à leur participation au cours de la réplication, la recombinaison, la réparation ***(Brosh, 2013)***, la transcription et la ségrégation des chromosomes. On peut citer parmi les nombreuses hélicases, BLM, ChiR1, FancJ, RecQ, XPD et WRN, à l'origine de formes syndromiques sévères. RTEL1, qui appartient à la famille des hélicases SF2 avec un cluster Fe(S), apparaît donc à ce jour comme un acteur crucial du maintien des télomères, et plus généralement comme un garant de la stabilité du génome. Son mode de fonctionnement et sa participation aux mécanismes de réplication et de réparation de l'ADN reste à préciser,, mais il est d'ores et déjà clair que RTEL1, tout comme de nombreuses autres hélicases, a une importance particulière dans le bon fonctionnement et le maintien du support génétique.

## Identification d'une cause moléculaire d'un déficit immunitaire associant alymphocytose B, dyshématopoïèse et défaut de réparation de l'ADN

❖ ***Caractéristiques cliniques du patient***

En parallèle du travail sur l'exploration des dysfonctions en RTEL1, l'investigation d'un autre patient a été réalisée, celui-ci présentant un tableau clinique assez atypique. Le patient est un petit garçon issu d'une famille avec une double boucle de consanguinité (*figure 40*). Ce patient a présenté à la naissance un retard de développement généralisé, touchant en particulier son périmètre crânien

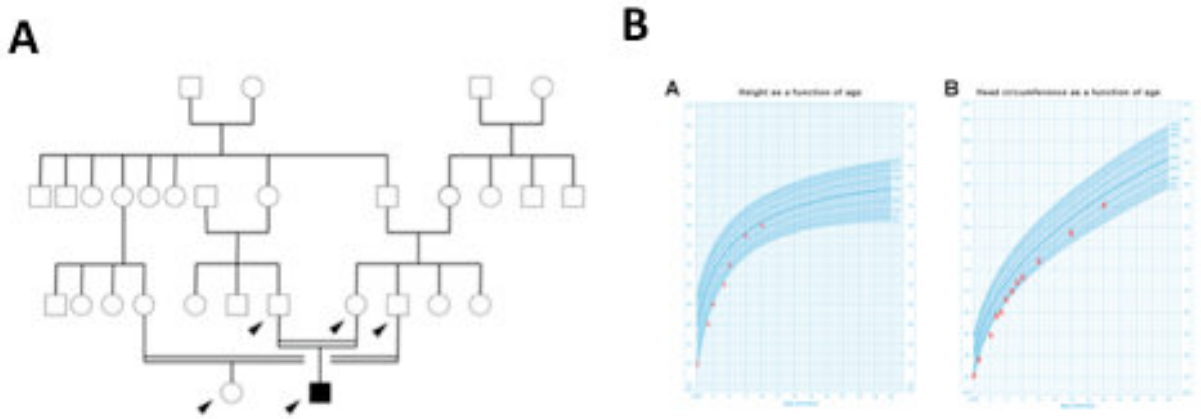



***Figure 40 :*** **a/** Phylogénie de la famille du malade, issu d'une double boucle de consanguinité. **b/** Graphiques représentant l'évolution des courbes de taille et de la circonférence de la tête durant la première et les deux premières années respectivement.

Par ailleurs, le patient présente des anomalies immuno-hématologiques sévères (*table 3*). En effet, l'exploration phénotypique révèle une anémie arégénérative (hémoglobines et réticulocytes bas), et une leucopénie grave (neutrophiles et lymphocytes bas), mais surtout une absence totale de lymphocytes B circulants (alymphocytose B).

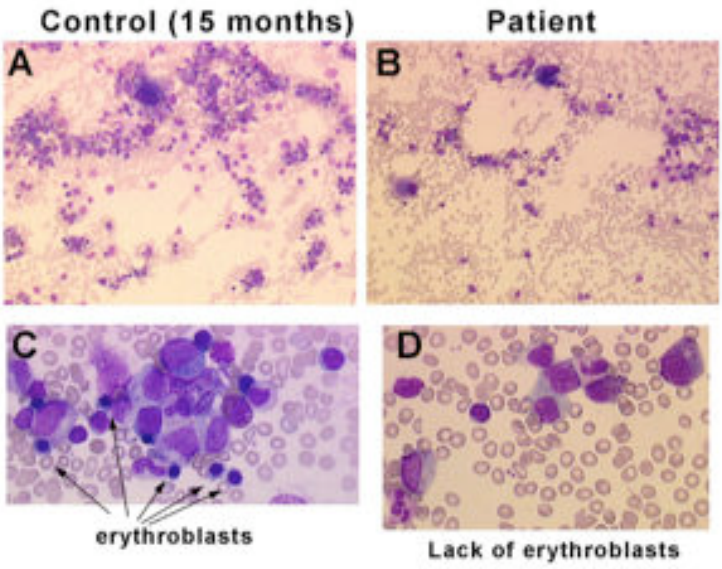
**TABLE I. Immunohematologic features of the patient at 4 months of age.**

| | |
|---|---|
| White Cell Count | 2900 /µL (6000–17500) |
| Polymorphonuclear Neutrophils | 700 /µL (1000-8500) |
| Lymphocyte | 1300 /µL (2700-13500) |
| Haemoglobin | 7.5 g/dL (11.5-13.5) |
| Platelets /µL | 249000 /µL (150000-500000) |
| T Cell population | |
| $CD3^+$ | 1183 /µL (2500–5600) |
| $CD4^+$ | 585 /µL (1800–4000) |
| $CD8^+$ | 481 /µL (590–1600) |
| $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ (%) | 17 (60–72) |
| B cell $CD19^+$ | 0 /µL (430–3000) |
| Natural killer $CD56^+CD16^+$ cells - | 130 (170–830) |
| T-cell proliferation- $\times 10^3$ cpm | |
| PHA | 38 (>50) |
| Seric Immunoglobulin levels | |
| IgG | 1.94 g/L (2.35 - 4.37) |
| IgA | <0.06 g/L (0.2 - 0.62) |
| IgM | <0.04 g/L (0.34 - 0.95) |

For all values, normal range or normal threshold are indicated in brackets. PHA, Phytohemagglutinin

***Table 3 :*** Paramètres immuno-hématologiques du patient à l'âge de 4 mois.

De plus, l'analyse de la moelle osseuse (*figure 41*) met en évidence une « hypo-cellularité » et révèle que les précurseurs érythrocytaires sont particulièrement pauvres chez le patient comparé à un contrôle sain. Des tests de différenciation *in-vitro* rapportent une réduction des progéniteurs granulo-monocytaires (CFU-GM) de la moelle, ainsi que de certains précurseurs érythroïdes (BFU-E), comparé à un contrôle sain.




E

Colony-forming cell (CFC) assays using 15000 mononuclear cells from bone marrow samples

| | Control (healthy adult) | Patient |
|---|---|---|
| CFU-E | 4 | 4 |
| BFU-E | 13 | **0** |
| CFU-GM | 31 | **11** |

***Figure 41 :*** **a-d/** Frottis de la moelle avec coloration violette en Giemsa May-Grünwald des érythroblastes. **e/** Quantification des cellules mononucléaires de la moelle osseuse, dont les progéniteurs érythroïdes (CFU-E et BFU-E) et les macrophages / granulocytes (CFU-GM).

Les cellules mononuclées issues de la moelle osseuse ont été marquées pour une analyse phénotypique (*figure 42*). On constate que la population de progéniteurs hématopoïétiques CD34+ est très nettement diminuée chez le patient (près de 15 fois), alors que la population CD19+ est réduite (près de 3 fois), comparativement à un donneur sain. De plus, nous remarquons une augmentation de la proportion de double positive CD34+ / CD19+, correspondant au stade de maturation pré-BI. Enfin, la détection des immunoglobulines M révèle que la population simple positive IgM + / CD34 – est en nette baisse, et qu'il y a une majorité de cellules IgM-. Ces résultats suggèrent des anomalies de la maturation et de la différenciation des cellules B.

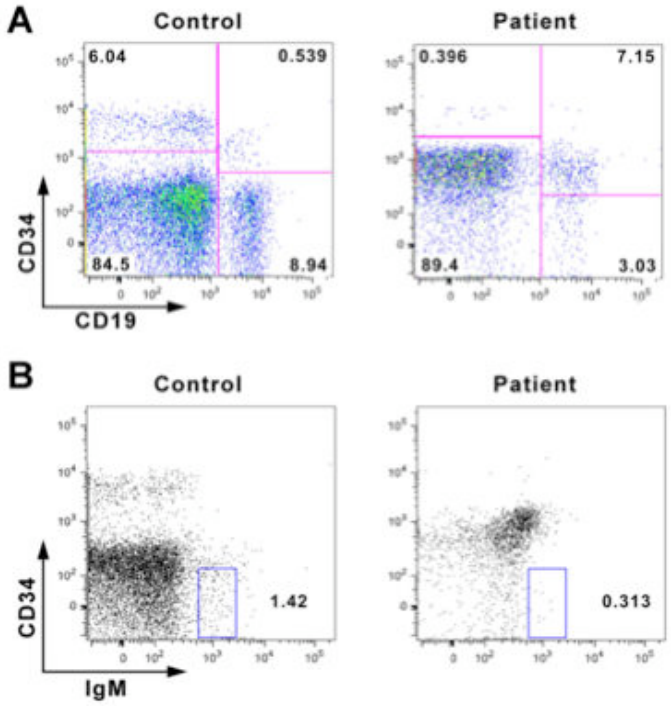



***Figure 42 :*** Marquage des cellules mono-nucléaires issues de la moelle osseuse par détection anti-CD34 couplé au FITC, anti-CD19 couplé à l'APC (**a**) et anti-IgM couplé au PE (**b**). Les pourcentages annotés correspondent aux régions de populations cellulaires sélectionnées.

Compte tenu de la lymphopénie T et d'une diminution importante du taux de lymphocyte T naïfs (CD31+ CD45 RA+), une analyse du répertoire des lymphocytes T a été entreprise (*figure 43 et 44*) en collaboration avec Annick LIM (Institut Pasteur). Celle-ci a révélé que le répertoire du patient (TCR a et b) était normalement diversifié et polyclonal.

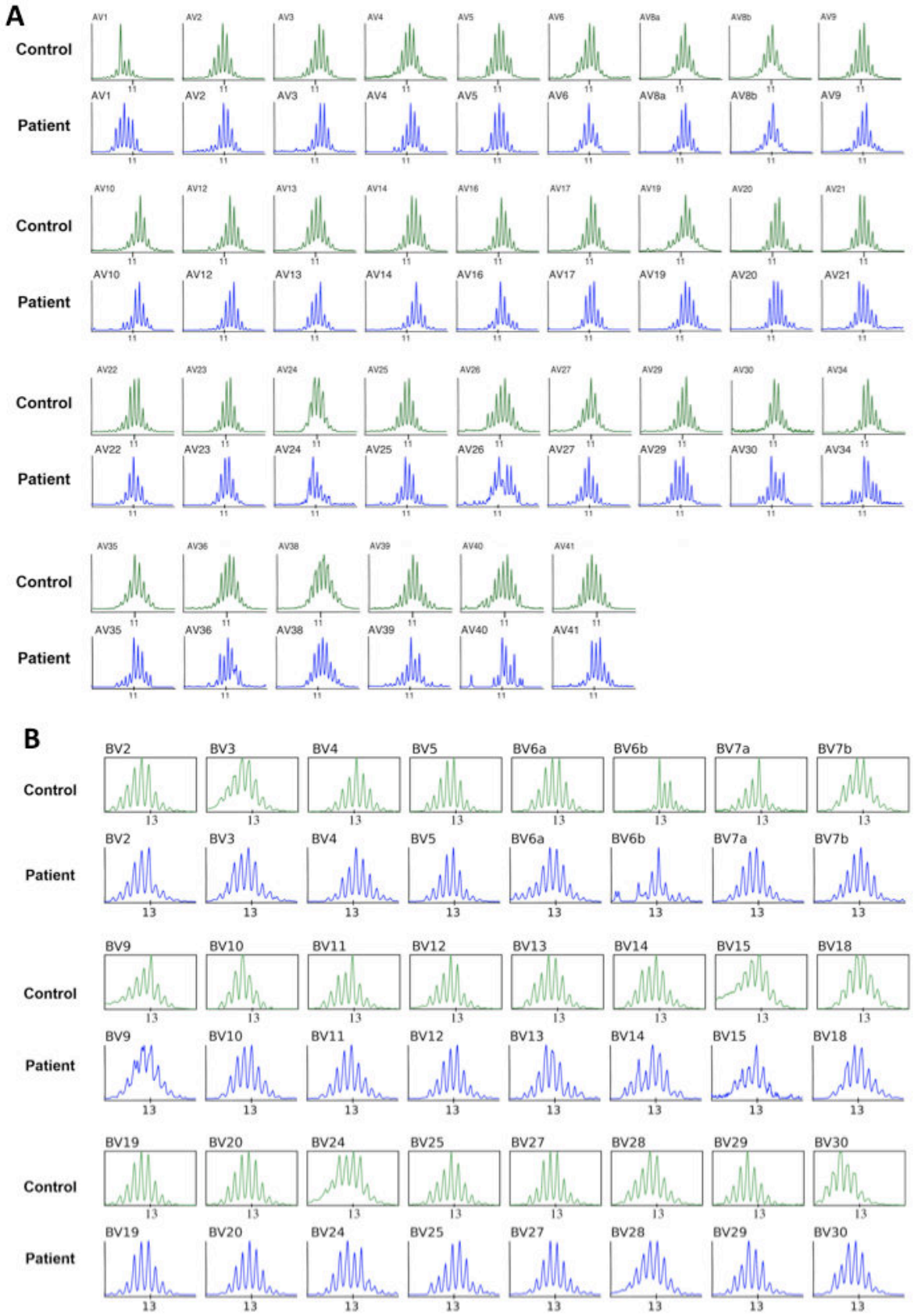
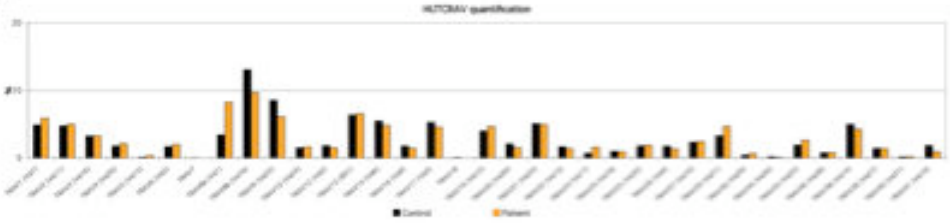



***Figure 43 :*** Immunoscope réalisé à partir de cellules sanguines mono-nucléaires provenant d'un contrôle sain et du patient. Le répertoire des cellules T réceptrices de type a ou b est établi (TRAV (**a**) et TRBV (**b**)).

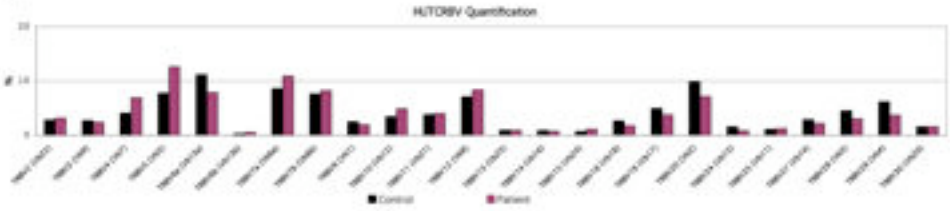
**A**



| Control | | |
|---|---|---|
| Ct | HUTCRVAlpha | % |
| 26,6 | TRAV1 (Va7) | 4,9 |
| 26,6 | TRAV2 (Va11) | 4,8 |
| 27,2 | TRAV3 (Va16) | 3,3 |
| 28,0 | TRAV4 (Va20) | 1,9 |
| 31,9 | TRAV5 (Va15) | 0,1 |
| 28,1 | TRAV6 (Va3) | 1,7 |
| 34,8 | TRAV7 | 0,0 |
| 27,1 | TRAV8a (Va1) | 3,4 |
| 25,2 | TRAV8b (Va10) | 13,1 |
| 25,8 | TRAV9 (Va22) | 8,6 |
| 28,3 | TRAV10 (Va24) | 1,5 |
| 28,0 | TRAV12 (Va2) | 1,8 |
| 26,2 | TRAV13 (BV1) | 6,4 |
| 26,4 | TRAV14 (Va6) | 5,5 |
| 28,1 | TRAV16 (Va9) | 1,8 |
| 26,5 | TRAV17 (Va3) | 5,3 |
| 32,5 | TRAV18 | 0,1 |
| 26,9 | TRAV19 (Va12) | 4,0 |
| 27,8 | TRAV20 (Va30) | 2,1 |
| 26,5 | TRAV21 (Va23) | 5,1 |
| 28,1 | TRAV22 (Va13) | 1,7 |
| 29,4 | TRAV23 (Va17) | 0,7 |
| 28,9 | TRAV24 (Va18) | 1,0 |
| 28,0 | TRAV25 (Va32) | 1,8 |
| 28,1 | TRAV26 (Va4) | 1,8 |
| 27,7 | TRAV27 (Va10) | 2,4 |
| 27,2 | TRAV29 (Va21) | 3,3 |
| 30,1 | TRAV30 (Va29) | 0,4 |
| 31,0 | TRAV34 (Va26) | 0,2 |
| 28,0 | TRAV35 (Va25) | 1,9 |
| 29,2 | TRAV36 (Va28) | 0,8 |
| 26,6 | TRAV38 (Va14) | 5,0 |
| 28,4 | TRAV39 (Va27) | 1,5 |
| 31,3 | TRAV40 (Va31) | 0,2 |
| 28,0 | TRAV41 (Va19) | 1,9 |

| Patient | | |
|---|---|---|
| Ct | HUTCRVAlpha | % |
| 28,0 | TRAV1 (Va7) | 5,9 |
| 28,2 | TRAV2 (Va11) | 5,0 |
| 28,8 | TRAV3 (Va16) | 3,3 |
| 29,4 | TRAV4 (Va20) | 2,1 |
| 32,0 | TRAV5 (Va15) | 0,4 |
| 29,5 | TRAV6 (Va3) | 2,0 |
| 60,0 | TRAV7 | 0,0 |
| 27,5 | TRAV8a (Va1) | 8,3 |
| 27,3 | TRAV8b (Va10) | 9,7 |
| 27,9 | TRAV9 (Va22) | 6,2 |
| 29,8 | TRAV10 (Va24) | 1,6 |
| 29,9 | TRAV12 (Va2) | 1,5 |
| 27,8 | TRAV13 (BV1) | 6,6 |
| 28,3 | TRAV14 (Va6) | 4,8 |
| 30,0 | TRAV16 (Va9) | 1,4 |
| 28,3 | TRAV17 (Va3) | 4,6 |
| 40,9 | TRAV18 | 0,0 |
| 28,3 | TRAV19 (Va12) | 4,7 |
| 29,9 | TRAV20 (Va30) | 1,5 |
| 28,2 | TRAV21 (Va23) | 5,0 |
| 30,0 | TRAV22 (Va13) | 1,4 |
| 29,8 | TRAV23 (Va17) | 1,6 |
| 30,6 | TRAV24 (Va18) | 0,9 |
| 29,6 | TRAV25 (Va32) | 1,9 |
| 30,1 | TRAV26 (Va4) | 1,4 |
| 29,2 | TRAV27 (Va10) | 2,5 |
| 28,3 | TRAV29 (Va21) | 4,7 |
| 31,1 | TRAV30 (Va29) | 0,7 |
| 34,4 | TRAV34 (Va26) | 0,1 |
| 29,1 | TRAV35 (Va25) | 2,6 |
| 30,8 | TRAV36 (Va28) | 0,8 |
| 28,4 | TRAV38 (Va14) | 4,3 |
| 30,1 | TRAV39 (Va27) | 1,4 |
| 32,8 | TRAV40 (Va31) | 0,2 |
| 30,6 | TRAV41 (Va19) | 0,9 |

**B**



| Control | | |
|---|---|---|
| Ct | HUTCRVBéta | % |
| 24,2 | TRBV2 (Vb22) | 2,8 |
| 24,3 | TRBV3 (Vb9) | 2,7 |
| 23,7 | TRBV4 (Vb7) | 4,1 |
| 22,7 | TRBV5 (Vb5) | 7,8 |
| 22,2 | TRBV8a (Vb13a) | 11,2 |
| 27,5 | TRBV8b (Vb13b) | 0,3 |
| 22,6 | TRBV7a (Vb6a) | 8,6 |
| 22,8 | TRBV7b (Vb6b) | 7,8 |
| 24,4 | TRBV9 (Vb1) | 2,5 |
| 23,9 | TRBV10 (Vb12) | 3,5 |
| 23,8 | TRBV11 (Vb21) | 3,8 |
| 22,9 | TRBV12 (Vb8) | 7,1 |
| 25,8 | TRBV13 (Vb23) | 1,0 |
| 25,9 | TRBV14 (Vb16) | 0,9 |
| 26,2 | TRBV15 (Vb24) | 0,7 |
| 24,3 | TRBV18 (Vb18) | 2,7 |
| 23,4 | TRBV19 (Vb17) | 5,0 |
| 22,4 | TRBV20 (Vb2) | 9,9 |
| 25,1 | TRBV24 (Vb15) | 1,6 |
| 25,6 | TRBV25 (Vb11) | 1,1 |
| 24,2 | TRBV27 (Vb14) | 2,9 |
| 23,5 | TRBV28 (Vb3) | 4,5 |
| 23,1 | TRBV29 (Vb4) | 6,2 |
| 25,1 | TRBV30 (Vb20) | 1,6 |

| Patient | | |
|---|---|---|
| Ct | HUTCRVBéta | % |
| 27,0 | TRBV2 (Vb22) | 3,2 |
| 27,4 | TRBV3 (Vb9) | 2,4 |
| 25,5 | TRBV4 (Vb7) | 6,9 |
| 25,0 | TRBV5 (Vb5) | 12,6 |
| 25,7 | TRBV8a (Vb13a) | 7,9 |
| 28,7 | TRBV8b (Vb13b) | 0,5 |
| 25,2 | TRBV7a (Vb6a) | 10,9 |
| 25,6 | TRBV7b (Vb6b) | 8,2 |
| 27,7 | TRBV9 (Vb1) | 1,9 |
| 26,4 | TRBV10 (Vb12) | 4,9 |
| 26,7 | TRBV11 (Vb21) | 4,0 |
| 25,6 | TRBV12 (Vb8) | 8,4 |
| 28,8 | TRBV13 (Vb23) | 0,9 |
| 29,2 | TRBV14 (Vb16) | 0,7 |
| 26,5 | TRBV15 (Vb24) | 1,1 |
| 27,8 | TRBV18 (Vb18) | 1,8 |
| 26,8 | TRBV19 (Vb17) | 3,8 |
| 25,8 | TRBV20 (Vb2) | 7,2 |
| 28,9 | TRBV24 (Vb15) | 0,8 |
| 28,4 | TRBV25 (Vb11) | 1,2 |
| 27,6 | TRBV27 (Vb14) | 2,2 |
| 26,8 | TRBV28 (Vb3) | 3,0 |
| 27,1 | TRBV29 (Vb4) | 3,7 |
| 28,0 | TRBV30 (Vb20) | 1,8 |

***Figure 44 :*** Quantification du répertoire TCR α (**a**) et β (**b**).

❖ ***Les cellules du patient présentent un défaut de réparation de l'ADN***

L'association de défauts développementaux et d'un déficit immunitaire évoquait un possible défaut de réparation de l'ADN comme observé chez les patients déficients en Fanconi, Cernunnos, ADN ligase IV, ou ATM. Afin d'identifier un éventuel défaut dans la prise en charge des dommages de l'ADN, la sensibilité des cellules du patient à différents agents génotoxiques - la MMC et la phléomycine - a été explorée (*figure 45*). Des cellules ont été ensemencées en nombre très faible et mises en présence de ces agents durant 14 jours, afin d'observer leur capacité à former des colonies, suivant la concentration de drogues testées. On constate que les fibroblastes du patient sont hypersensibles à la MMC et à la phléomycine, comparativement aux contrôles positifs de sensibilité (patient Fanconi et patient muté dans le facteur Cernunnos, respectivement). Les lésions de l'ADN générées par ces agents exogènes ne sont donc pas correctement réparées ce qui entraîne une capacité moindre des cellules à générer des colonies.

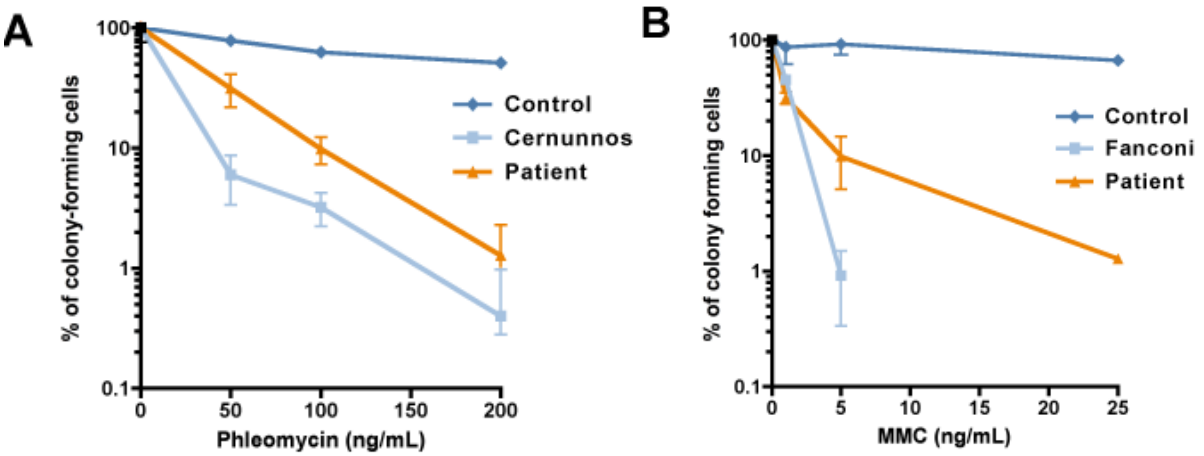



***Figure 45 :*** Test de clonogénie des fibroblastes transformés du patient avec un traitement continu de 14 jours à la mitomycine C ou à la phléomycine. Le pourcentage de colonie formée est représenté en fonction de la dose d'agent génotoxique.

Le défaut de prise en charge des ponts interbrins générés par la MMC dans les cellules du patient a été confirmé par l'analyse de l'accumulation des cellules en G2 (*Figure 46*). En effet,

en culture de fibroblastes primaires (prolifération sans drogue), il y a environ 15% des cellules en phase G2, quelque soit l'individu. Puis avec une gamme croissante de traitement à la MMC, on observe une augmentation des cellules en G2 pour un patient muté dans un des facteurs de la signalisation Fanconi, mais également pour notre patient.

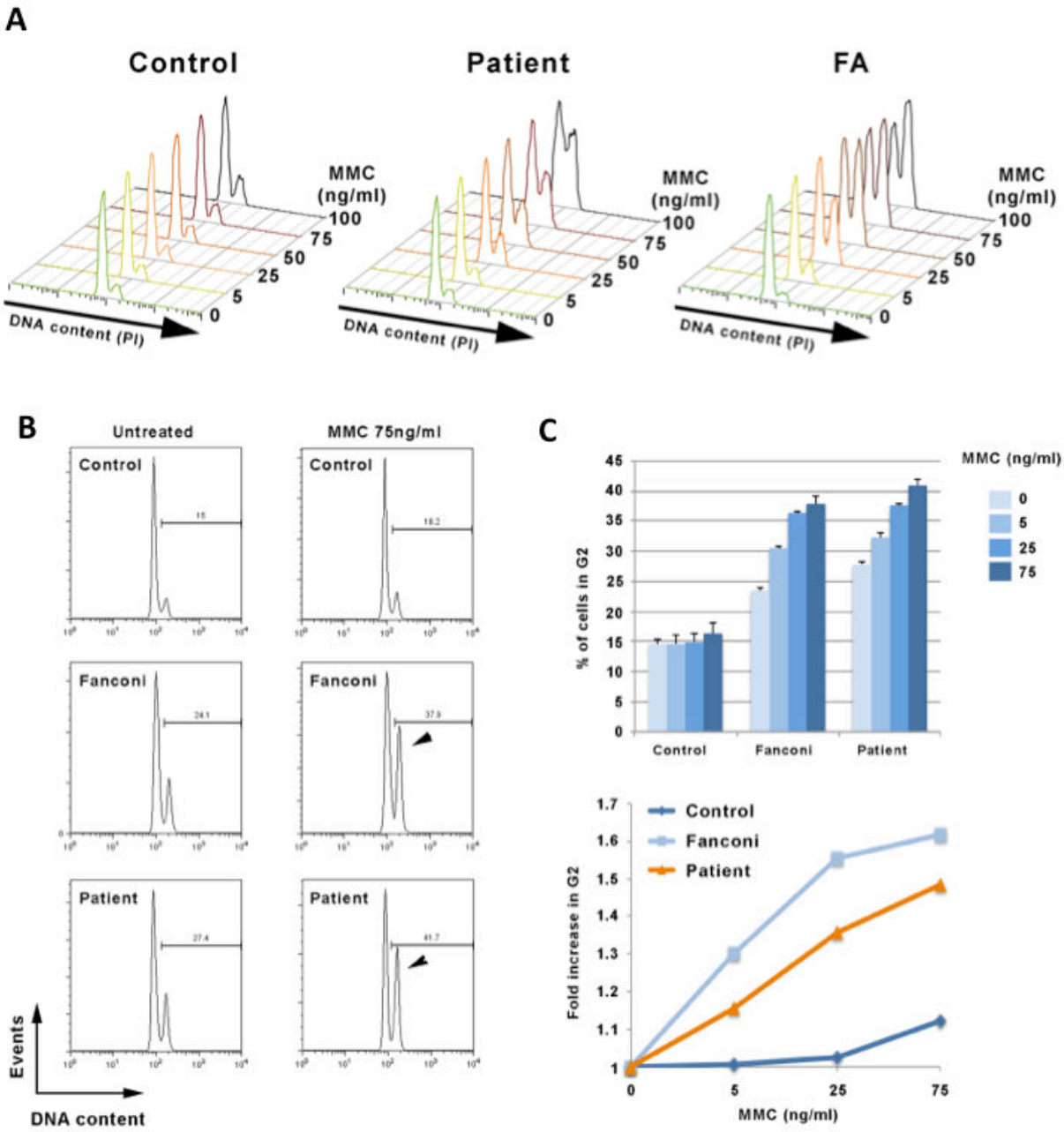



***Figure 46 :*** **a/** Profil d'accumulation des cellules en phase G2 suite à un traitement en doses croissantes de mitomycine C. Les fibroblastes primaires d'un patient Fanconi (FA) muté sont utilisés en tant que contrôle positif d'accumulation en phase G2. **b et c/** Quantification du niveau d'accumulation en phase G2.

Afin de savoir si la sensibilité accrue aux génotoxiques était associée à un défaut de contrôle du cycle cellulaire après dommages de l'ADN, des analyses par FACS ont été effectuées (*figure 47*). L'incorporation de BrdU (analogue de l'uridine) lors de la phase S ou la détection de l'histone H3 phosphorylée (marqueur corrélant avec la compaction des chromosomes en phase G2 / M), nous permettent d'obtenir des données sur l'intégrité ou non des points de contrôle G1 / S et G2 / M, respectivement. Comme attendu, après irradiation gamma, les cellules d'un patient atteint d'ataxie télengiectasie ne s'arrêtent pas au niveau des points de contrôle G1 / S et G2 / M du cycle cellulaire. Comparativement à ce contrôle déficient, les cellules du patient se comportent comme celles d'un individu sain. Bien que le phénotype cellulaire traduit des anomalies au cours de la réparation de l'ADN, nous concluons que cela ne semble pas dû à un défaut de contrôle du cycle cellulaire après dommages de l'ADN.

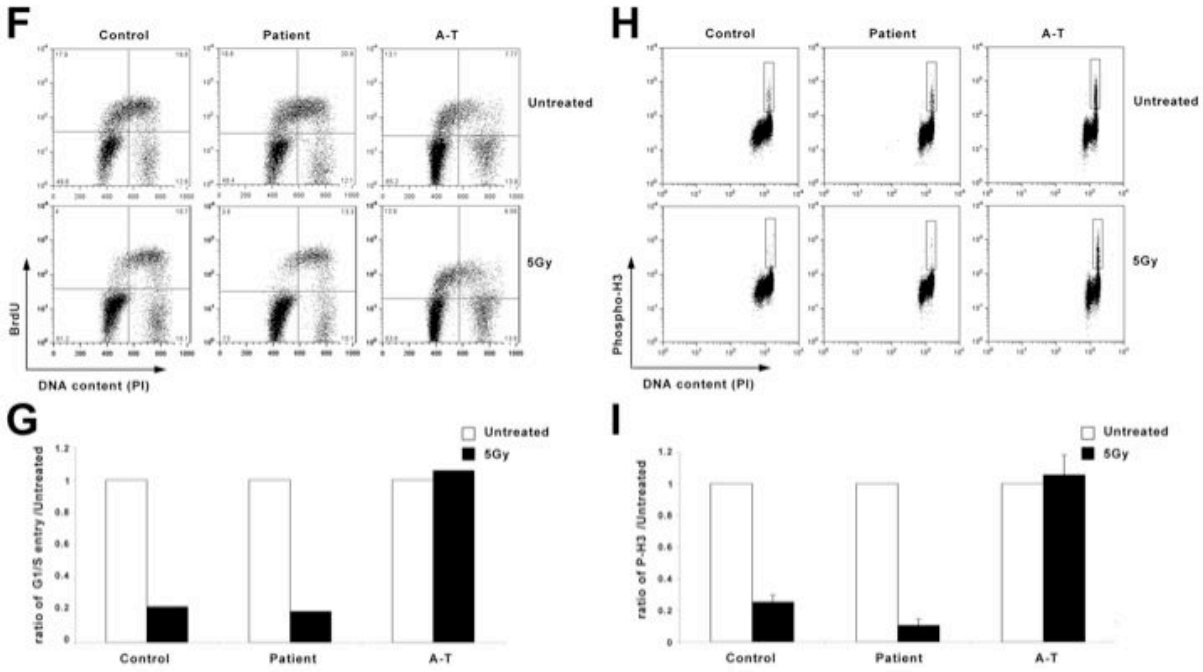



***Figure 47 :*** Test (de la fonctionnalité) des points de contrôle G1 / S (**f-g**) et G2 / M (**h-i**) après dommages de l'ADN (par irradiation gamma). L'analyse du cycle cellulaire se fait suite à l'incorporation de BrdU ou anti-H3 phosphorylé et marquage de l'ADN à l'iodure de propidium (PI).

Certaines caractéristiques du phénotype cellulaire (et clinique) sont similaires à des patients mutés dans l'un des facteurs du complexe Fanconi. De ce fait, pour savoir si un défaut dans la signalisation Fanconi pouvait être à l'origine du phénotype du patient, la vérification de la fonctionnalité de cette voie de réparation de l'ADN a été effectuée (*figure 48*). Ainsi dans une cellule fonctionnelle après dommages de l'ADN tels les ponts inter-brins (induits par la MMC) ou les cassures double brin (induites par l'irradiation gamma), FancD2 est ubiquitiné. On constate que l'ubiquitination de FancD2 a lieu suite aux dommages, aussi bien dans les cellules du contrôle que du patient. D'autre part, les mêmes conditions d'induction de lésions de l'ADN permettent de confirmer l'intégrité des voies de signalisation impliquées dans les points de contrôle G1 / S et G2 / M puisque CHK1 et CHK2 sont phosphorylés et donc activés.

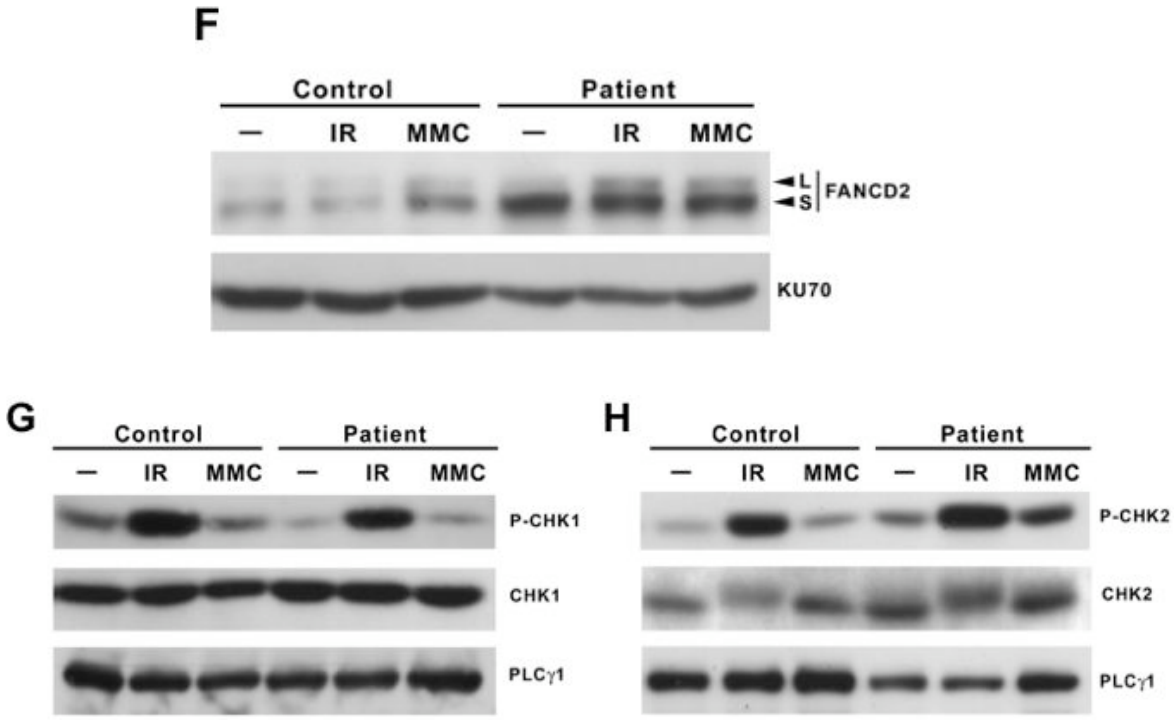
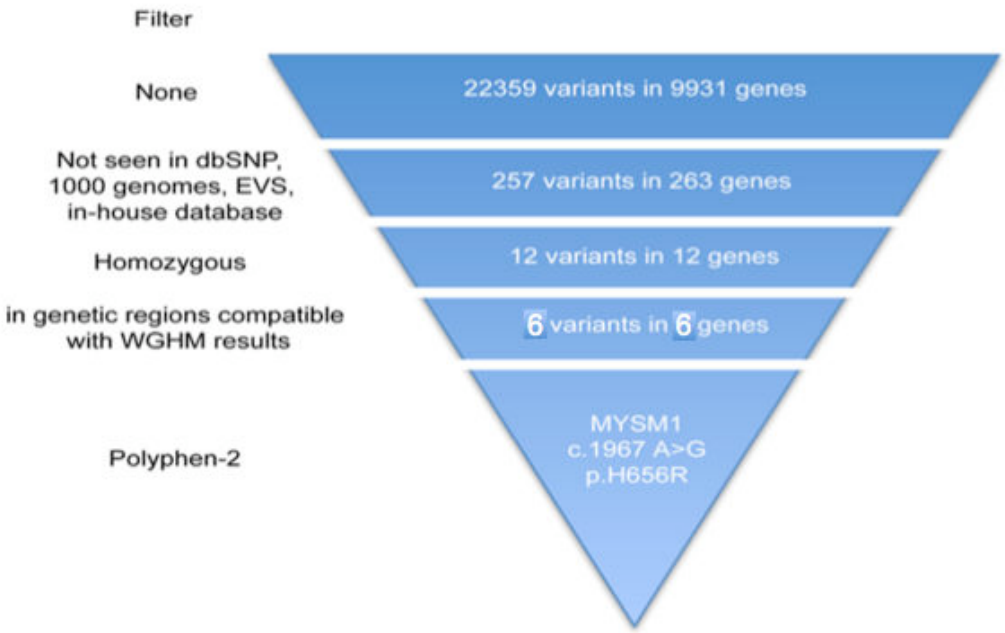



***Figure 48 :*** Analyse par Western-Blot après induction de dommages de l'ADN (irradiation gamma et traitement à la mitomycine C) de l'ubiquitination de FancD2 (**f**), du niveau total de protéines CHK1/2, et de la phosphorylation-Chk1/2 (**g** et **h**).

❖ ***L'approche génétique permet de caractériser une mutation homozygote faux-sens dans le gène MYSM1***

Afin d'identifier la cause moléculaire associée à ce syndrome, une approche génétique a été réalisée. Le patient étant issu d'une famille consanguine, nous avons tout d'abord réalisé un WGHM afin d'identifier les régions chromosomiques co-ségrégeant avec la maladie. En combinant le WGHM et le séquençage par WES, environ 10 000 gènes ont au moins une variation nucléotidique dans leur partie codante (*figure 49*). Le même type de filtres que pour les patients exposés dans la 1ère partie des résultats a été appliqué. Néanmoins, la famille étant consanguine, on pose l'hypothèse d'une mutation homozygote. Ainsi, après exclusion des variations déjà répertoriées dans les bases de données accessibles, il ne restait plus que 6 gènes avec un variant génétique à l'état homozygote, dans des régions compatibles avec l'analyse par WGHM. Parmi les gènes candidats, certains codent des protéines transmembranaires, des protéines sécrétrices, ou bien des protéines aux rôles peu documentés. Les études prédictives par Polyphen-2 ne concluent pas en un risque dommageable pour 5 de ces facteurs. En revanche, l'un d'entre eux apparaît comme un candidat fort avec un score proche de 1 par le logiciel d'analyse prédictif : il s'agit d'une déubiquitinase de l'histone H2A mono-ubiquitinée sur la lysine 119 (K119), appelée MYSM1 (ou 2A-DUB).



| Gene | Gene position (GRCh37) | mutation (cDNA) | mutation protein | Polyphen-2 score | gene description |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_001085487.1 (MYSM1) | chr1:59.167747-59.123.590 | c.1967A>G | p. H656R | 0.999 | Myb-like, SWIRM and MPN domains 1; histone H2A deubiquitinase |
| NM_015888.4 (HOOK1) | chr1:60.278.533-60.344.050 | c.493T>A | p.L165M | 0.094 | hook homolog 1 (Drosophila) |
| NM_001164835.1 (L1TD1) | chr1:62.658.474-62.680.000 | UTR | | ND | LINE-1 type transposase domain containing 1 |
| NM_003838.3 (FPGT) | chr1:74.661.896-74.676.148 | splice site | | ND | fucose-1-phosphate guanylyltransferase |
| NM_003393.3 (WNT8B) | chr10:102.242.185-102.242.367 | c.759G>A | p.P253P | 0 | wingless-type MMTV integration site family, member 8B |
| NM_001166283.1 (RGMA) | chr15:93.588.616-93.588.434 | c.1080C>T | p.P360P | 0 | RGM domain family, member A |

***Figure 49 :*** Analyse génétique par WGHM et WES, et application des différents filtres d'exclusion pour l'analyse. Une liste restreinte de gènes candidats avec variation exonique sous hypothèse homozygote est retranscrite dans le tableau.

La vérification de la mutation a été réalisée sur l'ADN génomique des parents et du patient à partir du sang total et des fibroblastes, en séquençage direct après amplification d'une région flanquante de la mutation (*figure 50*). Le séquençage de MYSM1 démontre que les parents portent la mutation à l'état hétérozygote et qu'ils transmettent chacun leur allèle muté à l'enfant malade. La mutation homozygote c.1967A>G (p.H656R) faux-sens est retrouvée aussi bien dans l'ADN génomique du sang total que dans les fibroblastes primaires du patient.

MYSM1 est une métalloprotéase à doigt de zinc capable de déubiquitiner l'histone H2A mono-ubiquitinée en position K119, et dont l'importance au cours de la régulation transcriptionnelle a été montrée *(Zhu et al., 2007)*.

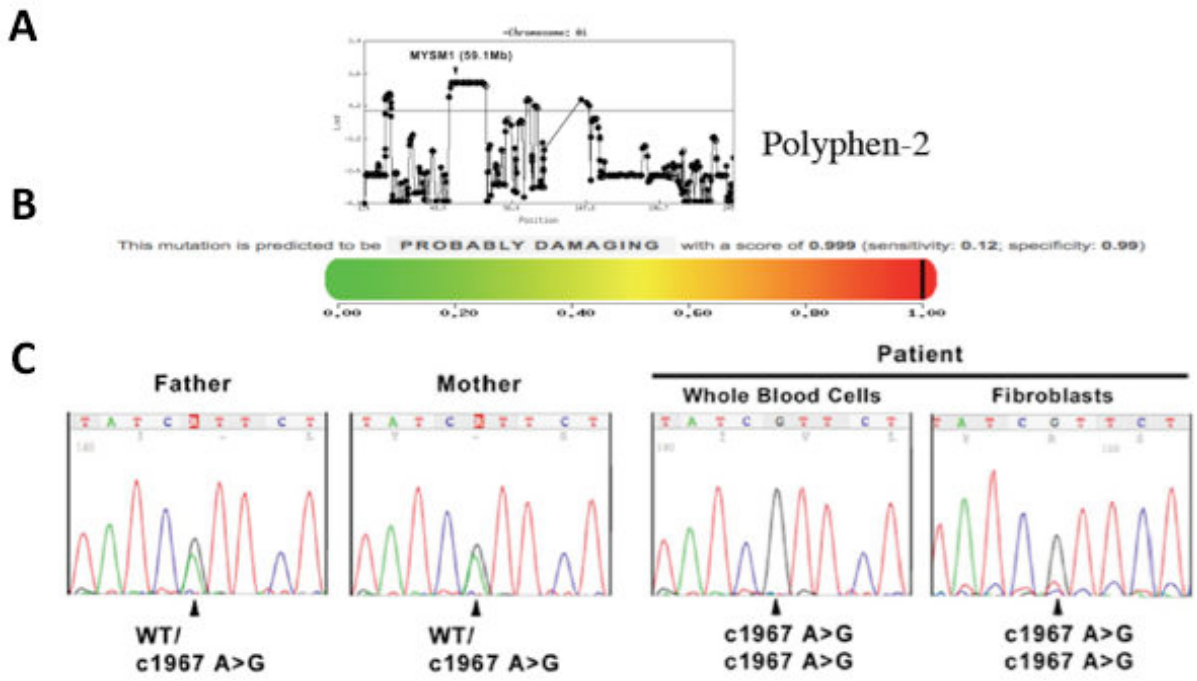



***Figure 50 :*** **a/** Le gène MYSM1, situé sur le chromosome 1 est présent dans une région co-ségrégeant avec la maladie. **b/** Prédiction par Polyphen-2 des conséquences de la mutation in-silico. **c/** Séquençage direct de la mutation identifiée par WES pour la famille c1967A>G .

Des approches d'immunofluorescence (*figure 51*) ont été faites afin d'évaluer l'impact de la mutation sur la stabilité et / ou l'expression de MYSM1. A l'aide d'un anticorps dirigé contre MYSM1, nous avons observé que la localisation n'est pas affectée par la mutation puisque la protéine est répartie de manière homogène dans le noyau, de façon similaire aux cellules contrôles. En revanche, l'intensité de fluorescence est réduite dans les fibroblastes du patient comparativement au contrôle. Cette diminution de l'expression de MYSM1 a été confirmée par Western-Blot.

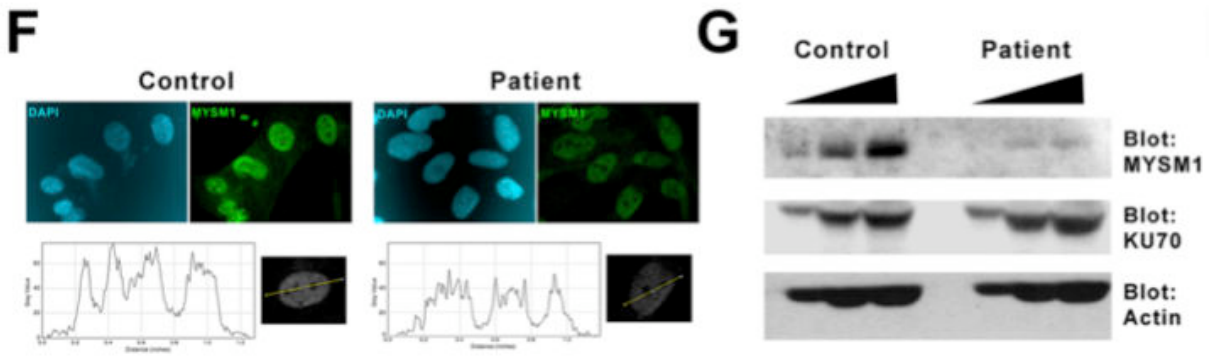



***Figure 51 :*** **f/** Immunofluorescence sur fibroblastes primaires avec détection de la protéine endogène MYSM1. **g/** Analyse par Western-Blot du niveau d'expression protéique total de MYSM1 entre un contrôle et le patient, avec KU70 et l'actine en tant que contrôle de charge.

Pour mesurer l'influence de la mutation de MYSM1, des vecteurs permettant l'expression de la forme entière sauvage et de la forme mutée de MYSM1 ont été construits, les 2 avec une étiquette Flag dans la partie N-terminale de la protéine. Ces plasmides ont été transfectés dans des lignées HEK-293T avant préparation de lysats protéiques (*figure 52)*. La révélation par un anticorps dirigé contre l'étiquette Flag révèle une différence de niveau protéique entre les cellules transfectées avec une construction sauvage et celles transfectées avec la forme mutée (p.H656R) de MYSM1. Cela indique que la mutation provoque une déstabilisation de MYSM1.

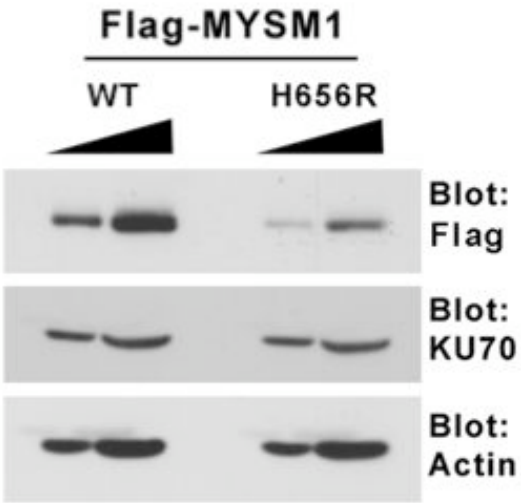



***Figure 52 :*** Surexpression de constructions plasmidiques exprimant la forme entière sauvage et la forme mutée de MYSM1 avec détection anti-FLAG (étiquette en C-terminal). Les protéines Ku70 et actine servent de contrôle de charge protéique.

Des études structurales et comparatives avec les différents orthologues de MYSM1 ont été réalisées pour prédire l'impact de la mutation (*figure 53*). La mutation se trouve dans le cœur catalytique de l'enzyme, domaine JAMM (JAb1/Mpn/Mov34) hautement conservé entre les différents orthologues, dédié à cliver l'ubiquitine présente sur H2A en position K119. De ce fait, il est probable que la mutation, perturbant l'interaction avec l'ion Zinc, affecte l'activité déubiquitinase de MYSM1.

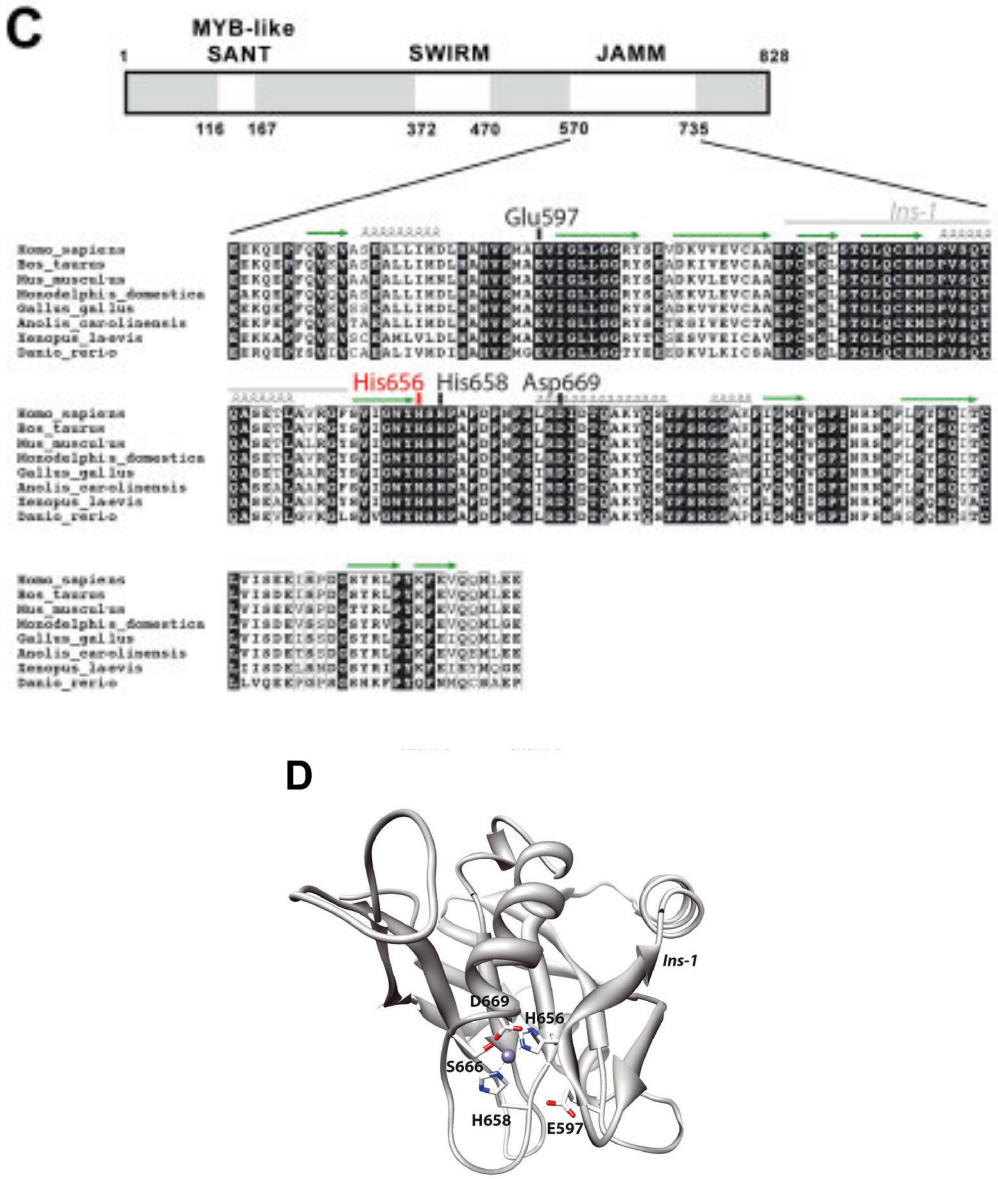



***Figure 53 :*** **c/** Domaines protéiques de MYSM1 et alignement de la région encadrant la mutation sur l'histidine H656. **d/** Structure 3D de la protéine localisant la mutation.

Afin d'évaluer le niveau global de mono-ubiquitination de l'histone 2A sur la lysine 119 dans les cellules du patient, nous avons réalisé des expériences d'immuno-fluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre H2A mono-ubiquitiné (*figure 54)*. Le niveau d'intensité de signal de H2A mono-ubiquitinée chromatinienne (car l'IF a été réalisée après déplétion des facteurs libres) est significativement augmenté dans les cellules du patient. Cela conforte l'idée d'un défaut fonctionnel de MYSM1 dans les cellules du patient.

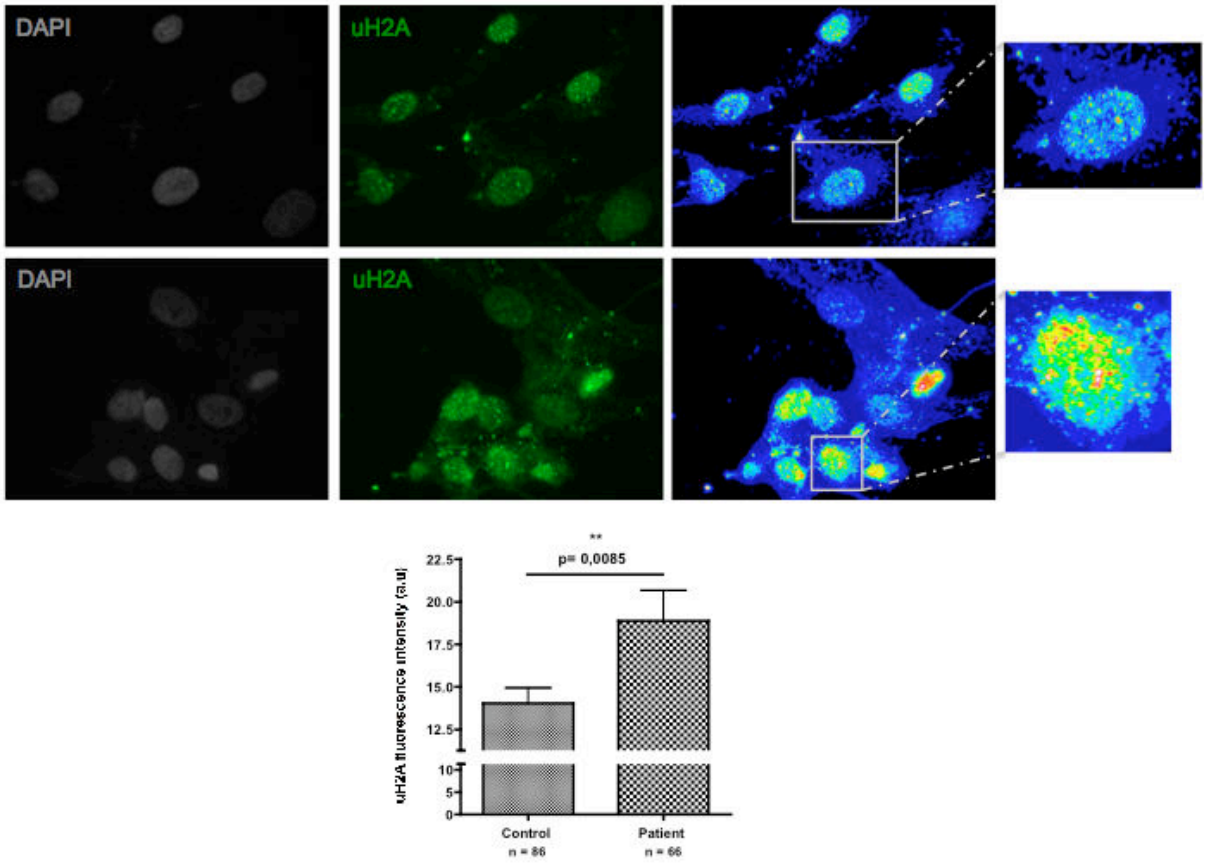



***Figure 54 :*** Immunofluorescence et quantification de l'ubiquitination de l'histone H2A dans les fibroblastes primaires après déplétion de la forme non-chromatinienne.

- ***Complémentation fonctionnelle par l'expression ectopique de la forme sauvage de MYSM1 dans les cellules du patient***

Ayant observé une sensibilité accrue des cellules du patient aux génotoxiques, nous avons réalisé des expériences de complémentation fonctionnelle en exprimant une forme sauvage de

MYSM1 dans les cellules du patient (*figure 55*). Des transductions lentivirales de vecteurs co-exprimant MYSM1 et la GFP ou du vecteur sans insert (n'exprimant que la GFP) ont été réalisées. Des traitements continus aux drogues pendant 10 jours ont été appliqués aux fibroblastes transduits. Le niveau de cellules transduites (GFP +) est alors détectable par FACS, et le ratio des 2 populations distinctes (cellules vivantes non-transduites (GFP-) par rapport aux cellules vivantes transduites) est calculé. Le ratio de cellules GFP+ augmente uniquement dans les fibroblastes du patient exprimant la forme sauvage de MYSM1 lorsque ces cellules sont soumises à un agent génotoxique. Ces résultats démontrent que la forme sauvage de MYSM1 confère un avantage sélectif dans les cellules du patient, lorsque celles-ci sont en présence d'agents induisant différents dommages de l'ADN. Cela prouve aussi le lien causal entre le défaut en MYSM1 et le défaut de réparation de l'ADN.

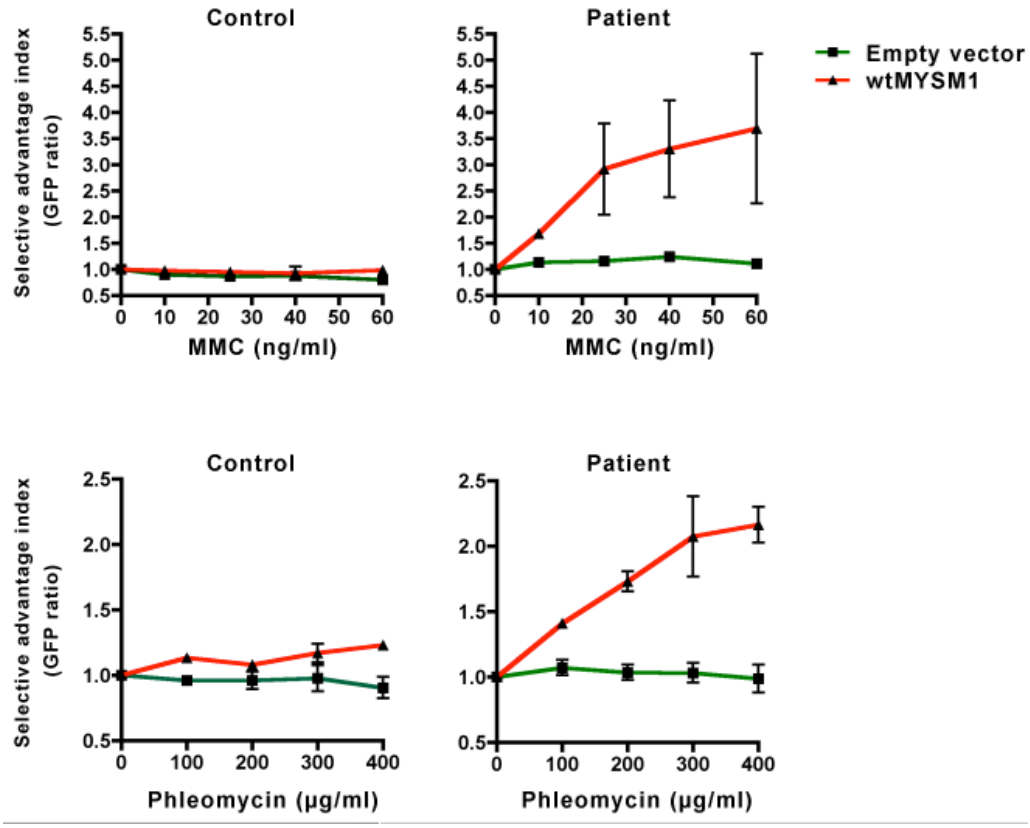


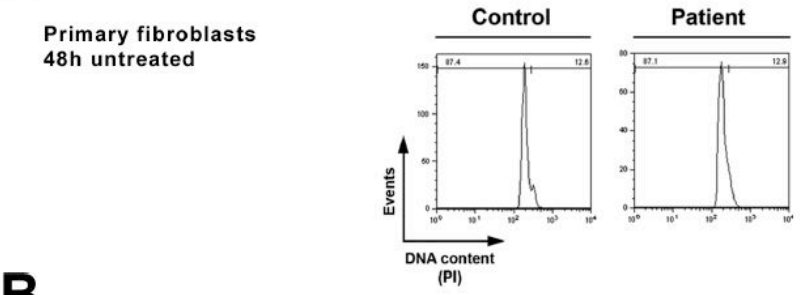

***Figure 55 :*** Complémentation fonctionnelle par mesure de l'avantage sélectif (ratio des cellules GFP positives transduites en fonction des cellules GFP négatives non-transduites), après traitement à la MMC et à la phléomycine durant 10 jours, après transduction lentivirales de constructions vides ou avec la forme sauvage de MYSM1 dans des fibroblastes d'un contrôle et du patient.

Fin 2011, deux groupes ont simultanément publié des travaux décrivant la souris *Knock-Out* pour Mysm1. Les auteurs mettent en évidence que Mysm1 est capable de réguler l'expression de certains loci de gènes clés impliqués dans le développement hématopoïétique et la maturation lymphocytaire B ***(Jiang et al., 2011) (Nijnik et al., 2012)***. Récemment, deux autres études du modèle murin documentent le rôle de mMysm1 en tant que régulateur de nombreux loci impliqués dans la maintenance des cellules souches hématopoïétiques, dans l'auto-renouvellement de ces cellules et dans les régulations épigénétiques ***(Wang et al., 2013)***, et au cours de la maturation des cellules NK (« *Natural Killer* ») ***(Nandakumar, PNAS 2013)***.

L'une des études publiées sur le modèle *KO Mysm1* démontre que ce gène est important pour réguler la transcription de certains gènes impliqués dans le développement hématopoïétique et la maturation des lignées lymphoïdes. Par des approches d'analyse transcriptionnelle haut débit, les auteurs ont mis en évidence une cible pour MYSM1, le locus EBF1. Ne pouvant réaliser le même type d'analyse dans les cellules souches hématopoïétiques du patient (du fait de l'hypocellularité de la moelle osseuse), nous avons voulu néanmoins déterminer si MYSM1 dérégulait certains facteurs impliqués dans les processus de réparation de l'ADN ce qui pourrait expliquer l'hypersensibilité des cellules déficientes en MYSM1 aux lésions de l'ADN. Pour cela, les fibroblastes primaires du patient et d'un contrôle, ont été soumis à la MMC durant 48 heures. La vérification en parallèle de l'accumulation des cellules du patient en phase G2 a été faite, afin de s'assurer de l'efficacité de la drogue. Les ARN messagers totaux ont été extraits et leur qualité vérifiée par la technologie Agilent. Puis, l'utilisation d'une puce haut débit Affymetrix a permis de générer les études transcriptionnelles de l'ensemble des gènes connus (*figure 56*). Par une analyse bio-informatique, les données sont filtrées afin d'obtenir pour l'ensemble des gènes un facteur de dérégulation transcriptionnel positif ou négatif. Le seuil multiplicatif est placé à 2 fois pour obtenir une liste de gènes

dérégulés de manière significative. L'expression d'aucun gène directement impliqué dans la réparation de l'ADN n'apparaît modifiée dans les cellules déficientes en MYSM1. On conclut alors que la dysfonction dans les mécanismes de prise en charge des dommages de l'ADN dans les cellules déficientes en MYSM1 ne semble pas dûe à des dérégulations transcriptionnelles de gènes clés de la réparation de l'ADN.

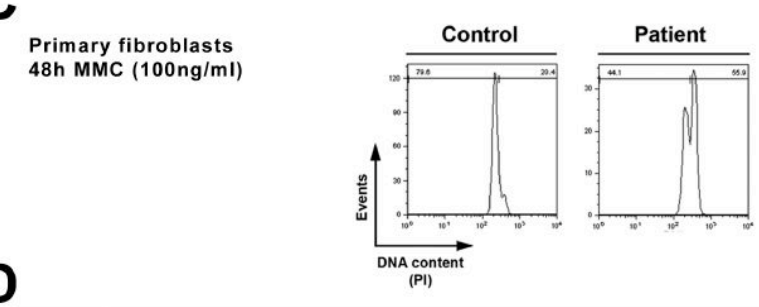
**A**




**B**

| Genes | Nom | Mean Ratio Patient untreated vs Control untreated |
|---|---|---|
| CDK4 | cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), mRNA, | 3,21633757 |
| RNASEK | ribonuclease, RNase K (RNASEK), mRNA, | 2,971061821 |
| SPNS1 | spinster homolog 1 (Drosophila) (SPNS1), mRNA, | 2,849737522 |
| GUF1 | GUF1 GTPase homolog (S, cerevisiae) (GUF1), mRNA, | 2,49866871 |
| S100PBP | S100P binding protein (S100PBP), transcript variant 1, mRNA, | 2,478740532 |
| KRT126P | PREDICTED: keratin 126 pseudogene (KRT126P), mRNA, | 2,233511725 |
| NBPF10 | PREDICTED: neuroblastoma breakpoint family, member 10, transcript variant 36 (NBPF10), mRNA, | 2,176005137 |
| LOC389101 | PREDICTED: similar to ribosomal protein L23a (LOC389101), mRNA, | 2,133875674 |
| PABPC3 | poly(A) binding protein, cytoplasmic 3 (PABPC3), mRNA, | 2,111883381 |
| HIP2 | huntingtin interacting protein 2 (HIP2), mRNA, | 2,041299309 |
| ANXA5 | annexin A5 (ANXA5), mRNA, | 2,037308946 |
| LOC441743 | similar to C367G8,3 (novel protein similar to RPL23A (60S ribosomal protein L23A)) (LOC441743), mRNA, | 0,476403392 |
| RPA3 | replication protein A3, 14kDa (RPA3), mRNA, | 0,439765687 |
| QPCT | glutaminyl-peptide cyclotransferase (QPCT), mRNA, | 0,400609487 |

**C**




**D**

| Gene | Name | Mean Ratio Patient MMC vs Control MMC |
|---|---|---|
| CDK4 | cyclin-dependent kinase 4 (CDK4), mRNA, | 2,92866135 |
| RNASEK | ribonuclease, RNase K (RNASEK), mRNA, | 2,840134793 |
| SPNS1 | spinster homolog 1 (Drosophila) (SPNS1), mRNA, | 2,721839784 |
| NBPF10 | PREDICTED: neuroblastoma breakpoint family, member 10, transcript variant 36 (NBPF10), mRNA, | 2,54512253 |
| GUF1 | GUF1 GTPase homolog (S, cerevisiae) (GUF1), mRNA, | 2,455741239 |
| KRT126P | PREDICTED: keratin 126 pseudogene (KRT126P), mRNA, | 2,340086988 |
| PABPC3 | poly(A) binding protein, cytoplasmic 3 (PABPC3), mRNA, | 2,315557561 |
| S100PBP | S100P binding protein (S100PBP), transcript variant 1, mRNA, | 2,203741473 |
| HIP2 | huntingtin interacting protein 2 (HIP2), mRNA, | 2,186895021 |
| RPA3 | replication protein A3, 14kDa (RPA3), mRNA, | 0,458374161 |
| QPCT | glutaminyl-peptide cyclotransferase (QPCT), mRNA, | 0,449440691 |
| LOC441743 | similar to C367G8,3 (novel protein similar to RPL23A (60S ribosomal protein L23A)) (LOC441743), mRNA, | 0,395593752 |

***Figure 56 :*** Analyse bio-informatique du transcriptome sur puce Affymetrix à partir de fibroblastes primaires contrôles et du patient, traité (**b**) ou non (**d**) à la mitomycine C durant 48 heures, après vérification de l'accumulation en phase G2 des cellules du patient (**a** et **c**).

Pour mimer la déficience de MYSM1 dans des lignées cellulaires HEK-293T, des stratégies d'interférence à ARN (shARN) dirigés contre MYSM1 ont été tentées (*figure 57*). La co-transfection d'une construction exprimant MYSM1 sauvage étiquetée Flag avec différents shARN, permet de valider l'efficacité de certains shARN (#1 et #2) contre les ARN messagers de MYSM1. On observe en effet une diminution du niveau protéique de MYSM1 comparativement au contrôle de charge GAPDH. Malheureusement, la transposition de ces mêmes shARN dans des fibroblastes contrôles afin de cibler la forme endogène de MYSM1 n'a pas induit une diminution d'expression satisfaisante. Un pack de siARN (« *small interferent RNA* ») a également été testé dans des systèmes de lignées cellulaires, sans que la diminution protéique ou le niveau des ADN complémentaires spécifiques de MYSM1 amplifiés par RT-PCR ne le soit significativement. L'obtention de modèle cellulaire déficient en MYSM1 n'a donc pour le moment pas été obtenu.

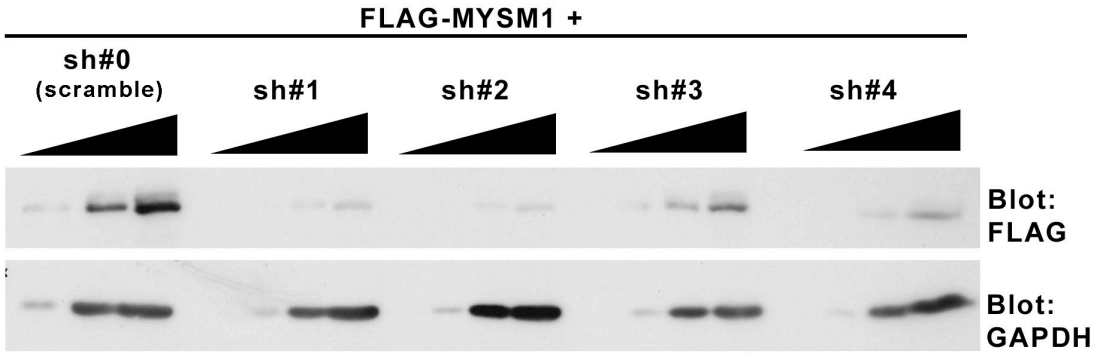



***Figure 57 :*** Test d'un panel de « *Small-Hairpin RNA* » (shRNA) dirigés contre la forme sauvage de MYSM1 (#1, #2, #3, #4) ou non-spécifique (scramble). La co-transfection de ces shARN se fait avec une construction sauvage de MYSM1 flaguée. La GAPDH est le contrôle de charge protéique.

- ***Réversion génétique et phénotypique spontanée « in-vivo » chez le patient***

De façon surprenante, au cours de notre étude il est apparu que les anomalies immuno-hématologiques du patient se corrigeaient progressivement pour atteindre des valeurs

normales. Un prélèvement de la moelle osseuse a permis d'observer une reconstitution du pool des cellules de la moelle chez le patient (*figure 58*). Le pourcentage de cellules CD34+ est semblable à un contrôle, alors que le nombre de CD19+ est extrêmement augmenté chez le patient (d'un facteur 5 environ). De plus, la population double positive de pré-B1 (CD19+ / CD34+) est plus largement détectée chez le patient comme cela était déjà visible au cours des études phénotypiques préliminaires.

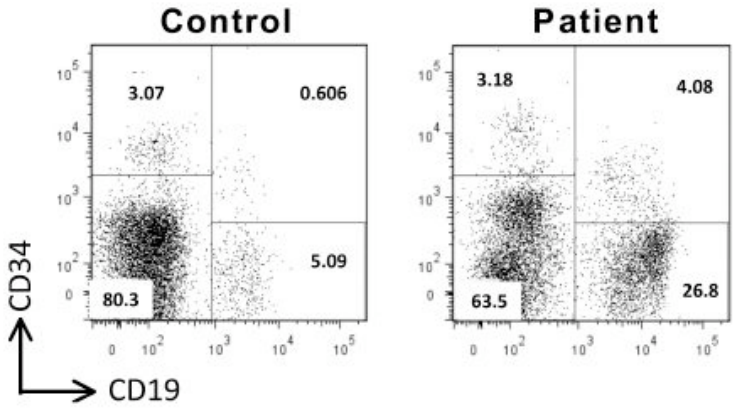



***Figure 58 :*** Marquage des mononucléaires de la moelle osseuse par détection CD34 et CD19 entre un donneur sain, et le patient après réversion génétique.

En particulier, on constate l'apparition de cellules positives pour le marqueur CD19, correspondant aux lymphocytes B (*figure 59*). Le patient a donc reconstitué une population de cellules B. Pour exclure, une éventuelle reconstitution de la population B à partir d'une transfusion sanguine (qui normalement est impossible), une analyse de marqueurs microsatellites a été effectuée sur une population enrichie en cellules CD19+ du patient. On constate que les marqueurs exprimés dans les fibroblastes primaires du patient sont identiques aux néo-lymphocytes B de l'enfant, ces derniers sont donc bien des cellules provenant du patient.

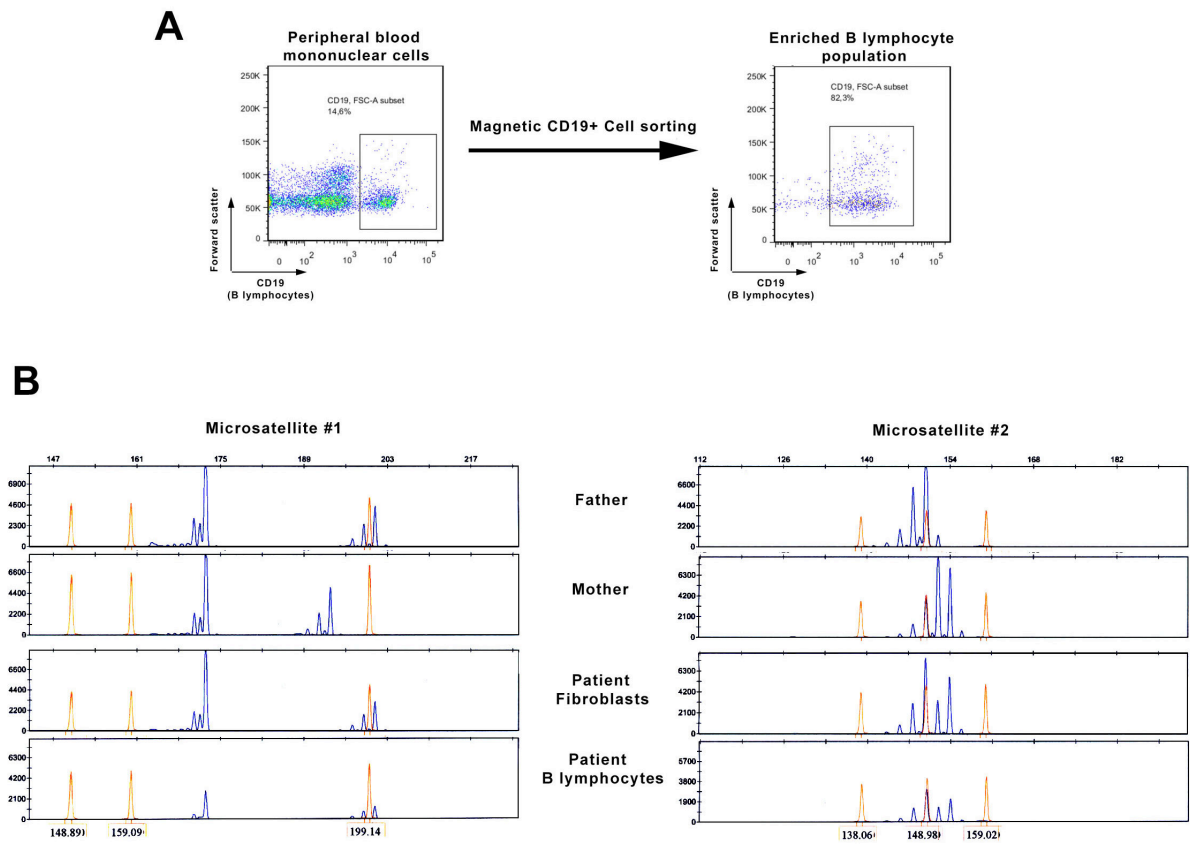



***Figure 59 :*** **a/** Marquage à partir de cellules mono-nucléaires d'une population de lymphocytes B provenant du sang périphérique du patient. **b/** Marqueurs microsatellites pour la vérification du pedigree familial.

Afin de savoir si cette reconstitution du compartiment des lymphocytes B chez le patient avait permis de générer une population polyclonale et diversifiée, le répertoire a été analysé par immunoscope (*figure 60*). On constate que le répertoire des IgM et IgG est diversifié et polyclonal.

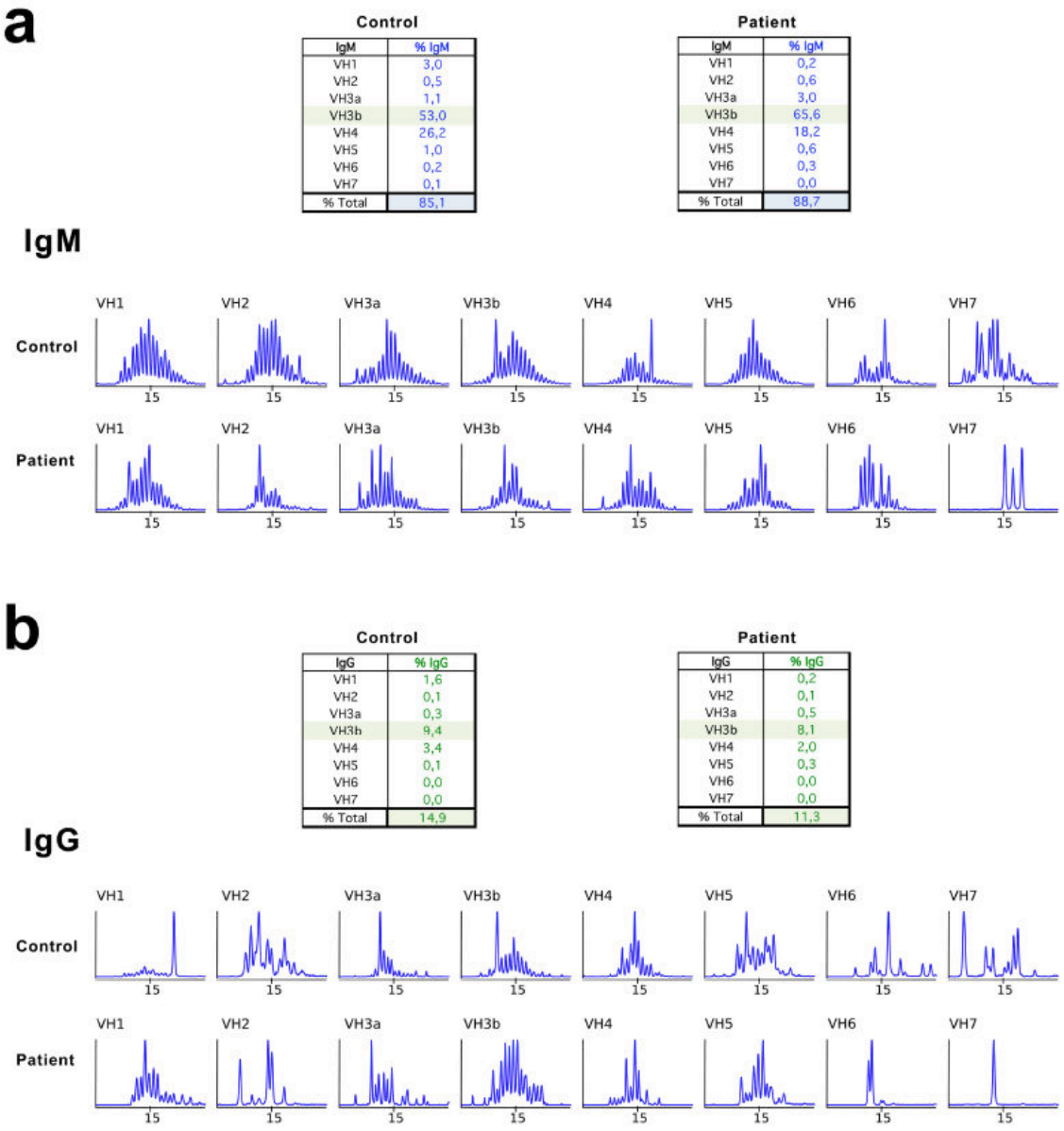



***Figure 60 :*** Immunoscope post-réversion des immunoglobulines M (**a**) et G (**b**) à partir des lymphocytes B d'un donneur sain et du patient.

L'évolution plus précise des paramètres dans chaque compartiment immuno-hématologique a pu être mesurée (*figure 61)*. On s'aperçoit que l'ensemble des compartiments étudiés (lymphocytes, neutrophiles, réticulocytes, CD3+, CD4+, CD8+, cellules NK, et CD19+) sont en nette augmentation, puisque le patient retrouve des normes établies pour des individus sains.

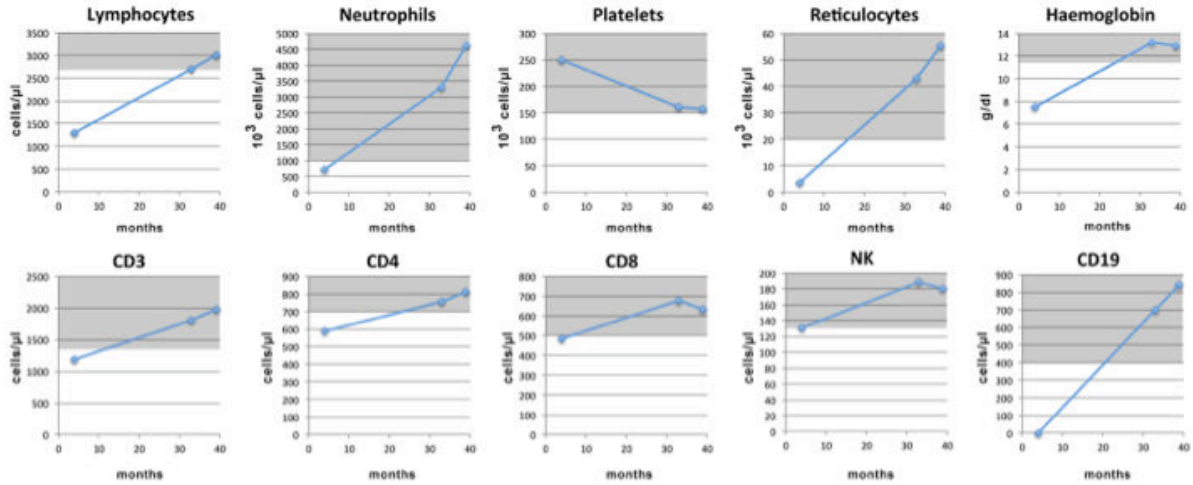



***Figure 61 :*** Evolution des valeurs des différentes populations immuno-hématologiques étudiées à 4, 33 et 39 mois. Les normes établies provenant d'individus sains apparaissent en zones grisées.

Cette réversion phénotypique suggérait une possible réversion génétique. Afin de savoir si les lymphocytes B du patient ont été générés grâce à une réversion génétique, le séquençage direct du gène MYSM1 a été effectué (*figure 62*). Comparativement à l'ADN génomique des fibroblastes primaires du patient (mutation homozygote c.1967A>G), on s'aperçoit qu'il y a retour à un état hétérozygote avec un allèle sauvage (A) en position c.1967, ce qui correspond à une réversion « vraie ».

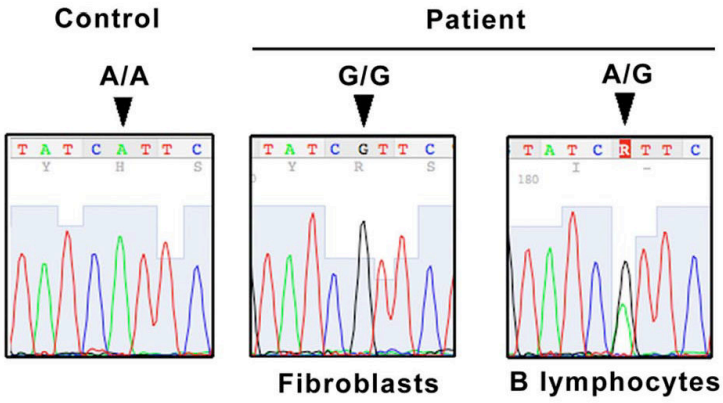



***Figure 62 :*** Séquençage des lymphocytes B au niveau de la mutation de MYSM1

Enfin, pour savoir si la réversion génétique s'accompagnait d'une normalisation de la capacité cellulaire à réparer des lésions de l'ADN, nous avons généré des lignées B–EBV du patient, et testé leur sensibilité à la MMC (*figure 63*). Tout comme le contrôle, il n'y a pas d'accumulation en phase G2 des lignées B-EBV du patient en présence de MMC, contrairement aux cellules de FA ou aux fibroblastes primaires du patient, qui dès les 1ères doses ont leur profil phénotypique caractéristique d'inversion de pic des phases G1 et G2.

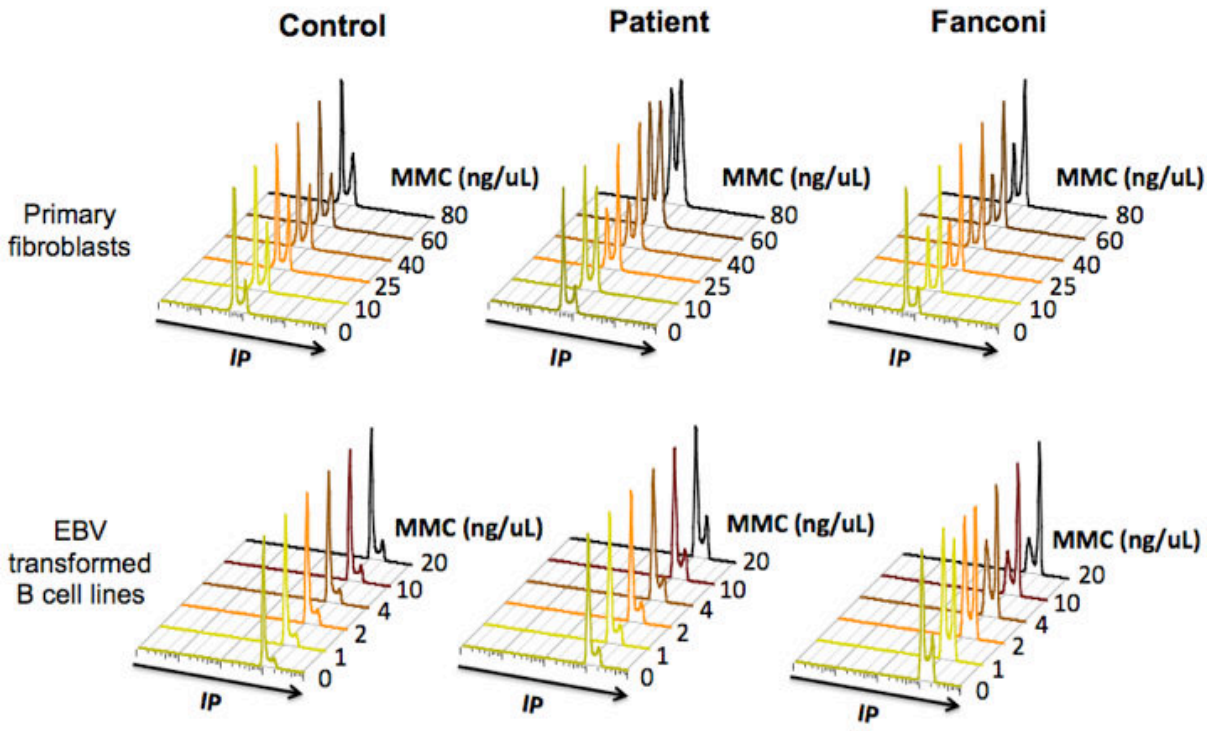



***Figure 63 :*** Analyse de l'accumulation des cellules en phase G2 après traitement aux doses croissantes de MMC, dans des fibroblastes primaires et dans des lignées B transformées avec le virus Epstein-Barr (notée B-EBV).

Afin d'identifier la population cellulaire dans laquelle la réversion génétique a eu lieu, un séquençage haut débit de la région génétique portant la mutation à partir de l'ADN génomique des différentes populations souches de la moelle préalablement triées a été réalisé (*figure 64*). Les populations qui ont été triées par FACS sont les cellules souches hématopoïétiques (CSH), les progéniteurs multi-potents (MPP), les progéniteurs myéloïdes communs (CMP), les progéniteurs multi-lymphoïdes (MLP), les cellules CD19+/CD34+ (pré-

lymphocytes BI), les CD19+/CD34- (pré-BII et B immatures), et enfin les CD11b+ (myéloïdes). Pour s'assurer que notre méthode d'analyse était quantitative, différents contrôles ainsi que les 2 parents ont été analysés pour la même variation nucléotidique du gène MYSM1. Plusieurs milliers de séquences ont été obtenues pour permettre d'établir la proportion entre l'allèle sauvage (c.1967A) et muté (c.1967G), au sein de l'ensemble des populations de précurseurs et de progéniteurs lymphoïdes. La fiabilité de la technique est validée à partir d'ADN génomique de contrôles (99,8 % d'allèle sauvage), du père et de la mère (près de 50 % de chacune des allèles) et des fibroblastes primaires du patient (99,9 % d'allèle muté). L'analyse des différentes populations met en évidence que l'ensemble des progéniteurs hématopoïétiques ont réverté puisque l'on retrouve près de 50% de séquence sauvage, l'autre moitié étant mutée, ce qui correspond à la situation génotypique des parents du patient. Les faibles pourcentages de séquences mutées (0,1 et 0,2 %) trouvés chez des contrôles homozygotes sauvages, et dans les fibroblastes primaires du patient MYSM1, correspondent à des erreurs de séquence. Par conséquent, la réversion vraie qui s'est produite spontanément dans les cellules souches du patient et a permis de restituer un système immuno-hématologique normal.

| | c. 1967A (#reads) | % WT | c. 1967G (#reads) | % Mutated |
|---|---|---|---|---|
| Ctl1 | 3743 | 99.8 | 7 | 0.2 |
| Ctl2 | 3792 | 99.8 | 7 | 0.2 |
| Father | 2069 | 49.7 | 2098 | 50.3 |
| Mother | 7421 | 48.9 | 7759 | 51.1 |
| **Patient** | | | | |
| Blood cells (4 mths) | 422 | 3.2 | 12563 | 96.8 |
| Primary fibroblasts | 6 | 0.1 | 4204 | 99.9 |
| HSC | 4558 | 50.4 | 4482 | 49.6 |
| MPP | 2622 | 43.6 | 3393 | 56.4 |
| CMP | 6884 | 46.7 | 7869 | 53.3 |
| MLP | 8351 | 47.9 | 9086 | 52.1 |
| preBI | 1639 | 43.6 | 2120 | 56.4 |
| preBII/immature B cells | 3638 | 42.4 | 4947 | 57.6 |
| Granulocytes | 1836 | 41.3 | 2611 | 58.7 |

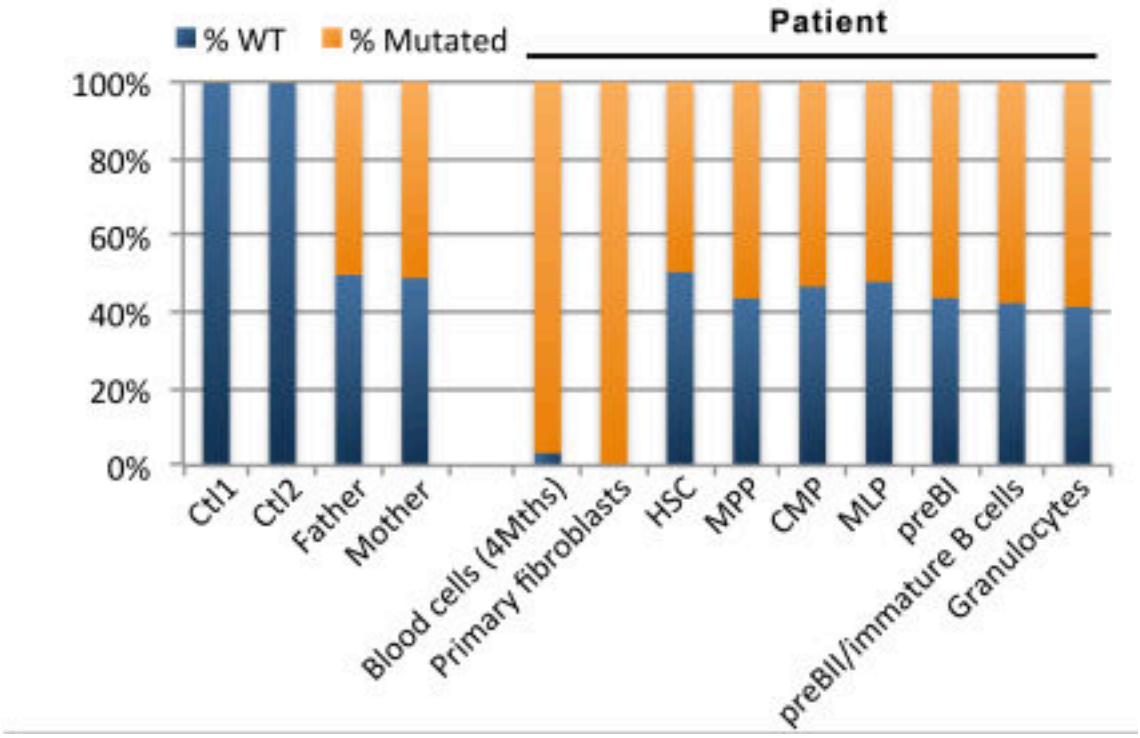



***Figure 64 :*** Analyse par séquençage haut débit de la proportion d'allèle sauvage (réverté) et d'allèle muté dans les différentes populations de progéniteurs et précurseurs hématopoïétiques triés, comparativement à des contrôles extra-familiaux, aux parents, ainsi que les fibroblastes primaires.

## DISCUSSION et PERSPECTIVES

- ***MYSM1 est un facteur clé engagé lors du développement immuno-hématologique chez l'homme***

L'exploration phénotypique réalisée chez ce patient démontre que la déficience en MYSM1 est à l'origine du tableau immuno-hématologique du patient. La réversion vraie décelée - événement particulièrement rare dans ce genre de pathologie - a permis de restaurer les populations des lignées lymphoïdes et hématopoïétiques (car ayant affecté les progéniteurs hématopoïétiques les plus précoces). Le pool de cellules révertées a contribué à la régénération de l'ensemble des populations, puisque le patient se retrouve après plusieurs mois dans les normes basses cliniquement établies. Ceci est la démonstration *in-vivo* que MYSM1 est indispensable au bon développement immuno-hématologique chez l'homme. Ces observations corrèlent avec les 4 études publiées récemment sur la souris « *Knock-Out* » pour MYSM1. Les auteurs mettent en avant l'importance de la régulation transcriptionnelle de MYSM1 au cours du développement général du système immuno-hématopoïétique ***(Jiang et al., 2011) (Nijnik et al., 2012) (Wang et al., 2013)***.

Il y a une régulation transcriptionnelle de facteurs clés (en particulier Ebf1, indispensable au bon développement et à la différentiation des lymphocytes B), ou bien d'ID2 au cours de la maturation des cellules NK (« *Natural Killer* ») ainsi que Gfi1 dans le maintien du pool de cellules souches hématopoïétiques quiescents ***(Nandakumar et al., 2013)***. Nos données démontrent que la forme humaine de MYSM1 est aussi essentielle au développement immuno-hématologique, en particulier des lymphocytes B.

- ***La déficience humaine en MYSM1 a permis de déceler un rôle nouveau au cours de la réponse aux dommages de l'ADN***

Les approches d'induction de dommages de l'ADN en présence de drogues génotoxiques dans les cellules du patient MYSM1, nous ont permis de révéler des dysfonctions dans la réparation des lésions de l'ADN. Les stratégies de surexpression ectopique de la forme sauvage de MYSM1 permettent de complémenter ces défauts, démontrant l'implication de MYSM1 dans la prise en charge des cassures de l'ADN. Les cellules du patient bien que sensibles aux ponts inter-brins ne sont pas affectées dans la voie du complexe core Fanconi, puisque l'ubiquitination de FancD2 est effective. Nos résultats ont également révélé un rôle de MYSM1 au cours de la réparation des cassures double brin générées par la phléomycine. Le mode d'action de MYSM1 au cours de la signalisation de réponses aux dommages de l'ADN reste à déterminer.

- ***L'implication précise de MYSM1 au cours de la réponse des dommages de l'ADN reste à élucider***

L'implication de MYSM1 dans les mécanismes de prise en charge des lésions de l'ADN a été clairement établie. Le but serait de poursuivre la caractérisation précise de sa fonction au cours des processus de réparation. Des résultats préliminaires ont été obtenus suite à des cinétiques de réparation post-dommages double brin ou ponts inter-brins, par détection des foyers de réparation 53BP1 (*figures 65 et 66*). Ces expériences permettent de voir qu'après 24h, il y a persistance des foyers 53BP1 dans les fibroblastes primaires du patient, contrairement à un contrôle qui a eu le temps de réparer les dommages générés par l'irradiation. Les cellules du patient se retrouve en fait dans une situation intermédiaire, comparativement à un patient Cernunnos, dont le nombre de foyers 53BP1 reste très élevé après 24h. Cela suggère une déficience dans le temps de réparation des cassures double brin ou une réparation partielle des lésions. D'autre part, une même approche mais suite à des

ponts inter-brins induits par la MMC, met en évidence un retard dans la détection des foyers 53BP1 aux sites de cassures. En effet, après seulement 4 heures de traitement, nous remarquons l'apparition massive de foyers 53BP1 dans les fibroblastes primaires du contrôle et d'un patient Fanconi. Les 1ers foyers apparaissent distinctement pour le patient MYSM1 uniquement après 10 heures de traitement continu. Cela peut suggèrer un défaut de signalisation et /ou de recrutement du facteur 53BP1 aux sites de lésions. Il est important de noter que ce retard n'est pas causé par un ralentissement de pousse des cellules (le pourcentage de cellules en phase S et le niveau d'incorporation de BrdU étant comparables dans des cellules déficientes en MYSM1 et dans des cellules contrôles).

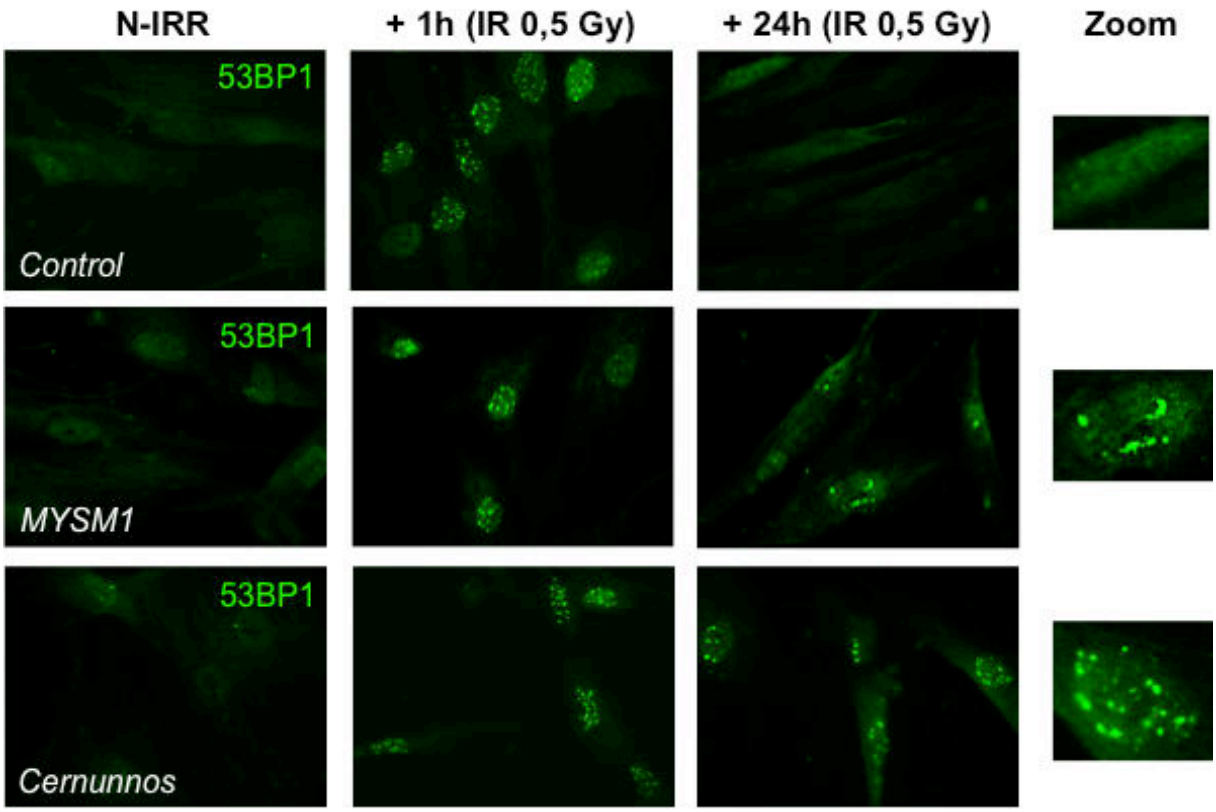



***Figure 65 :*** Cinétique de rétention des foyers 53BP1 après radiations ionisantes (0,5 Gy) dans les fibroblastes primaires d'un contrôle, du patient, et de contrôles mutés Fanconi et Cernunnos. (N-IRR : non-irradié)

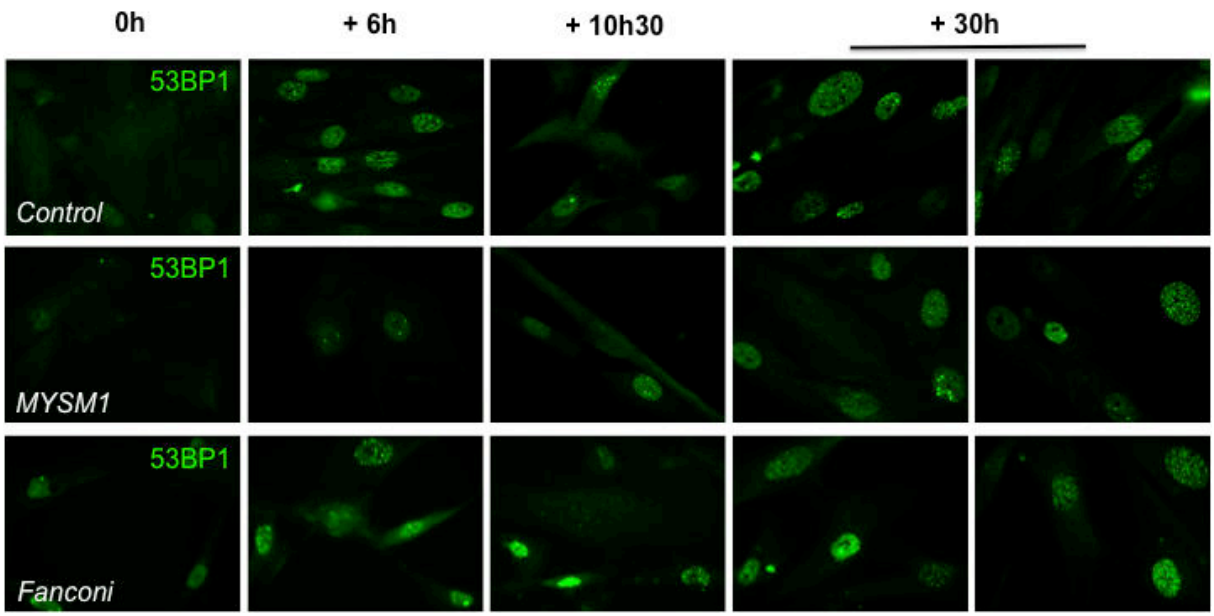



***Figure 66 :*** Cinétique d'apparition des foyers 53BP1 après traitement à la mitomycine C (200 ng/mL) dans les fibroblastes primaires d'un contrôle, du patient, et de contrôles Fanconi et Cernunnos.

Néanmoins, ces résultats tendent à suggérer que la réponse aux dommages n'est pas totalement abolie, mais est simplement ralentie, ce qui suffit à rendre les cellules plus sensibles aux cassures double brin de l'ADN et aux ponts inter-brin. On peut émettre l'hypothèse qu'une ou plusieurs autres protéines compenseraient partiellement le défaut du facteur, en mettant en place une réponse aux dommages différée.

De plus, nous souhaiterions poursuivre les expériences de micro-irradiation pour une visualisation directe en temps réel du comportement de MYSM1 après induction de lésion. Le but serait de tenter de mettre en évidence une éventuelle co-localisation aux sites de dommages de MYSM1 avec les médiateurs connus de la réponse aux dommages de l'ADN (tels que gH2AX, 53BP1, NBS1, MDC1 …). Nous possédons au laboratoire des constructions sous forme de protéines de fusion, correspondants à certains facteurs de la réparation couplés à des tags fluorescents, à savoir la GFP ou la DsRed. Nous avons mis en place la technique permettant de suivre en temps réel le recrutement de facteurs de réparation aux sites d'ADN lésés. Par exemple, la surexpression d'un vecteur NBS1-GFP dans des lignées cellulaires U-2-

OS, a permis le suivi du comportement en temps réel de la protéine NBS1 suite aux dommages générés par un faisceau laser (*Figure 67*).

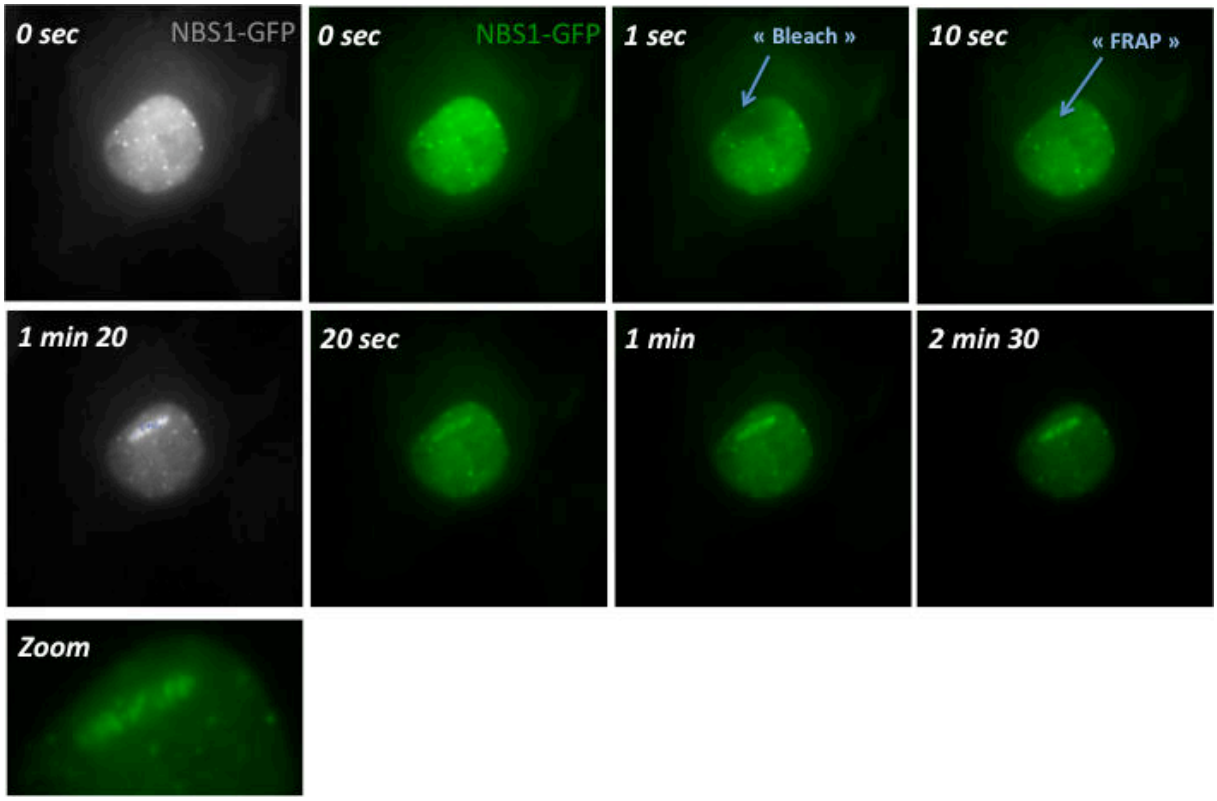



***Figure 67 :*** Micro-irradiation (« *Laser-foci* ») dans des cellules U-2-OS, après surexpression par transfection d'une construction NBS1-GFP.

Des expériences très préliminaires, et dans lesquelles les conditions n'étaient pas idéales, ont permis d'entrevoir un éventuel recrutement de MYSM1 à la cassure peu de temps après 53BP1 (*Figure 68*). Ceci est bien évidemment à explorer plus en détail et à confirmer.

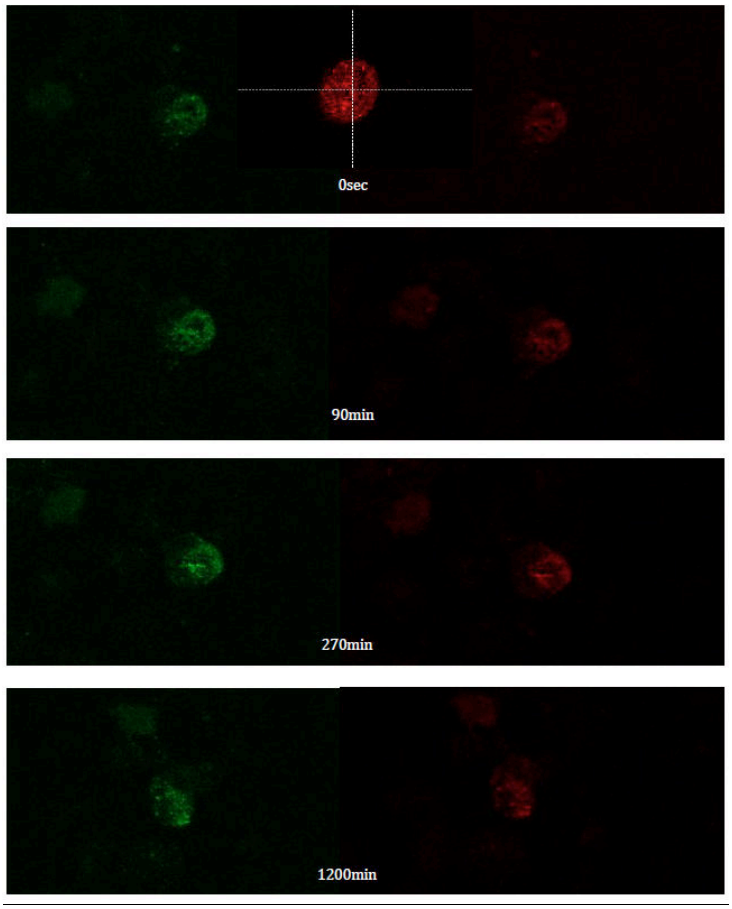



***Figure 68 :*** Test de micro-irradiation dans des cellules U-2-OS, après surexpression par transfection de constructions 53BP1-GFP et DsRed-MYSM1 sauvage.

A partir de nos résultats actuels, resituer précisément MYSM1 dans les voies de signalisation ou les mécanismes de réparation reste pour le moment compliqué. Nous ignorons si l'action de cette enzyme déubiquitinase au cours de la réparation est directe ou indirecte. Il pourrait y avoir des interactions de MYSM1 avec des facteurs intervenant dans les mécanismes de réparation. En se dirigeant vers la région lésée, MYSM1 serait alors capable de jouer le rôle d'un « cargo », en facilitant le trafic d'un autre facteur intervenant dans la réparation, avant de lui-même déubiquitiner les histones 2A mono-ubiquitinées flanquants les régions endommagées.

D'autre part, certains résultats préliminaires d'analyse haut débit de religation de plasmides linéarisés ont été obtenus (séquençage par la technologie *Ion Torrent PGM Sequencer*, Life

Technologies). Cette approche nous permet de conclure sur la nature de la religation - fidèle ou infidèle - et d'estimer précisément la taille en nucléotides des délétions relevées (*figure 69*). Ainsi, dans le cas de coupure franche de type « *blunt-blunt* », nous avons observé une altération de la voie de réparation dépendante du NHEJ dans les cellules du patient. La jonction est caractérisée par un taux d'infidélité important et accompagnée de délétions de nucléotides. Une composante non négligeable à la jonction des extrêmités lors du NHEJ seraient la structure de l'ADN à proximité des sites de dommages. La réorganisation chromatinienne qui a lieu grâce aux facteurs activés suite à la signalisation de lésions de l'ADN est cruciale. La meilleure accessibilité de la structure du double brin est rendue possible grâce à de nombreux complexes remodeleurs. Si ces étapes de « nettoyages des extrêmités » sont efficaces, cela favorise le choix vers l'utilisation de la voie de réparation du NHEJ. Dans cette situation, la ligature des extrêmités est alors plus facilement faisable, et ce avec une consommation d'énergie assez faible au sein de la cellule.

Un autre type de coupure de plasmide est de type « *3' – 3'* » (dites extrêmités cohésives) : la prise en charge de ces cassures reste à déterminer par une stratégie similaire de séquençage haut-débit.

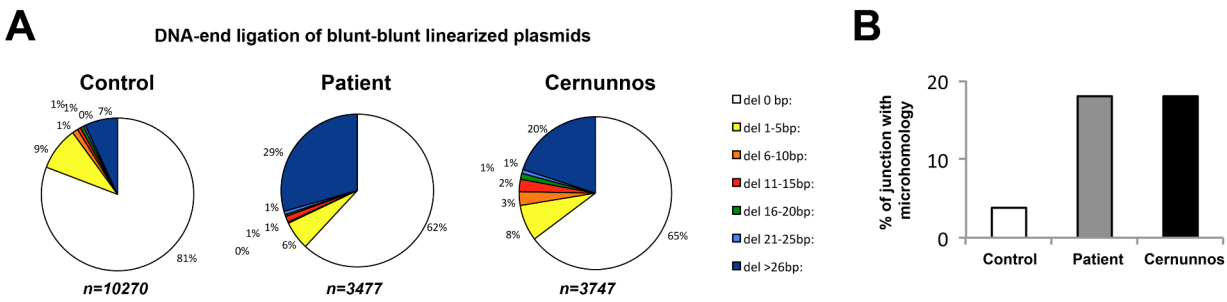



***Figure 69 :*** Analyse de plasmide linéarisé par une coupure de type « *blunt – blunt* », puis de religation par la voie de réparation du « *Non-Homologous End-Joining* », après transfection dans des fibroblastes de contrôle, du patient, et d'un individu muté Cernunnos. La taille des délétions est répertoriée (**a**). Le pourcentage de jonctions avec micro-homologies est également quantifié (**b**).

- ***L'absence de déubiquitination de l'histone H2A mono-ubiquitinée dans la région endommagée pourrait engendrer un état constitutif d' « hyper-signalisation »***

La mutation située dans le cœur catalytique de MYSM1 conduit très vraisemblablement à une perte de fonction, et donc de son activité de déubiquitination de l'histone H2A : de ce fait, on peut considérer qu'il y a un état d' « hyper-mono-ubiquitination » de l'histone H2A (similaire à une activation constitutive). Cela serait un signal permanent transmis à la cellule pour l'activation de la signalisation de réponse aux dommages de l'ADN. Cette situation de stress cellulaire, due à une signalisation inappropriée, serait dommageable à la cellule lorsque de réels dommages de l'ADN interviennent, puisque les acteurs de la réparation seraient déjà mobilisés inutilement, aléatoirement dans la cellule. Pour étudier cette hypothèse, nous comparerons par FRAP (« *Fluorescence Recovery After Photobleaching* ») la mobilité de certains facteurs de réparation de l'ADN dans des fibroblastes contrôles et du patient. De même, on pourrait suivre l'évolution de l'état d'ubiquitination et de déubiquitination de l'histone H2A au cours de cinétique post-cassures double brin, par immunofluorescence.

- ***L'exploration du modèle murin KO conditionnel pour Mysm1 devrait permettre de préciser les fonctions de Mysm1***

Le modèle murin KO conditionnel est en cours de production dans le laboratoire à partir de cellules ES provenant du consortium KOMP (« *Knock-Out Mouse Project* »). Dès obtention de ces souris, il nous sera envisageable de développer des lignées de fibroblastes d'oreille et en parallèle des MEFs de souris déficientes en Mysm1. Le but sera d'explorer et de reproduire les approches expérimentales permettant l'analyse de la réponse aux lésions de l'ADN (mesure de la sensibilité aux drogues génotoxiques, de l'accumulation des cellules en transition G2 / M, et vérification de l'intégrité de la signalisation Fanconi). Des analogies entre modèle humain et murin sont attendues pour ce qui est de la réparation de l'ADN, étant donné les défauts immuno-hématologiques très semblables entre les 2 modèles. A plus long

terme, nous aimerions utiliser ce modèle souris pour explorer le versant immunitaire, et estimer l'importance de MYSM1 au cours des processus de recombinaison V(D)J, de la commutation de classe des immunoglobulines. Puisque les souris KO Mysm1 n'ont pas de lymphocytes B, les explorations seront possibles en délétant Mysm1 spécifiquement dans les lymphocytes B (en croisant nos souris conditionnelles avec des CD21-Cre exprimant la recombinase Cre.

- ***Le rôle transcriptionnel de MYSM1 serait indépendant de son action aux dommages***

De plus, en se référant aux fonctions de MYSM1 déjà exposées dans la littérature et pour pouvoir conclure sur un rôle direct ou indirect au cours de la réparation, des approches d'inhibition transcriptionnelle ont déjà été initiées. L'utilisation d'inhibiteur tel que l'actinomycine D, suivi d'une validation de l'efficacité de l'extinction par des vecteurs d'expression de la luciférase avec le gène rapporteur T4 Renilla, permettront de valider l'approche. La mise en présence des cellules transcriptionnellement inactives à des traitements génotoxiques générant des cassures double brin ou des ponts inter-brins permettront de conclure définitivement, si le phénotype de défaut de réparation des ponts inter-brin ou des cassures double brin est une conséquence primaire ou secondaire à des dérégulations transcriptionnelles de certains facteurs sous contrôle de MYSM1 (sachant que nous ne concluons pas en une dérégulation de gènes impliqués dans la réparation chez le patient, par notre approche de puce Affymetrix). Enfin, nous entreprenons actuellement le développement de cellules IPS (« *Induced Pluripotent Stem cells* ») à partir des fibroblastes primaires du patient, en collaboration avec Luigi D. NOTARANGELO (Harvard University, Etats-Unis), pour avoir un modèle de différentiation *in-vitro* de cellules du système immuno-hématopoïétique humain. Nous pourrons ainsi procéder à des analyses transcriptomiques au cours de ces étapes de différenciation.

- ***Certaines caractéristiques phénotypiques dans les modèles déficients, pourraient mettre en évidence la participation de MYSM1 à d'autres processus***

Outre le système immuno-hématologique, si l'on compare le modèle souris et le patient, on s'aperçoit de certains traits relevés comme l'absence de queue, qui ne peuvent pas être la conséquence des dysfonctions du système immunitaire. Ceci est compatible avec les aberrations de développement relevé de certains organes (surdité, atrésie des choanes et microcéphalie). Procéder à ces analyses phénotypiques comparatives pourraient permettre de conclure que MYSM1 participe à d'autres processus. Ainsi, l'activité de régulateur transcriptionnel de MYSM1, comme le suggère l'étude de P. Zhu, ciblerait également certains facteurs clés impliqués au cours du développement embryonnaire.

- ***L'influence de MYSM1 sur le déroulement du cycle cellulaire***

Nous avons remarqué que les cultures issues des fibroblastes primaires du patient ainsi que ceux transformés par le virus SV40 ou télomérisés par hTERT, ont des capacités prolifératives plus importantes (temps de doublement réduit), comparé à des contrôles. Nous avons d'ores et déjà entrepris des études de synchronisation cellulaire, par double blocage thymidine (accumulant les cellules en fin de phase G1 ou phase S précoce), ou par blocage thymidine – colcémide (accumulant les cellules en fin de phase S - début mitose), puis relâchement afin de suivre la cinétique de redémarrage du cycle cellulaire. Des résultats très préliminaires (données non présentées) suggèrent que les cellules déficientes en MYSM1 ont une progression plus rapide au cours du cycle cellulaire après la synchronisation. On peut imaginer que MYSM1 pourrait avoir une action sur l'un des points de contrôle du cycle cellulaire. Pourtant, les proliférations mesurées par incorporation de BrDU et par l'iodure de propidium semblent comparables aux contrôles. De ce fait, l'étude des fourches de réplication par peignage moléculaire pourrait nous apporter certains éléments de compréhension.

- ***MYSM1 est-il un acteur aux télomères ?***

Les analyses phénotypiques classiques que nous réalisons au laboratoire ont révélé certaines caractéristiques particulières chez le patient muté dans le gène MYSM1. La taille des télomères à partir de l'ADN génomique de sang total ou de fibroblastes primaires a été estimée. Les TIFs, les anomalies par FISH et co-FISH ainsi que la sénescence ont été explorées et quantifiées. Ces explorations préliminaires nous ont interpellés (*figure 70, 71, 72 et 73*). En effet, bien que les télomères soient de tailles normales (9,6 kb) comparativement aux parents, et à son frère et cousin sains, nous avons relevé un fort taux de senescence (près de 70 %). De plus, aucune aberration télomérique n'apparaît significative, mais la colocalisation de 53BP1 avec une sonde télomérique (TIFs) est très significativement augmentée dans les cellules du patient. Ceci suggère d'éventuelles anomalies aux télomères.

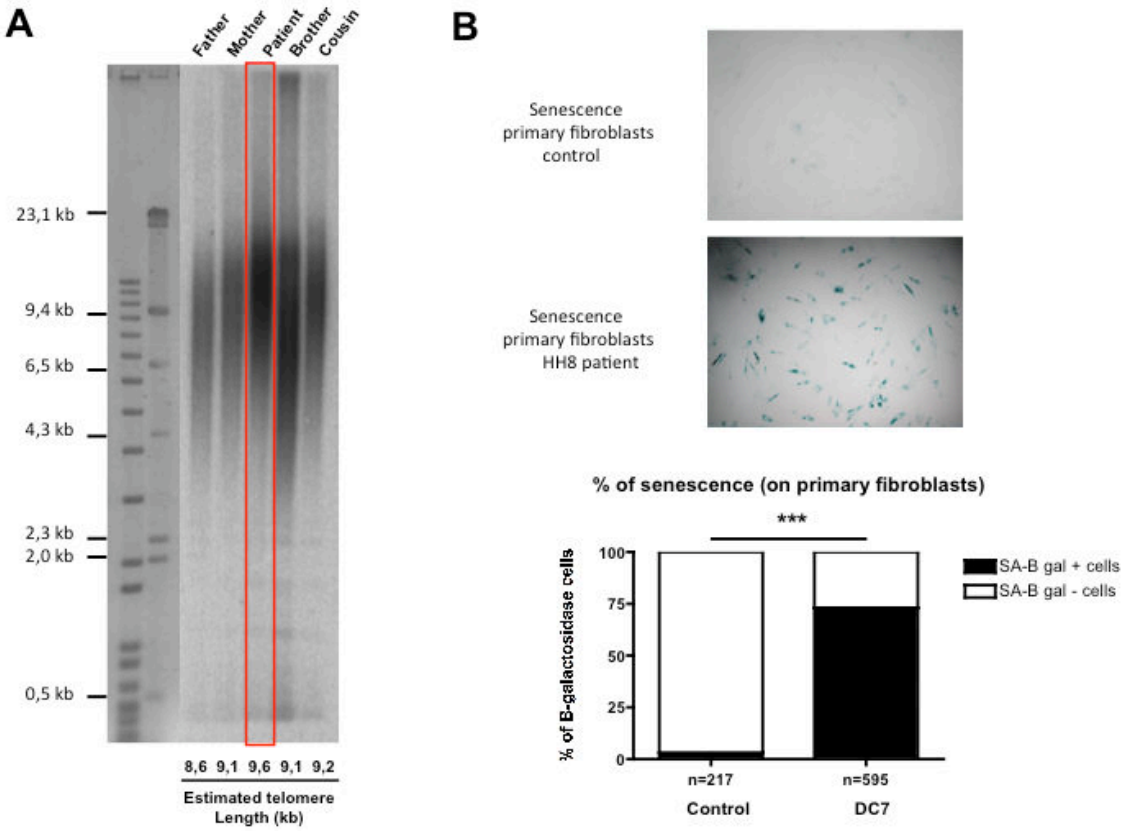



***Figure 70 :*** **a/** Mesure de la longueur des télomères par Southern-Blot à partir d'ADN génomique du sang total de l'ensemble des membres de la famille du patient.
**b/** Quantification du taux de sénescence des fibroblastes primaires, mesurée par l'activité béta-galactosidase.

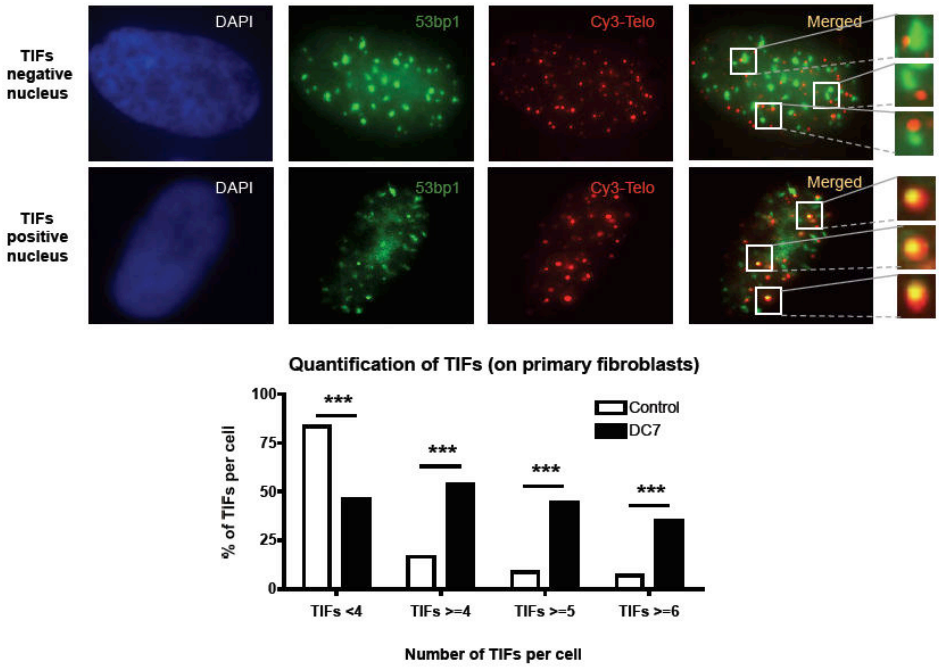



***Figure 71 :*** Quantification du niveau de TIFs dans les fibroblastes primaires du patient comparativement à un contrôle, par marquage du médiateur 53BP1 et d'une sonde télomérique.

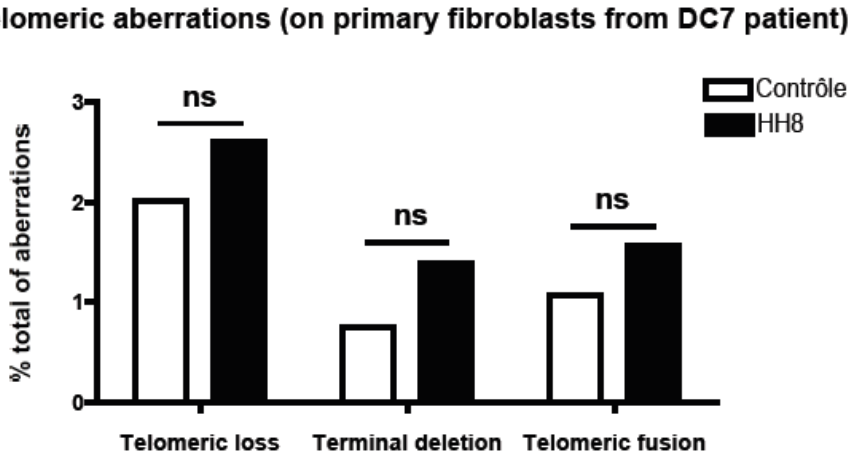



***Figure 72 :*** Quantification par FISH des aberrations télomériques – pertes sèches, délétions terminales et fusions télomériques - pouvant être détectées sur fibroblastes contrôle et du patient transformés par l'antigène SV40.

Suite à ces observations, et puisque MYSM1 possède un domaine MYB potentiellement impliqué dans l'interaction avec l'ADN, nous avons tenté de mettre en évidence une éventuelle interaction de MYSM1 avec des séquences télomériques par une approche de co-immunoprécipitation entre séquences d'ADN et protéines, par « *Telomere Pull-Down* »

(*figure 73*). Nous avons surexprimé un vecteur MYSM1 sauvage avec une étiquette Flag, puis co-immunoprécipité les protéines avec une séquence aléatoire d'ADN, de l'ADN télomérique ou sans ADN. La détection par Western-Blot est réalisée avec un anticorps dirigé contre le Flag, ou contre la Shelterin TRF2 (contrôle positif d'interaction aux séquences télomériques). Ku70 est le contrôle de charge. Un « input » permet de mesurer le taux d'expression endogène des protéines. Ces expériences ne révèlent pas d'interaction de MYSM1 aux séquences télomériques.

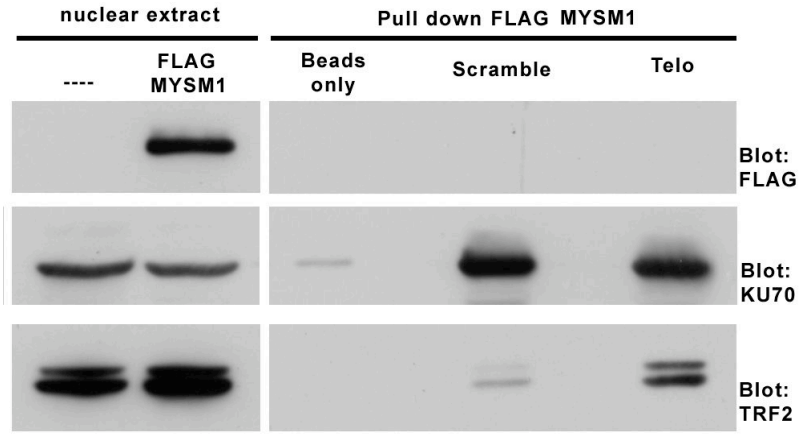



***Figure 73 :*** « *Telomere-pull down* » réalisé avec des séquences d'ADN aléatoires ou télomériques, et détection par immuno-précipitation du niveau de protéines de MYSM1, KU70 et TRF2 liés aux différentes séquences utilisées.

Enfin, MYSM1 étant une enzyme déubiquitinase de l'histone H2A, il serait intéressant de procéder à une mesure des marques aux télomères par « *Telomere-Dot Blot* », afin d'étudier la dynamique chromatinienne au niveau des télomères (chromatine-immunoprécipitation aux télomères de l'histone H2A en comparaison à la chromatine-immunoprécipitation de l'histone H2A extra-télomérique).

# CONCLUSION

L'étude de syndromes héréditaires rares caractérisés par un déficit immunitaire et des anomalies du développement, a permis par le passé d'identifier de nouveaux facteurs de réparation et d'en analyser les fonctions. Le travail réalisé au cours de cette thèse a permis d'identifier 2 nouvelles causes moléculaires de syndromes associés à des défauts de protection des télomères et / ou de réparation de l'ADN : l'hélicase de l'ADN RTEL1 responsable du syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson, et la déubiquitinase d'histone MYSM1, à l'origine d'un nouveau syndrome nommé « BADD » (« *B-Alymphocytosis Dyshematopoiesis Dna repair defect* »).

Des études seront maintenant indispensables à réaliser pour préciser les fonctions de RTEL1 et MYSM1. Par ailleurs, les nouvelles approches génétiques à haut débit devraient permettre d'identifier au laboratoire d'autres pathologies dont l'origine moléculaire reste à ce jour inconnue.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES


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

Ahn, J.Y., Schwarz, J.K., Piwnica-Worms, H., and Canman, C.E. (2000). Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. Cancer Res *60*, 5934-5936.

Ahnesorg, P., Smith, P., and Jackson, S.P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. Cell *124*, 301-313.

Al-Hakim, A., Escribano-Diaz, C., Landry, M.C., O'Donnell, L., Panier, S., Szilard, R.K., and Durocher, D. (2010). The ubiquitous role of ubiquitin in the DNA damage response. DNA Repair (Amst) *9*, 1229-1240.

Alpi, A.F., and Patel, K.J. (2009). Monoubiquitylation in the Fanconi anemia DNA damage response pathway. DNA Repair (Amst) *8*, 430-435.

Alt, F.W., Zhang, Y., Meng, F.L., Guo, C., and Schwer, B. (2013). Mechanisms of programmed DNA lesions and genomic instability in the immune system. Cell *152*, 417-429.

Alter, B.P., Greene, M.H., Velazquez, I., and Rosenberg, P.S. (2003). Cancer in Fanconi anemia. Blood *101*, 2072.

Anderson, B.H., Kasher, P.R., Mayer, J., Szynkiewicz, M., Jenkinson, E.M., Bhaskar, S.S., Urquhart, J.E., Daly, S.B., Dickerson, J.E., O'Sullivan, J.*, et al.* (2012). Mutations in CTC1, encoding conserved telomere maintenance component 1, cause Coats plus. Nat Genet *44*, 338-342.

Andrade, P., Martin, M.J., Juarez, R., Lopez de Saro, F., and Blanco, L. (2009). Limited terminal transferase in human DNA polymerase mu defines the required balance between accuracy and efficiency in NHEJ. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 16203-16208.

Armanios, M.Y., Chen, J.J., Cogan, J.D., Alder, J.K., Ingersoll, R.G., Markin, C., Lawson, W.E., Xie, M., Vulto, I., Phillips, J.A., 3rd*, et al.* (2007). Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med *356*, 1317-1326.

Arnoult, N., Van Beneden, A., and Decottignies, A. (2012). Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1alpha. Nat Struct Mol Biol *19*, 948-956.

Artandi, S.E., and DePinho, R.A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. Carcinogenesis *31*, 9-18.

Atkinson, S.P., Hoare, S.F., Glasspool, R.M., and Keith, W.N. (2005). Lack of telomerase gene expression in alternative lengthening of telomere cells is associated with chromatin remodeling of the hTR and hTERT gene promoters. Cancer Res *65*, 7585-7590.

Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. J Biol Chem *279*, 55117-55126.

Auerbach, A.D. (1988). A test for Fanconi's anemia. Blood *72*, 366-367.

Ayoub, N., Jeyasekharan, A.D., Bernal, J.A., and Venkitaraman, A.R. (2009). Paving the way for H2AX phosphorylation: chromatin changes in the DNA damage response. Cell Cycle *8*, 1494-1500.

Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khoriauli, L., Giulotto, E., and Lingner, J. (2007). Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. Science *318*, 798-801.

Bae, J.B., Mukhopadhyay, S.S., Liu, L., Zhang, N., Tan, J., Akhter, S., Liu, X., Shen, X., Li, L., and Legerski, R.J. (2008). Snm1B/Apollo mediates replication fork collapse and S Phase checkpoint activation in response to DNA interstrand cross-links. Oncogene *27*, 5045-5056.

Bae, N.S., and Baumann, P. (2007). A RAP1/TRF2 complex inhibits nonhomologous end-joining at human telomeric DNA ends. Mol Cell *26*, 323-334.

Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature *421*, 499-506.

Ballew, B.J., Joseph, V., De, S., Sarek, G., Vannier, J.B., Stracker, T., Schrader, K.A., Small, T.N., O'Reilly, R., Manschreck, C.*, et al.* (2013a). A Recessive Founder Mutation in Regulator of Telomere Elongation Helicase 1, RTEL1, Underlies Severe Immunodeficiency and Features of Hoyeraal Hreidarsson Syndrome. PLoS Genet *9*, e1003695.
Ballew, B.J., Yeager, M., Jacobs, K., Giri, N., Boland, J., Burdett, L., Alter, B.P., and Savage, S.A. (2013b). Germline mutations of regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, in Dyskeratosis congenita. Human genetics.
Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y.*, et al.* (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. Science *281*, 1674-1677.
Barber, L.J., Youds, J.L., Ward, J.D., McIlwraith, M.J., O'Neil, N.J., Petalcorin, M.I., Martin, J.S., Collis, S.J., Cantor, S.B., Auclair, M.*, et al.* (2008). RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination. Cell *135*, 261-271.
Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. Cancer cell *3*, 421-429.
Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Kramer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldberg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C.*, et al.* (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. Nature *434*, 864-870.
Bassing, C.H., Suh, H., Ferguson, D.O., Chua, K.F., Manis, J., Eckersdorff, M., Gleason, M., Bronson, R., Lee, C., and Alt, F.W. (2003). Histone H2AX: a dosage-dependent suppressor of oncogenic translocations and tumors. Cell *114*, 359-370.
Baumann, P., and Cech, T.R. (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. Science *292*, 1171-1175.
Bednarski, J.J., and Sleckman, B.P. (2012). Lymphocyte development: integration of DNA damage response signaling. Adv Immunol *116*, 175-204.
Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2011). The ubiquitin- and SUMO-dependent signaling response to DNA double-strand breaks. FEBS Lett *585*, 2914-2919.
Beneke, S., Cohausz, O., Malanga, M., Boukamp, P., Althaus, F., and Burkle, A. (2008). Rapid regulation of telomere length is mediated by poly(ADP-ribose) polymerase-1. Nucleic Acids Res *36*, 6309-6317.
Benetti, R., Garcia-Cao, M., and Blasco, M.A. (2007a). Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. Nat Genet *39*, 243-250.
Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I., Schotta, G., Klatt, P., Jenuwein, T., and Blasco, M.A. (2007b). Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. J Cell Biol *178*, 925-936.
Bennett, G., Papamichos-Chronakis, M., and Peterson, C.L. (2013). DNA repair choice defines a common pathway for recruitment of chromatin regulators. Nat Commun *4*, 2084.
Bennett-Lovsey, R.M., Herbert, A.D., Sternberg, M.J., and Kelley, L.A. (2008). Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. Proteins *70*, 611-625.
Berquist, B.R., and Wilson, D.M., 3rd (2012). Pathways for repairing and tolerating the spectrum of oxidative DNA lesions. Cancer Lett *327*, 61-72.
Bernstein, N.K., Hammel, M., Mani, R.S., Weinfeld, M., Pelikan, M., Tainer, J.A., and Glover, J.N. (2009). Mechanism of DNA substrate recognition by the mammalian DNA repair enzyme, Polynucleotide Kinase. Nucleic Acids Res *37*, 6161-6173.
Bester, A.C., Roniger, M., Oren, Y.S., Im, M.M., Sarni, D., Chaoat, M., Bensimon, A., Zamir, G., Shewach, D.S., and Kerem, B. (2011). Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development. Cell *145*, 435-446.
Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P., and de Lange, T. (1997). TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. Embo J *16*, 1785-1794.
Bilaud, T., Brun, C., Ancelin, K., Koering, C.E., Laroche, T., and Gilson, E. (1997). Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. Nat Genet *17*, 236-239.

Blackburn, E.H. (1991). Structure and function of telomeres. Nature *350*, 569-573.
Blackburn, E.H. (1994). Telomeres: no end in sight. Cell *77*, 621-623.
Blackwell, T.K., Moore, M.W., Yancopoulos, G.D., Suh, H., Lutzker, S., Selsing, E., and Alt, F.W. (1986). Recombination between immunoglobulin variable region gene segments is enhanced by transcription. Nature *324*, 585-589.
Blasco, M.A. (2007). The epigenetic regulation of mammalian telomeres. Nat Rev Genet *8*, 299-309.
Blasina, A., de Weyer, I.V., Laus, M.C., Luyten, W.H., Parker, A.E., and McGowan, C.H. (1999). A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase. Curr Biol *9*, 1-10.
Boboila, C., Oksenych, V., Gostissa, M., Wang, J.H., Zha, S., Zhang, Y., Chai, H., Lee, C.S., Jankovic, M., Saez, L.M*., et al.* (2012). Robust chromosomal DNA repair via alternative end-joining in the absence of X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1). Proc Natl Acad Sci U S A *109*, 2473-2478.
Bower, K., Napier, C.E., Cole, S.L., Dagg, R.A., Lau, L.M., Duncan, E.L., Moy, E.L., and Reddel, R.R. (2012). Loss of wild-type ATRX expression in somatic cell hybrids segregates with activation of Alternative Lengthening of Telomeres. PLoS One *7*, e50062.
Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., and de Lange, T. (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. Nat Genet *17*, 231-235.
Brosh, R.M., Jr. (2013). DNA helicases involved in DNA repair and their roles in cancer. Nat Rev Cancer *13*, 542-558.
Bryan, T.M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M.A., and Reddel, R.R. (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. Nature medicine *3*, 1271-1274.
Buck, D., Malivert, L., de Chasseval, R., Barraud, A., Fondaneche, M.C., Sanal, O., Plebani, A., Stephan, J.L., Hufnagel, M., le Deist, F*., et al.* (2006a). Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. Cell *124*, 287-299.
Buck, D., Moshous, D., de Chasseval, R., Ma, Y., le Deist, F., Cavazzana-Calvo, M., Fischer, A., Casanova, J.L., Lieber, M.R., and de Villartay, J.P. (2006b). Severe combined immunodeficiency and microcephaly in siblings with hypomorphic mutations in DNA ligase IV. Eur J Immunol *36*, 224-235.
Bunting, S.F., Callen, E., Wong, N., Chen, H.T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L*., et al.* (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. Cell *141*, 243-254.
Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. J Biol Chem *276*, 42462-42467.
Buscemi, G., Zannini, L., Fontanella, E., Lecis, D., Lisanti, S., and Delia, D. (2009). The shelterin protein TRF2 inhibits Chk2 activity at telomeres in the absence of DNA damage. Curr Biol *19*, 874-879.

Calado, R.T., and Young, N.S. (2008). Telomere maintenance and human bone marrow failure. Blood *111*, 4446-4455.
Calado, R.T., and Young, N.S. (2009). Telomere diseases. N Engl J Med *361*, 2353-2365.
Callen, E., Nussenzweig, M.C., and Nussenzweig, A. (2007). Breaking down cell cycle checkpoints and DNA repair during antigen receptor gene assembly. Oncogene *26*, 7759-7764.
Callen, E., Jankovic, M., Difilippantonio, S., Daniel, J.A., Chen, H.T., Celeste, A., Pellegrini, M., McBride, K., Wangsa, D., Bredemeyer, A.L*., et al.* (2007). ATM prevents the persistence and propagation of chromosome breaks in lymphocytes. Cell *130*, 63-75.
Campos, E.I., and Reinberg, D. (2009). Histones: annotating chromatin. Annu Rev Genet *43*, 559-599.
Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. Science *281*, 1677-1679.
Canudas, S., Houghtaling, B.R., Bhanot, M., Sasa, G., Savage, S.A., Bertuch, A.A., and Smith, S. (2011). A role for heterochromatin protein 1gamma at human telomeres. Genes Dev *25*, 1807-1819.

Carney, J.P., Maser, R.S., Olivares, H., Davis, E.M., Le Beau, M., Yates, J.R., 3rd, Hays, L., Morgan, W.F., and Petrini, J.H. (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. Cell *93*, 477-486.
Ceccaldi, R., Briot, D., Larghero, J., Vasquez, N., Dubois d'Enghien, C., Chamousset, D., Noguera, M.E., Waisfisz, Q., Hermine, O., Pondarre, C.*, et al.* (2011). Spontaneous abrogation of the G(2)DNA damage checkpoint has clinical benefits but promotes leukemogenesis in Fanconi anemia patients. J Clin Invest *121*, 184-194.
Ceccaldi, R., Parmar, K., Mouly, E., Delord, M., Kim, J.M., Regairaz, M., Pla, M., Vasquez, N., Zhang, Q.S., Pondarre, C.*, et al.* (2012). Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. Cell Stem Cell *11*, 36-49.
Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M.J., Pilch, D.R., Staudt, D.W., Lee, A., Bonner, R.F., Bonner, W.M., and Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. Nat Cell Biol *5*, 675-679.
Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P.J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Sedelnikova, O.A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M.J.*, et al.* (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. Science *296*, 922-927.
Celli, G.B., and de Lange, T. (2005). DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. Nat Cell Biol *7*, 712-718.
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 *51*, 141-155.
Cha, H., Lowe, J.M., Li, H., Lee, J.S., Belova, G.I., Bulavin, D.V., and Fornace, A.J., Jr. (2010). Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response. Cancer Res *70*, 4112-4122.
Chai, B., Huang, J., Cairns, B.R., and Laurent, B.C. (2005a). Distinct roles for the RSC and Swi/Snf ATP-dependent chromatin remodelers in DNA double-strand break repair. Genes Dev *19*, 1656-1661.
Chai, W., Sfeir, A.J., Hoshiyama, H., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2006). The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres. EMBO Rep *7*, 225-230.
Chai, W., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2005b). Human telomeres maintain their overhang length at senescence. Mol Cell Biol *25*, 2158-2168.
Chan, D.W., and Lees-Miller, S.P. (1996). The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. J Biol Chem *271*, 8936-8941.
Chapman, J.R., Barral, P., Vannier, J.B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., Sartori, A.A., Adams, I.R., Batista, F.D., and Boulton, S.J. (2013). RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection. Mol Cell *49*, 858-871.
Chapman, J.R., Taylor, M.R., and Boulton, S.J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. Mol Cell *47*, 497-510.
Chehab, N.H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T.D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. Genes Dev *14*, 278-288.
Chen, L.Y., Redon, S., and Lingner, J. (2012). The human CST complex is a terminator of telomerase activity. Nature *488*, 540-544.
Chen, Y., Yang, Y., van Overbeek, M., Donigian, J.R., Baciu, P., de Lange, T., and Lei, M. (2008). A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins. Science *319*, 1092-1096.
Chowdhury, D., Keogh, M.C., Ishii, H., Peterson, C.L., Buratowski, S., and Lieberman, J. (2005). gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. Mol Cell *20*, 801-809.
Churikov, D., Wei, C., and Price, C.M. (2006). Vertebrate POT1 restricts G-overhang length and prevents activation of a telomeric DNA damage checkpoint but is dispensable for overhang protection. Mol Cell Biol *26*, 6971-6982.

Ciccia, A., Ling, C., Coulthard, R., Yan, Z., Xue, Y., Meetei, A.R., Laghmani el, H., Joenje, H., McDonald, N., de Winter, J.P., *et al.* (2007). Identification of FAAP24, a Fanconi anemia core complex protein that interacts with FANCM. Mol Cell *25*, 331-343.
Cimprich, K.A., and Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. Nat Rev Mol Cell Biol *9*, 616-627.
Cohen, S.B., Graham, M.E., Lovrecz, G.O., Bache, N., Robinson, P.J., and Reddel, R.R. (2007). Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. Science *315*, 1850-1853.
Cohn, M.A., and D'Andrea, A.D. (2008). Chromatin recruitment of DNA repair proteins: lessons from the fanconi anemia and double-strand break repair pathways. Mol Cell *32*, 306-312.
Compton, S.A., Choi, J.H., Cesare, A.J., Ozgur, S., and Griffith, J.D. (2007). Xrcc3 and Nbs1 are required for the production of extrachromosomal telomeric circles in human alternative lengthening of telomere cells. Cancer Res *67*, 1513-1519.
Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. Science *294*, 1713-1716.
Crabbe, L., Verdun, R.E., Haggblom, C.I., and Karlseder, J. (2004). Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. Science *306*, 1951-1953.
Curtin, N.J. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. Nat Rev Cancer *12*, 801-817.

d'Adda di Fagagna, F., Teo, S.H., and Jackson, S.P. (2004). Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. Genes Dev *18*, 1781-1799.
Dart, D.A., Adams, K.E., Akerman, I., and Lakin, N.D. (2004). Recruitment of the cell cycle checkpoint kinase ATR to chromatin during S-phase. J Biol Chem *279*, 16433-16440.
Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. Nature *334*, 395-402.
de Lange, T. (2009). How telomeres solve the end-protection problem. Science *326*, 948-952.
de Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. Oncogene *21*, 532-540.
de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. Genes Dev *19*, 2100-2110.
de Lange, T., and Jacks, T. (1999). For better or worse? Telomerase inhibition and cancer. Cell *98*, 273-275.
Deans, A.J., and West, S.C. (2011). DNA interstrand crosslink repair and cancer. Nat Rev Cancer *11*, 467-480.
Decottignies, A. (2013). Alternative end-joining mechanisms: a historical perspective. Front Genet *4*, 48.
Denchi, E.L., and de Lange, T. (2007). Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. Nature *448*, 1068-1071.
Deng, Y., Guo, X., Ferguson, D.O., and Chang, S. (2009). Multiple roles for MRE11 at uncapped telomeres. Nature *460*, 914-918.
Deng, Z., Glousker, G., Molczan, A., Fox, A.J., Lamm, N., Dheekollu, J., Weizman, O.E., Schertzer, M., Wang, Z., Vladimirova, O., *et al.* (2013). Inherited mutations in the helicase RTEL1 cause telomere dysfunction and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A *110*, E3408-3416.
Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. Nature *444*, 638-642.
Di Noia, J.M., and Neuberger, M.S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. Annual review of biochemistry *76*, 1-22.
Di Virgilio, M., Callen, E., Yamane, A., Zhang, W., Jankovic, M., Gitlin, A.D., Feldhahn, N., Resch, W., Oliveira, T.Y., Chait, B.T., *et al.* (2013). Rif1 prevents resection of DNA breaks and promotes immunoglobulin class switching. Science *339*, 711-715.

Dimitrova, N., and de Lange, T. (2006). MDC1 accelerates nonhomologous end-joining of dysfunctional telomeres. Genes Dev *20*, 3238-3243.
Dimitrova, N., Chen, Y.C., Spector, D.L., and de Lange, T. (2008). 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. Nature *456*, 524-528.
Dimitrova, N., and de Lange, T. (2009). Cell cycle-dependent role of MRN at dysfunctional telomeres: ATM signaling-dependent induction of nonhomologous end joining (NHEJ) in G1 and resection-mediated inhibition of NHEJ in G2. Mol Cell Biol *29*, 5552-5563.
Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O.*, et al.* (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 9363-9367.
Ding, H., Schertzer, M., Wu, X., Gertsenstein, M., Selig, S., Kammori, M., Pourvali, R., Poon, S., Vulto, I., Chavez, E.*, et al.* (2004). Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein. Cell *117*, 873-886.
Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D.H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J.*, et al.* (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. Cell *136*, 435-446.
Dokal, I. (2000). Dyskeratosis congenita in all its forms. Br J Haematol *110*, 768-779.
Dokal, I. (2011). Dyskeratosis congenita. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program *2011*, 480-486.
Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., and Dick, J.E. (2012). Hematopoiesis: a human perspective. Cell Stem Cell *10*, 120-136.
Downey, M., and Durocher, D. (2006). Chromatin and DNA repair: the benefits of relaxation. Nat Cell Biol *8*, 9-10.
Drouet, J., Delteil, C., Lefrancois, J., Concannon, P., Salles, B., and Calsou, P. (2005). DNA-dependent protein kinase and XRCC4-DNA ligase IV mobilization in the cell in response to DNA double strand breaks. J Biol Chem *280*, 7060-7069.
Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., and Alt, F.W. (2005). Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. Adv Immunol *86*, 43-112.

Edelbrock, M.A., Kaliyaperumal, S., and Williams, K.J. (2013). Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities. Mutat Res *743-744*, 53-66.
Egan, K.M., Thompson, R.C., Nabors, L.B., Olson, J.J., Brat, D.J., Larocca, R.V., Brem, S., Moots, P.L., Madden, M.H., Browning, J.E.*, et al.* (2011). Cancer susceptibility variants and the risk of adult glioma in a US case-control study. Journal of neuro-oncology *104*, 535-542.
Ellis, N.A., Groden, J., Ye, T.Z., Straughen, J., Lennon, D.J., Ciocci, S., Proytcheva, M., and German, J. (1995). The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. Cell *83*, 655-666.
Ellis, N.A., Ciocci, S., and German, J. (2001). Back mutation can produce phenotype reversion in Bloom syndrome somatic cells. Human genetics *108*, 167-173.
Escargueil, A.E., Soares, D.G., Salvador, M., Larsen, A.K., and Henriques, J.A. (2008). What histone code for DNA repair? Mutat Res *658*, 259-270.
Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J.T., Tkac, J., Cook, M.A., Rosebrock, A.P., Munro, M., Canny, M.D.*, et al.* (2013). A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. Mol Cell *49*, 872-883.

Falck, J., Petrini, J.H., Williams, B.R., Lukas, J., and Bartek, J. (2002). The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. Nat Genet *30*, 290-294.
Fanconi, G. (1967). Familial constitutional panmyelocytopathy, Fanconi's anemia (F.A.). I. Clinical aspects. Seminars in hematology *4*, 233-240.

Faraci, M., Lanino, E., Micalizzi, C., Morreale, G., Di Martino, D., Banov, L., Comoli, P., Locatelli, F., Soresina, A., and Plebani, A. (2009). Unrelated hematopoietic stem cell transplantation for Cernunnos-XLF deficiency. Pediatr Transplant *13*, 785-789.
Feijoo, C., Hall-Jackson, C., Wu, R., Jenkins, D., Leitch, J., Gilbert, D.M., and Smythe, C. (2001). Activation of mammalian Chk1 during DNA replication arrest: a role for Chk1 in the intra-S phase checkpoint monitoring replication origin firing. J Cell Biol *154*, 913-923.
Fernandez-Capetillo, O., and Nussenzweig, A. (2004). Linking histone deacetylation with the repair of DNA breaks. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 1427-1428.
Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Zheng, H., Cenni, B., Nehme, A., Christen, R.D., and Howell, S.B. (1996). The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. Cancer Res *56*, 4881-4886.
Flynn, R.L., Centore, R.C., O'Sullivan, R.J., Rai, R., Tse, A., Songyang, Z., Chang, S., Karlseder, J., and Zou, L. (2011). TERRA and hnRNPA1 orchestrate an RPA-to-POT1 switch on telomeric single-stranded DNA. Nature *471*, 532-536.
Fradet-Turcotte, A., Canny, M.D., Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Leung, C.C., Huang, H., Landry, M.C., Kitevski-LeBlanc, J., Noordermeer, S.M., Sicheri, F*., et al.* (2013). 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. Nature *499*, 50-54.
Franco, S., Gostissa, M., Zha, S., Lombard, D.B., Murphy, M.M., Zarrin, A.A., Yan, C., Tepsuporn, S., Morales, J.C., Adams, M.M*., et al.* (2006). H2AX prevents DNA breaks from progressing to chromosome breaks and translocations. Mol Cell *21*, 201-214.
Friedberg, E.C. (1995). Out of the shadows and into the light: the emergence of DNA repair. Trends in biochemical sciences *20*, 381.

Garcia-Cao, M., O'Sullivan, R., Peters, A.H., Jenuwein, T., and Blasco, M.A. (2004). Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. Nat Genet *36*, 94-99.
Gell, D., and Jackson, S.P. (1999). Mapping of protein-protein interactions within the DNA-dependent protein kinase complex. Nucleic Acids Res *27*, 3494-3502.
Geuting, V., Reul, C., and Lobrich, M. (2013). ATM release at resected double-strand breaks provides heterochromatin reconstitution to facilitate homologous recombination. PLoS Genet *9*, e1003667.
Ghosh, A.K., Rossi, M.L., Singh, D.K., Dunn, C., Ramamoorthy, M., Croteau, D.L., Liu, Y., and Bohr, V.A. (2012). RECQL4, the protein mutated in Rothmund-Thomson syndrome, functions in telomere maintenance. J Biol Chem *287*, 196-209.
Gilley, D., Tanaka, H., Hande, M.P., Kurimasa, A., Li, G.C., Oshimura, M., and Chen, D.J. (2001). DNA-PKcs is critical for telomere capping. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 15084-15088.
Giraud-Panis, M.J., Teixeira, M.T., Geli, V., and Gilson, E. (2010). CST meets shelterin to keep telomeres in check. Mol Cell *39*, 665-676.
Gluckman, E., Broxmeyer, H.A., Auerbach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P*., et al.* (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med *321*, 1174-1178.
Goldberg, M., Stucki, M., Falck, J., D'Amours, D., Rahman, D., Pappin, D., Bartek, J., and Jackson, S.P. (2003). MDC1 is required for the intra-S-phase DNA damage checkpoint. Nature *421*, 952-956.
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.
Goodarzi, A.A., and Jeggo, P.A. (2013). The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. Advances in genetics *82*, 1-45.
Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Ditullio, R.A., Jr., Kastrinakis, N.G., Levy, B*., et al.* (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. Nature *434*, 907-913.

Gostissa, M., Alt, F.W., and Chiarle, R. (2011). Mechanisms that promote and suppress chromosomal translocations in lymphocytes. Annu Rev Immunol *29*, 319-350.
Graakjaer, J., Londono-Vallejo, J.A., Christensen, K., and Kolvraa, S. (2006). The pattern of chromosome-specific variations in telomere length in humans shows signs of heritability and is maintained through life. Annals of the New York Academy of Sciences *1067*, 311-316.
Grabarz, A., Barascu, A., Guirouilh-Barbat, J., and Lopez, B.S. (2012). Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-homologous end-joining and alternative end-joining. American journal of cancer research *2*, 249-268.
Grallert, B., and Boye, E. (2008). The multiple facets of the intra-S checkpoint. Cell Cycle *7*, 2315-2320.
Grant, S., and Dai, Y. (2012). Histone deacetylase inhibitors and rational combination therapies. Adv Cancer Res *116*, 199-237.
Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M., and Lieber, M.R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. Nature *388*, 492-495.
Gregory, J.J., Jr., Wagner, J.E., Verlander, P.C., Levran, O., Batish, S.D., Eide, C.R., Steffenhagen, A., Hirsch, B., and Auerbach, A.D. (2001). Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 2532-2537.
Greider, C.W. (1996). Telomere length regulation. Annual review of biochemistry *65*, 337-365.
Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell *43*, 405-413.
Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. Cell *97*, 503-514.
Groselj, B., Sharma, N.L., Hamdy, F.C., Kerr, M., and Kiltie, A.E. (2013). Histone deacetylase inhibitors as radiosensitisers: effects on DNA damage signalling and repair. Br J Cancer *108*, 748-754.
Gross, M., Hanenberg, H., Lobitz, S., Friedl, R., Herterich, S., Dietrich, R., Gruhn, B., Schindler, D., and Hoehn, H. (2002). Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. Cytogenet Genome Res *98*, 126-135.
Groth, A., Rocha, W., Verreault, A., and Almouzni, G. (2007). Chromatin challenges during DNA replication and repair. Cell *128*, 721-733.
Haber, J.E. (1999). DNA recombination: the replication connection. Trends in biochemical sciences *24*, 271-275.

Haince, J.F., McDonald, D., Rodrigue, A., Dery, U., Masson, J.Y., Hendzel, M.J., and Poirier, G.G. (2008). PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites. J Biol Chem *283*, 1197-1208.
Hammel, M., Rey, M., Yu, Y., Mani, R.S., Classen, S., Liu, M., Pique, M.E., Fang, S., Mahaney, B.L., Weinfeld, M*., et al.* (2011). XRCC4 protein interactions with XRCC4-like factor (XLF) create an extended grooved scaffold for DNA ligation and double strand break repair. J Biol Chem *286*, 32638-32650.
Hartley, K.O., Gell, D., Smith, G.C., Zhang, H., Divecha, N., Connelly, M.A., Admon, A., Lees-Miller, S.P., Anderson, C.W., and Jackson, S.P. (1995). DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product. Cell *82*, 849-856.
Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. Exp Cell Res *37*, 614-636.
Heiss, N.S., Knight, S.W., Vulliamy, T.J., Klauck, S.M., Wiemann, S., Mason, P.J., Poustka, A., and Dokal, I. (1998). X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. Nat Genet *19*, 32-38.
Heyer, W.D., Ehmsen, K.T., and Liu, J. (2010). Regulation of homologous recombination in eukaryotes. Annu Rev Genet *44*, 113-139.

Hirschhorn, R. (2003). In vivo reversion to normal of inherited mutations in humans. J Med Genet *40*, 721-728.
Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature *411*, 366-374.
Horn, S., Figl, A., Rachakonda, P.S., Fischer, C., Sucker, A., Gast, A., Kadel, S., Moll, I., Nagore, E., Hemminki, K.*, et al.* (2013). TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. Science *339*, 959-961.
Houghtaling, B.R., Cuttonaro, L., Chang, W., and Smith, S. (2004). A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2. Curr Biol *14*, 1621-1631.
Hsu, H.L., Gilley, D., Blackburn, E.H., and Chen, D.J. (1999). Ku is associated with the telomere in mammals. Proc Natl Acad Sci U S A *96*, 12454-12458.
Hu, J., Hwang, S.S., Liesa, M., Gan, B., Sahin, E., Jaskelioff, M., Ding, Z., Ying, H., Boutin, A.T., Zhang, H.*, et al.* (2012). Antitelomerase therapy provokes ALT and mitochondrial adaptive mechanisms in cancer. Cell *148*, 651-663.
Huang, F.W., Hodis, E., Xu, M.J., Kryukov, G.V., Chin, L., and Garraway, L.A. (2013). Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. Science *339*, 957-959.
Huen, M.S., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M.B., and Chen, J. (2007). RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly. Cell *131*, 901-914.

Ira, G., Pellicioli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N.M.*, et al.* (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. Nature *431*, 1011-1017.

Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. Nature *461*, 1071-1078.
Jacob, N.K., Kirk, K.E., and Price, C.M. (2003). Generation of telomeric G strand overhangs involves both G and C strand cleavage. Mol Cell *11*, 1021-1032.
Jeggo, P.A., and Lobrich, M. (2007). DNA double-strand breaks: their cellular and clinical impact? Oncogene *26*, 7717-7719.
Jiang, X.X., Nguyen, Q., Chou, Y., Wang, T., Nandakumar, V., Yates, P., Jones, L., Wang, L., Won, H., Lee, H.R.*, et al.* (2011). Control of B cell development by the histone H2A deubiquitinase MYSM1. Immunity *35*, 883-896.
Johnson, R.D., and Jasin, M. (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. Embo J *19*, 3398-3407.
Jongmans, W., Artuso, M., Vuillaume, M., Bresil, H., Jackson, S.P., and Hall, J. (1996). The role of Ataxia telangiectasia and the DNA-dependent protein kinase in the p53-mediated cellular response to ionising radiation. Oncogene *13*, 1133-1138.

Kaliberov, S.A., and Buchsbaum, D.J. (2012). Chapter seven--Cancer treatment with gene therapy and radiation therapy. Adv Cancer Res *115*, 221-263.
Karlseder, J., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. Science *295*, 2446-2449.
Karlseder, J., Hoke, K., Mirzoeva, O.K., Bakkenist, C., Kastan, M.B., Petrini, J.H., and de Lange, T. (2004). The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. PLoS Biol *2*, E240.
Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. Nature *432*, 316-323.

Katsura, Y., Sasaki, S., Sato, M., Yamaoka, K., Suzukawa, K., Nagasawa, T., Yokota, J., and Kohno, T. (2007). Involvement of Ku80 in microhomology-mediated end joining for DNA double-strand breaks in vivo. DNA Repair (Amst) *6*, 639-648.
Keeney, S., and Neale, M.J. (2006). Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. Biochemical Society transactions *34*, 523-525.
Keller, R.B., Gagne, K.E., Usmani, G.N., Asdourian, G.K., Williams, D.A., Hofmann, I., and Agarwal, S. (2012). CTC1 Mutations in a patient with dyskeratosis congenita. Pediatric blood & cancer *59*, 311-314.
Kennedy, R.D., and D'Andrea, A.D. (2005). The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. Genes Dev *19*, 2925-2940.
Kerzendorfer, C., and O'Driscoll, M. (2009). Human DNA damage response and repair deficiency syndromes: linking genomic instability and cell cycle checkpoint proficiency. DNA Repair (Amst) *8*, 1139-1152.
Khanna, K.K., and Jackson, S.P. (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. Nat Genet *27*, 247-254.
Khobta, A., and Epe, B. (2012). Interactions between DNA damage, repair, and transcription. Mutat Res *736*, 5-14.
Killela, P.J., Reitman, Z.J., Jiao, Y., Bettegowda, C., Agrawal, N., Diaz, L.A., Jr., Friedman, A.H., Friedman, H., Gallia, G.L., Giovanella, B.C.*, et al.* (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. Proc Natl Acad Sci U S A *110*, 6021-6026.
Kim, H., and D'Andrea, A.D. (2012). Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway. Genes Dev *26*, 1393-1408.
Kim, J.M., Kee, Y., Gurtan, A., and D'Andrea, A.D. (2008). Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FANCM/FAAP24. Blood *111*, 5215-5222.
Kim, J.S., Krasieva, T.B., Kurumizaka, H., Chen, D.J., Taylor, A.M., and Yokomori, K. (2005). Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. J Cell Biol *170*, 341-347.
Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., and Shay, J.W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. Science *266*, 2011-2015.
Kim, S.H., Beausejour, C., Davalos, A.R., Kaminker, P., Heo, S.J., and Campisi, J. (2004). TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. J Biol Chem *279*, 43799-43804.
Kim, S.H., Kaminker, P., and Campisi, J. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. Nat Genet *23*, 405-412.
Kirwan, M., Vulliamy, T., Beswick, R., Walne, A.J., Casimir, C., and Dokal, I. (2008). Circulating haematopoietic progenitors are differentially reduced amongst subtypes of dyskeratosis congenita. Br J Haematol *140*, 719-722.
Knight, S.W., Heiss, N.S., Vulliamy, T.J., Aalfs, C.M., McMahon, C., Richmond, P., Jones, A., Hennekam, R.C., Poustka, A., Mason, P.J.*, et al.* (1999). Unexplained aplastic anaemia, immunodeficiency, and cerebellar hypoplasia (Hoyeraal-Hreidarsson syndrome) due to mutations in the dyskeratosis congenita gene, DKC1. Br J Haematol *107*, 335-339.
Knudson, M., Kulkarni, S., Ballas, Z.K., Bessler, M., and Goldman, F. (2005). Association of immune abnormalities with telomere shortening in autosomal-dominant dyskeratosis congenita. Blood *105*, 682-688.
Kornberg, R.D., and Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. Cell *98*, 285-294.
Kottemann, M.C., and Smogorzewska, A. (2013). Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. Nature *493*, 356-363.
Krangel, M.S. (2009). Mechanics of T cell receptor gene rearrangement. Curr Opin Immunol *21*, 133-139.

Kratz, K., Schopf, B., Kaden, S., Sendoel, A., Eberhard, R., Lademann, C., Cannavo, E., Sartori, A.A., Hengartner, M.O., and Jiricny, J. (2010). Deficiency of FANCD2-associated nuclease KIAA1018/FAN1 sensitizes cells to interstrand crosslinking agents. Cell *142*, 77-88.

Lam, Y.C., Akhter, S., Gu, P., Ye, J., Poulet, A., Giraud-Panis, M.J., Bailey, S.M., Gilson, E., Legerski, R.J., and Chang, S. (2010). SNMIB/Apollo protects leading-strand telomeres against NHEJ-mediated repair. Embo J *29*, 2230-2241.

Lansdorp, P.M., Verwoerd, N.P., van de Rijke, F.M., Dragowska, V., Little, M.T., Dirks, R.W., Raap, A.K., and Tanke, H.J. (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. Hum Mol Genet *5*, 685-691.

Lavin, M.F., and Shiloh, Y. (1997). The genetic defect in ataxia-telangiectasia. Annual review of immunology *15*, 177-202.

Lee, J.H., and Paull, T.T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. Science *308*, 551-554.

Lee, J.W., Blanco, L., Zhou, T., Garcia-Diaz, M., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Wang, Z., and Povirk, L.F. (2004). Implication of DNA polymerase lambda in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in human nuclear extracts. J Biol Chem *279*, 805-811.

Lehmann, A.R., and Fuchs, R.P. (2006). Gaps and forks in DNA replication: Rediscovering old models. DNA Repair (Amst) *5*, 1495-1498.

Lei, M., Podell, E.R., Baumann, P., and Cech, T.R. (2003). DNA self-recognition in the structure of Pot1 bound to telomeric single-stranded DNA. Nature *426*, 198-203.

Lei, M., Podell, E.R., and Cech, T.R. (2004). Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. Nat Struct Mol Biol *11*, 1223-1229.

Lejnine, S., Makarov, V.L., and Langmore, J.P. (1995). Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. Proc Natl Acad Sci U S A *92*, 2393-2397.

Lenain, C., Bauwens, S., Amiard, S., Brunori, M., Giraud-Panis, M.J., and Gilson, E. (2006). The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair. Curr Biol *16*, 1303-1310.

Li, B., Oestreich, S., and de Lange, T. (2000). Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. Cell *101*, 471-483.

Liang, L., Deng, L., Chen, Y., Li, G.C., Shao, C., and Tischfield, J.A. (2005). Modulation of DNA end joining by nuclear proteins. J Biol Chem *280*, 31442-31449.

Liang, L., Deng, L., Nguyen, S.C., Zhao, X., Maulion, C.D., Shao, C., and Tischfield, J.A. (2008). Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. Nucleic Acids Res *36*, 3297-3310.

Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. Annual review of biochemistry *79*, 181-211.

Limbo, O., Chahwan, C., Yamada, Y., de Bruin, R.A., Wittenberg, C., and Russell, P. (2007). Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. Mol Cell *28*, 134-146.

Lin, T.T., Letsolo, B.T., Jones, R.E., Rowson, J., Pratt, G., Hewamana, S., Fegan, C., Pepper, C., and Baird, D.M. (2010). Telomere dysfunction and fusion during the progression of chronic lymphocytic leukemia: evidence for a telomere crisis. Blood *116*, 1899-1907.

Lin, W., Sampathi, S., Dai, H., Liu, C., Zhou, M., Hu, J., Huang, Q., Campbell, J., Shin-Ya, K., Zheng, L*., et al.* (2013). Mammalian DNA2 helicase/nuclease cleaves G-quadruplex DNA and is required for telomere integrity. Embo J *32*, 1425-1439.

Lindahl, T., and Barnes, D.E. (2000). Repair of endogenous DNA damage. Cold Spring Harb Symp Quant Biol *65*, 127-133.

Ling, C., Ishiai, M., Ali, A.M., Medhurst, A.L., Neveling, K., Kalb, R., Yan, Z., Xue, Y., Oostra, A.B., Auerbach, A.D*., et al.* (2007). FAAP100 is essential for activation of the Fanconi anemia-associated DNA damage response pathway. Embo J *26*, 2104-2114.

Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T.R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. Science *276*, 561-567.
Lisby, M., Barlow, J.H., Burgess, R.C., and Rothstein, R. (2004). Choreography of the DNA damage response: spatiotemporal relationships among checkpoint and repair proteins. Cell *118*, 699-713.
Liu, D., O'Connor, M.S., Qin, J., and Songyang, Z. (2004a). Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. J Biol Chem *279*, 51338-51342.
Liu, D., Safari, A., O'Connor, M.S., Chan, D.W., Laegeler, A., Qin, J., and Songyang, Z. (2004b). PTOP interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. Nat Cell Biol *6*, 673-680.
Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A.*, et al.* (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. Genes Dev *14*, 1448-1459.
Liu, Y., Shete, S., Etzel, C.J., Scheurer, M., Alexiou, G., Armstrong, G., Tsavachidis, S., Liang, F.W., Gilbert, M., Aldape, K.*, et al.* (2010). Polymorphisms of LIG4, BTBD2, HMGA2, and RTEL1 genes involved in the double-strand break repair pathway predict glioblastoma survival. J Clin Oncol *28*, 2467-2474.
Llorente, B., Smith, C.E., and Symington, L.S. (2008). Break-induced replication: what is it and what is it for? Cell Cycle *7*, 859-864.
Lo Ten Foe, J.R., Kwee, M.L., Rooimans, M.A., Oostra, A.B., Veerman, A.J., van Weel, M., Pauli, R.M., Shahidi, N.T., Dokal, I., Roberts, I.*, et al.* (1997). Somatic mosaicism in Fanconi anemia: molecular basis and clinical significance. European journal of human genetics : EJHG *5*, 137-148.
Loayza, D., and De Lange, T. (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. Nature *423*, 1013-1018.
Londono-Vallejo, J.A., DerSarkissian, H., Cazes, L., and Thomas, G. (2001). Differences in telomere length between homologous chromosomes in humans. Nucleic Acids Res *29*, 3164-3171.
Lowndes, N.F., and Murguia, J.R. (2000). Sensing and responding to DNA damage. Curr Opin Genet Dev *10*, 17-25.
Lukas, J., and Bartek, J. (2004). Watching the DNA repair ensemble dance. Cell *118*, 666-668.
Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. Nat Cell Biol *13*, 1161-1169.

Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. Cell *108*, 781-794.
MacKay, C., Declais, A.C., Lundin, C., Agostinho, A., Deans, A.J., MacArtney, T.J., Hofmann, K., Gartner, A., West, S.C., Helleday, T.*, et al.* (2010). Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2. Cell *142*, 65-76.
MacMillan, M.L., Hughes, M.R., Agarwal, S., and Daley, G.Q. (2011). Cellular therapy for fanconi anemia: the past, present, and future. Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation *17*, S109-114.
Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2007). RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. Cell *131*, 887-900.
Makarov, V.L., Hirose, Y., and Langmore, J.P. (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. Cell *88*, 657-666.
Malivert, L., Callebaut, I., Rivera-Munoz, P., Fischer, A., Mornon, J.P., Revy, P., and de Villartay, J.P. (2009). The C-terminal domain of Cernunnos/XLF is dispensable for DNA repair in vivo. Mol Cell Biol *29*, 1116-1122.
Mallette, F.A., Gaumont-Leclerc, M.F., and Ferbeyre, G. (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. Genes Dev *21*, 43-48.

Mani, R.S., Yu, Y., Fang, S., Lu, M., Fanta, M., Zolner, A.E., Tahbaz, N., Ramsden, D.A., Litchfield, D.W., Lees-Miller, S.P*., et al.* (2010). Dual modes of interaction between XRCC4 and polynucleotide kinase/phosphatase: implications for nonhomologous end joining. J Biol Chem *285*, 37619-37629.
Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2008a). Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. DNA Repair (Amst) *7*, 1765-1771.
Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., and Gorbunova, V. (2008b). DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. Cell Cycle *7*, 2902-2906.
Marion, R.M., and Blasco, M.A. Telomere rejuvenation during nuclear reprogramming. Curr Opin Genet Dev *20*, 190-196.
Marteijn, J.A., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Lans, H., Schwertman, P., Gourdin, A.M., Dantuma, N.P., Lukas, J., and Vermeulen, W. (2009). Nucleotide excision repair-induced H2A ubiquitination is dependent on MDC1 and RNF8 and reveals a universal DNA damage response. J Cell Biol *186*, 835-847.
Martinez, P., and Blasco, M.A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. Nat Rev Cancer *11*, 161-176.
Mason, P.J., and Bessler, M. (2011). The genetics of dyskeratosis congenita. Cancer genetics *204*, 635-645.
Masutomi, K., Possemato, R., Wong, J.M., Currier, J.L., Tothova, Z., Manola, J.B., Ganesan, S., Lansdorp, P.M., Collins, K., and Hahn, W.C. (2005). The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. Proc Natl Acad Sci U S A *102*, 8222-8227.
Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y*., et al.* (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. Science *316*, 1160-1166.
Matsushita, N., Kitao, H., Ishiai, M., Nagashima, N., Hirano, S., Okawa, K., Ohta, T., Yu, D.S., McHugh, P.J., Hickson, I.D*., et al.* (2005). A FancD2-monoubiquitin fusion reveals hidden functions of Fanconi anemia core complex in DNA repair. Mol Cell *19*, 841-847.
Maytal-Kivity, V., Reis, N., Hofmann, K., and Glickman, M.H. (2002). MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. BMC biochemistry *3*, 28.
McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. Genetics *26*, 234-282.
McCord, R.A., and Broccoli, D. (2008). Telomeric chromatin: roles in aging, cancer and hereditary disease. Mutat Res *647*, 86-93.
McKinnon, P.J. (2009). DNA repair deficiency and neurological disease. Nature reviews Neuroscience *10*, 100-112.
McNeil, E.M., and Melton, D.W. (2012). DNA repair endonuclease ERCC1-XPF as a novel therapeutic target to overcome chemoresistance in cancer therapy. Nucleic Acids Res *40*, 9990-10004.
McVey, M., and Lee, S.E. (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. Trends Genet *24*, 529-538.
Meek, K., Douglas, P., Cui, X., Ding, Q., and Lees-Miller, S.P. (2007). trans Autophosphorylation at DNA-dependent protein kinase's two major autophosphorylation site clusters facilitates end processing but not end joining. Mol Cell Biol *27*, 3881-3890.
Meetei, A.R., Sechi, S., Wallisch, M., Yang, D., Young, M.K., Joenje, H., Hoatlin, M.E., and Wang, W. (2003). A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome. Mol Cell Biol *23*, 3417-3426.
Meier, U.T. (2006). How a single protein complex accommodates many different H/ACA RNAs. Trends in biochemical sciences *31*, 311-315.
Michishita, E., McCord, R.A., Berber, E., Kioi, M., Padilla-Nash, H., Damian, M., Cheung, P., Kusumoto, R., Kawahara, T.L., Barrett, J.C*., et al.* (2008). SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. Nature *452*, 492-496.
Mitchell, J.R., Wood, E., and Collins, K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. Nature *402*, 551-555.

Miyake, Y., Nakamura, M., Nabetani, A., Shimamura, S., Tamura, M., Yonehara, S., Saito, M., and Ishikawa, F. (2009). RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway. Mol Cell *36*, 193-206.
Mladenov, E., and Iliakis, G. (2011). Induction and repair of DNA double strand breaks: the increasing spectrum of non-homologous end joining pathways. Mutat Res *711*, 61-72.
Mokrani-Benhelli, H., Gaillard, L., Biasutto, P., Le Guen, T., Touzot, F., Vasquez, N., Komatsu, J., Conseiller, E., Picard, C., Gluckman, E.*, et al.* (2012). Primary Microcephaly, Impaired DNA Replication, and Genomic Instability Caused by Compound Heterozygous ATR Mutations. Human mutation.
Moldovan, G.L., Madhavan, M.V., Mirchandani, K.D., McCaffrey, R.M., Vinciguerra, P., and D'Andrea, A.D. (2010). DNA polymerase POLN participates in cross-link repair and homologous recombination. Mol Cell Biol *30*, 1088-1096.
Morin, G.B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. Cell *59*, 521-529.
Moshous, D., Callebaut, I., de Chasseval, R., Corneo, B., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., Tezcan, I., Sanal, O., Bertrand, Y., Philippe, N.*, et al.* (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. Cell *105*, 177-186.
Moshous, D., Pannetier, C., Chasseval Rd, R., Deist Fl, F., Cavazzana-Calvo, M., Romana, S., Macintyre, E., Canioni, D., Brousse, N., Fischer, A.*, et al.* (2003). Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in Artemis. J Clin Invest *111*, 381-387.
Moynahan, M.E., Chiu, J.W., Koller, B.H., and Jasin, M. (1999). Brca1 controls homology-directed DNA repair. Mol Cell *4*, 511-518.
Moynahan, M.E., and Jasin, M. (1997). Loss of heterozygosity induced by a chromosomal double-strand break. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 8988-8993.
Muftuoglu, M., Wong, H.K., Imam, S.Z., Wilson, D.M., 3rd, Bohr, V.A., and Opresko, P.L. (2006). Telomere repeat binding factor 2 interacts with base excision repair proteins and stimulates DNA synthesis by DNA polymerase beta. Cancer Res *66*, 113-124.
Murnane, J.P. (2006). Telomeres and chromosome instability. DNA Repair (Amst) *5*, 1082-1092.
Murr, R., Loizou, J.I., Yang, Y.G., Cuenin, C., Li, H., Wang, Z.Q., and Herceg, Z. (2006). Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks. Nat Cell Biol *8*, 91-99.

Nacerddine, K., Beaudry, J.B., Ginjala, V., Westerman, B., Mattiroli, F., Song, J.Y., van der Poel, H., Ponz, O.B., Pritchard, C., Cornelissen-Steijger, P.*, et al.* (2012). Akt-mediated phosphorylation of Bmi1 modulates its oncogenic potential, E3 ligase activity, and DNA damage repair activity in mouse prostate cancer. J Clin Invest *122*, 1920-1932.
Nakamura, T.M., Morin, G.B., Chapman, K.B., Weinrich, S.L., Andrews, W.H., Lingner, J., Harley, C.B., and Cech, T.R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. Science *277*, 955-959.
Nandakumar, V., Chou, Y., Zang, L., Huang, X.F., and Chen, S.Y. (2013). Epigenetic control of natural killer cell maturation by histone H2A deubiquitinase, MYSM1. Proc Natl Acad Sci U S A.
Niedernhofer, L.J., Lalai, A.S., and Hoeijmakers, J.H. (2005). Fanconi anemia (cross)linked to DNA repair. Cell *123*, 1191-1198.
Nielsen, A.L., Oulad-Abdelghani, M., Ortiz, J.A., Remboutsika, E., Chambon, P., and Losson, R. (2001). Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. Mol Cell *7*, 729-739.
Nijman, S.M., Luna-Vargas, M.P., Velds, A., Brummelkamp, T.R., Dirac, A.M., Sixma, T.K., and Bernards, R. (2005). A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes. Cell *123*, 773-786.

Nijnik, A., Woodbine, L., Marchetti, C., Dawson, S., Lambe, T., Liu, C., Rodrigues, N.P., Crockford, T.L., Cabuy, E., Vindigni, A.*, et al.* (2007). DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. Nature *447*, 686-690.
Nijnik, A., Clare, S., Hale, C., Raisen, C., McIntyre, R.E., Yusa, K., Everitt, A.R., Mottram, L., Podrini, C., Lucas, M.*, et al.* (2012). The critical role of histone H2A-deubiquitinase Mysm1 in hematopoiesis and lymphocyte differentiation. Blood *119*, 1370-1379.
Nijnik, A., Woodbine, L., Marchetti, C., Dawson, S., Lambe, T., Liu, C., Rodrigues, N.P., Crockford, T.L., Cabuy, E., Vindigni, A.*, et al.* (2007). DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. Nature *447*, 686-690.
Nimonkar, A.V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2011). BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. Genes Dev *25*, 350-362.
Nishikawa, M. (2008). Reactive oxygen species in tumor metastasis. Cancer Lett *266*, 53-59.
Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2010). Origin of chromosomal translocations in lymphoid cancer. Cell *141*, 27-38.

O'Driscoll, M., Cerosaletti, K.M., Girard, P.M., Dai, Y., Stumm, M., Kysela, B., Hirsch, B., Gennery, A., Palmer, S.E., Seidel, J.*, et al.* (2001). DNA ligase IV mutations identified in patients exhibiting developmental delay and immunodeficiency. Mol Cell *8*, 1175-1185.
O'Connor, M.S., Safari, A., Xin, H., Liu, D., and Songyang, Z. (2006). A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 11874-11879.
O'Sullivan, R.J., and Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. Nat Rev Mol Cell Biol *11*, 171-181.
Opresko, P.L., von Kobbe, C., Laine, J.P., Harrigan, J., Hickson, I.D., and Bohr, V.A. (2002). Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. J Biol Chem *277*, 41110-41119.
Opresko, P.L., Sowd, G., and Wang, H. (2009). The Werner syndrome helicase/exonuclease processes mobile D-loops through branch migration and degradation. PLoS One *4*, e4825.

Paeschke, K., Bochman, M.L., Garcia, P.D., Cejka, P., Friedman, K.L., Kowalczykowski, S.C., and Zakian, V.A. (2013). Pif1 family helicases suppress genome instability at G-quadruplex motifs. Nature *497*, 458-462.
Palm, W., and de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. Annu Rev Genet *42*, 301-334.
Papamichos-Chronakis, M., and Peterson, C.L. (2013). Chromatin and the genome integrity network. Nat Rev Genet *14*, 62-75.
Park, J.I., Venteicher, A.S., Hong, J.Y., Choi, J., Jun, S., Shkreli, M., Chang, W., Meng, Z., Cheung, P., Ji, H.*, et al.* (2009). Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. Nature *460*, 66-72.
Park, M.S., Ludwig, D.L., Stigger, E., and Lee, S.H. (1996). Physical interaction between human RAD52 and RPA is required for homologous recombination in mammalian cells. J Biol Chem *271*, 18996-19000.
Pfeiffer, P., Goedecke, W., and Obe, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. Mutagenesis *15*, 289-302.
Pierce, A.J., Hu, P., Han, M., Ellis, N., and Jasin, M. (2001). Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. Genes Dev *15*, 3237-3242.
Polo, S.E., and Jackson, S.P. (2011). Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. Genes Dev *25*, 409-433.
Polvi, A., Linnankivi, T., Kivela, T., Herva, R., Keating, J.P., Makitie, O., Pareyson, D., Vainionpaa, L., Lahtinen, J., Hovatta, I.*, et al.* (2012). Mutations in CTC1, encoding the CTS telomere maintenance

complex component 1, cause cerebroretinal microangiopathy with calcifications and cysts. Am J Hum Genet *90*, 540-549.
Porro, A., Feuerhahn, S., Reichenbach, P., and Lingner, J. (2010). Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. Mol Cell Biol *30*, 4808-4817.
Poulet, A., Buisson, R., Faivre-Moskalenko, C., Koelblen, M., Amiard, S., Montel, F., Cuesta-Lopez, S., Bornet, O., Guerlesquin, F., Godet, T.*, et al.* (2009). TRF2 promotes, remodels and protects telomeric Holliday junctions. Embo J *28*, 641-651.
Price, B.D., and D'Andrea, A.D. (2013). Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. Cell *152*, 1344-1354.

Rai, R., Zheng, H., He, H., Luo, Y., Multani, A., Carpenter, P.B., and Chang, S. (2010). The function of classical and alternative non-homologous end-joining pathways in the fusion of dysfunctional telomeres. Embo J *29*, 2598-2610.
Ramsay, A.J., Quesada, V., Foronda, M., Conde, L., Martinez-Trillos, A., Villamor, N., Rodriguez, D., Kwarciak, A., Garabaya, C., Gallardo, M.*, et al.* (2013). POT1 mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. Nat Genet *45*, 526-530.
Redon, S., Reichenbach, P., and Lingner, J. (2010). The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. Nucleic Acids Res *38*, 5797-5806.
Revy, P., Busslinger, M., Tashiro, K., Arenzana, F., Pillet, P., Fischer, A., and Durandy, A. (2000). A syndrome involving intrauterine growth retardation, microcephaly, cerebellar hypoplasia, B lymphocyte deficiency, and progressive pancytopenia. Pediatrics *105*, E39.
Riballo, E., Critchlow, S.E., Teo, S.H., Doherty, A.J., Priestley, A., Broughton, B., Kysela, B., Beamish, H., Plowman, N., Arlett, C.F.*, et al.* (1999). Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. Curr Biol *9*, 699-702.
Rich, T., Allen, R.L., and Wyllie, A.H. (2000). Defying death after DNA damage. Nature *407*, 777-783.
Ridet, A., Guillouf, C., Duchaud, E., Cundari, E., Fiore, M., Moustacchi, E., and Rosselli, F. (1997). Deregulated apoptosis is a hallmark of the Fanconi anemia syndrome. Cancer Res *57*, 1722-1730.
Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. J Cell Biol *146*, 905-916.
Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J Biol Chem *273*, 5858-5868.
Ropars, V., Drevet, P., Legrand, P., Baconnais, S., Amram, J., Faure, G., Marquez, J.A., Pietrement, O., Guerois, R., Callebaut, I.*, et al.* (2011). Structural characterization of filaments formed by human Xrcc4-Cernunnos/XLF complex involved in nonhomologous DNA end-joining. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 12663-12668.
Rosenberg, P.S., Greene, M.H., and Alter, B.P. (2003). Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. Blood *101*, 822-826.
Rossi, D.J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J., and Weissman, I.L. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. Nature *447*, 725-729.
Rossi, D.J., Jamieson, C.H., and Weissman, I.L. (2008). Stems cells and the pathways to aging and cancer. Cell *132*, 681-696.

Sakasai, R., and Tibbetts, R. (2008). RNF8-dependent and RNF8-independent regulation of 53BP1 in response to DNA damage. J Biol Chem *283*, 13549-13555.
Sale, J.E. (2012). Competition, collaboration and coordination--determining how cells bypass DNA damage. J Cell Sci *125*, 1633-1643.

Sallmyr, A., Fan, J., and Rassool, F.V. (2008). Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair. Cancer Lett *270*, 1-9.
Sarin, K.Y., Cheung, P., Gilison, D., Lee, E., Tennen, R.I., Wang, E., Artandi, M.K., Oro, A.E., and Artandi, S.E. (2005). Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. Nature *436*, 1048-1052.
Sato, Y., Yoshikawa, A., Yamagata, A., Mimura, H., Yamashita, M., Ookata, K., Nureki, O., Iwai, K., Komada, M., and Fukai, S. (2008). Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. Nature *455*, 358-362.
Savage, S.A., Giri, N., Baerlocher, G.M., Orr, N., Lansdorp, P.M., and Alter, B.P. (2008). TINF2, a component of the shelterin telomere protection complex, is mutated in dyskeratosis congenita. Am J Hum Genet *82*, 501-509.
Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D.A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S*., et al.* (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. Science *268*, 1749-1753.
Schmitt, C.A. (2003). Senescence, apoptosis and therapy--cutting the lifelines of cancer. Nat Rev Cancer *3*, 286-295.
Seiler, J.A., Conti, C., Syed, A., Aladjem, M.I., and Pommier, Y. (2007). The intra-S-phase checkpoint affects both DNA replication initiation and elongation: single-cell and -DNA fiber analyses. Mol Cell Biol *27*, 5806-5818.
Sertic, S., Pizzi, S., Lazzaro, F., Plevani, P., and Muzi-Falconi, M. (2012). NER and DDR: classical music with new instruments. Cell Cycle *11*, 668-674.
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.
Sfeir, A., Kabir, S., van Overbeek, M., Celli, G.B., and de Lange, T. (2010). Loss of Rap1 induces telomere recombination in the absence of NHEJ or a DNA damage signal. Science *327*, 1657-1661.
Sfeir, A., and de Lange, T. (2012). Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem. Science *336*, 593-597.
Shi, T., Bunker, R.D., Mattarocci, S., Ribeyre, C., Faty, M., Gut, H., Scrima, A., Rass, U., Rubin, S.M., Shore, D*., et al.* (2013). Rif1 and Rif2 shape telomere function and architecture through multivalent Rap1 interactions. Cell *153*, 1340-1353.
Shibata, Y., and Nakamura, T. (2002). Defective flap endonuclease 1 activity in mammalian cells is associated with impaired DNA repair and prolonged S phase delay. J Biol Chem *277*, 746-754.
Shiloh, Y., and Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. Nat Rev Mol Cell Biol *14*, 197-210.
Shrivastav, M., De Haro, L.P., and Nickoloff, J.A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. Cell Res *18*, 134-147.
Sibanda, B.L., Critchlow, S.E., Begun, J., Pei, X.Y., Jackson, S.P., Blundell, T.L., and Pellegrini, L. (2001). Crystal structure of an Xrcc4-DNA ligase IV complex. Nat Struct Biol *8*, 1015-1019.
Simsek, D., and Jasin, M. (2010). Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. Nat Struct Mol Biol *17*, 410-416.
Singleton, B.K., Torres-Arzayus, M.I., Rottinghaus, S.T., Taccioli, G.E., and Jeggo, P.A. (1999). The C terminus of Ku80 activates the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit. Mol Cell Biol *19*, 3267-3277.
Smith, J., Tho, L.M., Xu, N., and Gillespie, D.A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. Adv Cancer Res *108*, 73-112.
Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. Annual review of biochemistry *73*, 177-208.

Smogorzewska, A., Matsuoka, S., Vinciguerra, P., McDonald, E.R., 3rd, Hurov, K.E., Luo, J., Ballif, B.A., Gygi, S.P., Hofmann, K., D'Andrea, A.D*., et al.* (2007). Identification of the FANCI protein, a monoubiquitinated FANCD2 paralog required for DNA repair. Cell *129*, 289-301.
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.
Sobhian, B., Shao, G., Lilli, D.R., Culhane, A.C., Moreau, L.A., Xia, B., Livingston, D.M., and Greenberg, R.A. (2007). RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. Science *316*, 1198-1202.
Song, K., Jung, D., Jung, Y., Lee, S.G., and Lee, I. (2000). Interaction of human Ku70 with TRF2. FEBS Lett *481*, 81-85.
Sonoda, E., Hochegger, H., Saberi, A., Taniguchi, Y., and Takeda, S. (2006). Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. DNA Repair (Amst) *5*, 1021-1029.
Soohoo, C.Y., Shi, R., Lee, T.H., Huang, P., Lu, K.P., and Zhou, X.Z. (2011). Telomerase inhibitor PinX1 provides a link between TRF1 and telomerase to prevent telomere elongation. J Biol Chem *286*, 3894-3906.
Soria, G., and Almouzni, G. (2013). Differential contribution of HP1 proteins to DNA end resection and homology-directed repair. Cell Cycle *12*, 422-429.
Soulas-Sprauel, P., Le Guyader, G., Rivera-Munoz, P., Abramowski, V., Olivier-Martin, C., Goujet-Zalc, C., Charneau, P., and de Villartay, J.P. (2007). Role for DNA repair factor XRCC4 in immunoglobulin class switch recombination. J Exp Med *204*, 1717-1727.
Stansel, R.M., de Lange, T., and Griffith, J.D. (2001). T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. Embo J *20*, 5532-5540.
Stavnezer, J., Bjorkman, A., Du, L., Cagigi, A., and Pan-Hammarstrom, Q. (2010). Mapping of switch recombination junctions, a tool for studying DNA repair pathways during immunoglobulin class switching. Adv Immunol *108*, 45-109.
Stewart, G.S., Wang, B., Bignell, C.R., Taylor, A.M., and Elledge, S.J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. Nature *421*, 961-966.
Stewart, G.S., Stankovic, T., Byrd, P.J., Wechsler, T., Miller, E.S., Huissoon, A., Drayson, M.T., West, S.C., Elledge, S.J., and Taylor, A.M. (2007). RIDDLE immunodeficiency syndrome is linked to defects in 53BP1-mediated DNA damage signaling. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 16910-16915.
Stewart, G.S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A.K., Kolas, N.K., Miller, E.S., Nakada, S., Ylanko, J., Olivarius, S., Mendez, M*., et al.* (2009). The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. Cell *136*, 420-434.
Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. Cell *123*, 1213-1226.
Suram, A., Kaplunov, J., Patel, P.L., Ruan, H., Cerutti, A., Boccardi, V., Fumagalli, M., Di Micco, R., Mirani, N., Gurung, R.L*., et al.* (2012). Oncogene-induced telomere dysfunction enforces cellular senescence in human cancer precursor lesions. Embo J *31*, 2839-2851.
Surovtseva, Y.V., Churikov, D., Boltz, K.A., Song, X., Lamb, J.C., Warrington, R., Leehy, K., Heacock, M., Price, C.M., and Shippen, D.E. (2009). Conserved telomere maintenance component 1 interacts with STN1 and maintains chromosome ends in higher eukaryotes. Mol Cell *36*, 207-218.
Svendsen, J.M., Smogorzewska, A., Sowa, M.E., O'Connell, B.C., Gygi, S.P., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (2009). Mammalian BTBD12/SLX4 assembles a Holliday junction resolvase and is required for DNA repair. Cell *138*, 63-77.
Symington, L.S., and Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. Annu Rev Genet *45*, 247-271.

Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. Curr Biol *13*, 1549-1556.
Takai, K.K., Kibe, T., Donigian, J.R., Frescas, D., and de Lange, T. (2011). Telomere protection by TPP1/POT1 requires tethering to TIN2. Mol Cell *44*, 647-659.
Tang, J., Cho, N.W., Cui, G., Manion, E.M., Shanbhag, N.M., Botuyan, M.V., Mer, G., and Greenberg, R.A. (2013). Acetylation limits 53BP1 association with damaged chromatin to promote homologous recombination. Nat Struct Mol Biol *20*, 317-325.
Tang, J., Kan, Z.Y., Yao, Y., Wang, Q., Hao, Y.H., and Tan, Z. (2008). G-quadruplex preferentially forms at the very 3' end of vertebrate telomeric DNA. Nucleic Acids Res *36*, 1200-1208.
Tarsounas, M., Munoz, P., Claas, A., Smiraldo, P.G., Pittman, D.L., Blasco, M.A., and West, S.C. (2004). Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein. Cell *117*, 337-347.
Tashiro, S., Kotomura, N., Shinohara, A., Tanaka, K., Ueda, K., and Kamada, N. (1996). S phase specific formation of the human Rad51 protein nuclear foci in lymphocytes. Oncogene *12*, 2165-2170.
Tejera, A.M., Stagno d'Alcontres, M., Thanasoula, M., Marion, R.M., Martinez, P., Liao, C., Flores, J.M., Tarsounas, M., and Blasco, M.A. (2010). TPP1 is required for TERT recruitment, telomere elongation during nuclear reprogramming, and normal skin development in mice. Dev Cell *18*, 775-789.
Tennen, R.I., Bua, D.J., Wright, W.E., and Chua, K.F. (2011). SIRT6 is required for maintenance of telomere position effect in human cells. Nat Commun *2*, 433.
Tomlinson, R.L., Ziegler, T.D., Supakorndej, T., Terns, R.M., and Terns, M.P. (2006). Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. Mol Biol Cell *17*, 955-965.
Tommerup, H., Dousmanis, A., and de Lange, T. (1994). Unusual chromatin in human telomeres. Mol Cell Biol *14*, 5777-5785.
Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. Nature *302*, 575-581.
Touzot, F., Callebaut, I., Soulier, J., Gaillard, L., Azerrad, C., Durandy, A., Fischer, A., de Villartay, J.P., and Revy, P. (2010). Function of Apollo (SNM1B) at telomere highlighted by a splice variant identified in a patient with Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A *107*, 10097-10102.
Touzot, F., Gaillard, L., Vasquez, N., Le Guen, T., Bertrand, Y., Bourhis, J., Leblanc, T., Fischer, A., Soulier, J., de Villartay, J.P*., et al.* (2012a). Heterogeneous telomere defects in patients with severe forms of dyskeratosis congenita. J Allergy Clin Immunol *129*, 473-482, 482 e471-473.
Touzot, F., Le Guen, T., de Villartay, J.P., and Revy, P. (2012b). [Dyskeratosis congenita: short telomeres are not the rule]. Med Sci (Paris) *28*, 618-624.

Uringa, E.J., Lisaingo, K., Pickett, H.A., Brind'Amour, J., Rohde, J.H., Zelensky, A., Essers, J., and Lansdorp, P.M. (2012). RTEL1 contributes to DNA replication and repair and telomere maintenance. Mol Biol Cell *23*, 2782-2792.
Uringa, E.J., Youds, J.L., Lisaingo, K., Lansdorp, P.M., and Boulton, S.J. (2011). RTEL1: an essential helicase for telomere maintenance and the regulation of homologous recombination. Nucleic Acids Res *39*, 1647-1655.

van Attikum, H., and Gasser, S.M. (2005). The histone code at DNA breaks: a guide to repair? Nat Rev Mol Cell Biol *6*, 757-765.
van den Bosch, M., Bree, R.T., and Lowndes, N.F. (2003). The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. EMBO Rep *4*, 844-849.
van der Burg, M., Ijspeert, H., Verkaik, N.S., Turul, T., Wiegant, W.W., Morotomi-Yano, K., Mari, P.O., Tezcan, I., Chen, D.J., Zdzienicka, M.Z*., et al.* (2009). A DNA-PKcs mutation in a radiosensitive T-B-SCID patient inhibits Artemis activation and nonhomologous end-joining. J Clin Invest *119*, 91-98.
van der Burg, M., Weemaes, C.M., Preijers, F., Brons, P., Barendregt, B.H., van Tol, M.J., Hoogerbrugge, P., and van Dongen, J.J. (2006). B-cell recovery after stem cell transplantation of

Artemis-deficient SCID requires elimination of autologous bone marrow precursor-B-cells. Haematologica *91*, 1705-1709.
van Overbeek, M., and de Lange, T. (2006). Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase. Curr Biol *16*, 1295-1302.
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.
Vannier, J.B., Pavicic-Kaltenbrunner, V., Petalcorin, M.I., Ding, H., and Boulton, S.J. (2012). RTEL1 dismantles T loops and counteracts telomeric G4-DNA to maintain telomere integrity. Cell *149*, 795-806.
Varela, E., Schneider, R.P., Ortega, S., and Blasco, M.A. (2011). Different telomere-length dynamics at the inner cell mass versus established embryonic stem (ES) cells. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 15207-15212.
Venteicher, A.S., Abreu, E.B., Meng, Z., McCann, K.E., Terns, R.M., Veenstra, T.D., Terns, M.P., and Artandi, S.E. (2009). A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. Science *323*, 644-648.
Venteicher, A.S., Meng, Z., Mason, P.J., Veenstra, T.D., and Artandi, S.E. (2008). Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. Cell *132*, 945-957.
Vinagre, J., Almeida, A., Populo, H., Batista, R., Lyra, J., Pinto, V., Coelho, R., Celestino, R., Prazeres, H., Lima, L.*, et al.* (2013). Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. Nat Commun *4*, 2185.
Vulliamy, T., Marrone, A., Goldman, F., Dearlove, A., Bessler, M., Mason, P.J., and Dokal, I. (2001). The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. Nature *413*, 432-435.
Vulliamy, T., Marrone, A., Dokal, I., and Mason, P.J. (2002). Association between aplastic anaemia and mutations in telomerase RNA. Lancet *359*, 2168-2170.
Vulliamy, T., Marrone, A., Szydlo, R., Walne, A., Mason, P.J., and Dokal, I. (2004). Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. Nat Genet *36*, 447-449.
Vulliamy, T.J., Walne, A., Baskaradas, A., Mason, P.J., Marrone, A., and Dokal, I. (2005). Mutations in the reverse transcriptase component of telomerase (TERT) in patients with bone marrow failure. Blood cells, molecules & diseases *34*, 257-263.
Vulliamy, T., Beswick, R., Kirwan, M., Marrone, A., Digweed, M., Walne, A., and Dokal, I. (2008). Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 8073-8078.

Waisfisz, Q., Morgan, N.V., Savino, M., de Winter, J.P., van Berkel, C.G., Hoatlin, M.E., Ianzano, L., Gibson, R.A., Arwert, F., Savoia, A.*, et al.* (1999). Spontaneous functional correction of homozygous fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. Nat Genet *22*, 379-383.
Walker, J.R., Corpina, R.A., and Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. Nature *412*, 607-614.
Walne, A.J., Vulliamy, T., Marrone, A., Beswick, R., Kirwan, M., Masunari, Y., Al-Qurashi, F.H., Aljurf, M., and Dokal, I. (2007). Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10. Hum Mol Genet *16*, 1619-1629.
Walne, A.J., Vulliamy, T., Beswick, R., Kirwan, M., and Dokal, I. (2008). TINF2 mutations result in very short telomeres: analysis of a large cohort of patients with dyskeratosis congenita and related bone marrow failure syndromes. Blood *112*, 3594-3600.

Walne, A.J., Vulliamy, T., Beswick, R., Kirwan, M., and Dokal, I. (2010). Mutations in C16orf57 and normal-length telomeres unify a subset of patients with dyskeratosis congenita, poikiloderma with neutropenia and Rothmund-Thomson syndrome. Hum Mol Genet *19*, 4453-4461.
Walne, A., Bhagat, T., Kirwan, M., Gitaux, C., Desguerre, I., Leonard, N., Nogales, E., Vulliamy, T., and Dokal, I. (2012). Mutations in the telomere capping complex in bone marrow failure and related syndromes. Haematologica.
Walne, A.J., Vulliamy, T., Kirwan, M., Plagnol, V., and Dokal, I. (2013). Constitutional mutations in RTEL1 cause severe dyskeratosis congenita. Am J Hum Genet *92*, 448-453.
Wan, M., Qin, J., Songyang, Z., and Liu, D. (2009). OB fold-containing protein 1 (OBFC1), a human homolog of yeast Stn1, associates with TPP1 and is implicated in telomere length regulation. J Biol Chem *284*, 26725-26731.
Wang, B., and Elledge, S.J. (2007). Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brca1/Brcc36 complex in response to DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 20759-20763.
Wang, B., Hurov, K., Hofmann, K., and Elledge, S.J. (2009). NBA1, a new player in the Brca1 A complex, is required for DNA damage resistance and checkpoint control. Genes Dev *23*, 729-739.
Wang, B., Matsuoka, S., Ballif, B.A., Zhang, D., Smogorzewska, A., Gygi, S.P., and Elledge, S.J. (2007a). Abraxas and RAP80 form a BRCA1 protein complex required for the DNA damage response. Science *316*, 1194-1198.
Wang, F., Podell, E.R., Zaug, A.J., Yang, Y., Baciu, P., Cech, T.R., and Lei, M. (2007b). The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. Nature *445*, 506-510.
Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., and Iliakis, G. (2005). DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. Cancer Res *65*, 4020-4030.
Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., and Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. Nucleic Acids Res *34*, 6170-6182.
Wang, Q., Liu, J.Q., Chen, Z., Zheng, K.W., Chen, C.Y., Hao, Y.H., and Tan, Z. (2011). G-quadruplex formation at the 3' end of telomere DNA inhibits its extension by telomerase, polymerase and unwinding by helicase. Nucleic Acids Res *39*, 6229-6237.
Wang, R.C., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2004). Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. Cell *119*, 355-368.
Wang, T., Nandakumar, V., Jiang, X.X., Jones, L., Yang, A.G., Huang, X.F., and Chen, S.Y. (2013). The control of hematopoietic stem cell maintenance, self-renewal and differentiation by Mysm1-mediated epigenetic regulation. Blood.
Wang, Y., and Taniguchi, T. (2013). MicroRNAs and DNA damage response: implications for cancer therapy. Cell Cycle *12*, 32-42.
Wellinger, R.J. (2009). The CST complex and telomere maintenance: the exception becomes the rule. Mol Cell *36*, 168-169.
Wilson, D.M., 3rd, and Bohr, V.A. (2007). The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. DNA Repair (Amst) *6*, 544-559.
Wilson, J.S., Tejera, A.M., Castor, D., Toth, R., Blasco, M.A., and Rouse, J. (2013). Localization-Dependent and -Independent Roles of SLX4 in Regulating Telomeres. Cell reports *4*, 853-860.
Woodbine, L., Neal, J.A., Sasi, N.K., Shimada, M., Deem, K., Coleman, H., Dobyns, W.B., Ogi, T., Meek, K., Davies, E.G.*, et al.* (2013). PRKDC mutations in a SCID patient with profound neurological abnormalities. J Clin Invest *123*, 2969-2980.
Wrensch, M., Jenkins, R.B., Chang, J.S., Yeh, R.F., Xiao, Y., Decker, P.A., Ballman, K.V., Berger, M., Buckner, J.C., Chang, S.*, et al.* (2009). Variants in the CDKN2B and RTEL1 regions are associated with high-grade glioma susceptibility. Nat Genet *41*, 905-908.
Wright, W.E., Tesmer, V.M., Huffman, K.E., Levene, S.D., and Shay, J.W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. Genes Dev *11*, 2801-2809.

Wu, J., Huen, M.S., Lu, L.Y., Ye, L., Dou, Y., Ljungman, M., Chen, J., and Yu, X. (2009). Histone ubiquitination associates with BRCA1-dependent DNA damage response. Mol Cell Biol *29*, 849-860.
Wu, L., Multani, A.S., He, H., Cosme-Blanco, W., Deng, Y., Deng, J.M., Bachilo, O., Pathak, S., Tahara, H., Bailey, S.M.*, et al.* (2006). Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. Cell *126*, 49-62.
Wu, L.C., Wang, Z.W., Tsan, J.T., Spillman, M.A., Phung, A., Xu, X.L., Yang, M.C., Hwang, L.Y., Bowcock, A.M., and Baer, R. (1996). Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. Nat Genet *14*, 430-440.
Wu, P., van Overbeek, M., Rooney, S., and de Lange, T. (2010). Apollo contributes to G overhang maintenance and protects leading-end telomeres. Mol Cell *39*, 606-617.
Wu, X., Sandhu, S., Nabi, Z., and Ding, H. (2012). Generation of a mouse model for studying the role of upregulated RTEL1 activity in tumorigenesis. Transgenic Res *21*, 1109-1115.

Xie, A., Kwok, A., and Scully, R. (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. Nat Struct Mol Biol *16*, 814-818.
Xin, H., Liu, D., and Songyang, Z. (2008). The telosome/shelterin complex and its functions. Genome biology *9*, 232.
Xin, H., Liu, D., Wan, M., Safari, A., Kim, H., Sun, W., O'Connor, M.S., and Songyang, Z. (2007). TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. Nature *445*, 559-562.
Xu, Y., and Baltimore, D. (1996). Dual roles of ATM in the cellular response to radiation and in cell growth control. Genes Dev *10*, 2401-2410.

Yamaguchi, H., Baerlocher, G.M., Lansdorp, P.M., Chanock, S.J., Nunez, O., Sloand, E., and Young, N.S. (2003). Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. Blood *102*, 916-918.
Yamaguchi, H., Calado, R.T., Ly, H., Kajigaya, S., Baerlocher, G.M., Chanock, S.J., Lansdorp, P.M., and Young, N.S. (2005). Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. N Engl J Med *352*, 1413-1424.
Yan, C.T., Boboila, C., Souza, E.K., Franco, S., Hickernell, T.R., Murphy, M., Gumaste, S., Geyer, M., Zarrin, A.A., Manis, J.P.*, et al.* (2007). IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. Nature *449*, 478-482.
Yarden, R.I., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M., Cowan, K.H., and Brody, L.C. (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. Nat Genet *30*, 285-289.
Ye, J., Lenain, C., Bauwens, S., Rizzo, A., Saint-Leger, A., Poulet, A., Benarroch, D., Magdinier, F., Morere, J., Amiard, S.*, et al.* (2010). TRF2 and apollo cooperate with topoisomerase 2alpha to protect human telomeres from replicative damage. Cell *142*, 230-242.
Ye, J.Z., and de Lange, T. (2004). TIN2 is a tankyrase 1 PARP modulator in the TRF1 telomere length control complex. Nat Genet *36*, 618-623.
Ye, J.Z., Donigian, J.R., van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A.N., Chait, B.T., and de Lange, T. (2004a). TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. J Biol Chem *279*, 47264-47271.
Ye, J.Z., Hockemeyer, D., Krutchinsky, A.N., Loayza, D., Hooper, S.M., Chait, B.T., and de Lange, T. (2004b). POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. Genes Dev *18*, 1649-1654.
Youds, J.L., Mets, D.G., McIlwraith, M.J., Martin, J.S., Ward, J.D., NJ, O.N., Rose, A.M., West, S.C., Meyer, B.J., and Boulton, S.J. (2010). RTEL-1 enforces meiotic crossover interference and homeostasis. Science *327*, 1254-1258.
Yu, X., Fu, S., Lai, M., Baer, R., and Chen, J. (2006). BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. Genes Dev *20*, 1721-1726.

Yun, M.H., and Hiom, K. (2009). CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. Nature *459*, 460-463.

Zahler, A.M., Williamson, J.R., Cech, T.R., and Prescott, D.M. (1991). Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. Nature *350*, 718-720.
Zakian, V.A. (1995). Telomeres: beginning to understand the end. Science *270*, 1601-1607.
Zhao, J., Jain, A., Iyer, R.R., Modrich, P.L., and Vasquez, K.M. (2009). Mismatch repair and nucleotide excision repair proteins cooperate in the recognition of DNA interstrand crosslinks. Nucleic Acids Res *37*, 4420-4429.
Zhao, Y., Sfeir, A.J., Zou, Y., Buseman, C.M., Chow, T.T., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2009). Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. Cell *138*, 463-475.
Zhong, F., Savage, S.A., Shkreli, M., Giri, N., Jessop, L., Myers, T., Chen, R., Alter, B.P., and Artandi, S.E. (2011). Disruption of telomerase trafficking by TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita. Genes Dev *25*, 11-16.
Zhong, Z., Shiue, L., Kaplan, S., and de Lange, T. (1992). A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. Mol Cell Biol *12*, 4834-4843.
Zhou, B.B., and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature *408*, 433-439.
Zhu, L., Hathcock, K.S., Hande, P., Lansdorp, P.M., Seldin, M.F., and Hodes, R.J. (1998). Telomere length regulation in mice is linked to a novel chromosome locus. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 8648-8653.
Zhu, P., Zhou, W., Wang, J., Puc, J., Ohgi, K.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (2007). A histone H2A deubiquitinase complex coordinating histone acetylation and H1 dissociation in transcriptional regulation. Mol Cell *27*, 609-621.
Zhu, Q., Wani, G., Arab, H.H., El-Mahdy, M.A., Ray, A., and Wani, A.A. (2009). Chromatin restoration following nucleotide excision repair involves the incorporation of ubiquitinated H2A at damaged genomic sites. DNA Repair (Amst) *8*, 262-273.
Zhu, W., and Dutta, A. (2006). An ATR- and BRCA1-mediated Fanconi anemia pathway is required for activating the G2/M checkpoint and DNA damage repair upon rereplication. Mol Cell Biol *26*, 4601-4611.
Zhu, X.D., Kuster, B., Mann, M., Petrini, J.H., and de Lange, T. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. Nat Genet *25*, 347-352.
Zhu, X.D., Niedernhofer, L., Kuster, B., Mann, M., Hoeijmakers, J.H., and de Lange, T. (2003). ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. Mol Cell *12*, 1489-1498.
Zimmermann, M., Lottersberger, F., Buonomo, S.B., Sfeir, A., and de Lange, T. (2013). 53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection. Science *339*, 700-704.
Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. Science *300*, 1542-1548.

# ANNEXES

ARTICLE EN REVISION

# Human MYSM1 Deficiency Results in B-Alymphocytosis, Dyshematopoiesis, and DNA Repair Defect ("BADD syndrome")

Tangui Le Guen[1,2], Fabien Touzot[1,2,3], Isabelle André-Schmutz[2,3], Isabelle Callebaut[4], Chantal Lagresle-Peyrou[2,5], Nathalie Lambert[2,6,] Capucine Picard[2,3,6], Patrick Nitschke[7], Wassila Carpentier[8], Sylvie Fabrega[9], Nicolas Cagnard[7], Christine Bole-Feysot[10], Annick Lim[11], Marina Cavazzana[2,5], Jean Soulier[12], Nada Jabado[13], Alain Fischer[2,3], Jean-Pierre de Villartay[1,2,3], Patrick Revy[1,2,*]

[1] Genome Dynamics in the Immune System, Institut Imagine, Paris, France
[2] Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U768, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Institut Imagine, Paris, France
[3] AP-HP, Hôpital Necker Enfants-Malades, Service d'Immunologie et d'Hématologie Pédiatrique, Paris, France
[4] UMR7590, CNRS, Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

[5] CIC-BT 502 INSERM, Paris, France et Département de Biothérapie, AP-HP, Hopital Necker-Enfants Malades, Paris, France
[6] Study Center of Primary Immunodeficiencies, AP-HP, Necker Hospital, Paris, France
[7] Service de Bioinformatique, Institut Imagine, Paris 75015, France
[8] Plateforme Post-Génomique P3S, Faculté de Médecine Pitié Salpêtrière, Paris, France
[9] Plateforme de vectorologie, Institut Imagine, Paris 75015, France
[10] Plateforme de génomique, Institut Imagine, Paris 75015, France
[11] Institut Pasteur, Groupe Immunoscope, Unité de Régulation Immunitaire et Vaccinologie, Paris, France
[12] INSERM U944, Institut universitaire d'Hématologie, Université Denis Diderot, Paris, France
[13] McGill University and Genome Quebec Innovation Centre, Montreal, Canada

* corresponding author : patrick.revy@inserm.fr, Inserm U768, Equipe labélisée "La Ligue", Institut Imagine, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France. Phone: 33144494829. Fax: 33142730640

**Character count: 23969**

**Running title: Human MYSM1 deficiency**

**Abstract**

MYSM1 is a metallo-protease able to deubiquitinate the K119-monoubiquitinated form of histone H2A, a chromatin marker associated with gene transcription silencing. Likewise, it has been reported that murine Mysm1 participates in transcription derepression of genes among which are transcription factors involved in hematopoietic stem cells homeostasis, hematopoiesis, and lymphocyte differentiation. However, whether human MYSM1 presents similar function and could take part in other biological processes is not known. Here, we describe a patient presenting a complete lack of B lymphocytes, T cell lymphopenia, defective hematopoiesis, developmental abnormalities, and impaired DNA repair. We demonstrate that this novel disorder is caused by homozygous *MYSM1* missense mutation affecting the catalytic site within the deubiquitinase JAMM/MPN domain. Remarkably, during the course of our study, the patient recovered a normal immunohematologic phenotype that originated from a spontaneous genetic reversion of the *MYSM1* mutation in the hematopoietic stem cells. Collectively, our study provides evidence that MYSM1 is essential for proper immunohematopoietic development in humans and highlights a hitherto unrecognized participation of MYSM1 in the DNA damage response.

## Introduction

Acetylation, methylation, sumoylation, phosphorylation, and ubiquitination, are some of the post-translational modifications that can occur on histones and modify the epigenetic landscape. These histone modifications participate in the regulation of key biological processes including DNA repair, DNA replication, and transcription (Campos and Reinberg, 2009). The murine histone deubiquitinase Mysm1, via its transcriptional regulatory role, has been reported to be important in the maintenance of the hematopoietic stem cell (HSC) quiescence and to allow proper hematopoiesis and lymphocyte differentiation (Jiang et al., 2011; Nijnik et al., 2012; Wang et al., 2013; Zhu et al., 2007). We here describe a patient presenting with a syndrome characterized by a B-alymphocytosis, hematopoiesis defects, developmental abnormalities, and impaired DNA repair. Combination of whole genome homozigosity mapping and high-throughput whole exome sequencing led to the identification of homozygous mutation in *MYSM1* as responsible for this disorder. This study provides the first evidence that MYSM1 is required for lymphocyte differentiation, hematopoiesis, and proper DNA repair in humans.

## Results and discussion

### Patient's clinical features

The patient, a boy, is the first child of Turkish consanguineous parents. He was born at term with a weight of 2620 g (25e percentile), a height of 47 cm (25e percentile) and an overt microcephaly (head circumference of 32 cm, <2$^{nd}$ percentile). He presented at birth with a respiratory distress caused by choanal atresia that required surgical therapy, and a bilateral deafness secondary to an agenesis of the cochleovestibular nerves. Except for the absence of auditory nerve, cerebral magnetic resonance imaging was normal with the detection of both internal auditory canals. The hemogram performed at birth revealed a profound aregenerative anemia (hemoglobin at 5 g/dL with reticulocytes 15 000/µL) and a marked

leukopenia (polymorphonuclear neutrophil 960/µL, and lymphocytes 1800/µL). Bone marrow aspirate revealed an absence of erythroid precursors with normal granulocyte maturation. Colony forming assay revealed a major reduction in erythroid as well as granulo-monocyte progenitors in patient's bone marrow as compared to a healthy control**.** Phenotypic analysis of the bone marrow cells by fluorocytometry revealed rare $CD34^+$ hematopoietic progenitors (0.4%) as compared to the bone marrow of a healthy adult donor (4%; not depicted), in contrast with an enlarged $CD34^+CD19^+$ pre BI population (7.1% versus 0.5%; not depicted). Only rare $CD34^-$ cells were $IgM^+$ (0.3%) suggesting that most of the few $CD34^-CD19^+$ cells (3%) present in the patient's bone marrow were $IgM^-$ and thus did not correspond to fully differentiated pre BII/immature B cell stages. Altogether, this analysis revealed a blockade between the pre BI and pre BII/immature stages in the B-cell differentiation process. The patient presented an agammaglobulinemia with B alymphocytosis, a T cell lymphopenia predominant on $CD4^+$, and a moderate NK cell lymphopenia (**Table I**). In addition, a sharp reduction of naive ($CD45RA^+$ $CD31^+$) $CD4^+$ T cells (**Table I**) with a nevertheless normal polyclonal T cell repertoire was noticed in patient's blood (not depicted).

**Patient's cells exhibit defective DNA repair**

Immunodeficiency (including lymphocytopenia and lack of memory T cells) associated with developmental abnormalities suggested a possible DNA repair defect as observed in DNA-ligaseIV, Cernunnos, or Fanconi anemia (FA) deficiencies (Buck et al., 2006a; Buck et al., 2006b; Kottemann and Smogorzewska, 2013; Riballo et al., 1999). Therefore, we assessed the capacity of patient's fibroblasts to cope with DNA damage. As determined by clonogenic assay, patient's fibroblasts exhibited an increased sensitivity to phleomycin (an inducer of DNA double strand breaks (DNA-DSB)) (**Fig. 1A**) and mitomycin (MMC) (a DNA interstrand crosslink (ICL)-inducer) (**Fig. 1B)**. In addition, similarly to primary fibroblasts from FA patients, patient's primary fibroblasts accumulated in G2 after MMC treatment, further

demonstrating a defect in ICL-repair (**Fig. 1C, D and E**). However, the G2 accumulation and increased MMC sensitivity were consistently lower in patient's cells compared to those observed in FA cells (**Fig. 1B, and E**). Moreover, FANCD2 ubiquitination was similarly induced in control and patient's cells after MMC and IR treatment, ruling out a defect in the Fanconi core complex (Kottemann and Smogorzewska, 2013) (**Fig. 1D**). In addition, patient's fibroblasts exhibited normal induction of CHK1 and CHK2 phosphorylation following ionizing radiation indicating that the impaired DNA repair was not caused by an alteration of early DNA damage signaling (**Fig. 1E**). Consequently, patient's cells exhibited an effective G1/S and G2/M cell cycle checkpoints following 5 grays irradiation (not depicted).

**Identification of *MYSM1* mutation**

The consanguineous status of the patient suggested an autosomal recessive disease (**Fig. 2A**). To determine the molecular cause of the disease we searched for candidate mutations by combining whole genome homozygosity mapping (WGHM) and massive parallel sequencing of the patient's exome. Among the identified homozygous substitutions and insertions/deletions (indels) found by whole exome sequencing in the patient, only 6 were located in a genetic region compatible with the WGHM analysis and absent from 1000 genomes, EVS, dbSNP, and our in-house databases. Remarkably, only one was predicted by Polyphen-2 to be "probably damaging" and was thus considered as the strongest candidate. This variant affects the coding sequence of the histone deubiquitinase *MYSM1* (also known as *2A-DUB* (Zhu et al., 2007)) at position 1967 (c.1967A>G) leading to the amino acid substitution p.H656R. The inheritance of the *MYSM1* mutation was confirmed by direct sequencing of the MYSM1 gene in the patient and his parents (**Fig. 2B**). The p.H656R substitution is located in the highly conserved catalytic MYSM1 JAMM (JAB1/MPN/Mov34) domain, which has an isopeptidase activity allowing the removal of ubiquitin from conjugated substrates (Zhu et al., 2007) (**Fig. 2C**). In silico analysis predicts that the mutation disrupts

the interaction with the zinc ion and therefore compromises the MYSM1 protease activity **(Fig. 2D)**. Moreover, immunofluorescence study indicated that endogenous mutant MYSM1, although correctly located into the nucleus, was consistently weakly detected in patient's fibroblasts as compared to control **(Fig. 2 E).** Western blot analysis confirmed the reduced amount of endogenous MYSM1 in patient's fibroblast whole cell lysates (WCL) (**Fig. 2F**). This decreased expression was further confirmed through transfection of 293T cells with an epitope-tagged mutated MYSM1 (**Fig. 2G**). Thus, the p.H656R MYSM1 mutation is located in the catalytic domain and affects the expression and/or the stability of the protein. MYSM1 specifically regulates the level of monoubiquitinated form of H2A at position K119 (uH2A) via its deubiquitinase activity (Jiang et al., 2011; Nijnik et al., 2012; Zhu et al., 2007). In accordance, basal level of uH2A, detected by immunofluorescence, was significantly augmented in patient's fibroblasts as compared to control's cells **(Figure principale)** further arguing for a functional MYSM1 defect in these cells.

**Complementation of the DNA repair defect by wt *MYSM1***

To ascertain that the increased DNA damage sensitivity of patient's cells resulted from the MYSM1 deficiency, we transduced a lentiviral vector co-expressing wt-MYSM1 and a green fluorescent protein (GFP). A selective advantage was conferred by ectopic expression of wt MYSM1 only in MYSM1-deficient cells upon both phleomycin (**Fig. 3A**) and MMC (**Fig. 3B**) treatments, arguing for the functional complementation of the DNA repair defect in these cells. Similarly to the clinical patient's phenotype, Mysm1-deficient mice exhibit an abnormal immunohematological development and a complete absence of B lymphocytes (Jiang et al., 2011; Nijnik et al., 2012). In Mysm1-deficient mice, these features have been attributed to the transcription deregulation in hematopoietic stem cells (HSC) of genes involved in HSC homeostasis (such as Gfi1), in hematopoiesis, and in lymphocyte differentiation (such as Ebf1) (Jiang et al., 2011; Nijnik et al., 2012; Wang et al., 2013). However, in the patient, such

transcriptional analysis in HSC was unfortunately not possible because of a lack of hematopoietic progenitors. Nonetheless, in order to know whether transcriptional alteration could be responsible for the increased sensitivity to genotoxics of patient's fibroblasts, we compared the gene expression profiles in control and patient's primary fibroblasts treated or not with MMC. Corroborating results obtained in murine Mysm1-deficient fibroblasts (Nijnik et al., 2012), only few genes were differently expressed in untreated MYSM1-deficient fibroblasts (not depicted). In addition, comparative transcriptomic analysis between patient and control's primary fibroblasts treated with MMC did not reveal obvious transcriptional changes, in particular in genes known to be involved in DNA damage response (not depicted). This suggests that the defective ability of MYSM1-deficient fibroblasts to cope with DNA damages does not result from abnormal expression of genes involved in DNA repair.

**Patient experienced spontaneous in vivo genetic reversion**

Remarkably, during the course of our study, we noticed a spontaneous improvement of the patient's immunohematological features including a correction of the number of circulating T and NK lymphocytes, reticulocytes, and neutrophils **(Fig. 4A)**. More strikingly, B lymphocytes ($CD19^+$), which were completely absent in the patient at four months of age **(Table 1)**, were detected at a normal level at 33 and 39 months of age **(Fig. 4A)** and exhibited a polyclonal and diversified repertoire (not depicted). In addition, the haemoglobin level normalized in the absence of blood transfusions **(Fig. 4A)**. To test whether this complete immunohematological restoration could originate from a genetic reversion, we purified patient's circulating B lymphocytes, extracted genomic DNA, and sequenced the *MYSM1* gene. Unlike fibroblasts that carried the homozygous *MYSM1* mutation (**Fig. 2B and Fig. 4B**), B lymphocytes were heterozygous for the mutation **(Fig. 4B)** indicating a spontaneous in vivo reversion to normal of inherited mutation on one allele, a rare event known as "back mutation" (Gregory et al., 2001; Gross et al., 2002). To determine whether the genetic reversion was accompanied by

a phenotypic normalization, we derived B-lymphoblastoid cell line (B-LCL) from reverted B lymphocytes and analyzed its MMC sensitivity. The reverted B-LCL did not accumulate in G2 after MMC treatment in contrast to patient's fibroblasts or primary fibroblasts and B-LCL from a FA patient used as sensitive controls (**Fig. 4C)**. This result further emphasizes the causal link between MYSM1 deficiency and the compromised DNA repair in this patient. Next, to precise what hematopoietic cell type experienced the genetic reversion, we purified the major populations of stem, progenitor, and precursor cells from patient's bone marrow aspirate (Hematopoietic stem cell: HSC; Multipotent progenitors: MPP; Multi-lymphoid progenitors: MLP; Common myeloid progenitors: CMP; PreBI cells, PreBII/Immature B cells, and Granulocytes (Doulatov et al., 2012)), extracted the genomic DNA, PCR amplified the *MYSM1* region harboring the mutation, submitted the PCR product to single molecule sequencing using a next-generation sequencing system, and quantified for the presence of the WT (c.1967A) and mutated (c.1967G) *MYSM1* sequences. To validate the quantitative reliability of this method we first analyzed DNA from two WT controls, the patient's parents, the patient's primary fibroblasts, and the patient's blood cells before reversion (at 4 months of age). In both WT controls, 99.8% of reads carried WT *MYSM1* sequence (the remaining 0.2% likely represented sequence errors) while, as expected for a heterozygous status, the two patient's parents exhibited virtually 50% of WT and 50% of mutated *MYSM1* sequences (**Fig. 4, D and E**). In accordance with a homozygous mutated status, the *MYSM1* mutation was recovered in 99,86% and 96.8% of sequences obtained from patient's fibroblasts and blood cells before reversion, respectively. Similar analysis revealed that the back mutation (i.e. WT *MYSM1* sequence in patient) was detected with a frequency ranging from 41.3 to 50.4% of sequence reads among the various sorted bone marrow populations, meaning that between 82.6% to 100% of these cells carried the genetic reversion (**Fig. 4, D and E**). Importantly, the genetic reversion was found in 100% of the HSC suggesting that the back mutation took place in this cell type and ultimately led to the correction of all the patient's immunohematologic defects, including B lymphocyte development in bone marrow (not depicted).

In conclusion, our study defines the "BADD syndrome" as a novel human disorder associating B-alymphocytosis, dyshematopoiesis, and impaired DNA repair caused by MYSM1 deficiency. Notably, BADD syndrome shares some features with Fanconi anemia, in particular dyshematopoiesis, developmental abnormalities, and defect in ICL repair. Hence, *MYSM1* mutations should be considered as possible molecular diagnosis for atypical FA patients. The complete restoration of a fully complete immunohematologic system upon genetic reversion in patient's HSC highlights the strong in vivo selective advantage provided by wt-MYSM1, reinforcing the critical role for this factor in human hematopoiesis and lymphopoiesis. Similar genetic reversions in the immunohematopoietic system have been reported in rare situations of DNA repair defect-associated diseases such as FA (Gregory et al., 2001; Gross et al., 2002; Hirschhorn, 2003; Waisfisz et al., 1999) and Bloom syndromes (Ellis et al., 2001; Waisfisz et al., 1999).

Although such transcriptome analyses were not possible in the patient since HSCs were virtually absent before the genetic reversion, it is likely that the immunohematological defects, and in particular, the B-alymphocytosis resulted from a transcriptional deregulation caused by MYSM1 deficiency. the patient's B alymphocytosis and bone marrow failure result from defective transcription of factor(s) involved in B cell development and HSC homeostasis. Our work also demonstrates that human MYSM1, besides its shown function as a gene transcription regulator (Zhu et al., 2007), presents a hitherto unrecognized role to allow proper DNA repair. **Hence,** in addition to transcriptional deregulation caused by MYSM1 defect, one cannot exclude that some of the clinical aspects found in patients (i.e. dyshematopoiesis, T lymphocytopenia) could also result from the deleterious accumulation of DNA damages in HSC, as observed in other DNA repair deficiencies (Ceccaldi et al., 2012; Nijnik et al., 2012; Nijnik et al., 2007; Rossi et al., 2007). This hypothesis is also supported by the fact that HSC and hematopoietic progenitors from Mysm1-deficient mice accumulated ROS, DNA damages, and p53 (Nijnik et al., 2012) and exhibited an increased sensitivity to irradiation (Wang et al., 2013).

However, although we demonstrate that MYSM1-deficiency rendered fibroblasts hypersensitive to genotoxics, we do not know whether MYSM1 contribute directly or indirectly to the DNA damage response. Since H2A monoubiquitination is induced at the vicinity of DNA damages (Marteijn et al., 2009; Nacerddine et al., 2012; Polo and Jackson, 2011; Wu et al., 2009; Zhu et al., 2009) one can hypothesize that MYSM1 is recruited to these sites to serve as a platform for other DNA repair factors and/or to modify, via its deubiquitinase activity, the local chromatin environment or other targets to favor DNA repair. On the other hand, the overall increase in monoubiquitinated H2A observed in MYSM1 deficient cells may modify the chromatin landscape and impinge on optimal DNA repair. Further investigations are now needed to delineate how MYSM1 participates in DNA repair and whether this function is required to prevent genome instability and cancer development.

**Materials and Methods**

***Cells*.** Informed consent for our study was obtained from the family in accordance with the Helsinki Declaration. The INSERM Institutional Review Board also approved this study. SV40-transformed cell lines were obtained as described in Buck et al. (Buck et al., 2006a). Cernunnos deficient fibroblasts and DNA-ligaseIV deficient fibroblasts were obtained from patients previously described (Buck et al., 2006a; Buck et al., 2006b). Cells from FA patients carry *FANCA* mutations and have been described in Ceccaldi et al. (Ceccaldi et al., 2012).

***Genetic Analysis.*** For RT-PCR, total RNA from patient and control fibroblasts or B-LCL was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Grand Island, NY) according to the manufacturer instructions. Reverse transcription was performed using a SuperScript First–Strand Synthesis Kit (Invitrogen), and cDNAs were used as templates for PCR amplification. The DNA mutation numbering system used is based on cDNA sequence. Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence. The initiation codon is codon 1.

***Whole genome homozygosity mapping.*** Genotyping using the Illumina Human Linkage - 24 BeadChip was carried out according to standard methodology. In brief, each sample (200ng) was whole genome amplified, fragmented, precipitated, and resuspended in appropriate hybridization buffer. Denatured samples were hybridized on prepared Human Linkage-24 BeadChips for a minimum of 16 h at 48°C. After hybridization, the BeadChips were processed for the single-base extension reaction as well as staining and imaging on an Iscan (Illumina) and an Autoloader 2 (Illumina). Normalized bead intensity data obtained for each sample were loaded into the Illumina GenomeStudio software 2011.1, which converted fluorescence intensities into SNP genotypes.

***Whole exome sequencing.*** Standard manufacturer protocols were used to perform target capture with the Illumina TruSeq exome enrichment kit and sequencing of 100 bp paired end reads on Illumina HiSeq. We generated approximately 10 Gb of sequence for each subject

such that 90% of the coding bases of the exome defined by the consensus coding sequence (CCDS) project were covered by at least 10 reads. We removed adaptor sequences and quality trimmed reads using the Fastx toolkit (http://hannonlab. cshl.edu/fastx_toolkit/) and then used a custom script to ensure that only read pairs with both mates present were subsequently used. Reads were aligned to hg19 with BWA31, and duplicate reads were marked using Picard (http://picard.sourceforge.net/) and excluded from downstream analyses. Single nucleotide variants (SNVs) and short insertions and deletions (indels) were called using samtools (http://samtools.sourceforge.net/) pileup and varFilter32 with the base alignment quality (BAQ) adjustment disabled, and were then quality filtered to require at least 20% of reads supporting the variant call. Variants were annotated using both ANNOVAR33 and custom scripts to identify whether they affected protein coding sequence, and whether they had previously been seen in dbSNP the 1000 Genomes data set, or in approximately 160 exomes previously sequenced at our centre. A variant called in the patient was considered to be a candidate mutation if it was not reported in dbSNP or the 1000 Genomes data set or in our in-house database.

***Antibodies and Reagents.*** Rabbit polyclonal anti-53BP1 was from Novus biological, rabbit polyclonal anti-MYSM1 and anti-ubiquityl H2A were from Millipore. Antibodies against FANCD2, CHK1, CHK2 and Flag-M2 were from Sigma-Aldrich. Anti-Phosphorylated-CHK1 (Ser296) was from MBL International Corporation, and anti-phosphorylated- CHK2 (Thr68) was from Cell Signalling. Anti-actin was from Sigma-Aldrich, anti-KU70 from Neomarkers (Fremont, CA), and anti-PLC$\gamma$1 from Cell Signalling. For immunofluorescence, primary antibodies were used at a dilution of 1/200. Alexa Fluor488 and Alexa Fluor546 goat F(Ab)'2 anti-IgG, and Alexa Fluor488 goat F(Ab)'2 anti-IgM (used for ubH2A) secondary antibodies were from Molecular Probes (Grand Island,NY) and used at a dilution of 1/1,000.

***Western Blotting and Immunofluorescence.*** Cells were lysed for 20min on ice in lysis buffer containing 50mM Tris (pH 8.0), 2mMEDTA, 0.5% Nonidet P40, 1% phosphatase inhibitor cocktails (Sigma), and protease inhibitor (Roche Applied Science, Indianapolis, IN);

centrifuged; and supernatant was harvested and protein concentration quantified using Bradford assay. Whole cell lysates (WCLs) were analyzed by Western blotting with appropriate antibodies (dilution 1/1,000). Immunofluorescence study was performed as previously described by Touzot et al. (Touzot et al., 2012). For genotoxic-induced post-translational modifications of CHK1, CHK2, and FANCD2, cells were either treated with 10 Grays ionizing radiation and left 2 hours at 37°C before lysis, or with MMC (200ng/ml) during 6 hours.

***DNA repair assays and complementation.*** Clonogenic assays were performed as described in Buck et al. (Buck et al., 2006a). G2 accumulation after MMC treatment was performed as described in Ceccaldi et al. (Ceccaldi et al., 2011) and complementation with the $GFP^+$ pLenti7.3-*MYSM1* expressing vector (Invitrogen) was performed as described in Malivert et al. (Malivert et al., 2009).

***Genetic reversion analysis*.** Mononuclear BM cells were isolated by gradient centrifugation on Ficoll-hypaque (d=1.077 g/ml, Lymphoprep, Axis-Shield, Oslo, Norway). Part of mononuclear cells were stained with anti-CD45 VioGreen, anti-CD11b APC, anti-CD19 PE and anti-CD34 APC-Cy7 and directly sorted on an Aria II system (BD Biosciences) into a myeloid ($CD45^+CD11b^+$), preBI ($CD45^+CD34^+CD19^+$) and preBII/immature B ($CD45^+CD34^-CD19^+$) fractions. $CD34^+$ hematopoietic progenitors cells were positively selected from the other part of mononuclear cells using the human Miltenyi indirect CD34 Microbead Kit (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) and a separator (VarioMACS; Miltenyi Biotec). $CD34^+$ selected cells were further stained with anti-CD34 APC-Cy7, anti-CD45RA FITC, anti-lineage (CD2, CD3, CD4, CD8, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20, CD33, CD56, CD235a) PE, anti-CD38 PE-Cy7 and anti-CD90 PE-Cy5 and sorted on Aria II into a hematopoietic stem cell (HSC: $CD34^+$ $CD38^-$ $CD45RA^-$ $CD90^+$), multipotent progenitors (MPP: $CD34^+CD38^-CD45RA^-CD90^-$), Multi-lymphoid progenitors (MLP: $CD34^+CD38^-CD45RA^+CD90^-$) and common myeloid progenitors (CMP: $CD34^+CD38^+CD45RA^-$) fraction as described elsewhere(Doulatov et al., 2012). DNA was extracted using DNA isolation kit from

Roche. *MYSM1* PCR products were gel purified and processed for single molecule sequencing using an Ion personal genome machine (PGM) (Ion Torrent, Life Technologies) according to the manufacturer's recommendations.

**Acknowledgements**.

We thank the patient and his family, Dr Chantal Brouzes for the myelogram analysis, Laetitia Gaillard, Sonia Luce, Jeremy Schwartzentruber, and Jacek Majewski for technical assistance. This work was supported by institutional grants from INSERM, Ligue Nationale contre le Cancer (Equipe Labellisée La Ligue), ARC, INCa/Cancéropôle Ile de France, Institut Imagine, and the European Research Council [PIDIMMUN grant no. 249816]. T.L.G received fellowships from La Ligue contre le cancer. P.R. is a scientist from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

**Conflict of interest statement**

The authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

## References


Bennett-Lovsey, R.M., A.D. Herbert, M.J. Sternberg, and L.A. Kelley. 2008. Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins* 70:611-625.

Buck, D., L. Malivert, R. de Chasseval, A. Barraud, M.C. Fondaneche, O. Sanal, A. Plebani, J.L. Stephan, M. Hufnagel, F. le Deist, A. Fischer, A. Durandy, J.P. de Villartay, and P. Revy. 2006a. Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* 124:287-299.

Buck, D., D. Moshous, R. de Chasseval, Y. Ma, F. le Deist, M. Cavazzana-Calvo, A. Fischer, J.L. Casanova, M.R. Lieber, and J.P. de Villartay. 2006b. Severe combined immunodeficiency and microcephaly in siblings with hypomorphic mutations in DNA ligase IV. *Eur J Immunol* 36:224-235.

Campos, E.I., and D. Reinberg. 2009. Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet* 43:559-599.

Ceccaldi, R., D. Briot, J. Larghero, N. Vasquez, C. Dubois d'Enghien, D. Chamousset, M.E. Noguera, Q. Waisfisz, O. Hermine, C. Pondarre, T. Leblanc, E. Gluckman, H. Joenje, D. Stoppa-Lyonnet, G. Socie, and J. Soulier. 2011. Spontaneous abrogation of the G(2)DNA damage checkpoint has clinical benefits but promotes leukemogenesis in Fanconi anemia patients. *J Clin Invest* 121:184-194.

Ceccaldi, R., K. Parmar, E. Mouly, M. Delord, J.M. Kim, M. Regairaz, M. Pla, N. Vasquez, Q.S. Zhang, C. Pondarre, R. Peffault de Latour, E. Gluckman, M. Cavazzana-Calvo, T. Leblanc, J. Larghero, M. Grompe, G. Socie, A.D. D'Andrea, and J. Soulier. 2012. Bone marrow failure in Fanconi anemia is triggered by an exacerbated p53/p21 DNA damage response that impairs hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* 11:36-49.

Doulatov, S., F. Notta, E. Laurenti, and J.E. Dick. 2012. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell* 10:120-136.

Ellis, N.A., S. Ciocci, and J. German. 2001. Back mutation can produce phenotype reversion in Bloom syndrome somatic cells. *Human genetics* 108:167-173.

Gregory, J.J., Jr., J.E. Wagner, P.C. Verlander, O. Levran, S.D. Batish, C.R. Eide, A. Steffenhagen, B. Hirsch, and A.D. Auerbach. 2001. Somatic mosaicism in Fanconi anemia: evidence of genotypic reversion in lymphohematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2532-2537.

Gross, M., H. Hanenberg, S. Lobitz, R. Friedl, S. Herterich, R. Dietrich, B. Gruhn, D. Schindler, and H. Hoehn. 2002. Reverse mosaicism in Fanconi anemia: natural gene therapy via molecular self-correction. *Cytogenet Genome Res* 98:126-135.

Hirschhorn, R. 2003. In vivo reversion to normal of inherited mutations in humans. *J Med Genet* 40:721-728.

Jiang, X.X., Q. Nguyen, Y. Chou, T. Wang, V. Nandakumar, P. Yates, L. Jones, L. Wang, H. Won, H.R. Lee, J.U. Jung, M. Muschen, X.F. Huang, and S.Y. Chen. 2011. Control of B cell development by the histone H2A deubiquitinase MYSM1. *Immunity* 35:883-896.

Kottemann, M.C., and A. Smogorzewska. 2013. Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. *Nature* 493:356-363.

Malivert, L., I. Callebaut, P. Rivera-Munoz, A. Fischer, J.P. Mornon, P. Revy, and J.P. de Villartay. 2009. The C-terminal domain of Cernunnos/XLF is dispensable for DNA repair in vivo. *Mol Cell Biol* 29:1116-1122.

Marteijn, J.A., S. Bekker-Jensen, N. Mailand, H. Lans, P. Schwertman, A.M. Gourdin, N.P. Dantuma, J. Lukas, and W. Vermeulen. 2009. Nucleotide excision repair-induced H2A ubiquitination is dependent on MDC1 and RNF8 and reveals a universal DNA damage response. *J Cell Biol* 186:835-847.

Maytal-Kivity, V., N. Reis, K. Hofmann, and M.H. Glickman. 2002. MPN+, a putative catalytic motif found in a subset of MPN domain proteins from eukaryotes and prokaryotes, is critical for Rpn11 function. *BMC biochemistry* 3:28.

Nacerddine, K., J.B. Beaudry, V. Ginjala, B. Westerman, F. Mattiroli, J.Y. Song, H. van der Poel, O.B. Ponz, C. Pritchard, P. Cornelissen-Steijger, J. Zevenhoven, E. Tanger, T.K. Sixma, S. Ganesan, and M. van Lohuizen. 2012. Akt-mediated phosphorylation of Bmi1 modulates its oncogenic potential, E3 ligase activity, and DNA damage repair activity in mouse prostate cancer. *J Clin Invest* 122:1920-1932.

Nijnik, A., S. Clare, C. Hale, C. Raisen, R.E. McIntyre, K. Yusa, A.R. Everitt, L. Mottram, C. Podrini, M. Lucas, J. Estabel, D. Goulding, N. Adams, R. Ramirez-Solis, J.K. White, D.J. Adams, R.E. Hancock, and G. Dougan. 2012. The critical role of histone H2A-deubiquitinase Mysm1 in hematopoiesis and lymphocyte differentiation. *Blood* 119:1370-1379.

Nijnik, A., L. Woodbine, C. Marchetti, S. Dawson, T. Lambe, C. Liu, N.P. Rodrigues, T.L. Crockford, E. Cabuy, A. Vindigni, T. Enver, J.I. Bell, P. Slijepcevic, C.C. Goodnow, P.A. Jeggo, and R.J. Cornall. 2007. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* 447:686-690.

Polo, S.E., and S.P. Jackson. 2011. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev* 25:409-433.

Riballo, E., S.E. Critchlow, S.H. Teo, A.J. Doherty, A. Priestley, B. Broughton, B. Kysela, H. Beamish, N. Plowman, C.F. Arlett, A.R. Lehmann, S.P. Jackson, and P.A. Jeggo. 1999. Identification of a defect in DNA ligase IV in a radiosensitive leukaemia patient. *Curr Biol* 9:699-702.

Rossi, D.J., D. Bryder, J. Seita, A. Nussenzweig, J. Hoeijmakers, and I.L. Weissman. 2007. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 447:725-729.

Sato, Y., A. Yoshikawa, A. Yamagata, H. Mimura, M. Yamashita, K. Ookata, O. Nureki, K. Iwai, M. Komada, and S. Fukai. 2008. Structural basis for specific cleavage of Lys 63-linked polyubiquitin chains. *Nature* 455:358-362.

Touzot, F., L. Gaillard, N. Vasquez, T. Le Guen, Y. Bertrand, J. Bourhis, T. Leblanc, A. Fischer, J. Soulier, J.P. de Villartay, and P. Revy. 2012. Heterogeneous telomere defects in patients with severe forms of dyskeratosis congenita. *J Allergy Clin Immunol* 129:473-482, 482 e471-473.

Waisfisz, Q., N.V. Morgan, M. Savino, J.P. de Winter, C.G. van Berkel, M.E. Hoatlin, L. Ianzano, R.A. Gibson, F. Arwert, A. Savoia, C.G. Mathew, J.C. Pronk, and H. Joenje. 1999. Spontaneous functional correction of homozygous fanconi anaemia alleles reveals novel mechanistic basis for reverse mosaicism. *Nat Genet* 22:379-383.

Wang, T., V. Nandakumar, X.X. Jiang, L. Jones, A.G. Yang, X.F. Huang, and S.Y. Chen. 2013. The control of hematopoietic stem cell maintenance, self-renewal and differentiation by Mysm1-mediated epigenetic regulation. *Blood*

Wu, J., M.S. Huen, L.Y. Lu, L. Ye, Y. Dou, M. Ljungman, J. Chen, and X. Yu. 2009. Histone ubiquitination associates with BRCA1-dependent DNA damage response. *Mol Cell Biol* 29:849-860.

Zhu, P., W. Zhou, J. Wang, J. Puc, K.A. Ohgi, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, C.K. Glass, and M.G. Rosenfeld. 2007. A histone H2A deubiquitinase complex coordinating histone acetylation and H1 dissociation in transcriptional regulation. *Mol Cell* 27:609-621.

Zhu, Q., G. Wani, H.H. Arab, M.A. El-Mahdy, A. Ray, and A.A. Wani. 2009. Chromatin restoration following nucleotide excision repair involves the incorporation of ubiquitinated H2A at damaged genomic sites. *DNA Repair (Amst)* 8:262-273.

**Figure Legends**

**Figure 1. Patient's cells exhibit increased sensitivity to phleomycin and MMC without defect in G1/S and G2/M checkpoints. (A)** Survival of fibroblasts after phleomycin treatment up to 200$\mu$g/ml. Results are expressed as the fraction of colony-forming cells in relation to untreated cells. Each point represents the mean value and standard deviation of three separate determinations. Control phleomycin sensitive fibroblasts were from a Cernunnos patient (Buck et al., 2006a). The results are representative of three independent experiments **(B)** Survival of fibroblasts after Mitomycin (MMC) up to 25ng/ml. Results are expressed as the fraction of colony-forming cells in relation to untreated cells. Each point represents the mean value and standard deviation of three separate determinations. The results are representative of three independent experiments. **(C)** Unlike control's fibroblasts, patient's fibroblasts exhibited an increased G2 arrest (arrow) 48h after MMC treatment (up to 100ng/ml). Fibroblasts from a Fanconi anemia patient (FA) were used as sensitive control. **(D)** FANCD2 immunoblot of SV40-fibroblasts from a control and the patient left untreated or treated with 10 Grays ionizing radiation (IR) or 200n g/ml MMC for 6h reveals an induction of FANDCD2 monoubiquitination. KU70 immunoblot was used as loading control. **(E)** SV40-fibroblasts from a control and the patient left untreated or treated with 10 Grays ionizing radiation (IR) or 200n g/ml MMC for 6h reveals an induction of CHK1-phosphorylation (left panel) and CHK2-phosphorylation (right panel) following IR. PLC$\gamma$1 immunoblot was used as loading control. **(F and G)** The fraction of cells in early S phase was determined by FACS analysis with and without 5 Gy IR, and was used to calculate the inhibition of S phase entry. ATM-deficient cells (A-T) were, as expected, defective in G1/S checkpoints, whereas patient's cells behaved like normal control. **(H and I)** The phosphorylation of histone H3 and DNA content of either untreated or of 5 Gy-irradiated patient's cells were analysed by FACS. While ATM-deficient cells (A-T) retained phospho-H3-positive cells following IR, control and patient's cells did not.

**Figure 2. Mutation identified in the catalytic domain of MYSM1. (A)** Pedigree of the patient's family. Whole genome homozygosity mapping was performed with the individuals indicated by the arrows. **(B)** Direct sequencing of the MYSM1 gene in the patient and his parents confirmed the inheritance of the c.1967 A>G substitution. **(C)** The mutation identified in patient (p.H656R) is localized in the MPN domain and affects a histidine (H656 in red) highly conserved among species **(D)** Model of the 3D structure of the MYSM1 JAMM/MPN domain. The MYSM1 JAMM domain has an isopeptidase activity allowing the removal of ubiquitin from conjugated substrates (Zhu et al., 2007). The sequences of proteins from the JAMM family are highly divergent, but portions of the core, including amino acids from the catalytic site, are more conserved (Maytal-Kivity et al., 2002). The modelling was made using as a template the experimental 3D structure of Mov34 MPN domain, with which MYSM1 is aligned with significant low E-values ($3\ 10^{-7}$) by the Phyre fold recognition program (Bennett-Lovsey et al., 2008). The modelled catalytic site, which is not present in the Mov34 template, is similar to those observed in the 3D structures of "active" enzymes, such as AMSH-LP. In this site, $Zn^{+2}$ is coordinated by two histidine (His656 and His658), an aspartic acid (Asp669) and a water molecule hydrogen bonded to a glutamic acid (Glu597). An Ins-1 insertion, also found in AMSH-family members and including two extended sequences, might provide the beta-sheet interaction with the C-terminal tail of the distal ubiquitin or ubiquitin-like proteins (Sato et al., 2008). **(E)** Immunofluorescence using an anti-MYSM1 antibody revealed a lower detection of MYSM1 in patient's cells as compared to control. Lower panel shows a quantitative analysis of MYSM1 detection in nuclei from control's and patient's cells. **(F)** Immunoblot of MYSM1 with lysates from a healthy control and the patient. KU70 and Actin immunoblots were used as loading controls. **(G)** Flag Immunoblot with lysates from 293T cells transfected either with a WT Flag-MYSM1 or a p.H656R Flag-MYSM1 expressing vectors. KU70 and Actin immunoblots were used as loading controls.

**Figure 3. Expression of WT MYSM1 complements the DNA repair defect of patient's cells. (A)** Survival of control or MYSM1-deficient fibroblasts, transduced with the empty pLenti7.3-GFP-vector or containing WT MYSM1, 10 days after Phleomycin treatment. **(B)** Survival of control or MYSM1-deficient cells, transduced with the empty pLenti7.3-GFP-vector or containing WT MYSM1, 10 days after MMC treatment. Error bars, SD from two independent experiments.

**Figure 4. Spontaneous genetic reversion in patient. (A)** Immunohematologic values in patient before reversion (at 4 months ) and after reversion (at 33 and 39 months) revealed a spontaneous correction to normal values in all immunohematopoietic cell compartments. Grey areas represent the normal values obtained in healthy individuals. **(B)** Sequencing analysis indicated that a spontaneous genetic reversion occurred in *MYSM1* at position c.1967 in patient's B lymphocytes leading to a WT sequence on one allele. (**C**) Unlike patient's fibroblasts, patient's B-LCL did not exhibit an increased G2 arrest (red arrow) 48h after MMC treatment. Fibroblasts and B-LCL from a Fanconi anemia patient were used as sensitive control. **(D)** Quantitative analysis of WT (c.1967A) and mutated (c.1967G) *MYSM1* sequences obtained by high throughput sequencing in the different individuals and cell types. **(E)** Graphical representation of the results obtained in (D).

**TABLE I. Immunohematological features of the patient at 4 months of age.**

| | |
|---|---|
| White Cell Count | 2900 /µL (6000–17500) |
| Polymorphonuclear Neutrophils | 700 /µL (1000-8500) |
| Lymphocytes | 1300 /µL (2700-13500) |
| Haemoglobin | 7.5 g/dL (11.5-13.5) |
| Platelets /µL | 249000 /µL (150000-500000) |
| Lymphocyte phenotype | |
| (T cells) | |
| $CD3^+$ | 1183 /µL (2500–5600) |
| $CD4^+$ | 585 /µL (1800–4000) |
| $CD8^+$ | 481 /µL (590–1600) |
| $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ (%) | 17 (60–72) |
| (B cells) | |
| $CD19^+$ | 0 /µL (430–3000) |
| (Natural killer cells) | |
| $CD56^+CD16^+$ | 130/µl (170–830) |
| T-cell proliferation- $\times 10^3$ cpm | |
| PHA | 38 (>50) |
| Serum Immunoglobulin levels | |
| IgG | 1.94 g/L (2.35 - 4.37) |
| IgA | <0.06 g/L (0.2 - 0.62) |
| IgM | <0.04 g/L (0.34 - 0.95) |

For all values, normal range or normal threshold are indicated in brackets. PHA, Phytohemagglutinin

## Figures

## Figure 1

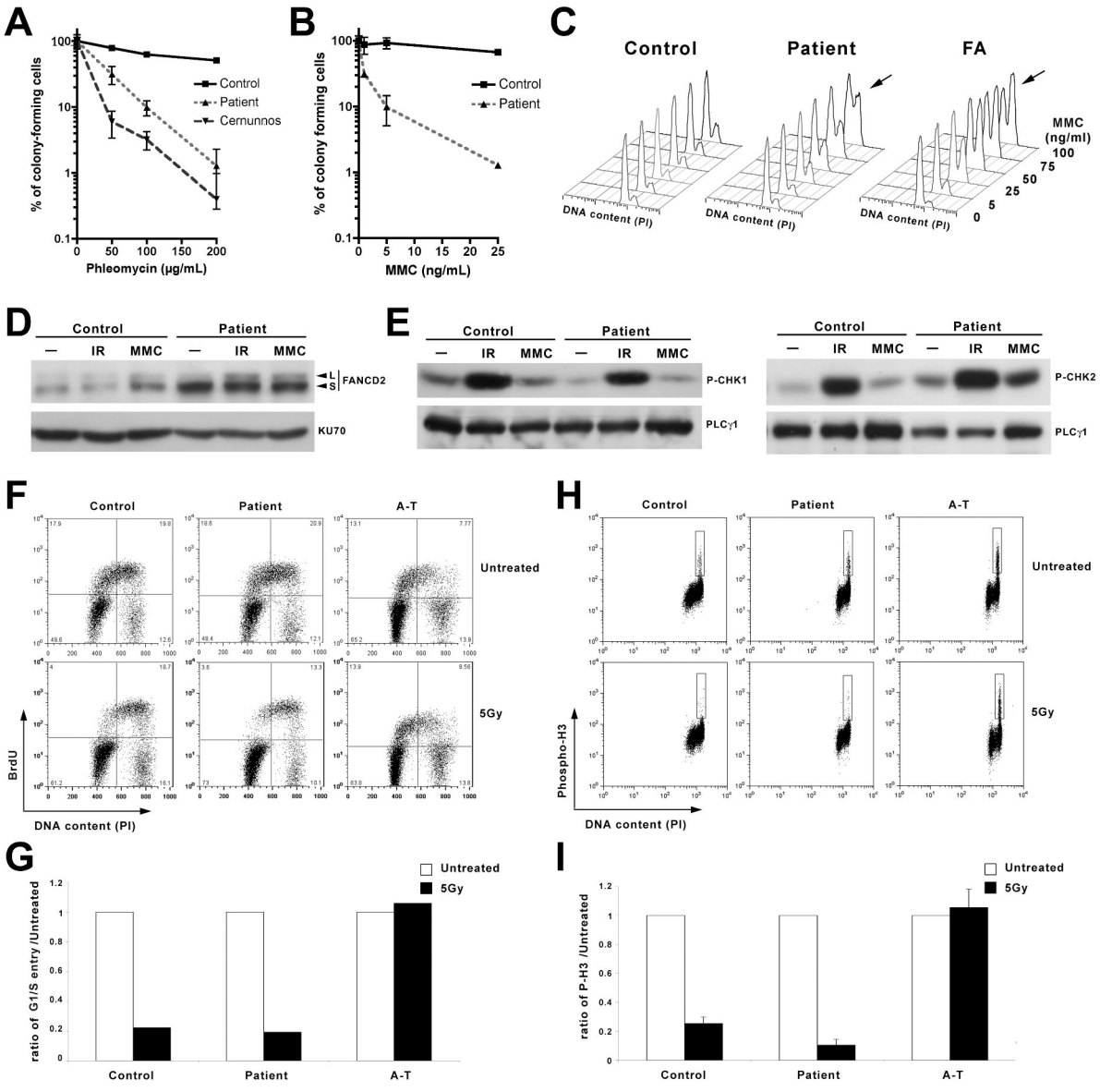


**Figure 2**

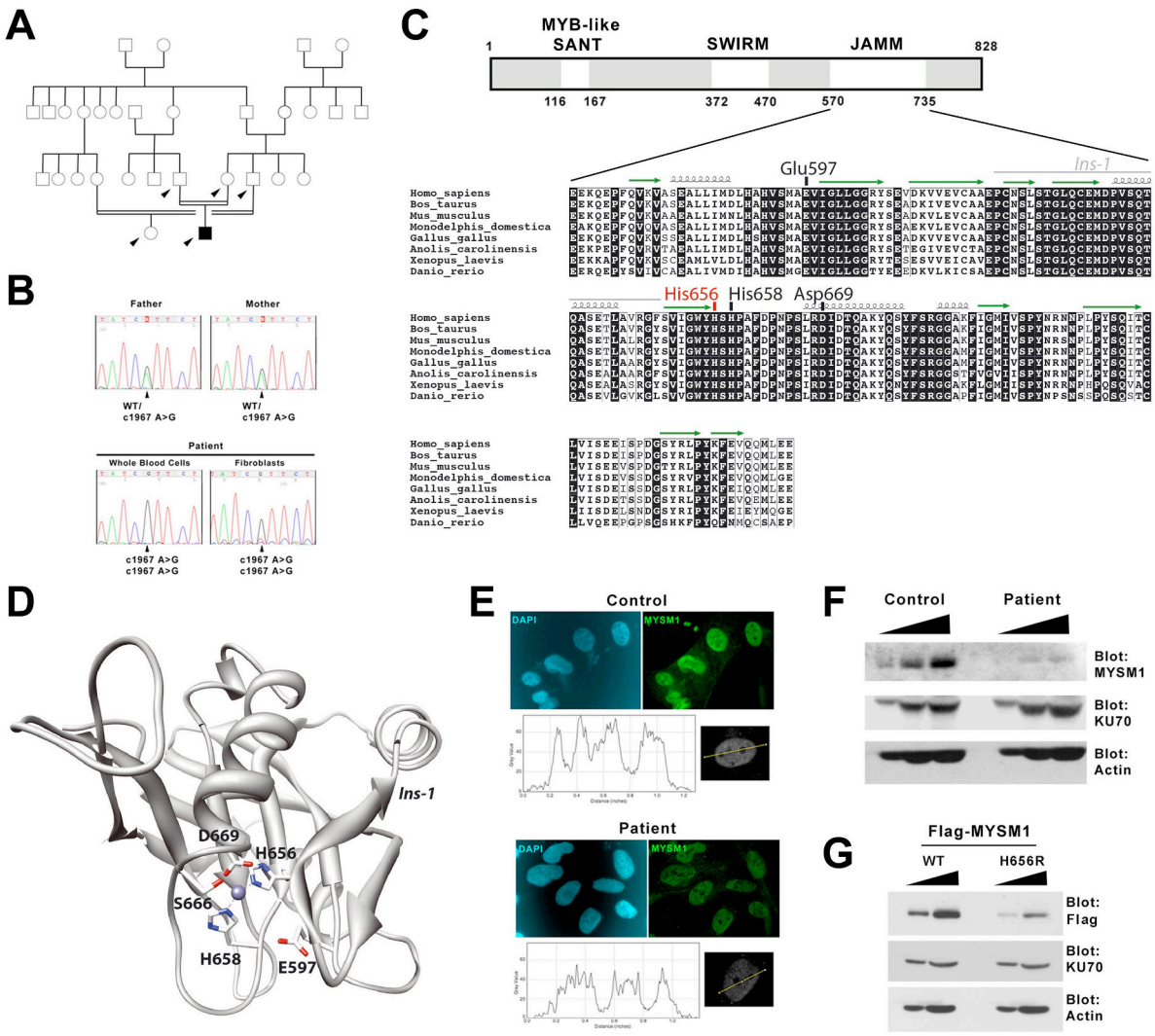
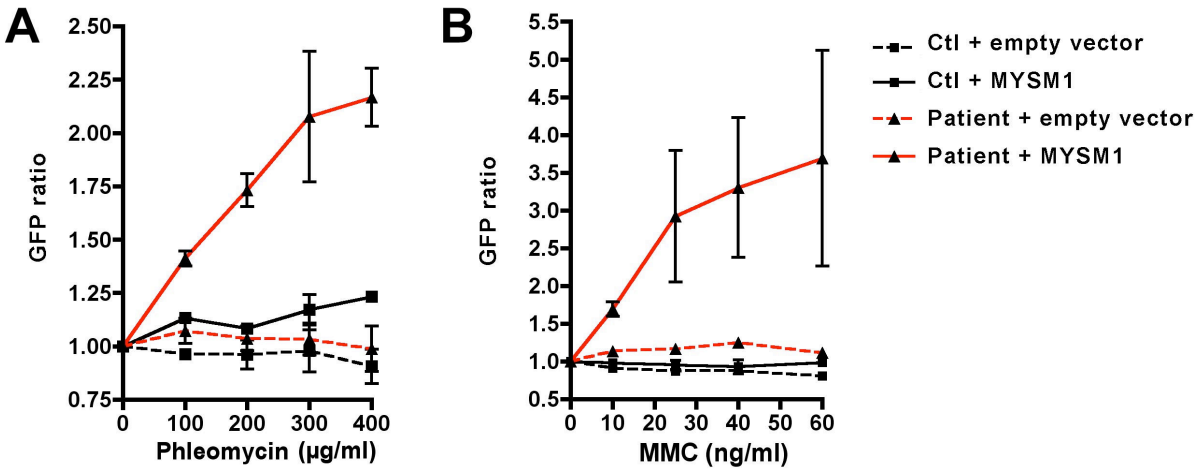
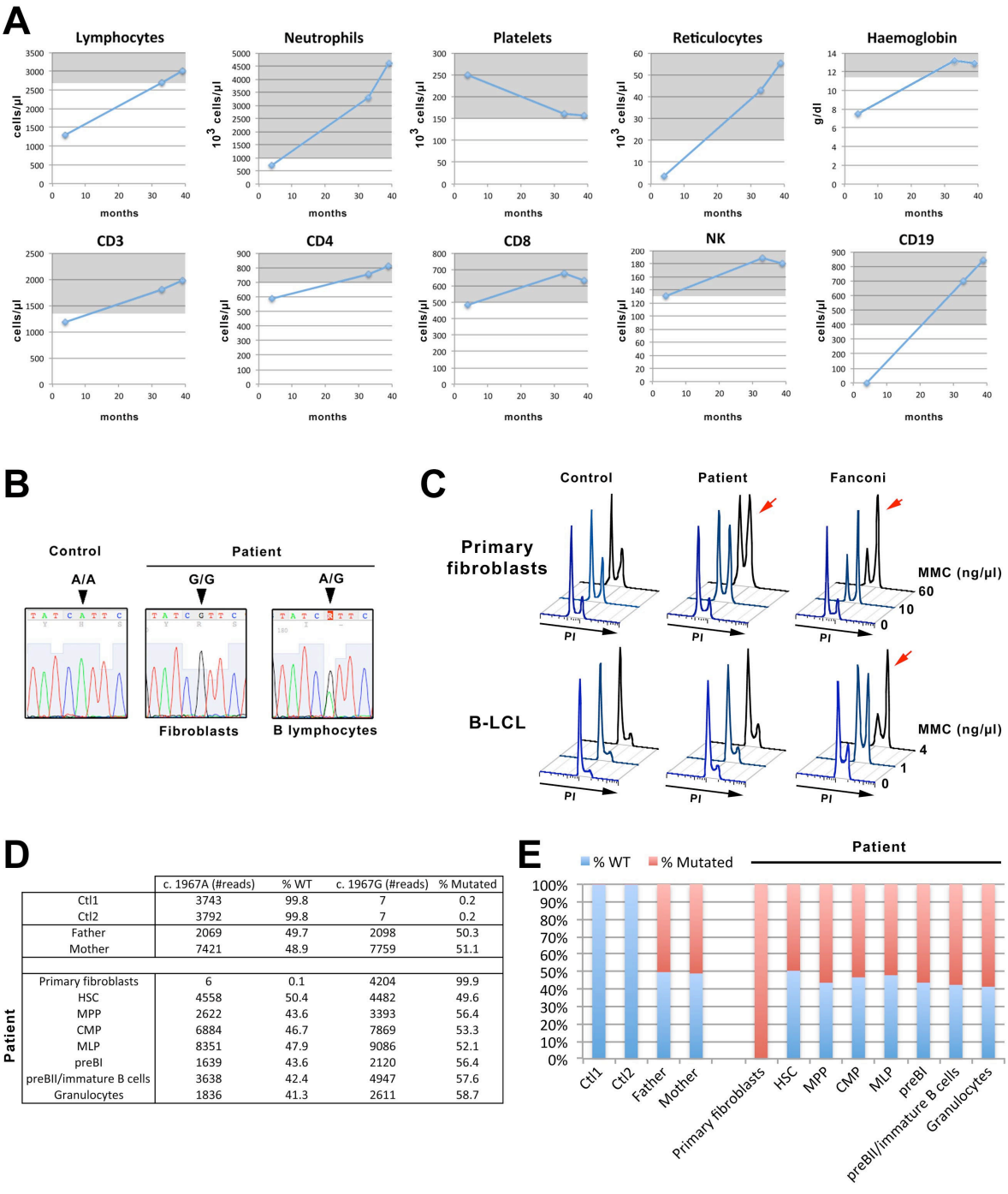

A
B
Father
Mother
WT/
c1967 A>G
WT/
c1967 A>G
Patient
Whole Blood Cells
Fibroblasts
c1967 A>G
c1967 A>G
c1967 A>G
c1967 A>G
C
MYB-like
SANT
SWIRM
JAMM
1
828
116
167
372
470
570
735
Glu597
Ins-1
His656
His658
Asp669
Homo_sapiens
Bos_taurus
Mus_musculus
Monodelphis_domestica
Gallus_gallus
Anolis_carolinensis
Xenopus_laevis
Danio_rerio
D
Ins-1
D669
H656
S666
H658
E597
E
Control
DAPI
MYSM1
Patient
F
Control
Patient
Blot:
MYSM1
Blot:
KU70
Blot:
Actin
G
Flag-MYSM1
WT
H656R
Blot:
Flag
Blot:
KU70
Blot:
Actin

**Figure 3**


A
GFP ratio
2.50
2.25
2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
0.75
0
100
200
300
400
Phleomycin (µg/ml)
B
GFP ratio
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
10
20
30
40
50
60
MMC (ng/ml)
Ctl + empty vector
Ctl + MYSM1
Patient + empty vector
Patient + MYSM1

## Figure 4




D

| Patient | c. 1967A (#reads) | % WT | c. 1967G (#reads) | % Mutated |
|---|---|---|---|---|
| Ctl1 | 3743 | 99.8 | 7 | 0.2 |
| Ctl2 | 3792 | 99.8 | 7 | 0.2 |
| Father | 2069 | 49.7 | 2098 | 50.3 |
| Mother | 7421 | 48.9 | 7759 | 51.1 |
| | | | | |
| Primary fibroblasts | 6 | 0.1 | 4204 | 99.9 |
| HSC | 4558 | 50.4 | 4482 | 49.6 |
| MPP | 2622 | 43.6 | 3393 | 56.4 |
| CMP | 6884 | 46.7 | 7869 | 53.3 |
| MLP | 8351 | 47.9 | 9086 | 52.1 |
| preBI | 1639 | 43.6 | 2120 | 56.4 |
| preBII/immature B cells | 3638 | 42.4 | 4947 | 57.6 |
| Granulocytes | 1836 | 41.3 | 2611 | 58.7 |