



**HAL**  
open science

# Implication des lysines acétyl transférase dans les mécanismes ALternatifs de maintenance des télomères

Dalal Bakhos Al Douaihy

► **To cite this version:**

Dalal Bakhos Al Douaihy. Implication des lysines acétyl transférase dans les mécanismes ALternatifs de maintenance des télomères. Génétique. Université Sorbonne Paris Cité, 2018. Français. NNT : 2018USPCB009 . tel-02466959

**HAL Id: tel-02466959**

**<https://theses.hal.science/tel-02466959>**

Submitted on 4 Feb 2020

**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 Descartes

ED562 –BioSPC

*Laboratoire de RadioPathologie-CEA*

# Implication des lysines acétyl transférase dans les mécanismes ALTERNATIFS de maintenance des télomères

Par Dalal BAKHOS AL DOUAIHY

Thèse de doctorat de Génétique et Neurobiologie

Dirigée par Dr François BOUSSIN

Présentée et soutenue publiquement le 14 mai 2018

Devant un jury composé de:

Pr Emmanuel Moyse

Pr Pierre Verrelle

Dr Michel Charbonneau

Dr Sophie Bombard

Dr François Boussin

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

«Tu peux faire ce que je ne peux pas faire. Je peux faire ce que tu ne peux pas faire. Ensemble, nous pouvons faire de grandes choses.» – Mère Teresa.

*A ma mère et à mon père qui m'ont toujours encouragée à réaliser ma passion et mon rêve final. J'espère que vous êtes fiers de moi car sans vous, je ne serais pas là*  
*Mille Merci*

# Remerciements

*Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.*

*Je voudrai tout d'abord adresser toute ma gratitude à Dr François Bousin, de m'avoir accueillie et intégrée au sein de son laboratoire durant mon stage de master 2 et ces trois années de thèse. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris, pour l'aide compétente que tu m'as apportée, pour ta patience infinie et ton encouragement. Ton œil critique m'a aidée à clarifier mes idées, structurer le travail et améliorer la qualité des différentes sections. Je garderai un excellent souvenir de ta positivité et de ton équipe.*

*J'exprime mes profonds remerciements aux membres du jury pour avoir acceptés d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie le Pr. Emmanuel Moyse pour avoir présidé ce jury, le Dr Michel Charbonneau et le Pr. Pierre Verrelle d'avoir acceptés d'être les rapporteurs de ce travail et pour le temps qu'ils ont passé à lire ma thèse et la corriger, et je remercie également le Dr Sophie Bombard d'avoir acceptée de participer en tant qu'examinatrice de cette thèse.*

*A l'issue de la rédaction de ce manuscrit, je suis convaincue que la thèse est loin d'être un travail solitaire.*

*Aux anciens et actuels membres du laboratoire de LRP, je voudrai remercier Maya, la doctorante qui a commencé ce projet, Christine, Laurent, Marc-André, Amandine et José qui ont accepté de répondre à mes questions avec une grande générosité, Mathieu, l'ancien post-doc qui était toujours de bonne humeur, Lise, Stéphane, Alexandra, Sofiane et Benjamin pour leur soutien, je vous souhaite tous plein de succès dans vos projets. Je tiens à remercier tout particulièrement Chantal, je suis reconnaissante pour le temps qu'elle a consacré surtout durant mon stage de master 2 et ma première année de thèse pour m'apprendre les techniques de cytogénétiques, je te remercie pour tes précieux conseils et les discussions scientifiques enrichissantes pendant ces années. Ce travail doctoral n'aurait jamais pu être réalisé sans le soutien surtout morale de deux personnes Thierry et Olivier dont leur bonne humeur, leur humour m'ont énormément aidée à garder le sourire et de progresser dans cette phase délicate dans ma vie. Finalement, à Mahasen! Je suis contente d'avoir gagnée une sœur comme toi au cours de mon passage au LRP. Merci pour tous les bons moments que nous avons partagés ensemble surtout à paris, je te souhaite pleins de succès aussi bien dans ta vie professionnelle que dans ta vie privée avec ton mari Samer et tes enfants dans le future et saches que je garde notre amitié très précieuse au fond de mon cœur et je resterai toujours à tes côtés. Je t'aime fort.*

*Au cours de ces années j'ai fait partie d'une grande unité au sein du CEA. Les discussions ainsi que les conseils avec les autres équipes m'ont beaucoup apporté. Je remercie donc toutes ces personnes : particulièrement Pascal pour toutes nos discussions et ses conseils, et toute son équipe : Benoit, laure, Caroline, Gaëlle, Emilie et Paola pour les moments conviviaux. Je tiens à remercier Jan, Françoise et Michelle pour leur aide technique, Aurélie et Arielle pour leur aide administrative irremplaçable. Sans oublier les voisins, en particulier Pierre, je l'invite pour visiter un jour le Liban, Marie-Justin, Nour, Sonia, Clotilde, Margaux et Sophie. Merci Amandine, Maelle et Alba pour votre amitié et votre sourire.*

*Je tiens aussi à remercier chaleureusement tous mes amis qui m'ont soutenue pendant mes années de thèse, à proximité ou à distance.*

*Mira, Lama, Angela et Karine ma petite famille en France, merci à chacune d'entre vous pour chaque moment que nous avons partagé ensemble, vous étiez toujours présentes pour rendre ces années plus qu'agréables. Marianne, ma "blondette" préférée, tu étais la seule à me faire sourire quand personne ne réussit à le faire, j'ai gagné une amitié très précieuse. Nadia, Ivona, Olina, Josiane et Rachelle, notre amitié double les joies et réduit de moitié les peines, merci pour votre motivation, je vous aime jusqu'à l'infini. A Rim, Tracy, Rachelle, Rayanne et christine : Beaucoup de chance j'ai de vous avoir à mes côtés. A Dima, Laurette et Charbel : merci pour l'ambiance de travail très agréable que vous avez su créer pendant nos réunions pour rédiger chacun son manuscrit. Merci à toutes les personnes que j'ai côtoyées à la MDL, particulièrement Mme Marlene qui était toujours à mes côtés, Nehme, Youssef, Layth... A Maya Sfeir : merci pour les relectures en anglais, avec beaucoup d'affection! Enfin, une énorme reconnaissance à George : merci de ta fidélité, de ton amitié toujours aussi belle à n'importe quel moment, ton écoute, ton soutien, tes conseils et ton attention...Une amitié inconditionnelle.*

*Qu'il me soit enfin permis de remercier toute ma famille surtout ma parraine Lamice pour son amour et son soutien constant. A mon parrain Badoui et ma tata Layla et leurs enfants Sandoura, Machoul, Alouni et Marouni, ma deuxième famille au Liban. A ma Grand-mère dont je porte le prénom avec fierté, mille bisous. A ma tante Amal, pour ses messages pleins d'affection que je reçois quotidiennement le matin. A ma tante Norma et mon oncle Raimond et leur famille surtout mon cousin Jimmy et Giscard, pour leur support. A mes parents qui n'ont jamais cessé de me faire confiance et de m'encourager pour continuer mes études supérieures en France. Ce n'était pas facile au début de nous séparer, mais vous avez toujours cru en moi et maintenant j'y suis ! A toi maman, pour qui notre avenir compte tant, tu es l'étoile de ma vie qui fait briller mes jours les plus sombres, qui réchauffe mon cœur quand il fait froid, tu es l'amour à l'état brut. Je te remercie pour tout. A toi papa, pour m'avoir toujours fait confiance dans mes choix, Je suis vraiment fière de t'avoir mon père car pour moi tu es le seul bonhomme sur terre, je veux simplement te dire merci pour tout ce que tu m'as appris car c'est grâce à toi que je bats cette vie pour te laisser garder toujours tes rires et pour que tu sois fier de ta fille pour toute la vie j'espère être au niveau que tu as voulu après tous les efforts constants que tu m'as fournis pour y arriver. Et finalement, à mes deux frères Sako et Badouche, ce lien pur où nul autre n'a sa place, merci pour votre support et votre courage, je vous aime fort et je suis fière d'être votre sœur.*

*Ces remerciements ne seraient pas complets sans une pensée très spéciale pour mon copain Tony, en qui je peux avoir une confiance aveugle. Je n'ai qu'une seule chose à te dire de tout mon cœur: merci d'être toujours là pour moi malgré cette distance angoissante entre nous deux. Merci pour ton amour infini et ton soutien quotidien indéfectible et ton enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. Tu m'as toujours poussée plus haut quand je voulais baisser les bras. Je suis très reconnaissante pour ton effort pour m'aider à relever tous les défis, je souhaite que tu sois sélectionné pour poursuivre ta formation l'année prochaine en France, ça sera une occasion pour compenser le temps qu'on a perdu pendant des années et avancer sur le chemin d'une vie plus heureuse ensemble en France.*

# Abstract

Some cancer cells can use a telomerase-independent mechanism, known as alternative lengthening of telomeres (ALT), to elongate their telomeres. ALT cells present unusual characteristics: extremely long and heterogeneous telomeres that colocalize with PML bodies to form nuclear structures called ALT-associated PML Bodies (APB), and high frequency of exchange events between sisters chromatid telomere referred to as Telomeric Sister Chromatid Exchange (T-SCE). Although it is agreed that homologous recombination is the key mechanism allowing the maintenance of the telomeres of ALT cells, the molecular actors involved are not yet known. We identified new actors potentially involved in the ALT mechanism: General control non-derepressible 5 (GCN5) and P300/CBP-associated factor (PCAF). Although they represent transcription factors, they can also acetylate non-histone proteins. They are mutually exclusive subunits in SAGA-like complexes. Here, we reveal that down regulation of GCN5 and PCAF had differential effects on some phenotypic characteristics of ALT cells. While GCN5 knockdown increased T-SCE and telomere instability, PCAF knockdown decreased T-SCE, APBs formation and telomere instability. GCN5 and PCAF knockdowns had thus differential effects on ALT, up-regulating it or down-regulating it respectively. Our results suggest that in ALT cells GCN5 is present at telomeres and opposes telomere recombination and does not affect the formation of APBs, unlike PCAF which may indirectly favour them and stimulate the APB formation. Then we evaluate the mechanisms by which PCAF and GCN5 contribute to the maintenance of telomeres in ALT cells. We have proposed that the participation of these two proteins should involve regulating the turnover of the telomeric protein TRF1 via USP22, a deubiquitinase identified for the first time as a component of APBs. In addition, the interest of targeting lysine acetyl transferase activities in ALT cells to oppose the maintenance of telomeres was subsequently tested *in vitro* using inhibitors alone or combined to irradiation. We have shown that ALT cells are particularly sensitive to the inhibition of acetyltransferases activities using Anacardic Acid (AA). AA treatment recapitulates the effect of PCAF knockdown on several ALT features, suggesting that AA decreased the ALT mechanism through the inhibition of lysine transferase activity of PCAF, but not that of GCN5. Furthermore, AA specifically sensitizes human ALT cells to radiation as compared to telomerase-positive cells suggesting that

the inhibition of lysine acetyltransferases activity may be used to increase the radiotherapy efficiency against ALT cancers.

# Résumé

Certaines cellules cancéreuses peuvent utiliser un mécanisme indépendant de la télomérase, connu sous le nom ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) pour allonger leurs télomères. Les cellules ALT sont caractérisées par des télomères hétérogènes extrêmement longs et d'autres très courts voire indétectables qui co-localisent avec les corps PML pour former des structures nucléaires appelées APB (ALT-associated PML Bodies), et une fréquence élevée d'échange entre les télomères des chromatides sœurs appelées T-SCE (Telomeric Sister Chromatid Exchange). Bien qu'il soit concevable que la recombinaison homologue soit le mécanisme clé pour le maintien des télomères par la voie ALT, les acteurs moléculaires ne sont pas très bien connus. Nous avons identifié de nouveaux régulateurs potentiellement impliqués dans le mécanisme ALT: PCAF (P300/CBP-associated factor) et GCN5 (General Control Non-repressible 5), deux lysines acétyl transférases homologues. Elles représentent généralement des facteurs de transcription, cependant, elles peuvent aussi acétyler des protéines non histones. Elles sont mutuellement exclusives dans de multiples complexes y compris le complexe SAGA. Nous avons montré que l'inhibition de ces deux protéines induit des effets opposés sur le phénotype ALT. Bien que l'absence de GCN5 augmentait l'instabilité des télomères et la fréquence des T-SCE et, la sous-expression de PCAF diminuait les T-SCE, la formation des APB et l'instabilité des télomères. Nos résultats suggèrent que dans les cellules ALT GCN5 est présent au niveau de l'ADN télomérique il inhibe la recombinaison entre les télomères et n'affecte pas la formation des APB, contrairement à PCAF qui peut indirectement les favoriser et stimuler aussi la formation des APB. Ensuite, nous avons cherché les mécanismes par lesquels PCAF et GCN5 contribuent au maintien des télomères dans les cellules ALT. Nous avons proposé que la participation de ces deux protéines consiste à réguler le turnover de la protéine télomérique TRF1 via USP22, une déubiquitinase identifiée pour la première fois comme un constituant des APB. En outre, l'intérêt de cibler l'activité de ces lysines acétyl transférases dans les cellules ALT a été testé *in vitro* en utilisant des inhibiteurs seuls ou combinés à l'irradiation. Nous avons montré que les cellules ALT sont particulièrement sensibles à l'inhibition de l'activité lysine acétyl transférases par l'acide anacardique (AA). Le traitement par cette molécule récapitule l'effet de la sous-expression de PCAF sur le phénotype ALT, suggérant que l'AA défavorise le



mécanisme ALT en inhibant l'activité lysine acétyl transférase de PCAF, et non pas celle du GCN5. De plus, l'AA sensibilise spécifiquement les cellules ALT humaines à l'irradiation en comparant aux cellules télomérase-positives, prouvant que l'inhibition de l'activité des lysines acétyl transférases peut être un outil traiter les cellules ALT en augmentant l'efficacité de la radiothérapie

# Table des matières

REMERCIEMENTS .....	2
ABSTRACT .....	4
RESUME .....	6
TABLE DES MATIERES.....	8
LISTE DES ILLUSTRATIONS .....	11
LISTE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES ABREVIATIONS.....	13
AVANT-PROPOS .....	14
INTRODUCTION .....	17
<b>I. TELOMERES ET TELOMERASE .....</b>	<b>18</b>
1. <i>Historique</i> .....	18
2. <i>Composition des télomères humains</i> .....	19
2.1. La structure de l'ADN télomérique .....	19
2.1.1. La région télomérique double brin.....	20
2.1.2 L'extension 3'OH simple brin .....	21
2.1.3 La région sub-télomérique:.....	21
2.2. Les protéines télomériques .....	22
2.2.1 TRF1.....	23
2.2.2. TRF2.....	24
2.2.3. POT1 .....	25
2.2.4. TPP1 .....	26
2.2.5. TIN2 .....	26
2.2.6. RAP1 .....	27
2.2.7. Les protéines accessoires .....	28
3. <i>La conformation des télomères</i> .....	28
3.1. Structure en boucle T .....	28
3.2. Structure en G-quadruplex.....	30
4. <i>Réplication des télomères</i> .....	31
5. <i>Fonction des télomères</i> .....	33
5.1. Protection de la stabilité génomique.....	33
5.2. Contrôle de la sénescence répllicative et de l'immortalisation .....	34
6. <i>La transcription télomérique</i> .....	35
7. <i>La télomérase</i> .....	36
7.1 La télomérase humaine .....	39
7.2. Le recrutement de la télomérase au niveau des télomères .....	40
7.3. L'activité de la télomérase.....	40
7.4. La régulation et la fonction de la télomérase .....	41
<b>II. MECANISMES ALTERNATIFS A LA TELOMERASE .....</b>	<b>44</b>
1. <i>Introduction</i> .....	44
2. <i>Les cellules souches de gliome et le mécanisme ALT</i> .....	45
3. <i>Caractéristiques du phénotype ALT</i> .....	47
3.1. L'absence de la télomérase .....	47
3.2. L'hétérogénéité des télomères et la présence de variants de répétitions télomériques .....	49
3.3. Les corps APB .....	51

3.4.	L'ADN télomérique extra-chromosomique .....	53
3.4.1.	Les t-circles .....	54
3.4.2.	Les C-circles .....	54
3.5.	Les échanges télomériques .....	55
3.6.	Le complexe shelterin dans les cellules ALT .....	56
3.7	Les modifications épigénétiques dans les cellules ALT .....	58
3.7.1	Les modifications de l'ADN .....	58
3.7.2	Les modifications des histones.....	59
3.7.3	Les protéines de remodelage de la chromatine.....	60
4.	<i>Les mécanismes moléculaires d'ALT</i> .....	61
4.1	Modèle basé sur les échanges asymétriques entre chromatides sœurs (T-SCE): .....	62
4.2	Modèle basé sur la recombinaison homologue .....	63
4.3	La réponse au dommage à l'ADN.....	65
4.3.1	Stress réplicatif et le mécanisme ALT .....	65
4.3.1.1	Les modifications épigénétiques et le stress réplicatif .....	66
4.3.1.2	Récepteurs nucléaires et stress réplicatif.....	68
4.3.2	La réparation par la recombinaison homologue: .....	68
4.3.2.1	La réparation par la recombinaison homologue dans les cellules ALT.....	70
4.3.2.1.2	ALT implique des mécanismes de recombinaison intra-télomériques indépendants de rad51.....	73
4.3.2.1.3.	Les détails moléculaires de la synthèse des télomères dans les cellules ALT .....	75
5.	<i>La répression du phénotype ALT dans les cellules normales</i> .....	78
<b>III. PCAF ET GCN5</b>	.....	<b>81</b>
1.	<i>Acétylation: généralité</i> .....	81
2.	<i>PCAF et GCN5 : généralités</i> .....	82
3.	<i>Les rôles de PCAF et GCN5 dans l'oncogénèse</i> .....	86
3.1.	Rôle de PCAF/GCN5 comme inhibiteurs de l'oncogénèse.....	86
3.2.	Rôle de PCAF/GCN5 dans l'oncogénèse.....	87
4.	<i>Les lysines acétyl transférases et les télomères</i> .....	87
<b>LES OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE</b>	.....	<b>89</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION</b>	.....	<b>90</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION - I</b>	.....	<b>91</b>
I.	<i>Introduction</i> .....	91
II.	<i>Publication</i> .....	93
III.	<i>Discussion</i> .....	110
1.	Récapitulation des résultats obtenus sur l'importance de PCAF et GCN5 ainsi que les mécanismes qu'ils contrôlent dans la régulation de la voie ALT .....	110
1.1.	Impact de l'absence de PCAF ou de GCN5 sur le phénotype ALT .....	110
1.2.	Résultats complémentaires.....	111
1.3.	Le mécanisme d'Atanassov existe-t-il dans les cellules ALT ? .....	114
1.4.	Comment PCAF pourrait réguler la voie ALT ? .....	115
1.5.	Importance d'USP22 dans le mécanisme ALT .....	115
2.	La régulation du mécanisme ALT par PCAF et GCN5 dépend-elle de leur exclusion mutuelle dans le complexe SAGA ? .....	116
3.	Importance de la régulation de TRF1 par le complexe SAGA pour le mécanisme ALT .....	117
4.	D'autres protéines télomériques peuvent-elle représenter des acteurs importants pour la régulation du mécanisme ALT par le complexe SAGA ? .....	120
5.	Régulation du turnover des protéines télomériques dans les APB? .....	122
<b>RESULTATS ET DISCUSSION - II</b>	.....	<b>123</b>
I.	<i>Introduction</i> .....	123
II.	<i>Publication</i> .....	125
III.	<i>Discussion</i> .....	156

1.	Récapitulation des résultats obtenus avec l'Acide Anacardique (AA).....	156
1.1.	Les effets de l'acide anacardique sur le phénotype ALT .....	156
1.2.	L'effet radiosensibilisateur de l'acide anacardique sur les cellules ALT .....	157
1.3.	Résultats complémentaires.....	157
2.	Des pistes importantes pour comprendre le rôle de l'activité lysine acétyl transférase dans la régulation du mécanisme ALT .....	159
3.	D'autres pistes importantes pour comprendre le rôle de l'activité lysine acétyl transférase dans la radiorésistance des cellules ALT.....	161
	<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>166</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>172</b>

# Liste des illustrations

Figure 1 : Structure primaire de l'ADN télomérique situé au bout d'un chromosome métaphasique.....	19
Figure 2 : Représentation schématique du complexe shelterin.....	23
Figure 3 : (A) Représentation schématique de la structure en boucle T et D. (B) Modèle de la formation de la boucle T par TRF1 et TRF2.....	29
Figure 4 : Représentation schématique du G-quartet (A), des G-quadruplex sur l'extrémité 3' simple brin des télomères (B) et au niveau de la boucle T (C).....	31
Figure 5 : Problème de la réplication terminale. ....	32
Figure 6 : Modèle hypothétique de la sénescence répliquative et de l'immortalisation.....	35
Figure 7 : Représentation schématique de la télomérase humaine et des protéines associées.....	37
Figure 8 : Modèle de la formation de la télomérase et de son recrutement au niveau des télomères .....	39
Figure 9 : Les étapes d'élongation de l'ADN télomérique humain par la télomérase humaine. ....	41
Figure 10 : Modèle de repopulation de la tumeur par les GSC résistantes aux traitements.....	46
Figure 11 : L'hétérogénéité des télomères dans les cellules ALT .....	50
Figure 12 : Structure et formation des APBs dans les cellules ALT.....	53
Figure 13 : Détection des T-SCE par la technique de CO-FISH .....	55
Figure 14 : Deux modèles d'élongation des télomères par le mécanisme ALT .....	63
Figure 15 : Les autres modèles de recombinaison télomérique dans les cellules ALT.....	64
Figure 16 : Modèles pour la réparation des cassures double brin d'ADN par la Recombinaison homologue. ....	69
Figure 17 : Modèle hypothétique pour l'activité de recombinaison inter-télomérique mediée par la voie de BIR au niveau des télomères des cellules ALT .....	73
Figure 18 : Modèle hypothétique pour l'activité de recombinaison intra-télomérique mediée par la voie de BIR au niveau des télomères des cellules ALT .....	74
Figure 19 : Réplication conservatrice de l'ADN au niveau des télomères des cellules humaines ALT.....	76
Figure 20 : Les événements moléculaires pour l'établissement du mécanisme ALT .....	80
Figure 21 : La régulation de l'expression des gènes en changeant la conformation de la chromatine par .... des enzymes modifiant les histones.....	82
Figure 22 : Structure des protéines GCN5 et PCAF.....	83
Figure 23 : Représentation schématique des complexes SAGA et ATAC .....	85
Figure 24 : Un modèle proposé pour le rôle de GCN5 et USP22 dans le turnover de TRF1 .....	88
Figure 25 : Deux modèles proposés pour la formation des APB induite par la sumoylation de TRF1. ....	118
Figure 26 : Modèle proposé pour la régulation du mécanisme ALT par PCAF et GCN5 .....	120
Figure 27 : Représentation schématique des différentes voies qui peuvent être régulées par l'activité lysine acétyl transférase de PCAF .....	160
Figure 28 : Modèle complet de régulation du mécanisme ALT par les lysines acétyl transférases.....	169

# Liste des tableaux

Tableau 1: Diversité et conservation des séquences télomériques entre les organismes.....	20
Tableau 2: Comparaison entre les sous-unités TERT et TR.....	38
Tableau 3: Les états de protection des télomères des cellules ALT par le complexe shelterin ....	57

# Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ALT	Alternative Lengthening of Telomeres
AA	Anacardic Acid
APB	ALT-associated PML Bodies
ARN	Acide Ribonucléique
ATRX	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked
AT	Acetyl Transferase
BIR	Break Induced Replication
BRCA1	Breast Cancer 1
CDB	Cassure Double Brin
CoA	Coenzyme A
CO-FISH	Chromosome Orientation-FISH
CSG	Cellule Souche de gliome
DAXX	Death domain-associated protein 6
DDR	DNA Damage Response
ECTR	Extrachromosomal Telomeric Repeats
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
G4	G-quadruplexe
GBM	Glioblastoma Multiform
GCN5	General Control Nonderepressible 5
HAT	Histone Acetyl Transferase
HDAC	Histone Deacetylase
Hop2	Histone Deacetylase
KAT	Lysine acétyl transférase
MRN	MRE11/RAD50/NBS1
NHEJ	Non-Homologous End Joining
PCAF	P300/CBP-associated Factor
PML	Promyelocytic leukemia protein
POLD3	DNA polymerase delta subunit 3
RH	Recombinaison Homologue
RPA	Replication Protein A
SAGA	Spt-Ada-Gcn5 Acetyltransferase
T-SCE	Telomere Sister Chromatid Exchange
TERC	Telomerase RNA Component
TERRA	Telomere Repeat-containing RNA
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TIF	Telomere dysfunction-induced Foci
TMZ	Témozolomide
USP22	Ubiquitin Specific Peptidase 22

# Avant-propos

La majorité des cellules cancéreuses activent la télomérase pour contrecarrer l'érosion de leurs télomères à chaque division cellulaire. Il s'agit d'une étape essentielle dans le processus d'oncogenèse leur permettant de proliférer indéfiniment en s'affranchissant totalement des limites imposées par le raccourcissement des télomères à la plupart des cellules somatiques normales. Cependant, 5 à 15 % des cancers utilisent un autre mécanisme, nommé ALT (Alternative lengthening of telomeres). Ce mécanisme n'est pas encore bien élucidé. Il est retrouvé notamment dans 25% des gliomes, des tumeurs cérébrales particulièrement résistantes aux traitements conventionnels. La caractérisation du mécanisme ALT pourrait donc permettre le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques spécifiques visant ce mécanisme de maintenance des télomères. Notre équipe a identifié le premier modèle de cellules de gliome ALT, les cellules TG20. La caractérisation de ce modèle a orienté les recherches de notre équipe sur le rôle de deux lysines acétyl transférases homologues PCAF et GCN5 dans la régulation du mécanisme ALT.

Ma thèse s'articule autour de deux objectifs principaux. Dans un premier temps, je me suis intéressée à comprendre comment PCAF et GCN5 contribuaient au maintien des télomères dans les cellules ALT. Nous avons montré que PCAF favorisait le mécanisme ALT, alors que GCN5, son homologue, induisait l'effet opposé. Ces travaux ont permis la publication d'un article dans Oncotarget dont je suis co-premier auteur. Dans un second temps, j'ai cherché à déterminer les effets de l'inhibition des lysines acétyl-transférase par l'acide anacardique, afin d'une part de mieux caractériser les rôles respectifs de PCAF et de GCN5 dans le mécanisme ALT et, d'autre part, de déterminer si leur ciblage pouvait constituer une nouvelle permettre le développement de nouvelles stratégies de traitement des tumeurs utilisant ce type de mécanisme de maintenance des télomères. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un manuscrit actuellement en révision à Oncotarget et dont je suis premier auteur.

Ce manuscrit débute par une introduction qui regroupe des généralités relatives aux télomères, à leurs mécanismes de maintenance et tout particulièrement à l'état des connaissances actuelles sur le mécanisme ALT, ainsi qu'aux lysines acétyl transférase. Puis j'ai présenté les



objectifs, les résultats constitués des deux articles, suivi de leurs discussions respectives. Après une discussion générale des résultats, le manuscrit s'achève par une conclusion rassemblant les principaux résultats et hypothèses soulevées par ce travail.



# **Introduction**

# I. Télomères et télomérase

## 1. Historique

C'est dans les années 1930 qu'Hermann Muller et Barbara McClintock évoquent l'existence de structures particulières aux bouts des chromosomes linéaires nommées télomères du grec τέλος, télos (« fin ») et μέρος, meros (« partie »). Ces auteurs définirent le télomère comme une extrémité naturelle susceptible de protéger les chromosomes d'éventuelles fusions de leurs extrémités (McClintock, 1939, Muller et al, 1938).

Une vingtaine d'années plus tard, Leonard Hayflick montra qu'une cellule normale est « programmée » pour se diviser un nombre limité de fois avant de mourir. Une fois cette limite atteinte, les cellules présentaient des signes de sénescence (Hayflick, 1965).

Dans les années 1970, le biologiste soviétique Alekseï Olovnikov a mis en évidence la relation entre la longueur des télomères et le vieillissement. Il montra que les télomères agissent comme une horloge biologique réglant la durée de vie des cellules. En effet, lors de chaque division cellulaire, les télomères s'érodent jusqu'à atteindre une taille critique qui déclenche un arrêt de prolifération et une entrée en sénescence de la cellule. Cette théorie est connue sous le nom de «sénescence réplivative» (Olovnikov, 1973). Olovnikov évoqua pour la première fois le "problème de la réplication terminale" ou "End replication problem". En 1972, Watson décrit le problème de la réplication terminale: les télomères sont sujets à un raccourcissement à cause de la réplication incomplète des extrémités, qui serait due à l'incapacité du complexe enzymatique de l'ADN polymérase de synthétiser l'extrémité de molécules d'ADN linéaire (Watson, 1972).

A la fin des années soixante-dix, les études menées chez le protozoaire cilié, *Tetrahymena thermophila* et chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont permis de déterminer la séquence des télomères, il s'agit de répétitions de séquences nucléotidiques en tandem (Blackburn and Gall, 1978, Yao et al., 1981, Szostak and Blackburn, 1982). C'est en 1985 que l'équipe d'E. Blackburn identifie une enzyme appelée télomérase chez le protozoaire cilié, *Tetrahymena thermophila*. Ce travail est récompensé par le prix Nobel de physiologie ou

médecine en 2009. La télomérase est une réverse transcriptase ribonucléoprotéique, exprimée préférentiellement dans les cellules tumorales. Elle est capable d'allonger les télomères assurant ainsi leur stabilité au cours des divisions cellulaires successives (Greider and Blackburn, 1985). Toutefois, les études de Bryan et ses collègues ont montré l'existence d'un mécanisme de maintenance de télomères, alternatif à la télomérase, nommé ALT (Alternative Lengthening of Telomeres), et basé sur des recombinaisons entre les télomères (Bryan et al., 1997).

## 2. Composition des télomères humains

Les télomères forment des structures nucléoprotéiques particulières, situées aux extrémités des chromosomes linéaires. Ils empêchent ces dernières d'être reconnues comme des sites de dommage à l'ADN et aident aussi à maintenir l'intégrité génomique (Karlseder et al., 1999, Denchi and Lange, 2007, Takai et al., 2011, van Steensel et al., 1998). Ils sont constitués d'ADN télomérique et de protéines associées.

### 2.1. La structure de l'ADN télomérique

L'ADN télomérique humain est composé de trois régions : la région double brin formée de répétitions de nucléotides en tandem, la région double brin sub-télomérique contenant des séquences moyennement répétées et une extension 3'OH sous forme de simple brin (Figure 1).

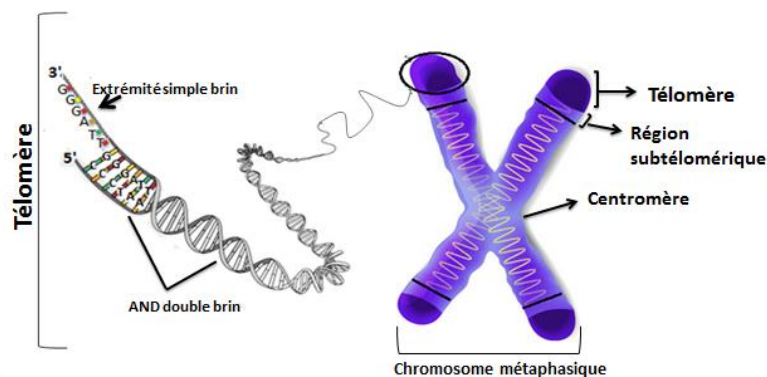


Figure 1 : Structure primaire de l'ADN télomérique situé au bout d'un chromosome métaphasique

### 2.1.1. La région télomérique double brin

Cette région contient des séquences répétitives d'ADN non codantes formant un motif qui varie d'une espèce à une autre et qui possède le plus souvent plusieurs bases guanines sur le brin d'ADN allant du centromère en 5' vers l'extrémité du chromosome en 3'. Les premières identifications de motifs télomériques, TTGGGG, ont été réalisées chez les organismes ciliés *Tetrahymena* (Blackburn and Gall, 1978). Chez la plupart des mammifères les télomères sont formés de répétitions de séquence TTAGGG, d'autres séquences télomériques ont été identifiées chez les protozoaires, les levures et les végétaux (Tableau 1). Le séquençage de l'ADN télomérique chez les différentes espèces montre une grande conservation de séquences télomériques entre les espèces, ce qui prouve leur importance fonctionnelle (Moyzis et al., 1988, Blackburn et al., 2006, Allshire et al., 1988, Meyne et al., 1989). Cependant, la longueur des télomères peut varier de quelques dizaines de nucléotides à plusieurs dizaines de milliers de nucléotides selon l'organisme (Tableau 1), voir même au sein d'une population cellulaire où elle présente une hétérogénéité liée au mode d'élongation (voir ci-après).

Organisme		Nature de répétitions	Longueur des télomères	Références
<b>Protozoaire</b>	<i>Tetrahymena thermophila</i>	GGGGTT	Macronoyau: 250 à 350 pb Micronoyau: >2.5 pb	(Blackburn and Gall, 1978) (Larson et al., 1987) (Kirk and Blackburn, 1995)
<b>Levure</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T6 2-3(TG)1-6	300 pb ± 75	(Walmsley et al., 1983) (Shampay et al., 1984)
<b>Nématode</b>	<i>Caenorhabditis Elegans</i>	TTAGGC	4 à 5 KB	(Wicky et al., 1996)
<b>Plantes</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	TTTAGGG	2-9 kb	(Richards et al., 1992) (Shakirov and Shippen, 2004)
<b>Vertébrés</b>	Zebrafish	TTAGGG	6 à 16 KB	(Imamura et al., 2008) (Henriques et al., 2013)
	<i>Mus musculus</i> (souris grise)	TTAGGG	Jusqu'à 150 kb	(Kipling and Cooke, 1990) (Kim et al., 2003)
	<i>Homo Sapiens</i> (homme)	TTAGGG	A la naissance 10 à 15 kb	(Morin, 1989) (Moyzis et al., 1988) (Lejnine et al., 1995) (Palm and Lange, 2008a)

**Tableau 1 : Diversité et conservation des séquences télomériques entre les organismes**

### **2.1.2 L'extension 3'OH simple brin**

L'ADN des télomères est constitué de séquences répétitives qui se terminent par une extension simple brin riche en G, qui elle-même dépasse le brin riche en C, créant un « overhang » connu sous le nom de « G-tail » (Henderson and Blackburn, 1989, Wellinger et al., 1993). Chez les mammifères ces extensions ont une longueur qui varie de 30 à 500 nucléotides et qui augmente en fin de phase S/G2 (Makarov et al., 1997, McElligott and Wellinger, 1997, Chai et al., 2006, Dai et al., 2010). En plus de son implication dans la formation de la boucle t ou des G quadruplex (voir ci- après), le G-overhang semble réguler l'activité de la télomérase en servant de substrat pour l'élongation des télomères médiée par cette enzyme (Bonetti et al., 2009, Dionne and Wellinger, 1998). De plus, le G-overhang est un site de liaison pour des protéines qui ont une affinité pour l'ADN simple brin jouant un rôle déterminant dans la protection des télomères (voir ci- après).

### **2.1.3 La région sub-téломérique:**

Les séquences sub-téломériques humaines sont des régions du génome formant une transition entre une séquence spécifique du chromosome et les courtes répétitions téломérique coiffant son extrémité. Ils représentent des zones de 10 à 300 kb et ils sont présents chez la plupart des chromosomes. Bien que de petits motifs puissent être répétés localement, la même séquence est rarement, voire jamais, utilisée plus d'une fois dans un sub- téломère donné (Mefford and Trask, 2002). Ces régions sub-téломériques sont très hétérogènes entre les différentes extrémités des chromosomes, de même qu'entre les espèces, conférant ainsi une variabilité génétique (Ijdo et al., 1992, Mefford and Trask, 2002).

Les structures sub-téломériques chez l'homme sont organisées en domaine proximal proche des centromères et un domaine distal juxtaposé aux séquences téломériques, les deux domaines sont séparés par un ensemble de répétitions téломériques TTAGGG (Flint et al., 1997). La conservation de ces dernières décroît en allant de la partie distale vers la partie proximale (Allshire et al., 1989). Des analyses comparatives des sub-téломères chez levure ont

révéle une structure commune, dans laquelle la présence de deux classes d'éléments sub-téломériques a été si bien distinguée : les éléments Y en partie distale et les éléments X plus centromériques, séparés par des séquences télomériques répétitives TTAGGG et des éléments ARS (Autonomously replicating sequence) (Flint et al., 1997, Pryde and Louis, 1997).

La nature complexe et variable des sub-téломères entre les espèces a rendu difficile l'évaluation des fonctions possibles de ces régions. Cependant plusieurs chercheurs ont essayé d'explorer le rôle biologique en se basant sur l'expression de certains gènes présents dans ces régions. En effet, les sous-téломères de *S. cerevisiae* contiennent des membres de plusieurs familles de gènes, tel que SUC ( $\beta$ -fructofuranosidase), MAL ( $\alpha$ -glucosidase/maltose permease), MEL ( $\alpha$ -galactosidase) qui fonctionnent dans l'utilisation de différentes sources de carbone (Carlson and Botstein, 1983, Carlson et al., 1985, Charron and Michels, 1988, Turakainen et al., 1993). La présence de plusieurs membres de la famille du gène OR (olfactory receptor) a également été repérée dans les régions sub-téломériques des chromosomes humains (Trask et al., 1998). D'autre part, les études génomiques ont révélé que les sous-téломères humains sont sujets à des taux élevés de recombinaison méiotique, d'échange de chromatides sœurs et de transfert d'ADN (Lynn et al., 2000, Linardopoulou et al., 2005, Rudd et al., 2007, Luo et al., 2011). Par ailleurs, les réarrangements sub-téломériques incontrôlés représentent une cause importante de certaines maladies chez l'homme tel que des retards mentaux inexplicés, le glaucome congénital et le retard de croissance (Shao et al., 2008, Wu et al., 2010, Tos et al., 2013, Nakane et al., 2013).

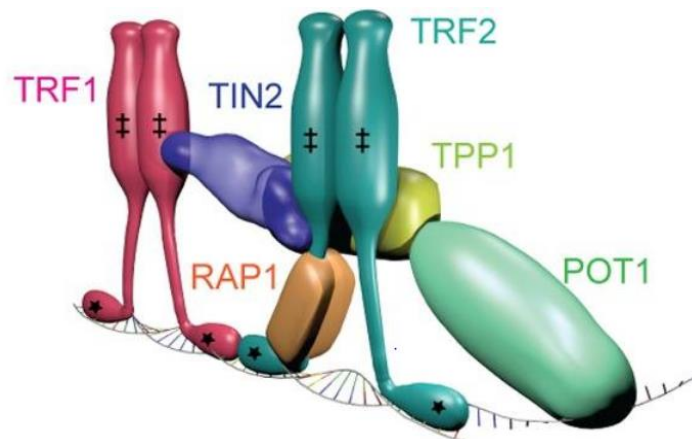
## **2.2. Les protéines télomériques**

Le télosome, nommé shelterin, est un complexe d'environ 1 MDa formé de six protéines spécifique dont trois reconnaissent spécifiquement les répétitions télomériques TTAGGG : TRF1 et TRF2 (Telomeric Repeat binding Factor 1 et 2) en se liant à la partie double brin télomérique et POT1 (Protection Of Telomeres 1) en s'associant à l'extension simple brin de l'extrémité 3'. Les autres protéines du télosome, TIN2 (TRF2- and TRF1-Interacting Nuclearprotein 2), Rap1 (Repressor Activator Protein 1), et TPP1 jouent le rôle d'adaptateurs



entre TRF1, TRF2 et POT1 (de Lange, 2005) (Figure 2). Des études suggèrent que le télosome forme un complexe stable dans des extraits nucléaires en l'absence d'ADN télomérique (Ye et al., 2004, Liu et al., 2004).

Le complexe shelterin remplit les fonctions principales dans la protection et la régulation de la longueur des télomères. En effet, il protège les extrémités naturelles chromosomiques en empêchant qu'elles soient reconnues comme des cassures doubles brin par la machinerie de réparation et en stabilisant la boucle T (de Lange, 2005). Le télosome régule de même la taille des télomères en contrôlant le recrutement de la télomérase (Smogorzewska and de Lange, 2004, Chen et al., 2007). L'inhibition de la fonction de ses composants, soit par des ARN interférences soit par la surexpression de dominants négatifs, déstabiliserait les télomères ce qui déclencherait par la suite une réponse de dommage à l'ADN (Palm and Lange, 2008, Takai et al., 2011, Diotti and Loayza, 2011).



**Figure 2 : Représentation schématique du complexe shelterin.** (Bandaria et al., 2016)

### 2.2.1 TRF1

TRF1 a été la première protéine télomérique identifiée chez les mammifères (Zhong et al., 1992, (Chong et al., 1995). TRF1 est un gène essentiel puisque son absence est létale chez l'embryon (Iwano et al., 2004, Karlseder et al., 2003). Il s'agit d'une protéine de 56 kDa contenant un domaine acide N-terminal, un domaine d'homodimérisation TRFH (TRFH), une

région de liaison flexible et un domaine Myb C-terminal de liaison à l'ADN (Broccoli et al., 1997, Fairall et al., 2001). La stabilité, la localisation et l'affinité de liaison à l'ADN de TRF1 sont régulées par diverses modifications post-traductionnelles, y compris la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation et la PARsylation (Walker and Zhu, 2012). La protéine TRF1 remplit plusieurs fonctions dans la cellule : la protection des télomères et la régulation de leur longueur et leur réplication. TRF1 est un important facteur dans la protection des télomères ; en absence de TRF1 les cellules montrent des niveaux élevés de fusions télomériques (Iwano et al., 2004, Martínez et al., 2009, McKerlie and Zhu, 2011, Sfeir et al., 2009), il joue un rôle dans la signalisation dans la réponse aux dommages de l'ADN (Sun et al., 2017, Yang et al., 2017). TRF1 est impliqué principalement dans la réplication des répétitions télomériques TTAGGG en recrutant les hélicases BLM et RTEL1 aux fourches de réplication (Sfeir et al., 2009, Zimmermann et al., 2014). TRF1 est bien connue pour son rôle de régulateur négatif de la longueur des télomères en limitant l'accès de la télomérase aux télomères (Ancelin et al., 2002, Smogorzewska and de Lange, 2004, Smogorzewska et al., 2000, van Steensel and de Lange, 1997). En effet, la surexpression de TRF1 dans les cellules télomérase positives entraîne une perte progressive de la longueur des télomères, alors que les mêmes cellules exprimant un dominant négatif de TRF1 montrent une augmentation progressive de la longueur des télomères (Smogorzewska et al. 2000, van Steensel et de Lange, 1997).

### 2.2.2. TRF2

TRF2 présente des similarités structurales avec TRF1, étant capable de s'homodimeriser *via* son domaine TRFH pour se lier à l'ADN télomérique double brin grâce au domaine C terminal myb, sauf que TRF2 montre quatre fois moins d'affinité pour les télomères que TRF1 (Bilaud et al., 1997, Broccoli et al., 1997, Fairall et al., 2001, Hanaoka et al., 2005). TRF1 et TRF2 diffèrent dans leur domaine N-terminal, qui est riche en résidus acides Glu et Asp pour TRF1, et en résidus basiques Gly et Arg pour TRF2 (Hanaoka et al., 2005, Mitchell et al., 2009). Comme TRF1, TRF2 régule négativement la taille télomères. En effet, la surexpression de TRF2 diminue la longueur des télomères, et inversement, sa sous-expression provoque une élévation télomérique (Smogorzewska et al., 2000, Takai et al., 2010). TRF2 est une protéine

clé dans le maintien de l'intégrité des télomères. La perte de TRF2 entraîne une déprotection des télomères et déclenche l'activation de la voie de signalisation d'ATM (Ataxia Telangiectasia Muté) (Karlseder et al., 1999, Celli and de Lange, 2005, Denchi and de Lange, 2007) ou l'induction des fusions chromosomiques médiées par la voie classique de NHEJ (Smogorzewska et al., 2002, Ribes-Zamora et al., 2013). TRF2 protège les télomères qu'ils soient reconnus comme des cassures double brins par la machinerie de réparation du dommage à l'ADN en modifiant leur structure en configuration de boucle en T (Sfeir et al., 2009, Doksan et al., 2013). La formation de cette boucle est favorisée *in vitro* par la capacité de TRF2 à contrôler la topologie de l'ADN télomérique en l'enveloppant autour de son domaine TRFH et à empêcher la dégradation de l'extrémité 3' simple brin responsable de la création de cette boucle (Stansel et al., 2001, Zhu et al., 2003, Benarroch-Popivker et al., 2016). En 2016, Bandaria et ses collaborateurs ont proposé un modèle dans lequel la perte de TRF2 et d'autres protéines du complexe shelterin conduirait à une décompaction jusqu'à 10 fois de la chromatine télomérique, rendant les télomères accessibles aux facteurs de la réponse aux dommages à l'ADN (Bandaria et al., 2016). Cette étude s'opposait à d'autres plus récentes où les chercheurs suggèrent que la compaction de la chromatine ne soit pas un mécanisme primaire par lequel le complexe shelterin protège les télomères de la réponse aux dommages à l'ADN (Timashev et al., 2017, Vancevska et al., 2017).

### **2.2.3. POT1**

La protéine POT1 humaine a été identifiée par homologie de séquence avec la protéine POT1 de *Schizosaccharomyes pombe* (Baumann and Cech, 2001). POT1 est capable de se lier spécifiquement à l'ADN simple brin avec son domaine OB N terminal et à la protéine TPP1 via sa partie C-terminale (Chen et al., 2017). L'interaction de POT1 avec TPP1 améliore de 10 fois sa capacité de liaison aux télomères et les protège contre les fusions et l'induction de réponses aux dommages à l'ADN (Hockemeyer et al., 2007). POT1 est nécessaire pour le control de la séquence précise aux extrémités 5' des chromosomes humains. La délétion de POT1 induit une diminution de la quantité d'ADN télomérique monocaténaire et une perte du motif 3'ATC-5' de l'extrémité télomérique 5' indispensable pour l'élongation du simple brin (Hockemeyer et al.

2005). POT1 peut réguler positivement ou négativement la longueur des télomères. En effet, en fonction de sa position par rapport à l'extrémité 3' des télomères, POT1 inhibe ou pas l'accès de la télomérase à l'ADN télomérique (Lei et al., 2005). POT1 favorise également l'activité de la télomérase en déstabilisant les structures G-quadruplexes télomériques (Zaug et al., 2005). POT1 joue un rôle important dans la répression de la voie de réponse aux dommages à l'ADN médiée par ATR en empêchant la liaison de RPA, détecteur de la voie de réparation par ATR, à l'ADN monocaténaire télomérique (Denchi and de Lange, 2007). D'autre part, POT1 maintient l'intégrité des télomères en renforçant la formation de la boucle en T inhibant par la suite les évènements de recombinaison homologue ou de NHEJ (Hockemeyer et al. 2005).

#### **2.2.4. TPP1**

La TPP1 est connue auparavant sous les noms de TINT1, PTOP et PIP1 puisqu'elle a été découverte par trois groupes différents (Houghtaling et al., 2004, Liu et al., 2004, Ye et al., 2004). TPP1 n'a pas un domaine de liaison à l'ADN, mais relie POT1 à TIN2 (Abreu et al., 2010, Takai et al., 2011). TPP1 joue un rôle majeur dans le recrutement de la télomérase au niveau de l'ADN télomérique grâce à son domaine OB (nommé TEL-patch) et la régulation de son activité en formant un hétérodimère avec POT1 (Abreu et al., 2010, Nandakumar and Cech, 2013, Wang and Lei, 2011). Des cellules délétées pour le domaine Tel-patch montrent un raccourcissement de la longueur des télomères dû à la diminution du recrutement de la télomérase au niveau des télomères (Kocak et al., 2014). L'interaction entre TPP1 et POT1 est également importante pour la protection et le maintien des télomères en favorisant le recrutement de POT1 au niveau de l'ADN télomérique (Liu et al., 2004, Kibe et al., 2010, Ye et al., 2004).

#### **2.2.5. TIN2**

La protéine TIN2 (TRF1-Interacting Nuclear Protein 2) est la composante principale du télosome, elle sert de pont entre TRF1 et TRF2 assurant l'interaction avec l'hétérodimère TPP1-

POT1(Houghtaling et al., 2004). TIN2 est un important stabilisateur de TRF2 au niveau des télomères. Les cellules déficientes en TIN2 montrent une activation de la voie de signalisation ATM, un phénotype accompagné avec la perte de TRF2 (Takai et al., 2011). Bien que TRF1 soit stabilisé sur les télomères par TIN2, sa fonction est indépendante de son association avec TIN2 (Takai et al., 2011). TIN2 protège TRF1 contre la PARsylation médiée par la tankyrase empêchant par la suite sa dégradation (Frescas and de Lange, 2014). L'interaction TIN2-TPP1 est nécessaire pour localiser l'hétérodimère POT1-TPP1 au niveau des télomères et les protéger en empêchant l'activation de la voie de signalisation des dommages aux télomères médiée par ATR et la réparation médiée par NHEJ (Hu et al., 2017). Un certain nombre de mutations dans le gène TIN2 ont été identifiées dans la dyskératose congénitale, un syndrome héréditaire rare d'insuffisance de la moelle osseuse. Les patients porteurs de cette mutation possèdent des télomères extrêmement courts et présentent une sévérité accrue de la maladie (Frescas and de Lange, 2014)

### **2.2.6. RAP1**

Identifiée par double hybride d'interactants de TRF2, RAP1 est le composant du complexe shelterin le plus hautement conservé de la levure aux mammifères (Chen et al., 2011). Bien que la protéine RAP1 contienne un domaine Myb dans la partie centrale, elle n'a pas la capacité de se lier à l'ADN (Hanaoka et al., 2001). Dans les cellules de fibrosarcome humain HTC75, l'inhibition endogène de Rap1 en utilisant des siARNs induisait une élongation des télomères (O'Connor et al., 2004), de même la surexpression de plusieurs mutants de Rap1 a révélé que les télomères ont tendance à être plus longs (Li and de Lange, 2003). Cependant, une autre étude a remis en question le rôle du Rap1 dans le contrôle de la longueur des télomères dans les cellules de mammifères (Kabir et al., 2014). Ces résultats nécessitent plus de recherche pour essayer de comprendre l'implication de Rap1 dans la régulation de la longueur des télomères chez les mammifères. D'autre part, le complexe TRF2-Rap1 joue un rôle critique et important dans la protection des télomères contre les recombinaisons homologues chez les mammifères. En effet des cellules déficientes en Rap1 et ayant TRF2 mutée pour son domaine de liaison à Rap1 montraient des fusions télomériques qui sont déclenchées suite à l'activation

de protéines impliquées dans les recombinaisons homologues tel que le complexe MRN, Rad51, Exo1 et PARP1 (Rai et al., 2016).

### **2.2.7. Les protéines accessoires**

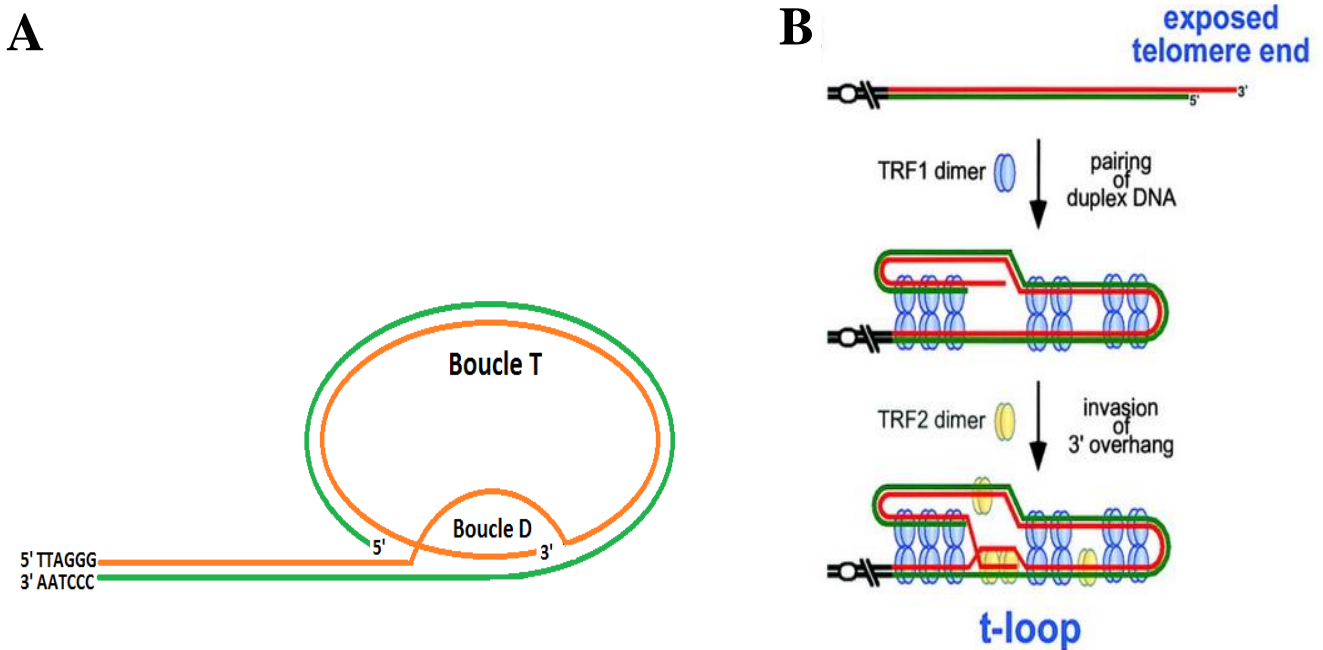
Les composants du complexe shelterin sont présents au niveau des télomères tout au long du cycle cellulaire. Ils peuvent exercer leur rôle au niveau des télomères en s'associant directement aux répétitions TTAGGG ou bien en recrutant transitoirement des facteurs accessoires. Ces derniers s'associent à des sous-unités spécifiques de ce complexe. En effet, les Tankyrase 1 et 2 (TANK1 / 2), deux poly (ADP-ribose) polymérases (PARP) interagissent avec TRF1 (Cook et al., 2002). Les tankyrases pourraient également participer à la réparation et / ou à la signalisation de du dommage à l'ADN au niveau des télomères (Dregalla et al., 2010, (Yang et al., 2017). Plusieurs autres protéines de réparation de l'ADN ont également été trouvées au niveau des télomères telles que les DNA-PK qui en plus de leur rôle dans la réparation de l'ADN peuvent également participer avec TRF2 dans la maintenance des télomères (Bailey et al., 2001), de même, le complexe RAD50, MRE11 et NBS1 (RMN), un autre complexe important de réparation de l'ADN, s'associe aux télomères en interagissant probablement avec TRF1 et TRF2 (Zhu et al., 2000, Wu et al., 2000). TRF2 interagit également avec l'hélicase WRN, la protéine qui semblerait diminuer les recombinaisons homologues entre les chromatides sœurs télomériques (T-SCE) (Laud et al., 2005, Opresko et al., 2002).

## **3. La conformation des télomères**

### **3.1. Structure en boucle T**

Cette configuration est formée lorsque l'extension 3' simple brin riche en G envahit la partie duplexe de l'ADN télomérique pour créer une sorte de boucle télomérique appelée boucle

en T (Griffith et al., 1999). La partie triple brin résultante est nommée boucle D ou D-loop (Displacement-loop) (Figure 3A). Des études de microscopie électronique sur des télomères artificiels générés *in vitro*, ont permis de visualiser pour la première fois la structure t-loop dont la taille peut varier entre 1Kb jusqu'à 15kb (Griffith et al., 1999, Stansel et al., 2001). En 1999, Griffith et ses collaborateurs ont proposé un rôle synergique de TRF1 et TRF2, deux protéines télomériques, dans la formation de la boucle en T (Figure 3B). D'après ce modèle, TRF1 stimule le repliement de l'ADN télomérique double brin sur lui-même favorisant l'invasion de l'extrémité 3' par TRF2 générant par la suite la boucle T (Griffith et al., 1999). D'autres études ont confirmé plus tard ce modèle et ont montré que TRF2 est le facteur majoritaire dans le maintien et la formation de cette boucle en T (Doksani et al., 2013, de Lange, 2005). Séquestrer l'extrémité du chromosome dans une boucle en T est censé fournir une barrière physique contre les machines de réparation des dommages à l'ADN qui, en absence de cette boucle vont reconnaître les télomères comme des cassures double brin (Doksani et al., 2013, de Lange, 2004).



**Figure 3 : (A) Représentation schématique de la structure en boucle T et D. (B) Modèle de la formation de la boucle T par TRF1 et TRF2 (Griffith et al., 1999).**

### 3.2. Structure en G-quadruplex

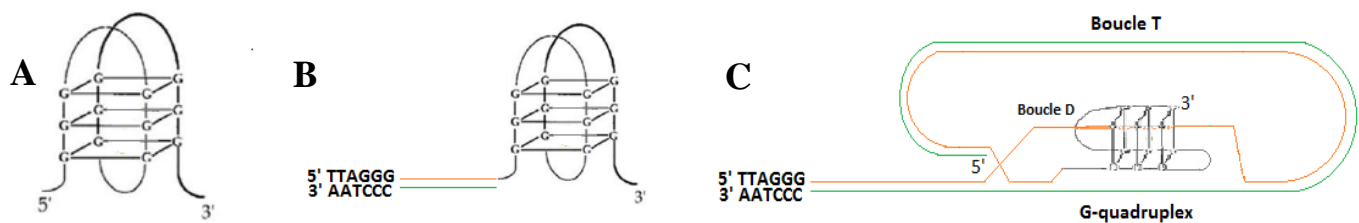
L'ADN existe principalement sous la forme d'une double hélice. Cependant, il peut également adopter d'autres conformations structurales secondaires telles que la structure en G quadruplex. Cette structure repose sur des interactions de type Hoogsteen formant un plateau de quatre résidus de guanine (G), également appelé «G-quartet» (Figure 4A). Chez l'homme, l'extension simple brin riche en G peut se replier sur lui-même et l'empilement des G-quartet stabilisant la structure à quatre brins constitue le G-quadruplex évoqué pour la première fois vers la fin des années 80s (Sen and Gilbert, 1988, Sundquist and Klug, 1989, Henderson et al., 1987) (Figure 4B). Biffi et ses collaborateurs ont utilisé un anticorps spécifique qui reconnaît le G-quadruplex et ils ont détecté ces structures en G au niveau des télomères et dans tout le génome humain (Biffi et al., 2013). Dans les G quadruplex les paires de guanines peuvent s'assembler sur des molécules d'ADN différentes pour former un G-quadruplex intermoléculaire ou sur le même brin d'ADN dans le cas d'un G-quadruplex intramoléculaire, et selon l'orientation des brins ils peuvent adopter une structure antiparallèle, parallèle ou hybride (Víglaský et al., 2010, Phan and Patel, 2003).

Les G-quadruplex ont le potentiel de jouer des rôles critiques dans plusieurs processus biologiques et surtout au niveau des télomères. Ils protègent l'ADN télomérique en favorisant la formation de la boucle T (Figure 4C). En effet, en 2007, Xu et ses collaborateurs ont mis en évidence un modèle dans lequel le G-quadruplex pourrait stimuler la formation de la boucle T et maintenir sa stabilité en favorisant l'invasion de l'extrémité 3' simple brin dans la région duplexe de l'ADN télomérique (Xu et al., 2007). En plus, la présence de G-quadruplex contrôle l'homéostasie des télomères en stimulant ou pas l'activité de la télomérase. Par exemple, chez *Oxytricha nova* et d'autres ciliés, ces structures régulent négativement la longueur des télomères en empêchant l'accès de la télomérase (Zahler et al., 1991, Oganessian et al., 2006), il en est de même chez l'homme où ces quadruplex sont déstabilisés par certaines protéines tel que la protéine télomérique POT1 afin de restaurer l'activité de la télomérase (Zaug et al., 2005). Cependant, il a été montré que des structures en G semblent stimuler l'activité de la télomérase et par la suite l'élongation des télomères chez les ciliés ainsi que chez l'homme (Oganessian et al., 2006, Moye et al., 2015). Cette différence de rôle biologique peut être expliquée du fait que



les G-quadruplex peuvent exister sous la forme de conformations bien distinctes qui leur permettent d'interagir différemment avec la télomérase et influencer par la suite son activité : les structures en G antiparallèles intramoléculaires bloquent l'activité de la télomérase, alors que les structures parallèles intermoléculaires ont tendance à stimuler son action.

Les données présentées ci-dessus fournissent des preuves que les structures en G occupent une fonction importante au niveau des télomères. Des ligands stabilisants ou perturbants ces structures ont été développés en tant qu'agents thérapeutiques anticancéreux (Neidle, 2010, Rezler et al., 2005, Qin et al., 2017, Yadav et al., 2017).

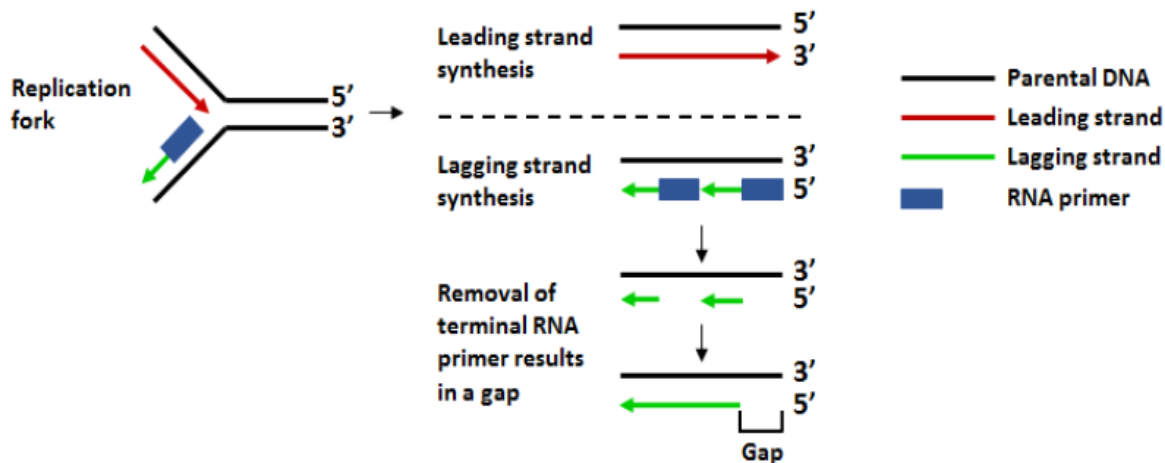


**Figure 4 : Représentation schématique du G-quartet (A), des G-quadruplex sur l'extrémité 3' simple brin des télomères (B) et au niveau de la boucle T (C).**

## 4. Réplication des télomères

La plupart des cellules somatiques humaines sont limitées à un certain nombre de divisions avant qu'elles entrent en sénescence, un processus de vieillissement biologique caractérisé par des changements morphologiques et métaboliques irréversibles (Dimri et al., 1995). Ce potentiel limité de divisions (la limite de Hayflick) est dû à un raccourcissement des télomères en raison d'une répllication incomplète des molécules d'ADN télomériques par les ADN polymérases classiques (Hayflick, 1965). Ce problème de répllication fut évoqué pour la première fois par Olovnikov en 1971, il était connu par le "problème de la répllication terminale" ou "End replication problem".

La réplication des télomères est semi-conservatrice, elle débute durant la phase S et pourrait s'achever en fin de la phase S, voire début de phase G2. Les deux brins complémentaires se séparent et chacun d'eux sert de matrice pour la synthèse d'un nouveau brin complémentaire. L'ADN polymérase progresse en direction 5' → 3' et a besoin d'une amorce, un petit morceau d'ARN, et d'un groupe 3'OH libre pour initier la synthèse. La réplication n'est pas identique sur les deux brins du fait qu'ils présentent des polarités inversées (Olovnikov, 1973). En effet, celle du brin précoce (3' → 5') ou leading strand riche en C est continue et complète. Cependant, le deuxième brin retardé ou lagging strand (5' → 3') riche en G est synthétisé en petits fragments discontinus de nucléotides appelés fragments d'Okazaki (Figure 5). A la fin de la réplication, les amorces d'ARN sont dégradées et remplacées par des fragments d'ADN ajoutés par l'ADN polymérase, qui seront ensuite liés par une ligase. Une exception se produit pour la dernière amorce d'ARN du brin retardé, qui ne peut pas être comblée en raison de l'incapacité de la polymérase à répliquer l'extrémité 3' du brin d'ADN parental (Figure 5).



**Figure 5 : Problème de la réplication terminale.** Les télomères raccourcissent en raison de la réplication incomplète de l'ADN. Une petite partie distale du brin retardé est perdue après chaque division cellulaire.

En conséquence, la molécule d'ADN néo-synthétisée à partir du brin retardé sera plus courte que le brin parental. Cette réplication incomplète génère deux produits : celui issu du brin

retardé ayant une extension 3' riche en G et l'autre issu du brin précoce se terminant par une extrémité franche. Finalement, la résection du brin riche en C est indispensable pour générer l'extrémité 3' OH simple brin au niveau du brin précoce, elle est assurée par l'action de certaines nucléases tel que Apollo/SNM1B et Exo1 (Wu et al., 2012, Lam et al., 2010). Chez certaines cellules, l'enzyme télomérase rajoute des répétitions télomériques, via l'extrémité 3' simple brin, pour compenser la perte des séquences durant la réplication de l'ADN (Osterhage and Friedman, 2009).

D'autre part, des obstacles tel que les conformations de type t-loop ou G quadruplex peuvent interférer avec la progression de la fourche de réplication au niveau des télomères. En conséquence l'élimination de ces structures par certains facteurs tel que les hélicases BLM, WRN ou RTEL1 semble indispensable pour l'avancement de cette fourche (Sampathi and Chai, 2011). En effet, si ces obstacles ne sont pas résolus, la réplication des télomères sera bloquée ce qui déclenchera une activation des voies de réparation conduisant à un arrêt de la prolifération cellulaire et à une instabilité chromosomique (Sfeiret *al.*, 2009).

## **5. Fonction des télomères**

Les télomères des eucaryotes ont une fonction principale de protéger les extrémités chromosomiques contre la dégradation de l'ADN, le mécanisme de réparation de l'ADN et la fusion avec d'autres extrémités chromosomiques contrôlant ainsi le vieillissement et la prolifération cellulaire.

### **5.1. Protection de la stabilité génomique**

Les télomères évitent que les extrémités des chromosomes soient reconnues comme des cassures doubles brin par les systèmes de détection empêchant l'activation des voies de signalisation et de réparation du dommage à l'ADN y compris les phénomènes de recombinaison et de fusion chromosomique. Cette fonction est facilitée grâce à une structure

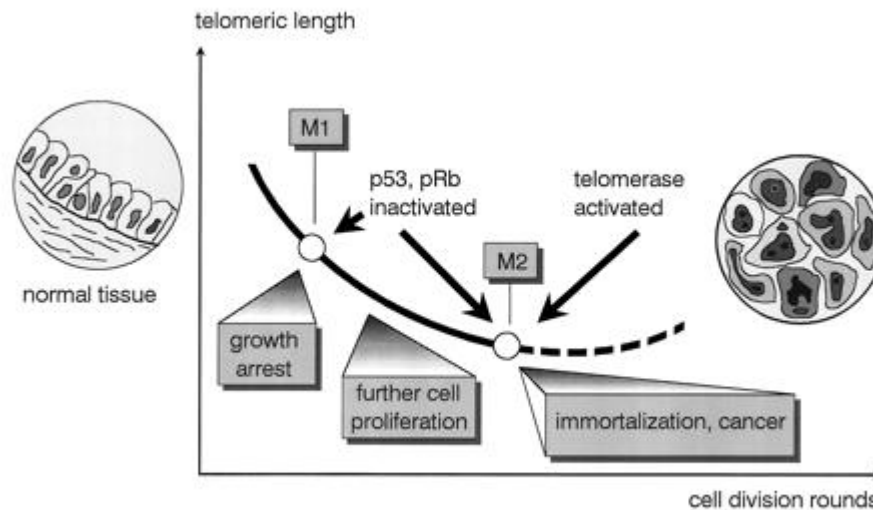
“coiffante” (“*capping structure*”) constituée par l’ADN télomérique et des nombreuses protéines associées et grâce à des structures secondaires adoptées par les télomères (Zakian, 1995, Donate and Blasco, 2011, Blackburn, 2001, Griffith et al., 1999). En plus, les télomères protègent le matériel génétique contre la dégradation enzymatique par des nucléases (Zakian, 1995, Donate and Blasco, 2011). Grâce à cette fonction majeure de protection, les télomères maintiennent la stabilité chromosomique et génomique.

## 5.2. Contrôle de la sénescence réplivative et de l’immortalisation

La longueur des télomères sert d’horloge biologique intrinsèque qui régule le nombre de divisions que la cellule peut effectuer (Harley, 1991), c’est-à-dire après chaque division cellulaire les télomères se raccourcissent, ils atteignent une taille courte à partir de laquelle, ils seront reconnus comme des sites endommagés, ce qui déclenchera une sénescence réplivative de la cellule. Il s’agit d’une première barrière proliférative M1 (Mortality stage 1) (Figure 6). Cet arrêt de prolifération après un certain nombre de divisions cellulaires est connu par la limite de Hayflick. Les cellules sénescents sont métaboliquement actives, mais incapables de proliférer. Cependant l’inactivation de certaines protéines de contrôle du cycle cellulaire, telles que p53 et Rb (retinoblastoma protein) peut prolonger leur potentiel de réplication et provoquer des érosions télomériques plus graves où les télomères atteignent une taille critique conduisant à la phase de la crise (Shay et al., 1991). C’est la deuxième barrière proliférative M2 (Mortality stage 2) caractérisée par une instabilité chromosomique suivie par une apoptose massive (Figure 6). Cependant, au cours d’un processus d’oncogenèse, quelques cellules acquièrent la capacité d’allonger leurs télomères, soit par réactivation de la télomérase (la voie majeure), soit par la voie ALT (alternative lengthening of telomeres), une voie moins fréquente, elles surmontent la crise et deviennent des cellules immortalisées ayant une capacité de prolifération indéfinie (Figure 6).

Outre les rôles cités ci-dessus, les télomères jouent un rôle dans la ségrégation des chromosomes au moment de la mitose et de la méiose et ils participent dans l’organisation et la répartition des chromosomes dans le noyau (Pandita et al., 2007); et d’autre part, un rôle dans la

répression de l'expression de gènes dans les régions sub-téломériques (Donate and Blasco, 2011).



**Figure 6 : Modèle hypothétique de la sénescence répllicative et de l'immortalisation.** Modèle hypothétique de la sénescence répllicative et de l'immortalisation. Le raccourcissement progressif de la longueur des télomères conduit à la sénescence répllicative (le premier arrêt du cycle cellulaire, également appelé M1 (Mortality stage 1) et ensuite à la crise (la deuxième barrière proliférative M2 (Mortality stage 2)). Les cellules subissent alors l'apoptose ou deviennent immortelles (Dahse et al., 1997).

## 6. La transcription télomérique

Malgré la structure hétérochromatique des télomères et l'absence de gènes à ce niveau, c'est en 2007, qu'Azzalin et ses collaborateurs ont mis en évidence pour la première fois la transcription des télomères. En particulier, le brin C télomérique est transcrit par l'ARN polymérase II, donnant naissance à des molécules d'ARN non codantes connues sous le nom de TERRA. La transcription de TERRA débute dans les régions subtelomériques et continue vers les extrémités du chromosome. (Schoeftner and Blasco, 2008, Azzalin et al., 2007). Des analyses de Northern blot ont montré que les molécules TERRA sont très hétérogènes en taille allant de 100 nucléotides jusqu'à 9 kb dans les cellules de mammifères, elles sont formées de

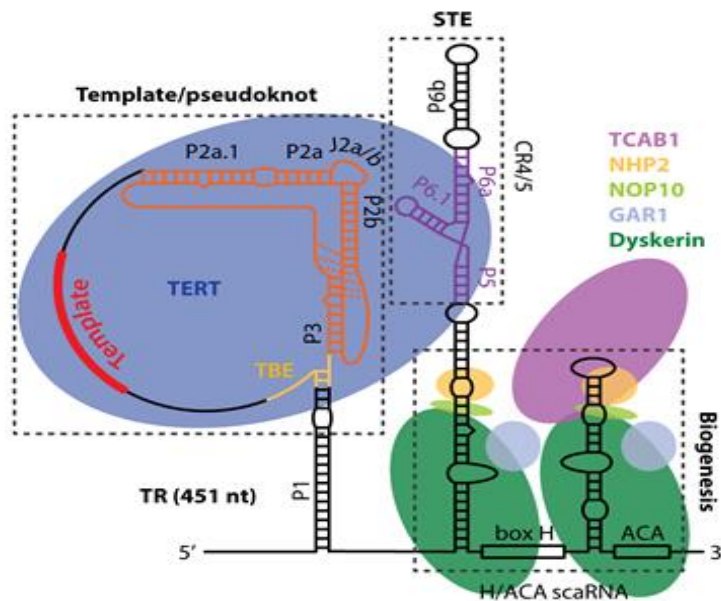
séquences dérivées de régions subtelomériques ainsi que des répétitions télomériques riches en G. Les molécules TERRA sont principalement localisées dans le noyau sous la forme de deux sous-populations bien distinctes: (1) une fraction nucléoplasmique non associée à la chromatine et (2) une fraction liée à la chromatine (Porro et al., 2010). 7% des transcrits TERRA sont polyadénylés à leur extrémité 3', ils présentent une demi-vie plus longue (8 h), par rapport aux transcrits non polyadénylés (3h) et sont majoritairement situés au niveau du nucléoplasme. Dans les cellules humaines, le niveau d'expression de TERRA est régulé en fonction des phases du cycle cellulaire, il atteint son pic en phase G1, diminue progressivement par la suite pour atteindre son niveau le plus bas à la fin de la phase S / G2 (Porro et al., 2010). Il a été montré que les ARNs TERRA s'associent à différentes protéines liées aux télomères dont les composants shelterin TRF1 et TRF2 et les différents membres de la famille des ribonucléoprotéines nucléaires (hnRNPs) (Deng et al., 2009, Silanes et al., 2010, Scheibe et al., 2013). Ces protéines semblent jouer un rôle actif dans la localisation de TERRA et son recrutement au niveau des télomères. La formation d'hybrides ADN / ARN peut également jouer un rôle dans le recrutement et la stabilisation de TERRA au niveau des télomères. En effet, il a été montré que ces ARNs forment des structures en G-quadruplex in vitro grâce à leur extrémité 3' télomérique riche en G (Xu et al., 2008), Martadinata and Phan, 2009, Randall and Griffith, 2009). La formation in vivo d'hybrides télomériques ARN-ADN ou boucles R retardent la sénescence en favorisant la recombinaison homologue au niveau des télomères en l'absence de la télomérase, suggérant un rôle potentiel de TERRA dans la maintenance des télomères (Balk et al., 2013).

## **7. La télomérase**

La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique responsable de l'addition de la séquence répétée de nucléotides spécifique aux télomères (TTAGGG). La télomérase a été découverte en 1985 par Elizabeth Blackburn et Carol Greider chez la *Tetrahymena thermophila* (Greider and Blackburn, 1985). Quelques années plus tard, Morin et ses collaborateurs ont mis en évidence l'activité télomérase humaine dans les cellules tumorales HeLa (Morin,

1989), puis elle a été évoquée dans des leucocytes issus de personnes saines et de patients atteints de leucémie (Broccoli et al., 1995).

La télomérase est composée de deux parties principales: la sous-unité catalytique TERT (Telomerase Reverse Transcriptase), une ADN polymérase dépendante de l'ARN, et la sous-unité ARN TR (Telomerase RNA) (Tableau 2). Outre ces deux composants essentiels, la télomérase est constituée de protéines associées qui sont impliquées dans l'assemblage du complexe ribonucléoprotéique, sa localisation dans les corps de Cajal (CB), son transport vers les télomères et la régulation de son activité (Theimer and Feigon, 2006, Chan et al., 2017) (figure 7). Il s'agit de la dyskerine, NHP2 (H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 2), NOP10 (Nucleolar Protein 10), TCAB1 (Telomerase and Cajal body protein 1), GAR1 (Glycine-and arginine-rich domain protein 1), reptine et pontine (Figure 7). Le composant accessoire le mieux caractérisé est la protéine dyskerine. Cette dernière forme un complexe central avec trois protéines plus petites NHP2, NOP10 et GAR1 (Kiss et al., 2010). La dyskerine se lie au motif H/ACA (Hairpin-hinge-hairpin-ACA) de la sous unité catalytique et elle est indispensable pour la stabilité de cette dernière et pour l'activité de la télomérase.



**Figure 7 : Représentation schématique de la télomérase humaine et des protéines associées** (Chan et al., 2017).

	TR	TERT
<b>Conservation ou variabilité des domaines entre les espèces</b>	<p>-conservation de la sous-unité TERC formé d'une séquence matrice (<i>template</i>) et de trois domaines essentiels au cours de l'évolution (1)</p> <p>-variabilité dans la longueur et la séquence qui est formée de 451 nucléotides chez l'homme (1)</p>	<p>-conservation de la sous-unité TERT formée de quatre domaines au cours de l'évolution (2)</p>
<b>Les différents domaines et leur fonction</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- la <b>matrice</b> complémentaire des séquences télomériques (<i>template</i>) et le domaine <b>pseudo-noeud</b>, formant le cœur catalytique ou le domaine <i>template/pseudoknot</i> encore nommé <b>core</b> (1)</li> <li>- le domaine <b>CR4-CR5</b> ou <b>STE</b> (stem terminus element) qui avec le cœur catalytique sont indispensables pour la liaison avec la sous-unité TERT et ainsi pour l'activité de la télomérase (1)</li> <li>- le domaine <b>H/ACA</b> nommé <i>biogenesis element</i> situé à l'extrémité 3'est impliqué dans la stabilité de l'ARN et sa localisation nucléaire et dans la liaison avec les protéines accessoires (1)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- le domaine N-terminal <b>TEN</b> joue un rôle clé dans le recrutement de la télomérase au niveau des télomères (2)</li> <li>- le domaine <b>TRBD</b> (TR-binding domain) est responsable de la formation stable du complexe ribonucléoprotéique (2)</li> <li>- le domaine <b>RT</b> (reverse transcriptase) et le domaine C terminal <b>CTE</b> (C-terminal extension) catalysent l'addition de séquences répétées spécifique sur l'extrémité 3'(2)</li> </ul>
<b>L'expression dans les cellules</b>	<p>- exprimée dans la plupart des tissus (3)</p>	<p>- est généralement réprimée dans les cellules normales et surexprimée dans les cellules immortelles (3)</p>

**Tableau 2: Comparaison entre les sous-unités TERT et TR.**

(1) : Chen et al., 2000, Theimer and Feigon, 2006, Chan et al., 2017

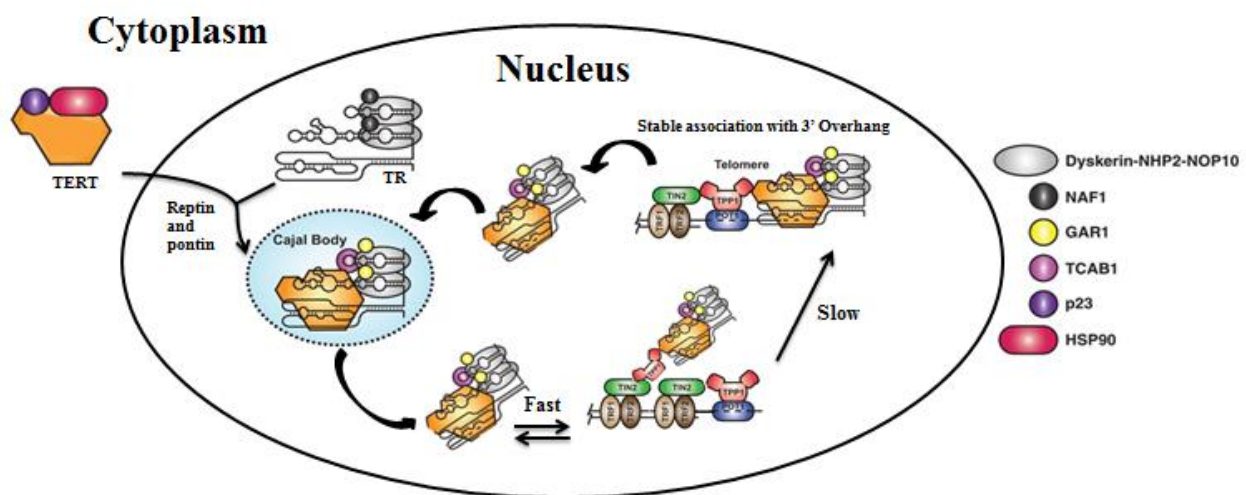
(2) : Blackburn and Collins, 2011, Collins, 2006. Chan et al., 2017

(3): Meyerson et al., 1997, Harrington et al., 1997, Nakamura et al., 1997



## 7.1 La télomérase humaine

La télomérase humaine active contient les composants TR et TERT et deux complexes dyskérine-NHP2-NOP10-GAR1 (Figure 7). La formation de ce complexe ribonucléoprotéique est un processus à plusieurs étapes qui nécessite des cofacteurs supplémentaires. La biogenèse de l'holoenzyme débute avec l'assemblage d'un transcrite TR grâce à son motif H / ACA avec le complexe de dyskérine, NHP2, NOP10 et NAF1 (Nuclear Assembly Factor 1 ribonucleoprotein) (Hockemeyer and Collins, 2015). Après cette association, TR subit une maturation de l'extrémité 5' et 3' accompagnée de l'échange de NAF1 par GAR1, générant ainsi une sous-unité stable. D'autre part, la sous-unité TERT est synthétisée dans le cytoplasme et s'associe aux protéines chaperonnes HSP90 et p23 (Schmidt et Cech, 2015), elle se lie ensuite aux deux domaines indépendants de TR, générant ainsi un complexe catalytiquement actif. Cette liaison est facilitée par les ATPases pontine et reptine qui interagissent également avec la dyskérine et sont nécessaires à la stabilité du TR in vivo (Venteicher et al., 2008). Une fois ce complexe formé, la pontine et la reptine se dissocient libérant la forme active de l'enzyme. TCAB1, se lie par la suite à TR et régule le transport de la télomérase vers les corps de cajal (CB) (Venteicher et al., 2009) (Figure 8).



**Figure 8 : Modèle de la formation de la télomérase et de son recrutement au niveau des télomères**  
(Inspiré de Schmidt et Cech, 2015, Schmidt et al., 2016)

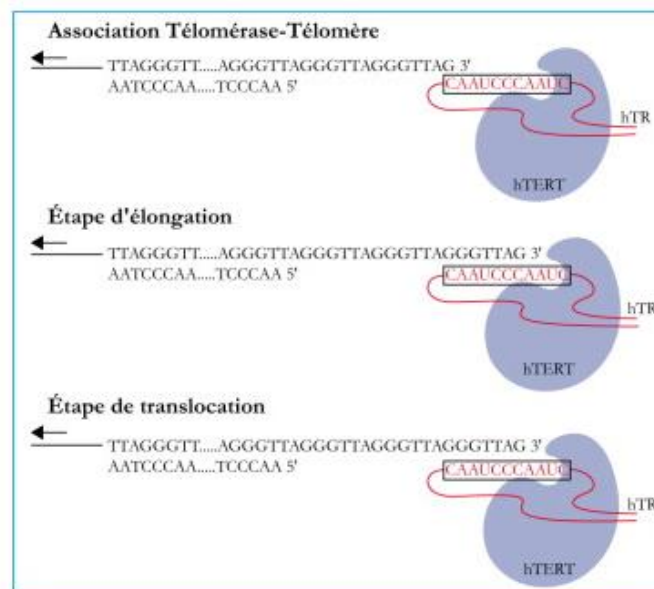
## **7.2. Le recrutement de la télomérase au niveau des télomères**

Les protéines du complexe shelterin jouent un rôle dans la régulation du recrutement de la télomérase. Les protéines ayant une affinité de liaison à l'ADN simple brin peuvent séquestrer l'extrémité 3' télomérique rendant l'ADN inaccessible à la télomérase (Stansel et al., 2001). Cependant, certaines sont nécessaires pour recruter la télomérase au niveau des télomères et stimuler ainsi son activité. La télomérase se retrouve au niveau des corps de Cajal pendant la majorité du cycle cellulaire (Jády et al., 2006, Tomlinson et al., 2006, Xi et al., 2015). En phase S, elle est recrutée au niveau des télomères grâce à l'interaction du domaine TEN de TERT avec le patch TEL de la protéine shelterin TPP1 (Schmidt and Cech, 2015). Si un de ces deux domaines est muté, la télomérase se concentre dans les corps de Cajal et pas au niveau des télomères, et l'élongation des télomères sera ainsi bloquée (Nandakumar et al., 2012, Zhong et al., 2012, Schmidt et al., 2014). Il a également été proposé que les télomères se rapprochent des corps de Cajal pour faciliter le recrutement de la télomérase vers l'ADN télomérique (Jády et al., 2006). D'autre part, la télomérase forme des interactions dynamiques de courte durée avec les télomères ciblant des milliers de fois chaque extrémité du chromosome au cours de la phase S. Rares sont les interactions dynamiques qui sont converties en interactions statiques de durées suffisamment longues pour permettre l'élongation des télomères (Schmidt et al., 2016). Bien que l'association de la télomérase avec TPP1 soit nécessaire pour la formation des deux types d'interactions, l'appariement de bases de la sous-unité TR avec l'extension 3' semble indispensable pour la formation que des interactions statiques (Schmidt et al., 2016, Schmidt et al., 2017). Finalement, des études récentes ont mis en évidence l'importance de la processivité de la télomérase, le nombre de répétitions que la télomérase ajoute après un seul événement d'association, dans l'élongation des télomères et par la suite dans leur maintien *in vitro* ainsi qu'*in vivo* (Schmidt et al., 2017, Wu et al., 2017).

## **7.3. L'activité de la télomérase**

L'élongation du télomère par la télomérase est un processus qui se déroule en trois étapes majeures: étape d'association télomères-télomérase, étape d'élongation et l'étape de

translocation (Sabatier et al., 2006) (Figure 9). Au cours de la phase S du cycle cellulaire, après qu'une fourche de réplication déroule la chromatine de l'extrémité 3' télomérique, une partie de la matrice ARN de la sous-unité TR s'apparie à une séquence télomérique de l'extension 3'. Ensuite, la télomérase grâce à son domaine catalytique est capable d'ajouter des nucléotides par transcription inverse de la matrice ARN créant ainsi une répétition d'ADN télomérique au niveau de l'extrémité 3' simple brin. Une fois la transcription de la séquence matrice ARN est achevée, la télomérase est transposée permettant un autre cycle de synthèse. Des cycles de synthèse successifs sont à la base de la formation de plusieurs répétitions en tandem ce qui permet d'allonger l'extrémité 3' riche en G. Dans la dernière étape, la télomérase est libérée de l'extrémité 3', et le complexe CST (CTC1-STN1-TEN1) achève la synthèse du brin complémentaire riche en C (Wang et al., 2012).



**Figure 9 :** Les étapes d'élongation de l'ADN télomérique humain par la télomérase humaine (Sabatier *et al.*, 2006).

#### 7.4. La régulation et la fonction de la télomérase

Chez l'homme, la télomérase est exprimée pendant les premières semaines de l'embryogenèse ensuite elle est réprimée dans la plupart des cellules somatiques (Hug and

Lingner, 2006) à l'exception des cellules souches adultes, les lignées germinales et les cellules ayant un grand potentiel de prolifération tels que les cellules précurseurs hématopoïétiques et les lymphocytes activés (Yasumoto et al., 1996, Wright et al., 1996). Dans la plupart des cellules somatiques, les télomères se raccourcissent progressivement à chaque division cellulaire, jusqu'à atteindre une taille critique qui induit la sénescence ou la mort cellulaire. L'érosion des télomères évite ainsi la formation de tumeurs en limitant le potentiel de réplication des cellules (Hug et Lingner, 2006). Toutefois, la grande majorité des cellules cancéreuses réactivent la télomérase pour contrecarrer cette érosion et acquérir un potentiel de prolifération indéfini (Kim et al., 1994). Plus précisément, l'activité de la télomérase est bloquée dans la plupart des tissus avant la naissance en raison d'une répression transcriptionnelle de la sous-unité catalytique TERT dont l'expression augmente dans à peu près 90% des cellules cancéreuses. La sous-unité TR étant fortement exprimée dans la majorité des tissus, la régulation transcriptionnelle de TERT paraît un facteur limitant important de l'activité de la télomérase dans les cellules humaines (Cong et al., 2002, Takakura et al., 1998)

L'identification d'abondants éléments régulateurs du promoteur TERT, des facteurs de transcription ainsi que des voies différentes impliquées dans la régulation de la télomérase suggère que l'activité de cette dernière est soumise à plusieurs niveaux de contrôle. En plus, les modifications post-traductionnelles de TERT, l'assemblage d'une holoenzyme fonctionnelle et son accès à ses substrats augmentent la complexité de la régulation de la télomérase. Il a été montré que le complexe shelterin représente un facteur clé dans le contrôle de l'activité de la télomérase aux niveaux des télomères. En effet, TPP1 recrute la télomérase au niveau de l'ADN télomérique et la formation de l'hétérodimère POT1-TPP1 améliore la processivité de l'enzyme (Nandakumar et Cech, 2013). Toutefois, les protéines TRF1, TRF2 et TIN2 établissent une boucle de rétroaction négative limitant l'addition de nucléotides par la télomérase (Smogorzewska et de Lange, 2004, Ye and de Lange, 2004). D'autre part, les transcrits TERRA représentent un autre régulateur négatif de l'élongation des télomères par la télomérase. Etant donné que l'extrémité 3 de TERRA est complémentaire de la séquence de la matrice ARN de la télomérase, cette dernière s'associe aux transcrits TERRA ce qui bloque son action au niveau des télomères (Redon et al., 2010). Il a été avéré que le statut épigénétique de la chromatine au niveau des télomères peut moduler l'accès de la télomérase aux extrémités des

chromosomes, modifiant ainsi l'extension des télomères (Benetti et al., 2007). Contrairement aux télomères des levures dépourvus d'histones (Wright et al., 1992), les télomères des mammifères sont organisés en nucléosomes. Les nucléosomes humains sont enrichis en modifications épigénétiques telles que la triméthylation de H3K9 et H4K20 et ils interagissent fortement avec la protéine HP1 (Heterochromatin protein 1) (Martínez and Blasco, 2015). Ces marques d'hétérochromatines sur les télomères affectent sa conformation structurelle vers un état plus "fermé" qui limite l'accès de la télomérase aux extrémités des chromosomes. Enfin, des conformations spécifiques de l'ADN télomérique, telles que les boucles en T et les G-quadruplex, pourraient également empêcher l'accès de la télomérase aux niveau de l'ADN télomérique (Doksani et al., 2013, Zaug et al., 2005).

La télomérase contrecarre l'érosion des télomères et fournit un potentiel de prolifération illimité aux cellules conduisant à leur immortalisation (Shay and Bacchetti, 1997). En plus de son rôle dans l'élongation des télomères, la sous-unité catalytique TERT est impliquée dans divers fonctions non télomériques dans le noyau ainsi que dans le cytoplasme et les mitochondries conduisant au développement et la progression du cancer (Li and Tergaonkar, 2014). Ces activités non télomériques influencent divers processus cellulaires essentiels, tels que les voies de signalisation, la fonction mitochondriale, le métabolisme ainsi que la survie cellulaire (Saretzki, 2014). Il a été montré que l'interaction de la télomérase avec des voies de signalisation intracellulaires telles que les voies NF-KB et WNT / B-caténine contribuent à l'inflammation, la transition épithéliale à mésenchymateuse (EMT) et l'invasion du cancer. En outre, dans les mitochondries, TERT diminue la production de ROS, améliore la respiration, se lie à l'ADN mitochondrial et le protéger contre les dommages à l'ADN. Toutes ces différentes fonctions aboutissent à la tumorigenèse, et augmentent la résistance des cellules cancéreuses contre les traitements génotoxiques en favorisant la survie cellulaire.

## **II. Mécanismes alternatifs à la télomérase**

### **1. Introduction**

En absence de la télomérase, les télomères raccourcissent à chaque division cellulaire jusqu'à atteindre une taille critique qui déclenche alors une entrée en sénescence de la cellule. Par conséquent, le développement du cancer est associé à un système actif de maintenance des télomères qui fournit un potentiel indéfini de prolifération conduisant à l'immortalisation des cellules. Bien que la réactivation de la télomérase soit le mécanisme le plus commun de l'allongement des télomères dans les cancers, 10 -15% des tumeurs utilisent une voie de maintenance des télomères indépendante de la télomérase, connue par ALT (Bryan et al., 1997).

Le mécanisme ALT a été initialement observé chez des levures présentant une mutation des gènes codants pour les sous-unités de la télomérase. En effet, la majorité des mutants meurent après une érosion progressive des télomères alors que certaines survivent grâce à leur capacité à activer un mécanisme de maintenance des télomères indépendant de la télomérase mais plutôt basé sur la recombinaison homologue (Lundblad and Blackburn, 1993). Cette étude a été validée également chez la levure par l'équipe de Nakamura qui a mis en évidence deux types de survivants pouvant échapper à la sénescence : le premier en circularisant ses chromosomes et le deuxième en maintenant ses télomères par la recombinaison homologue (Nakamura et al., 1998).

D'autre part, l'existence du mécanisme ALT a été également montrée chez certaines cellules de mammifères (Bryan et al., 1995, Bryan et al., 1997). Ce mécanisme fait intervenir des événements de recombinaison entre les télomères en utilisant des protéines impliquées dans la recombinaison homologue ainsi que dans la réparation des cassures d'ADN double brin (Dunham et al., 2000, McEachern and Blackburn, 1996). Chez l'Homme, le phénotype ALT n'a

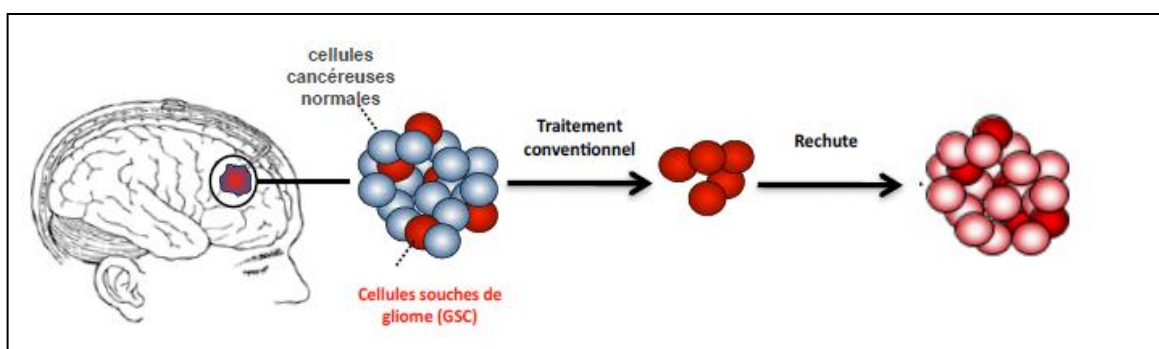
été détecté que dans un contexte physiologique anormale surtout dans les lignées cellulaires tumorales et dans les lignées immortalisées par le virus SV40 (Bryan et al., 1997). Ce mécanisme est activé dans les cancers d'origine neuroépithéliale de manière majoritaire dans les gliomes de type astrocytome, et d'origine mésenchymateuse y compris les sarcomes des tissus mous et les ostéosarcomes (Henson et al., 2005, Darefsky et al., 2012). Le pronostic des tumeurs ALT varie avec le type cellulaire et il est plus favorable en comparaison avec les tumeurs non ALT (Muntoni and Reddel, 2005, Hakin-Smith et al., 2003).

## **2. Les cellules souches de gliome et le mécanisme ALT**

Les gliomes sont des tumeurs primaires du système nerveux central touchant les cellules gliales formées des astrocytes, des oligodendrocytes et des épendymocytes. L'organisation mondiale de la Santé (OMS) a classé les gliomes selon les données histologiques en différents degrés de malignités croissantes (I, II, III et IV) (Louis et al., 2007). Le glioblastome multiforme (GBM), le cancer au pronostic le plus dramatique parmi les gliomes, est classé comme astrocytome de grade IV. Les glioblastomes sont des tumeurs localisées le plus souvent au niveau des hémisphères cérébraux, dans la matière blanche. Elles représentent des lésions volumineuses, profondes et infiltrantes. Un glioblastome peut se développer de novo (glioblastome primaire), ou à partir d'un astrocytome de bas grade (glioblastome secondaire). Bien que les glioblastomes primaires et secondaires ne puissent généralement être distingués du point de vue histologique, ils présentent des altérations génétiques bien spécifiques telles que, par exemple, les mutations IDH1/2 (mutation du gène de l'enzyme isocitrate déshydrogénase) qui sont reconnues comme des marqueurs moléculaires souvent des glioblastomes secondaires (Ohgaki and Kleihues, 2013, Cambruzzi and Cambruzzi, 2017).

Le traitement conventionnel associe la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie (Brandes et al., 2008, Stupp et al., 2005, Davis, 2016), malgré les progrès ces dernières années ces traitements ne permettent que de rallonger de quelques mois la survie des patients. Dans ces tumeurs, une population très minoritaire de cellules tumorales a été identifiée, il s'agit de

cellules souches de gliome (CSG). Ces dernières présentent un phénotype analogue aux cellules souches neurales normales, du fait de leur expression de marqueurs de cellules souches neurales (Stopschinski et al., 2013), leur capacité de se différencier en neurones ou en cellules gliales (Ignatova et al., 2002), ainsi que leur capacité de former des neurosphères in vitro qui une fois injectés dans les souris immunodéprimées peuvent régénérer les tumeurs (Singh et al., 2004, Bao et al., 2006). Elles seraient ainsi responsables en grande partie des rechutes observés chez les patients traités par les thérapies conventionnelles (Chen et al., 2012, Bao et al., 2006) (Figure 10).



**Figure 10 : Modèle de repopulation de la tumeur par les GSC résistantes aux traitements**  
 Les cellules souches de gliome (CSG) présentent une résistance aux traitements conventionnels, leur permettant de régénérer une tumeur. Une destruction efficace de la tumeur nécessiterait donc une thérapie ciblant ces CSG.

Le mécanisme ALT est détecté dans 30% des patients atteints de glioblastomes (Henson and Reddel, 2010). Il est majoritairement retrouvé dans les gliomes de type astrocytome caractérisés souvent par des mutations d'ATRX et d>IDH1/2, ce qui explique la fréquence élevée de l'activité ALT dans les glioblastomes secondaires (Henson et al., 2005, Hakin-Smith et al., 2003, McDonald et al., 2010, Mur et al., 2015, Fogli et al., 2017). Avec l'équipe du Professeur Hervé Chneiweiss du laboratoire de plasticité gliale (INSERM, Paris), notre laboratoire a identifié le premier modèle de cellules souches de gliome humain ALT nommées TG20 (Silvestre et al., 2011). D'autres modèles de cellules de gliome ALT, telles que les cellules JHH-GBM14, ont été établis plus tard (Heaphy et al., 2013). Ces cellules ont servi de modèle cellulaire ou préclinique de gliome ALT pour essayer de comprendre le rôle de ce mécanisme de maintenance des télomères dans la prolifération et le développement des glioblastomes multiformes (Jeitany et al., 2015).



### **3. Caractéristiques du phénotype ALT**

Il existe plusieurs caractéristiques principales des cellules ALT qui les distinguent des cellules télomérase-positives : une hétérogénéité de la longueur de télomères, une fréquence élevée des événements d'échange entre les télomères de chromatides sœurs (T-SCE), la présence de corps de PML associés aux télomères connus par APB et la présence des télomères extra-chromosomiques (ECTR). La majorité des cellules ALT présentent toutes ces caractéristiques et fonctionnent ainsi dans la voie canonique ALT. Bien que très rares, certaines cellules en possèdent une ou plusieurs. Cela laisse penser qu'il existe différents mécanismes de régulation du phénotype ALT (Muntoni et Reddel, 2005).

#### **3.1. L'absence de la télomérase**

Les lignées ALT sont caractérisées principalement par l'absence de la télomérase, certaines expriment hTR, mais pas hTERT, et d'autres n'expriment pas les deux composants (Bryan et al., 1997, Hoare et al., 2001, Dessain et al., 2000, Atkinson et al., 2005). La connaissance des mécanismes par lesquels la télomérase humaine est réprimée dans les cellules télomérase négative conduit à une meilleure compréhension du phénotype ALT. D'où l'importance d'examiner dans les lignées ALT l'activité catalytique de l'enzyme ainsi que l'expression de ses sous-unités TR et TERT.

L'activité de la télomérase est couramment détectée par la méthode de TRAP ("Telomeric repeat amplification protocol"), elle est régulée à plusieurs niveaux, hTERT étant souvent le facteur limitant (Liu et al., 2000). Des études ont montré que la transcription et l'épissage alternatif du transcrit hTERT sont impliqués dans la régulation de l'activité de la télomérase. Plusieurs variant d'épissage de hTERT ont été identifiés et nombreux différent dans les exons des motifs hautement conservés de la transcriptase inverse (RT), codant pour des protéines catalytiquement inactives (Kilian et al., 1997). L'activité de la télomérase corrélait souvent avec l'expression de la séquence complète du transcrit hTERT, bien que un ou plusieurs

variant d'épissage peu abondants restent souvent exprimés dans les cellules télomérase positive certains ont été identifiés comme des dominants négatifs de son activité (Zaffaroni et al., 2002, Colgin et al., 2000, Zhu et al., 2014). Toutefois, l'expression du transcrit complet de hTERT n'était pas suffisante pour déterminer l'activité de la télomérase. En effet, parmi les cellules télomérase négatives, certaines sont caractérisées par l'absence du transcrit complet de hTERT, tandis que d'autres l'expriment à un niveau nettement inférieure à celui des variant d'épissage (Zaffaroni et al., 2002). Que cette répression de l'activité de la télomérase soit dû à une diminution de l'expression du transcrit complet de hTERT ou à un effet inhibiteur actif de ces variant reste une question ouverte qui nécessite plus d'investigation pour y répondre.

D'autre part, certains variant sont exprimés à la fois dans des cellules télomérase positive ainsi que dans des lignées ALT télomérase négative et la surexpression de ces variant induit une augmentation de la prolifération cellulaire dans les deux types cellulaires. Toutefois, leur inhibition entraîne une altération du cycle cellulaire dans les lignées cellulaires ALT conduisant à une diminution de leur prolifération cellulaire, suggérant un rôle extra télomérique de ces variant qui malgré leur manque d'activité de télomérase participent dans l'induction de la croissance cellulaire surtout des lignées ALT (Hrdličková et al., 2012).

Plusieurs études se sont basées sur les modifications épigénétiques qui peuvent intervenir à différents niveaux sur la régulation des gènes TERT et TR et engendrer une répression de la télomérase. En effet, les promoteurs de ces gènes contiennent des îlots CpG qui représentent des cibles pour les ADN méthyltransférases, de sorte que la méthylation de ces régions provoquerait l'inactivation transcriptionnelle des gènes associés empêchant par la suite la liaison des facteurs de transcription. Bien qu'un certain degré de méthylation du promoteur TR soit observé dans des lignées cellulaires télomérase positives, cela n'était pas corrélé au taux d'expression du gène correspondant. Cependant, l'hyperméthylation de ce promoteur n'a été trouvée que dans des lignées ALT qui étaient les seules à montrer une absence complète de la sous-unité TR (Hoare et al., 2001). Par conséquent, il semblerait que la forte méthylation du promoteur TR soit associée à une inhibition de la transcription dans les lignées ALT alors qu'une faible méthylation n'affecte pas son niveau d'expression dans les cellules télomérase positive. Cette corrélation entre l'hyperméthylation du promoteur TR et l'absence d'expression a également été montrée au niveau du gène TERT dans certaines lignées ALT où la forte

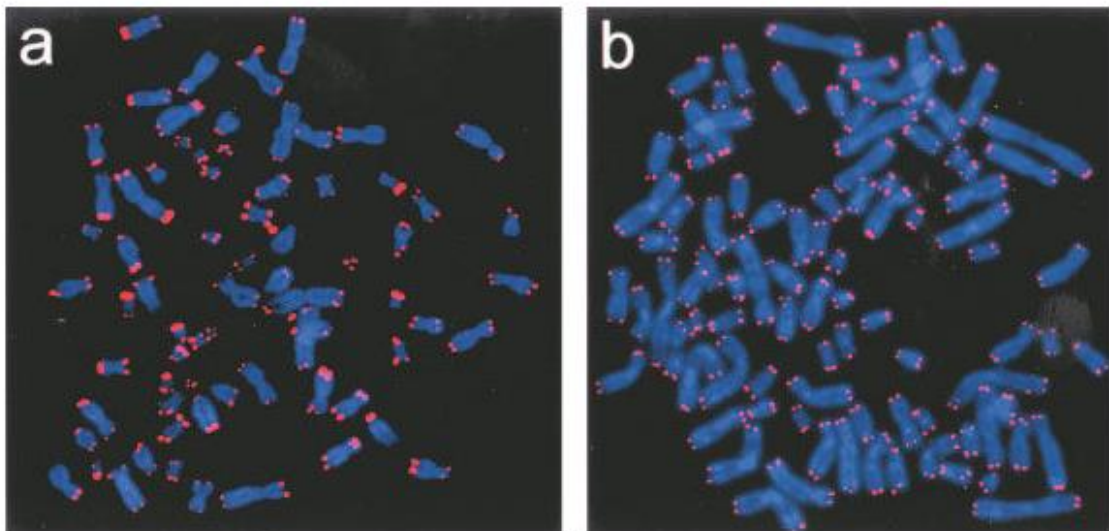
fréquence de méthylation peut toucher soit un des deux promoteurs soit les deux en même temps (Devereux et al., 1999, Dessain et al., 2000). Bien que la méthylation des promoteurs puisse influencer l'expression des gènes des sous-unités de la télomérase, la modification des histones et le remodelage de la chromatine pourraient également réguler leur expression. Les études d'Atkinson et ses collaborateurs ont montré que l'hypoacétylation des histones du promoteur hTERT ou hTR serait en partie responsable de la répression de chacune des sous unités correspondantes (Atkinson et al., 2005).

D'autre part, beaucoup de publications ont mis en évidence la présence de mutations somatiques dans les régions du promoteur du gène TERT, et dont le taux et la fréquence varient énormément entre les différents types de tumeurs malignes humaines (Liu et al., 2014, Liu et al., 2013). Ces mutations génèrent de nouveaux motifs pour la fixation de facteur de transcription ce qui augmente l'activité transcriptionnelle du gène TERT et par conséquent l'activité de la télomérase (Huang et al., 2013, Horn et al., 2013). D'une manière intéressante, des mutations du promoteur TERT sont aussi fréquentes dans les tumeurs qui utilisent le mécanisme ALT. Killela et ses collaborateurs ont montré que dans les gliomes ces mutations sont mutuellement exclusives avec celles de la protéine ATRX, mutations signature du phénotype ALT. Ils ont proposé que l'avantage sélectif offert par la mutation de TERT et conférant le phénotype ALT serait équivalent à l'avantage procuré par la mutation d'ATRX (Killela et al., 2013). Cependant, certaines tumeurs ALT tel que 40% du carcinome médullaire de la thyroïde (MTC) manquent l'expression du gène TERT mais ne présentent pas des mutations dans le promoteur du gène correspondant (Wang et al., 2014, Liu et al., 2014), d'où la nécessité d'élargir les recherches pour savoir l'origine de ces mutations différentielles entre les divers types de cancer.

### **3.2. L'hétérogénéité des télomères et la présence de variants de répétitions télomériques**

Les télomères sont normalement maintenus dans la lignée germinale humaine à des longueurs d'environ 15 kb. Pour les cellules somatiques normales in vitro, la longueur des

télomères diminue progressivement à un taux de 40-200 paires de bases (pb) par division cellulaire pour arriver à 5-8 kb à la sénescence (Wright et al., 1997). Quant aux cellules cancéreuses télomérase-positives, les télomères présentent une taille moyenne généralement inférieure à 10 kb, homogène au sein d'une même cellule (Figure 11). En revanche, les cellules ALT sont caractérisées par des télomères de longueur très hétérogène allant de 3 kb jusqu'à 50 kb, avec une taille moyenne aux alentours de 20kb, la distribution très irrégulière de ces télomères est clairement visible à la métaphase par la technique de Telo-FISH avec des télomères très longs et d'autres très courts, voire indétectables (Figure 11) (Bryan et al., 1995).



**Figure 11 : L'hétérogénéité des télomères dans les cellules ALT**

Marquage des télomères sur chromosomes métaphasiques par la technique d'hybridation in situ en fluorescence (Telo-FISH), montrant des télomères de tailles très hétérogènes dans les cellules ALT (a) et au contraire très homogènes dans les cellules télomérase-positives (b).

La taille n'est pas la seule différence au niveau des télomères entre les cellules télomérase-positives et négatives. En effet, les télomères dans les cellules ALT sont enrichis par des variants de séquences répétitives de type G (TGAGGG) et de type C (TCAGGG) (Conomos et al., 2012) alors que ces séquences sont limitées aux régions sub-téломériques dans les cellules télomérase-positives.

Ces variants recrutent des récepteurs nucléaires orphelins appartenant à la famille des facteurs de transcription des récepteurs nucléaires d'hormones (NHR). Ils ont été détectés au

niveau des télomères des cellules ALT et non pas des cellules télomérase-positives (Déjardin and Kingston, 2009, Conomos et al., 2012). Cette découverte était inattendue du fait que les facteurs de transcription s'associent habituellement aux régions régulatrices de gènes or les télomères sont dépourvus de gènes classiques. Marzec et ses collaborateurs ont identifié un rôle critique de ces protéines au niveau des télomères des cellules cancéreuses ALT (Marzec et al., 2015). En effet, ces récepteurs fixés aux télomères sont capables d'une part de former des ponts entre eux favorisant la recombinaison entre les télomères, et d'une part de s'assembler avec ces mêmes récepteurs liés à d'autres régions du génome conduisant à l'insertion de l'ADN télomérique dans tout le génome. Ces insertions créent des sites fragiles communs pouvant entraîner des cassures et des translocations. Ceci a permis aux auteurs de proposer ce mécanisme d'instabilité génomique induit par les télomères comme un modèle pour la génération des génomes hétérogènes et par conséquent des caryotypes complexes dans les cellules cancéreuses ALT (Taylor et al., 2011).

### **3.3. Les corps APB**

Les PML (promyelocytic leukemia nuclear body) sont des agrégats nucléaires mobiles contenus dans la plupart des types cellulaires. Les protéines PML et Sp100 sont les principaux composants des corps de PML. Ces deux protéines peuvent être sumoylées ce qui permet l'établissement et le maintien de liaisons non covalentes entre elles formant ainsi le corps sphérique de PML (Shen et al., 2006). Ces structures sont impliqués dans divers processus cellulaires tels que la réponse au stress, la régulation du cycle cellulaire, le stockage de facteur de transcription l'apoptose ou la tumorigenèse.

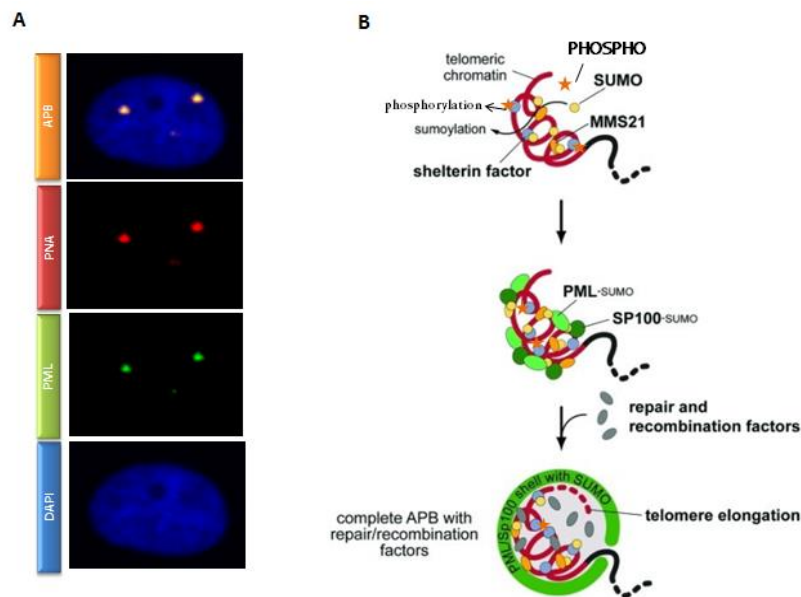
Dans les cellules ALT, ces PML sont associés à l'ADN télomérique et d'autres protéines accessoires pour former les APB (ALT-associated PML bodies), un critère principale d'identification du phénotype ALT (Yeager et al., 1999) (Figure 12A). Les APB peuvent contenir des télomères provenant de différents chromosomes ainsi que des répétitions de télomères extra-chromosomiques (ECTR) (Fasching et al., 2007, Cho et al., 2014). Les protéines télomériques du complexe shelterin (Yeager et al., 1999) sont aussi présents au niveau

des APB, ainsi que d'autres facteurs impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN et la réparation de ces dommages, tels que les composants du complexe 9-1-1 (hRAD9, hHUS1, hRAD1), hRAD17, le variant d'histone H2AX phosphorylé ( $\gamma$ H2AX), l'hélicase BLM de type RecQ, la protéine d'hétérochromatine (HP1) ou le complexe SMC5 / 6 qui comprend MMS21, une SUMO E3 ligase (Jiang et al., 2009, Nabetani et al., 2004, Potts and Yu, 2007). En outre, des protéines de la recombinaison homologue peuvent être aussi localisées aux niveau des APB, comme par exemple l'endonucléase MUS81, la protéine de réplication A (RPA), RAD51 et RAD52, la protéine BRCA1 et le complexe MRN constitué de NBS1, MRE11 ou RAD50 (Yeager et al., 1999, Zeng et al., 2009, Wu et al., 2003). Au cours de la mitose, la perte de la sumoylation de la protéine PML conduit à sa dégradation. Ainsi, les APB ne sont pas présents dans les cellules mitotiques et sont plutôt enrichis en phase G2/M durant laquelle la recombinaison de l'ADN est principalement activée (Draskovic et al., 2009, Grobelny et al., 2000)

La fonction précise des APB dans le mécanisme ALT reste à élucider. Cependant, il est clairement établi que les APB servent de plateforme à la recombinaison et la réplication des télomères. En effet, l'incorporation de l'analogue de la thymidine, la bromodésoxyuridine (BrdU), montre une synthèse d'ADN au niveau des APB dans les cellules ALT (Grobelny et al., 2000). De plus, l'inhibition de la formation des APB est accompagnée d'un raccourcissement progressif des télomères dans les cellules ALT (Jiang et al., 2005). Cette synthèse d'ADN dépend de l'activité d'ATM et d'ATR (Nabetani et al., 2004), du complexe MRN et de la protéine BRCA1 (Wu et al., 2003), suggérant que la signalisation du dommage à l'ADN est couplée à l'activité ALT.

Il a été proposé que la réponse aux cassures double brin au niveau des télomères déclençait le mouvement à distance et le regroupement entre les extrémités des chromosomes à proximité des PML formant ainsi les APB et conduisant à la synthèse d'ADN télomérique en facilitant la recombinaison entre les séquences télomériques homologues (Draskovic et al., 2009, Cho et al., 2014). La formation des APB nécessite aussi l'implication de NBS1, qui à son tour recrute MRE11, RAD50 et BRCA1 au niveau de ces structures (Jiang et al., 2005, Wu et al., 2003). La protéine PML, ainsi que les protéines du complexe shelterin telles que TRF1, TRF2, TIN2 et Rap1, représentent des facteurs essentiels pour la formation des APBs (Jiang et

al., 2007). En effet, des modifications post-traductionnelles, comme la sumoylation de TRF1 et TRF2, et la phosphorylation de TRF1 sur les thréonines 371 ou 271, s'avèrent indispensables pour l'assemblage des constituants des APB (Potts and Yu, 2007, Ho et al., 2016, Wilson et al., 2016) (Figure 12B).



**Figure 12 : Structure et formation des APBs dans les cellules ALT**

A) Images de microscopie confocale montrant les corps de PML (en vert), les télomères marqués par une sonde de PNA (en rouge) et les APBs (en orange). B) Modèle hypothétique de la formation des APBs dans les cellules ALT. Des modifications post-traductionnelles tel que la sumoylation et la phosphorylation de protéines spécifiques du complexe shelterin sont indispensables pour réguler l'assemblage des autres constituants tel que les protéines PML et sp100 ainsi que les facteurs de réparation et de recombinaison pour former les corps d'APBs (adapté de Chung et al., 2012).

### 3.4. L'ADN télomérique extra-chromosomique

L'un des phénotypes les plus remarquables des cellules ALT est la présence en quantité abondante d'ADN télomérique extra-chromosomique (ECTR) (Tokutake et al., 1998, Nabetani and Ishikawa, 2009). Ces ECTR peuvent se manifester sous la forme circulaire double brin (t circles) ou simple brin (c-circles) ou bien sous la forme de répétitions télomériques linéaires double brin (Henson and Reddel, 2010, Fasching et al., 2007). L'origine et les fonctions exactes d'ECTR ne sont pas entièrement investigués. Cependant, des études ont proposé qu'ils soient

des produits de la recombinaison, des substrats pour l'élongation des télomères ou bien des résultats de la résolution de la boucle T (Henson and Reddel, 2010, Fasching et al., 2007). Il a aussi été reporté que ces structures sont généralement, mais pas exclusivement, associées aux APBs (Yeager et al., 1999, Fasching et al., 2007).

### **3.4.1. Les t-circles**

Les t-circles sont des séquences d'ADN télomérique double brin circulaire, qui sont détectés par électrophorèse bidimensionnelle (2D) (Cesare and Griffith, 2004). Une augmentation de la fréquence des t-circles est considérée comme un marqueur du phénotype ALT, cependant ces molécules d'ADN circulaires ne seraient ni essentielles ni spécifiques du mécanisme ALT (Deng et al., 2007). Ils résultent principalement de la résolution de la boucle t de télomères longs (Cesare and Griffith, 2004, Pickett et al., 2009, Wang et al., 2004).

### **3.4.2. Les C-circles**

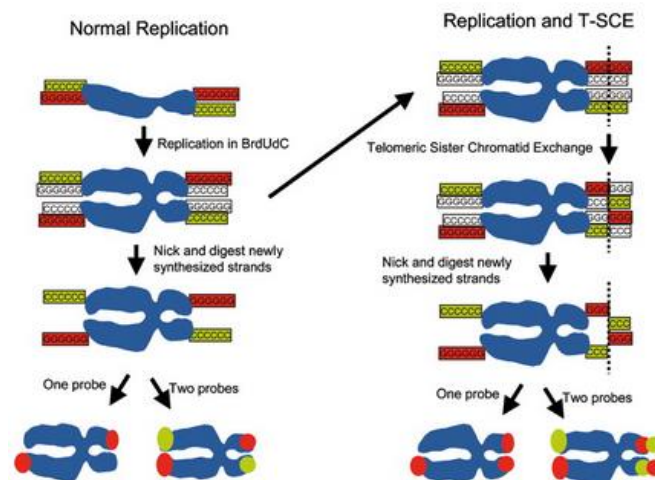
Les C-circles sont définis comme étant des marqueurs ALT universels. Il s'agit de molécules d'ADN circulaires simple brin riche en G (G strand structure ou ssG) ou en C (C strand structure ou ssC) (Nabetani and Ishikawa, 2009, Henson et al., 2009). Leur origine n'est pas très bien connue. Les ssC sont plus abondantes que les ssG et sont considérés comme des critères plus spécifiques d'identification du phénotype ALT que les t-circles (Henson et al., 2009). Les C-circles peuvent être détectés par la technique CCA (C-Circle Assay) (Henson et al., 2017). Cette méthode est basée sur l'amplification de ces molécules d'ADN circulaire simple brin grâce à leur propre amorce par une réaction RCA (**R**olling **C**ircle **A**mplification). Etant donné que ces C-circles peuvent être présents dans le sang des patients ayant le phénotype ALT, la technique CCA a été proposée comme un test clinique robuste pour mettre en évidence une activité ALT chez des patients atteints de cancers (Henson et al., 2009).



### 3.5. Les échanges télomériques

Les cellules ALT sont aussi caractérisées par de nombreux échanges entre les télomères des chromatides sœurs ou T-SCE (Telomere Sister Chromatid Exchange). Ces évènements qui représentent une marque de recombinaison homologe, sont détectés par la technique de CO-FISH (Chromosome Orientation-Fluorescent In Situ Hybridization) (Londoño-Vallejo et al., 2004). Cette dernière implique la destruction complète du brin d'ADN néo-synthétisé suivi par un marquage avec deux sondes chacune spécifique de l'un des brins télomériques matriciels couplées à des fluorophores différents (Figure 13).

Bien que la recombinaison entre les télomères dans les cellules ALT soit aussi fréquente, aucune augmentation de la recombinaison génomique n'a pas été observée entre les cellules télomérase- positives et les cellules ALT, suggérant que cet évènement anormal est spécifique des télomères et n'est pas lié à une dérégulation générale de la machinerie de recombinaison (Bechter et al., 2004, Bechter et al., 2003).



**Figure 13 : Détection des T-SCE par la technique de CO-FISH**

La méthode de CO-FISH est capable de détecter l'échange entre les chromatides sœurs télomériques. Elle consiste en l'incorporation du bromodésoxyuridine dans les brins néo-synthétisés suivie de leur dégradation. En absence de T-SCE, l'hybridation avec la sonde riche en G ou la sonde riche en C révèle un signal unique sur la chromatide cible d'une même extrémité. En cas de T-SCE, l'hybridation avec une sonde spécifique à un seul brin donnera un signal sur les deux chromatides sœurs d'une même extrémité. (sonde riche en C marquée par Cy3, sonde riche en G marquée par FITC dans ce modèle (Bechter et al., 2004).

### **3.6. Le complexe shelterin dans les cellules ALT**

La plupart des cellules ALT manquent l'expression de p53 et montrent une instabilité génomique élevée (Lovejoy et al., 2012). Cela est mis en évidence par le fait que ces cellules présentent spontanément des foyers de dommage à l'ADN associés aux télomères, connus sous le nom de TIF (Cesare et al., 2009). La surexpression de TRF2 et non pas de hTERT réduit la fréquence de ces TIF, prouvant qu'ils proviennent d'un défaut d'intégrité structurale et non pas de la présence de télomères courts (Potts and Yu, 2007). Cependant, ces cellules poursuivent toujours leur progression dans le cycle cellulaire et fusionnent très peu, il est probable que ces TIF représentent un état intermédiaire ou transitoire plutôt que des télomères totalement déprotégés (Cesare et al., 2009).

Bien que le mécanisme ALT soit caractérisé par une fréquence très importante de T-SCE, aucune augmentation de la recombinaison ailleurs dans le génome n'a été observée entre les cellules télomérase-positives et les cellules ALT, comme déjà cité. D'autre part, étant donné que le complexe shelterin protège les télomères d'une activation de voies de réparation, il semble qu'il peut interférer avec les mécanismes de recombinaison d'ALT. Par conséquent, il est raisonnable de supposer qu'un problème de protection des télomères soit associé au phénotype ALT.

TRF2, un composant du complexe shelterin, joue un rôle particulièrement intéressant dans le modèle de protection des télomères des cellules ALT. Il est impliqué dans la suppression des RH télomériques en favorisant à la fois la formation de boucles en T et en empêchant la résolution des intermédiaires de recombinaison télomérique (Poulet et al., 2009). Dans les cellules ALT, la quantité de TRF2 relative à la quantité d'ADN télomérique, est réduite en comparaison avec les cellules télomérase-positives, ce qui entraîne une perte en partie de la fonction de TRF2 provoquant un état permissif à la RH, rappelant ainsi les TIF intermédiaires (Cesare et al., 2009). Cesar et ses collaborateurs ont décrit trois niveaux de protection par le complexe shelterin que les télomères peuvent adopter et qui sont résumés dans le tableau 3. Plusieurs facteurs peuvent influencer la fixation de TRF2 au niveau des télomères. C'est le cas par exemple des variants de séquences répétitives nucléaires au niveau des télomères, pouvant

déplacer les protéines du complexe shelterin en recrutant les récepteurs qui montrent plus d'affinité pour ces variants (Conomos et al., 2012), Conomos et al., 2014). D'autre part, la sumoylation du TRF2 par le complexe SMC5/6 est une autre source pour séquestrer TRF2 qui ne se lie plus aux télomères dans les APB (Potts and Yu, 2007). En outre, le déplacement de TRF2 pourrait également réduire la protéine RAP1 au niveau de l'ADN télomérique, cette dernière est impliquée dans l'inhibition de la réparation dirigée par homologie (HDR) (Sfeir et al., 2010).


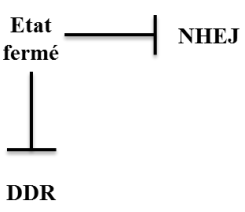



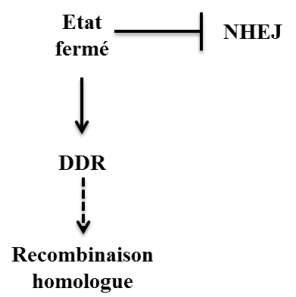


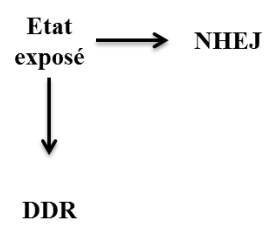
Etat de protection	Description	Illustration	Schéma
Etat fermé	Recouvrement des télomères par les protéines du complexe shelterin est suffisant pour inhiber les fusions et l'activation d'une réponse aux dommages à l'ADN, cette inhibition est facilitée grâce à la conformation télomérique (boucle en T).	 <p>Formation de la boucle T</p>	
Etat intermédiaire	Le complexe shelterin prévient les fusions grâce à l'inhibition partielle de TRF2 ou de POT1 mais active d'autre part les voies de réparation de dommage à l'ADN. Cet état se produit le plus souvent en raison de contraintes stériques sur les télomères courts qui empêchent l'adoption d'une structure protectrice.	 <p>Contraintes stériques sur télomères courts</p>  <p>Inhibition de POT1</p>  <p>Inhibition partielle de TRF2</p>	
Etat exposé	Recouvrement des télomères par les protéines du complexe shelterin est insuffisant pour inhiber les fusions et l'activation d'une réponse aux dommages à l'ADN. Cet état est révélé aussi par des télomères très courts incapables de fixer les composants du complexe shelterin.	 <p>Télomères très courts déprotégés</p>  <p>Inhibition de TRF2</p>	

Tableau 3: Les états de protection des télomères des cellules ALT par le complexe shelterin (inspiré de Cesare et al., 2009)

### **3.7 Les modifications épigénétiques dans les cellules ALT**

La structure de la chromatine est décisive pour le contrôle du métabolisme de l'ADN. Cette structure est soumise à des variations au niveau de l'ADN ou bien au niveau des histones des nucléosomes. La chromatine télomérique présente des marqueurs d'hétérochromatine, indicateurs d'une répression transcriptionnelle. L'état de la chromatine a longtemps été considéré comme un déterminant de la recombinaison homologue. Plusieurs études ont rapporté une forte corrélation entre la recombinaison homologue et la structure décompactée de la chromatine.

#### **3.7.1 Les modifications de l'ADN**

La chromatine télomérique des mammifères semble avoir plusieurs caractéristiques structurelles qui la rendent différente des autres régions, elle est caractérisée par une hyperméthylation de l'ADN (Gonzalo et al., 2006). La méthylation de l'ADN est un processus épigénétique dans lequel certaines bases nucléotidiques surtout les bases C et G peuvent être modifiées par l'addition d'un groupement méthyle. Cette modification de l'ADN est effectuée par des enzymes particulières appelées DNMT (DNA méthyl-transférase). Bien que les répétitions télomériques manquent les îlots CpG méthylables, les régions sub-télomériques en sont fortement enrichies dans les cellules somatiques (Brock et al., 1999). Il a été révélé que la méthylation de l'ADN empêche une recombinaison illégitime entre les séquences répétitives (Bender, 1998). De manière intéressante, l'étude menée par Gonzalo et ses collaborateurs a apporté une preuve supplémentaire sur le rôle de la méthylation dans la suppression du mécanisme ALT dans les cellules souches embryonnaires murines (Gonzalo et al., 2006). En effet, la déplétion des principales ADN méthyl-transférases : DNMT1, DNMT3a et DNMT3b favorisait la recombinaison entre les télomères et induisait le phénotype ALT, ceci était marqué par une augmentation des T-SCE, des télomères hétérogènes ainsi que la formation des APB. Les travaux menés par Vera et ses collaborateurs ont confirmé la corrélation entre l'hypométhylation globale des régions sub-télomériques et les événements de recombinaisons télomériques tels que les T-SCE (Vera et al., 2008).

Toutefois, le rôle de la méthylation de l'ADN dans les échanges de télomères reste encore un sujet de controverse. Tilman et ses collaborateurs ont analysé le niveau de méthylation dans les séquences sub-téломériques des cellules ALT et des cellules télomérase-positives (Tilman et al., 2009). Leurs résultats indiquent que la méthylation de ces régions est significativement réduite dans les lignées cellulaires ALT par rapport aux lignées télomérase-positives confirmant l'hypométhylation dans les cellules ALT. Cependant, ils ont trouvé que l'hypométhylation de l'ADN sub-téломérique n'est pas nécessaire pour les échanges entre les chromatides sœurs des télomères suggérant qu'il existe d'autres altérations épigénétiques, telles que les modifications des histones par exemple pouvant affecter le niveau de T-SCE dans ces cellules. La corrélation et le lien entre une telle hypométhylation et la stimulation du phénotype ALT reste alors à élucider dans les cellules tumorales humaines.

### **3.7.2 Les modifications des histones**

Chez les eucaryotes, il existe divers mécanismes de modifications des histones conduisant à un remodelage de la chromatine pour aboutir à un état relâché connu par l'euchromatine ou à un état plus compacté appelé hétérochromatine. Les télomères sont souvent connus comme des structures hétérochromatiques étant donné leur enrichissement en H3K9me3 et H4K20me3 et leur faible taux d'acétylation au niveau des histones (Schoeftner and Blasco, 2009). Les enzymes responsables de la méthylation des histones H4K20 sont SUV4-20H1 et SUV4-20H2 alors que la méthylation des histones H3K9 est assurée par les enzymes SUV39H1 et SUV39H2. Certains suppresseurs de tumeurs interagissent avec SUV4-20H1 et SUV4-20H2 afin de maintenir la méthylation de H4K20, cependant les histones H3K9 méthylées présentent plus d'affinité pour les protéines HP1 (Gonzalo et al., 2005, Gonzalo et al., 2006, Benetti et al., 2007). Ces marques d'hétérochromatines sont réduites suite à l'absence de ces enzymes conduisant à une élongation des télomères qui probablement semble être le résultat d'une augmentation de la recombinaison homologe. En 2014, Episkopou et ses collaborateurs ont mis en évidence une chromatine télomérique plus décompactée dans les cellules ALT que dans les cellules télomérase-positives, cela était marqué par une diminution de la tri-méthylation de H3K9 au niveau des télomères dans les cellules ALT

Une autre marque de l'hétérochromatine au niveau des télomères est le faible taux d'acétylation des histones H3 (AcH3) et H4 (AcH4) (Benetti et al., 2007). On ne sait pas si la déplétion des complexes de remodelage de la chromatine pourrait modifier la structure de la chromatine télomérique et affecter par la suite l'activité ALT. Notamment, l'inhibition des histones désacétylases (HDAC) avec la trichostatine A (TSA) afin de bloquer la formation d'hétérochromatine a induit l'apparition des APBs et une augmentation de l'échange télomérique entre les chromatides sœurs, prouvant que l'activité ALT est sensible aux changements de la structure de la chromatine (Jung et al., 2013). Ces observations impliqueraient une détection spécifique de chaque modification post-traductionnelle sur un site spécifique d'histone au niveau des télomères ALT, pour avoir un vrai atout pour l'identification des facteurs impliqués dans l'établissement et le maintien de la chromatine au niveau des télomères ALT.

### **3.7.3 Les protéines de remodelage de la chromatine**

Avec l'apparition des techniques de séquençage du génome, des mutations ont été identifiées dans le complexe ATRX (alpha-thalassémie / retards mentaux), DAXX (protéine associée au domaine de la mort) dans les cellules tumorales ALT, principalement dans les tumeurs pancréatiques endocrines (Jiao et al., 2011), le glioblastome multiforme et les astrocytomes (grade II et III) (Heaphy et al., 2011, Schwartzenuber et al., 2012, Liu et al., 2012, Jio et al., 2012) et autres. De plus, il a été montré que ces mutations représentaient une étape cruciale dans l'activation du mécanisme ALT (Lovejoy et al., 2012, Schwartzenuber et al., 2012). ATRX est un facteur de remodelage de la chromatine qui interagit avec DAXX, une protéine chaperonne d'histone, pour faciliter l'incorporation du variant d'histone H3.3 au niveau de l'hétérochromatine télomérique (Lewis et al., 2010, Goldberg et al., 2010).

ATRX peut se localiser dans les corps de PML ainsi qu'au niveau des séquences répétitives de l'hétérochromatine des télomères ou de l'ADN péricentromérique (Lewis et al., 2010, Nan et al., 2007, Xue et al., 2003). De manière intéressante, la colocalisation de H3.3 avec ATRX est associée à une répression de la transcription au niveau des répétitions télomériques (Goldberg et al., 2010). Une recherche de l'état de chromatine télomérique dans

certains types de tumeurs ALT tels que les glioblastomes multiformes pédiatriques, a montré que l'absence d'ATRX perturbe l'état hétérochromatique des télomères en réduisant le chargement de H3.3 au niveau de l'ADN télomérique, conférant un état plus permissif à la recombinaison, facilitant ainsi l'allongement des télomères par le mécanisme ALT (Schwartzentruber et al., 2012).

Il est intéressant de noter que Ramamoorthy et Smith ont découvert un rôle critique pour la perte d'ATRX dans la suppression de la résolution entre les chromatides sœurs des télomères (Ramamoorthy and Smith, 2015). Par conséquent, la cohésion persistante entre ces chromatides sœurs télomériques jouera un double rôle dans le phénotype ALT premièrement elle stimulera la recombinaison entre les télomères sœurs, favorisant la réparation de l'ADN et le maintien des télomères, et deuxièmement elle empêchera la recombinaison excessive entre les télomères non-sœurs inhibant ainsi la mort cellulaire. Finalement, la perte d'ATRX pourrait conduire à des changements épigénétiques au niveau des télomères les rendant permissifs à la recombinaison comme elle peut avoir une fonction essentielle dans le contrôle de l'hyper-recombinaison.

## **4. Les mécanismes moléculaires d'ALT**

Comme déjà évoqué, ALT reposerait sur la recombinaison homologe pour la synthèse d'ADN télomérique. Plusieurs études renforcent cette hypothèse. Par exemple, celles qui ont montré que rad52, une protéine de recombinaison homologe, est essentielle pour maintenir les télomères en absence de la télomérase (Grobely et al., 2000). Puis, l'étude menée par M.A. Dunham a supporté l'implication de cette voie dans le maintien des télomères dans les cellules ALT en se basant sur une technique de marquage des télomères par un plasmide d'ADN. Après plusieurs doublements de population, d'autres télomères avaient intégré le même plasmide et cet événement semblerait spécifique aux cellules ALT et non pas télomérase-positives (Dunham et al., 2000).

Bien qu'il soit concevable que le mécanisme ALT repose sur une étape de recombinaison pour maintenir les télomères, le mécanisme exact de l'étape de l'élongation reste inconnu. Deux modèles ont été proposés par l'équipe de Reddel : le modèle d'échange entre les chromatides sœurs (T-SCE et Unequal T-SCE) et le modèle de recombinaison entre les chromosomes (Cesare and Reddel, 2010)

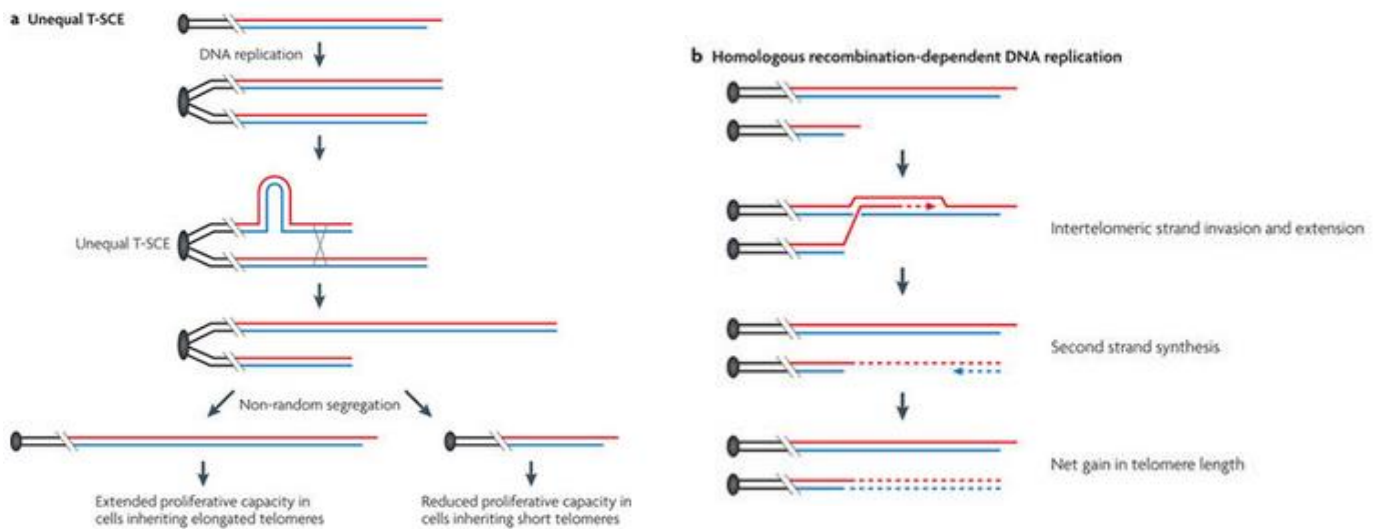
#### **4.1 Modèle basé sur les échanges asymétriques entre chromatides sœurs (T-SCE):**

Etant donné que les cellules ALT sont caractérisées par une fréquence élevée de T-SCE en comparaison avec les cellules télomérase-positives, aucune explication tranchante pour ces échanges au niveau des télomères n'a été rapportée. D'ailleurs, il est admissible que les échanges de chromatides sœurs au niveau des autres régions du génome sont les conséquences de la réparation des cassures générées par une fourche de réplication bloquée (Wilson and Thompson, 2007). Il a été proposé que les T-SCE permettent l'élongation des télomères (Figure 12) (Bechter et al., 2004). Cependant, une étude récente a montré que les TSCE seraient plutôt des événements de recombinaisons entre les télomères résultant d'une instabilité télomérique accrue et en absence d'allongement de télomères (Sobinoff et al., 2017). L'augmentation des T-SCE observée dans les cellules ALT peut aussi refléter la forte proportion de télomères courts caractérisant les cellules ALT, plutôt que d'être directement liée au mécanisme d'extension des télomères. Jusqu'à 30% des extrémités chromosomiques dans les cellules ALT ont été rapportées comme ayant des télomères très courts voire indétectables (Jegou et al., 2009). En général, les télomères courts sont plus recombino-gènes parce qu'ils sont plus mobiles (Jegou et al., 2009), ont une structure de chromatine plus ouverte (Benetti et al., 2007) et déclenchent une réponse aux dommages à l'ADN (DDR) (Cesare et al., 2009).

D'autre part, les T-SCE peuvent être asymétriques appelés aussi 'Unequal T-SCE' conduisant à une ségrégation non aléatoire des chromosomes pour obtenir une cellule-fille avec des télomères longs capable de proliférer et des survivre au détriment de l'autre cellule fille dont les télomères sont plus courts (Bailey et al., 2004) (Figure 14a). Ce modèle basé sur les T-SCE



reste hypothétique et n'est pas envisagé comme un mécanisme responsable de l'élongation des télomères.



**Figure 14 : Deux modèles d'élongation des télomères par le mécanisme ALT**

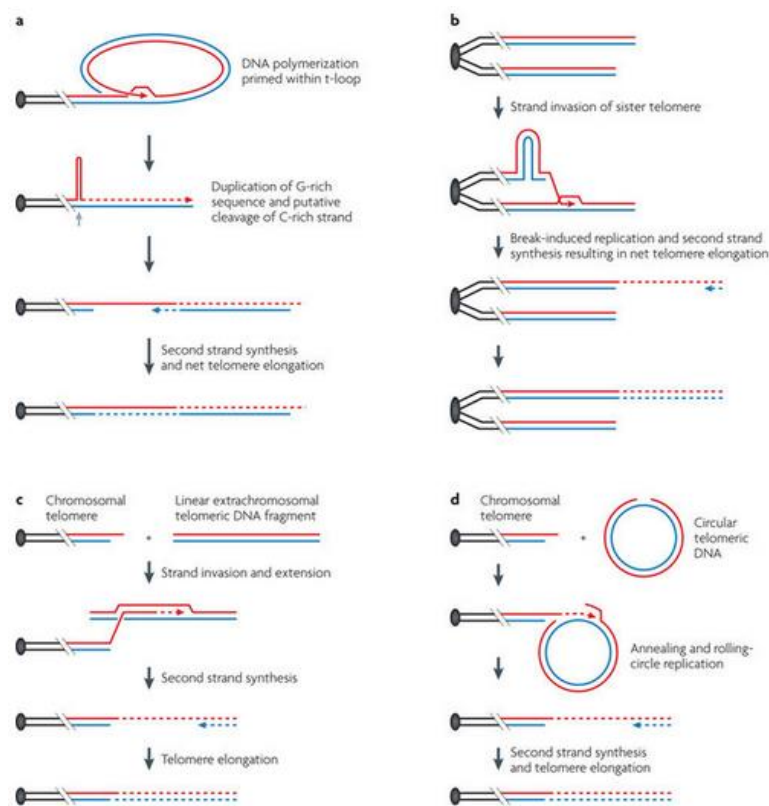
a) Des T-SCEs inégaux par crossing-over entre deux chromatides sœurs permettent de rallonger le télomère d'une des deux chromatides-sœurs et de raccourcir le télomère de l'autre chromatide-sœur. b) Des événements de RH interalléliques entre un télomère court et un autre plus long conduisant à l'élongation des chromosomes (Cesare and Reddel, 2010).

## 4.2 Modèle basé sur la recombinaison homologue

Selon une autre hypothèse, le mécanisme ALT est basé sur la synthèse d'un nouvel ADN télomérique par recombinaison en utilisant une séquence télomérique adjacente (Figure 14 b).

Ce modèle est privilégié du fait qu'il est corrélé avec l'étude menée par M.A. Dunham et une autre étude où des réarrangements complexes observés au niveau des télomères des cellules ALT ne sont pas prédits par le modèle d'échange inégal et de ségrégation asymétrique mais sont plutôt le résultat d'une recombinaison entre des télomères non-sœurs ou entre des télomères et un ADN télomérique extra-chromosomique. Dans ce modèle dépendant de la recombinaison homologue, la matrice d'ADN requise pour l'activité ALT n'est pas nécessairement le télomère d'un autre chromosome. La recombinaison peut avoir lieu entre les

chromatides sœurs comme elle peut être intra-téломérique se servant de la boucle-T comme matrice pour l'élongation du télomère par rolling-circle (Figure 15 a et b). D'autre part, l'ADN télomérique linéaire extra-chromosomique peut également servir de matrice ainsi que les cercles télomériques qui sont amplifiés par rolling-circle chez les levures (Figure 15 c et d). Le mécanisme ALT peut donc potentiellement inclure la copie de toute séquence d'ADN télomérique, bien qu'à ce jour, seul l'ADN télomérique chromosomique ait été démontré comme étant une matrice dans des cellules humaines malgré l'abondance des différentes formes d'ECTRs.



**Figure 15 : Les autres modèles de recombinaison télomérique dans les cellules ALT**

a) au sein de la t-loop par rolling-circle, b) entre les télomères de chromatides sœurs sans crossing-over, c) entre le télomère et des ECTRs linéaires, d) entre le télomère et des ECTRs circulaires par rolling-circle (Cesare and Reddel. 2010).

Ces différents modèles non mutuellement exclusifs ne semblent pas expliquer tous seuls la réplication des télomères dans les cellules ALT. Récemment, plusieurs publications suggèrent que le taux élevé du dommage à l'ADN au niveau des télomères ALT, résultant d'une fourche de réplication collapsée ou de dommages spontanés de l'ADN télomérique, favorisent la

recombinaison intra et / ou inter-télomérique pour permettre l'extension des télomères principalement par l'ADN polymérase  $\delta$  (Pol $\delta$ ), mais aussi par l'ADN polymérase  $\eta$  (Pol $\eta$ ). Par conséquent, pour mieux comprendre les mécanismes d'élongation des télomères dans les cellules ALT, il est impératif d'investiguer le rôle de la réponse aux dommages de l'ADN au niveau des télomères dans les cellules ALT.

### **4.3 La réponse au dommage à l'ADN**

Notre matériel génétique est constamment soumis à des dommages spontanés provenant de sources endogènes et exogènes. Ces sources de dommages peuvent générer des cassures de brins et perturber l'intégrité génomique conduisant à des troubles y compris le cancer. Pour faire face à la menace de ces dommages, les cellules ont établi un ensemble complexe de voies de signalisation connu sous le nom de Réponse aux Dommages de l'ADN (DDR) qui assure la maintenance du génome, coordonnant la réplication, la recombinaison et la réparation de l'ADN endommagé.

La réponse aux dommages à l'ADN (DDR) est une voie de transduction du signal qui reconnaît les sites endommagés et favorise divers voies qui partagent trois étapes communes: la détection des dommages, la transduction du signal et la réponse qui mène à une réparation de l'ADN, un arrêt du cycle cellulaire ou une apoptose (Cimprich and Cortez, 2008). Le DDR englobe de nombreuses voies de réparation chacune conçue pour réparer une lésion particulière.

#### **4.3.1 Stress réplicatif et le mécanisme ALT**

Les lésions qui découlent d'un stress de réplication sont parmi les plus grandes menaces auxquelles sont confrontées les cellules. Le stress réplicatif est une source importante d'instabilité provenant du ralentissement ou du blocage de la progression de la fourche de réplication ainsi que des défauts de synthèse de l'ADN qui en résultent (Gaillard et al., 2015).

Le stress réplicatif se produit souvent sur des sites du génome particulièrement difficiles à répliquer, tels que les télomères en raison de leur nature hétérochromatique et de leur capacité à former des structures secondaires (Sfeir et al., 2009). Ces dernières comprennent les boucles T, les hybrides ADN/ARN tels que les boucles R et les G-quadruplex, qui sont tous capables d'empêcher la progression de la réplication des fourches si elles ne sont pas efficacement éliminées (Tarsounas and Tijsterman, 2013). Par la suite, les fourches bloquées incapables de redémarrer la réplication finissent par s'effondrer, formant ainsi une cassure double brin (CDB) suivie d'une réponse qui sera médiée par une recombinaison homologue. Par conséquent, l'identification des sources de stress de réplication ainsi que les mécanismes responsables de leur résolution au niveau des télomères paraît pertinente pour comprendre le mécanisme ALT.

#### **4.3.1.1 Les modifications épigénétiques et le stress réplicatif**

Plusieurs études ont révélé que les modifications épigénétiques de la chromatine télomérique sont principalement associées à un stress réplicatif conduisant à l'activation d'une réponse par recombinaison homologue et activant ainsi le mécanisme ALT. Il a été montré que la protéine ATRX peut se lier aux structures en G quadruplex (Law et al., 2010) et que les cellules déficientes en ATRX éprouvent des difficultés à les résoudre ce qui bloque les fourches de réplication et provoque par la suite le stress réplicatif (Watson et al., 2013). ATRX lui-même n'est pas impliquée dans le déroulement de ces structures en G, prouvant qu'elle joue un rôle indirect face à ces obstacles (Clynes et al., 2014). Une étude récente menée par Koschmann et al a apporté une nouvelle perspective concernant le rôle d'ATRX dans les voies de réparation de l'ADN (Koschmann et al., 2016). En effet, les auteurs ont découvert que l'inhibition d'ATRX altérait la voie NHEJ, leurs résultats suggèrent qu'une augmentation relative de la recombinaison homologue par rapport à la voie NHEJ soit favorable au mécanisme ALT. Ainsi, en absence d'ATRX, la présence de structures en G au niveau de l'ADN télomérique pourrait favoriser le phénotype ALT en empêchant la progression de la fourche de réplication qui sera collapsée, déclenchant ainsi un mécanisme de réparation par recombinaison homologue. De plus, il a été déjà révélé qu'ATRX interagit de façon directe

avec les composants du complexe MRN lors de la réplication de l'ADN facilitant ainsi ce processus (Clynes et al., 2014). La réexpression d'ATRX dans les lignées cellulaires ALT entraîne une séquestration du complexe MRN loin des APB (Clynes et al., 2015), cela peut induire une suppression du mécanisme ALT (Jiang et al., 2005). Ces données montrent que l'expression d'ATRX peut limiter le phénotype ALT en séquestrant MRN loin des sites de recombinaison télomérique. Bien que les structures en G4 soient les substrats préférentiels pour MRE11 il est fort probable qu'en absence d'ATRX, MRN ait la capacité de cliver directement ces structures en G au niveau des APB induisant la formation de CDB et déclenchant par la suite la réponse au stress répliatif (Ghosal and Muniyappa, 2005, Clynes et al., 2015). Étant donné que le phénotype ALT est fortement corrélé aux mutations du complexe de remodelage de la chromatine ATRX / DAXX et de l'histone H3.3, une augmentation du stress répliatif peut être le résultat direct d'un défaut d'assemblage des nucléosomes sur l'ADN télomérique (Lovejoy et al., 2012, Heaphy et al., 2011). En effet, la réintroduction d'ATRX dans les lignées de cellules cancéreuses ALT réprimait l'activité ALT et provoquait une accumulation du variant d'histone H3.3 au niveau des télomères, suivie d'une réduction des fourches bloquées et par la suite du stress répliatif (Clynes et al., 2015). D'autre part, le rôle de l'assemblage de nucléosomes dans la lutte contre le stress répliatif au niveau des télomères dans les cellules ALT a également été mis en évidence par une étude menée sur la protéine ASF1, une chaperonne d'histone qui facilite le dépôt des histones pour former la particule nucléosomale lors de la réplication (O'Sullivan et al., 2014). La déplétion d'ASF1 dans les cellules télomérase-positives a provoqué une induction rapide de l'activité ALT, ceci était révélé par une augmentation de la recombinaison inter-télomériques. Toutes ces études suggèrent que le stress répliatif, induit en partie par l'absence des protéines de remodelage de la chromatine, soit un facteur stimulant du mécanisme ALT, et que sa résolution pourrait perturber l'activité ALT.

Comme déjà mentionné, les cellules ALT présentent une chromatine moins dense que celle des cellules télomérase-positives (Episkopou et al., 2014). Cet état de chromatine relâchée était accompagné d'un niveau plus élevé de l'ARN télomérique TERRA qui peut se lier directement à l'ADN télomérique pour former des hybrides ADN: ARN ou boucles R. Ces structures secondaires entraînent le blocage de la fourche de réplication et déclenchent par la

suite une réparation par recombinaison homologue (Graf et al., 2017). Une étude récente dans les cellules ALT a montré que l'élimination de la RNaseH1, une endonucléase qui dégrade spécifiquement l'ARN des hybrides ADN: ARN, provoquait une augmentation du stress réplicatif accompagnée de l'apparition de marqueurs du phénotype ALT, y compris la formation des APBs et des C-circles (Min et al., 2017).

#### **4.3.1.2 Récepteurs nucléaires et stress réplicatif**

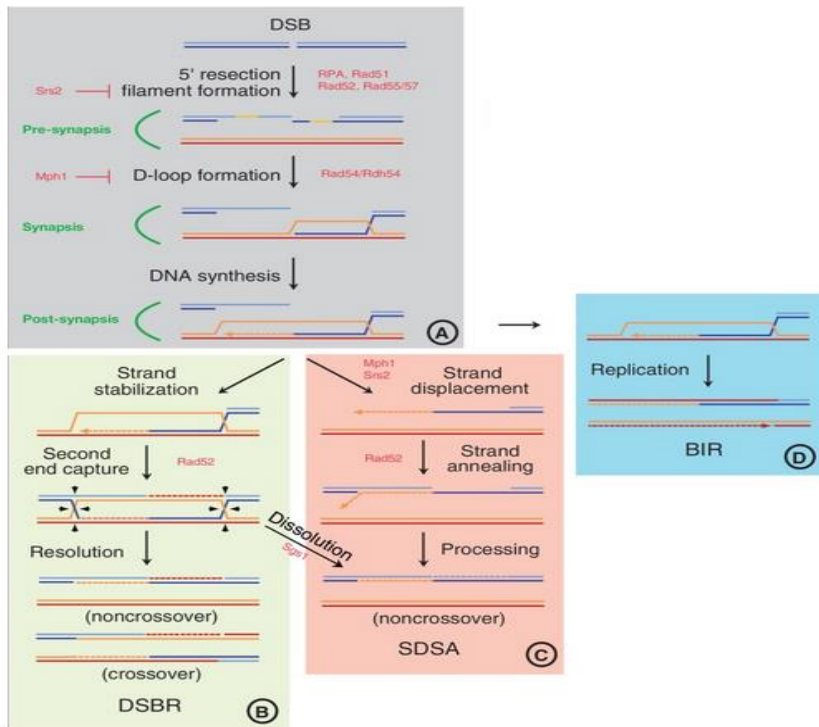
D'autre part, Conomos et ses collaborateurs ont démontré que NuRD (Nucleosome Remodeling Deacetylase), le complexe de remodelage et de désacétylation des histones, est recruté par la protéine ZNF827 pour se lier spécifiquement au niveau de l'ADN télomérique dans les cellules ALT (Conomos et al., 2014). Ce complexe déplace les protéines shelterin et induit un stress réplicatif suivi d'interactions entre les télomères et d'une synthèse télomérique. Paradoxalement, une condensation de la chromatine due à l'activité de désacétylation de NuRD se produit en parallèle, suggérant que NuRD-ZNF827 peut compenser certaines fonctions du complexe shelterin dans les cellules ALT, tout en créant simultanément un état permissif à la recombinaison homologue entre les télomères.

D'autre part, des études récentes ont montré le rôle de deux protéines FANCM et SMARCAL1, qui sont responsables de la résolution du stress réplicatif, dans la répression de l'activité ALT en induisant une régression de la fourche de réplication (Cox et al., 2016, Pan et al., 2017). Toutes ces données suggèrent que le mécanisme ALT peut être activé suite à une CDB générée par une fourche de réplication bloquée.

#### **4.3.2 La réparation par la recombinaison homologue:**

Les CDB spontanées ou formées suite à un stress réplicatif sont suivies d'une réparation par la recombinaison homologue. Cette dernière se produit généralement à la fin des phases S et G2 du cycle cellulaire, lorsque des chromatides sœurs sont déjà formées, elle est divisée en trois

phases : la phase pré-synaptique, la phase synaptique et la phase post-synaptique (pour revue voir Krejci et al., 2012, Dueva and Iliakis, 2013) (Figure 16 A).



**Figure 16 : Modèles pour la réparation des cassures double brin d'ADN par la Recombinaison homologue.**

A) Suite à une CDB, l'ADN télomérique est réséqué pour générer une extrémité 3' simple brin qui envahit une matrice homologue pour former une structure intermédiaire en boucle D. Trois voies de synthèse d'ADN peuvent être initiées :

B) Modèle de réparation de rupture à double brin (DSBR),

C) Modèle de l'hybridation de brin dépendante de la synthèse (SDSA) et D) Modèle de la réplication induite par la rupture (BIR) (inspiré de Krejci et al., 2012).

### La phase pré-synaptique:

Le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) chez l'Homme se fixe aux extrémités de la CDB. Le brin endommagé est ensuite dégradé de part et d'autre de la cassure par des exonucléases ou des endonucléases pour créer une extrémité 3' simple brin, cette étape est connue par la résection. Cette étape est suivie d'un recouvrement immédiat de l'ADN simple brin par RPA qui sera ensuite déplacée et remplacée par la recombinaison Rad51 afin d'initier la recombinaison. Ce déplacement nécessite certains médiateurs tels que RAD52, RAD54, BRCA1 et BRCA2.

### La phase synaptique:

Le nucléo-filament Rad51 scanne le génome à la recherche de la séquence homologue et envahit le brin d'ADN homologue. Ainsi cette étape conduit à la formation d'un hétéroduplex créant une « displacement loop » (D-loop) stabilisée par la protéine Rad54.

**La phase post-synaptique :**

Après la génération de la D-loop, cette étape implique la formation d'une structure caractéristique appelée jonction de Holliday, où deux brins d'ADN impliqués dans la recombinaison se croisent. La liaison des deux extrémités de la cassure détermine la formation d'une double jonction de Holliday. Cette jonction intermédiaire doit être résolue à l'aide des enzymes appelés « résolvasés » ou par l'action d'une hélicase et d'une topoisomérase I générant des produits dérivés ou non d'un « crossing over ».

Au moins trois voies différentes peuvent avoir lieu une fois que la synthèse d'ADN est initiée et elles utilisent presque toutes les étapes décrites ci-dessus. Premièrement, dans le modèle de réparation de rupture à double brin (DSBR), la seconde extrémité de la CDB peut s'engager pour stabiliser la structure de la boucle D, conduisant à la génération d'une double jonction Holliday qui sera résolue pour donner des produits croisés ou non croisés (Figure 16 B). Deuxièmement, dans le modèle de l'hybridation de brin dépendante de la synthèse (SDSA) une seule extrémité s'hybride à un seul brin de l'ADN homologue pour synthétiser de l'ADN sans former la jonction Holliday. Le produit de ce modèle est sans crossing-over (Figure 16 C). Dans le troisième modèle, la structure de la boucle D peut s'assembler dans une fourche de réplication et copier l'ensemble du bras chromosomique dans un processus appelé réplication induite par la rupture (BIR) (Figure 16 D). Ce mécanisme est évoqué le plus souvent lorsqu'il n'y a qu'une seule extrémité de la CDB disponible pour la réplication, soit en raison de la perte de l'autre, soit lors du processus d'allongement des télomères dans les cellules déficientes en télomérase. Finalement, tous ces modèles cités sont dépendants de Rad51, à l'exception de certaines formes de BIR.

**4.3.2.1 La réparation par la recombinaison homologue dans les cellules ALT**

Dès la première description du phénotype ALT, plusieurs études ont permis de formuler l'hypothèse que le mécanisme ALT est basé sur la recombinaison homologue (HR) induite par la CDB pour la synthèse des télomères. Cette hypothèse est tout d'abord soutenue par la présence de protéines de la recombinaison homologue y compris MRE11, RAD50, NBS1,



SMC5, SMC6, MMS21, FEN1, MUS81, FANCA et FANCD2 qui s'avéraient essentielles pour le maintien de la longueur des télomères dans les cellules humaines ALT et dont la plupart sont présentes dans les corps APB (Cesare and Reddel, 2010). Par conséquent, les principales étapes de la recombinaison homologue déjà citées semblent être impliquées dans le mécanisme de synthèse des télomères dans les cellules ALT.

Tout d'abord, dans les cellules ALT, les hélicases BLM ou WRN sont recrutées au niveau des fourches bloquées des télomères où elles sont supposées initier la résection en recrutant des exonucléases, telles que l'EXO1 et/ou DNA2, pour générer l'ADN télomérique simple brin. Cette dernière a le potentiel d'envahir l'ADN homologue, mais cette première étape peut être dépendante de la protéine rad51 comme elle peut ne pas l'être.

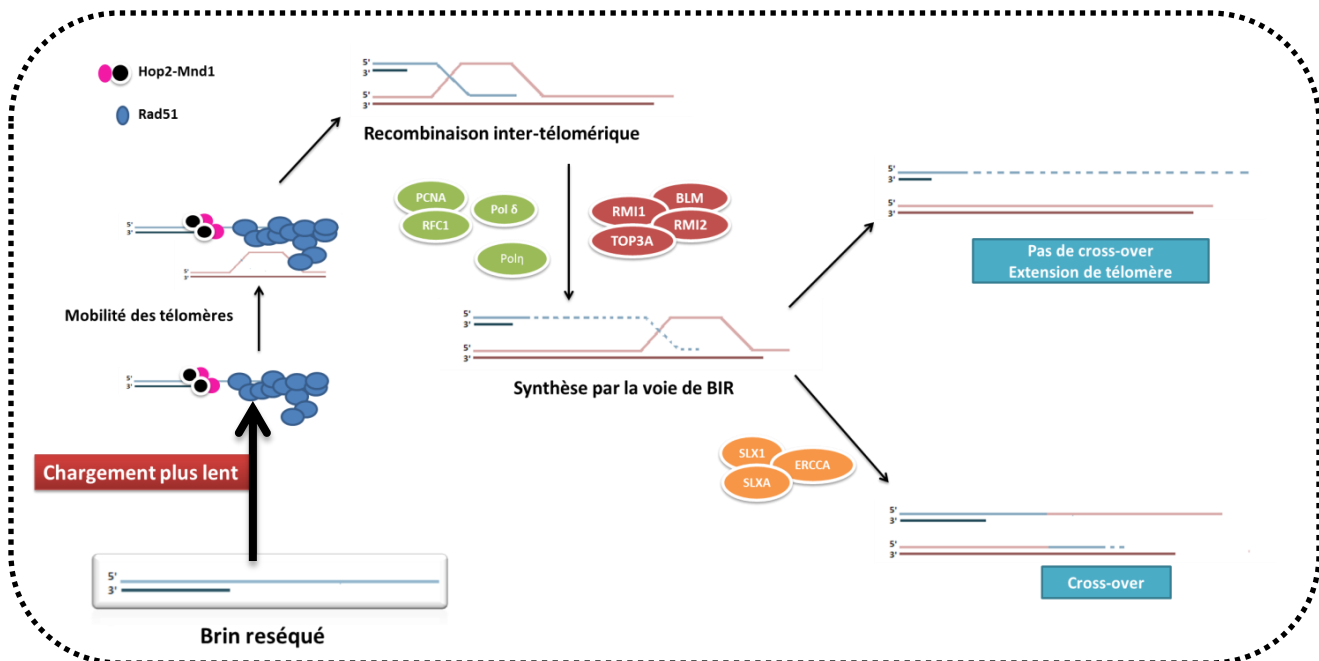
L'existence de mécanismes d'allongement de télomères dans les cellules ALT dépendants ou pas de Rad51 a été initialement évoquée chez les levures par l'émergence de deux groupes bien distincts de survivants (McEachern and Haber, 2006). Les survivants de type I et ceux de type II qui chacun utilise une voie différente de maintenance des télomères par recombinaison homologue et continue à proliférer en absence de la télomérase. Les survivants de type I sont dépendants de Rad51 et cherchent l'homologie à longue distance, tandis que les survivants de type II sont indépendants de Rad51 et détectent l'homologie à courtes distances pour envahir par la suite les brins homologues (Ira and Haber, 2002). Les voies de survie de type I et de type II sont mutuellement exclusives et ne se produisent pas dans les mêmes cellules de levure.

#### **4.3.2.1.1 ALT implique des mécanismes de recombinaison inter-télomériques dépendants de rad51**

Dans cette voie, l'étape de la résection, comme déjà mentionné, génère un ADN simple brin 3' qui sera recouvert par RPA qui à son tour sera déplacée et remplacée par Rad51, une protéine favorisant l'invasion. Cependant, les mécanismes responsables du recouvrement spécifique de chacune de ces protéines ne sont pas clairement élucidés dans les cellules ALT.

Comme POT1 se lie à l'ADN simple brin 3', sa présence au niveau de l'extrémité simple brin généré par la résection peut être remplacée par la protéine RPA. En effet, il a été montré que TERRA joue un rôle majeur dans la régulation du switch entre RPA et POT1 au niveau de l'ADN télomérique simple brin pendant le cycle cellulaire (Flynn et al., 2011). Dans les cellules ALT, la perte d'ATRAX favorise l'accumulation de TERRA au niveau des télomères simple brin, ce qui induit la persistance des protéines RPA, inhibant par la suite POT1 (Flynn et al., 2015). Finalement, des protéines spécifiques vont médier le remplacement de RPA par RAD51 qui à son tour facilite la recherche d'homologie pour induire l'invasion. (Krejci et al., 2012).

L'implication de rad51 dans la recombinaison homologue des télomères dans les cellules ALT a été abordée surtout par l'étude menée par Cho et ses collaborateurs (Cho et al., 2014). Tout d'abord, ces auteurs ont montré que la surexpression d'une protéine de fusion TRF1-FokI, qui provoque le clivage enzymatique des télomères, induit le regroupement télomérique dans les APB, la génération de C-circle et la synthèse d'ADN télomérique, ce qui va en faveur d'une activation du phénotype ALT. La présence de ces groupes intenses de télomères montre que les réponses aux CDB générées par le système TRF1-FokI initient un processus de recherche d'homologie qui sera suivi d'une recombinaison entre des télomères distants. Ces data rappellent la possibilité que ce mouvement de télomères endommagés à la recherche d'homologie soit analogue au même mouvement déjà rapporté chez la levure et qui dépend de rad51. Dans ce contexte, l'imagerie des cellules vivantes surexprimant TRF1-FokI a révélé que les télomères endommagés et recouverts par Rad51-GFP se propageaient vers d'autres télomères distants, aboutissant à une agrégation télomérique, et que le knockdown de Rad51 réduisait le regroupement des télomères ainsi que leur mobilité dans ces cellules. De plus, les auteurs ont également découvert que l'hétérodimère Hop2-MND1 au niveau des télomères endommagés était indispensable pour l'invasion du brin médiée par RAD51. De façon intéressante ces données montrent que suite à des lésions aiguës de l'ADN télomérique dans les cellules ALT, les télomères endommagés sont engagés dans des recherches d'homologie à distance ce qui aboutit à la formation de foyers de télomères groupés et à la synthèse de l'ADN télomérique. Cette synthèse implique une recombinaison inter-télomérique, et elle est dépendante de Rad51 et du complexe Hop2-MND1 (Figure 17).



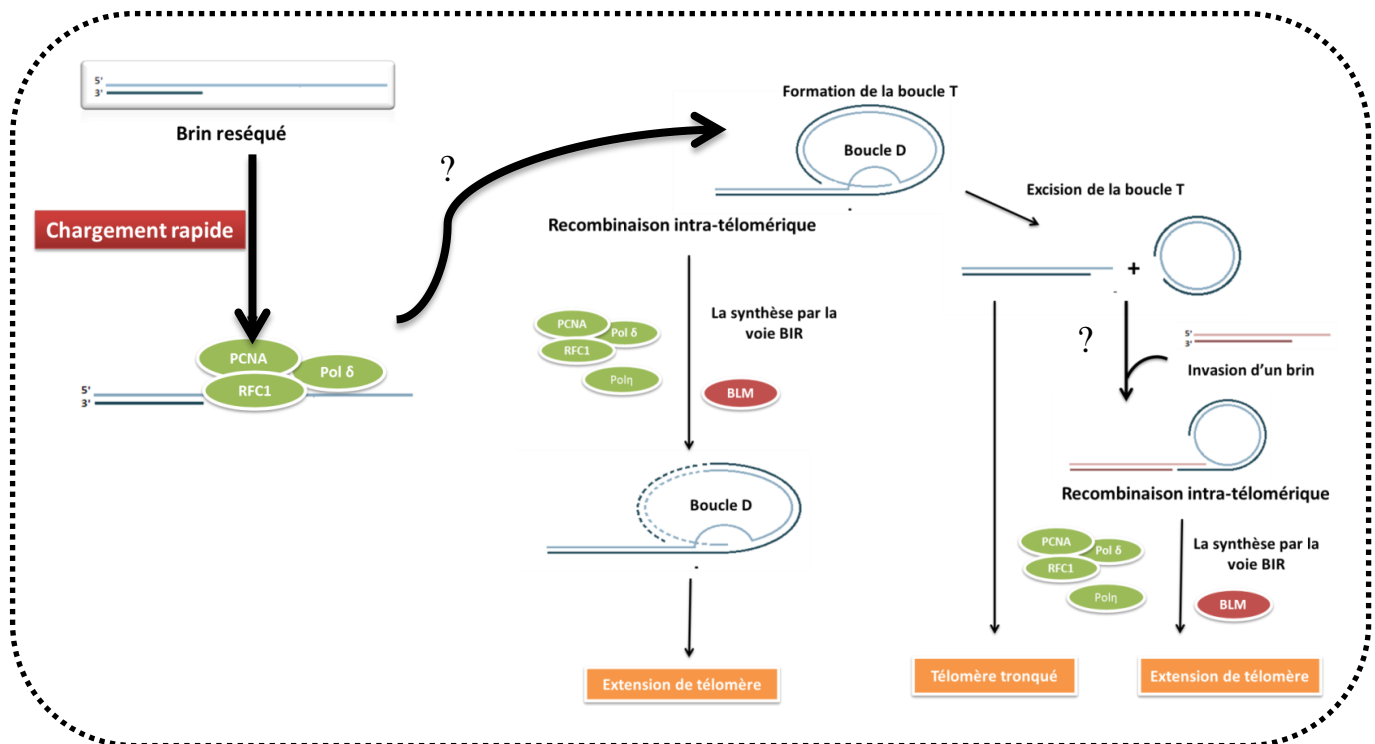
**Figure 17 : Modèle hypothétique pour l'activité de recombinaison inter-télomérique mediée par la voie de BIR au niveau des télomères des cellules ALT**

Bien que le complexe Rad51/Hop2-Mnd1 se charge plus lentement au niveau des télomères endommagés, il joue un rôle important dans la recombinaison inter-télomérique. En effet, suite à la résection, l'extrémité simple brin enrichie par le complexe Rad51/Hop2-Mnd1 s'engage dans des recherches d'homologie à distance ce qui aboutit à la synthèse de l'ADN télomérique par une recombinaison inter-télomérique induite par la voie de BIR et utilisant les ADN polymérase  $\eta$  (Pol $\eta$ ) et  $\delta$  (Pol $\delta$ ). Le complexe BLM/RMI1/RMI2/TOP3A favorise cette synthèse suivie par une dissolution télomérique. Bien que BLM nécessite à la fois POLD3 (Pol $\delta$ ) et Rad51 pour initier ces événements il était toujours capable de promouvoir l'allongement télomérique en absence de Rad51. D'autre part, la synthèse des télomères peut être inhibée par le complexe SLX4-SLX1-ERCC4, qui induit la résolution des structures intermédiaires de la recombinaison suite à l'invasion des brins télomériques, ce qui déclenche un événement d'échange entre les télomères en l'absence d'une extension télomérique. (Inspiré de Sobinoff et al., 2017, Sobinoff et Pickett., 2017, Dilley et al., 2016)

#### 4.3.2.1.2 ALT implique des mécanismes de recombinaison intra-télomériques indépendants de rad51

Bien que le brin 3' simple brin créé après la résection soit capable d'initier l'invasion de brins inter-télomériques, il pourra aussi subir une invasion de brins intra-télomériques formant une boucle T à l'extrémité du télomère. Les boucles T se forment naturellement au niveau des télomères à l'aide du complexe shelterin, ce qui empêche les extrémités des chromosomes d'être reconnues comme des CDB. La propension à former une boucle T annule l'exigence de Rad51

dans les recombinaisons intra-téломériques. D'une manière intéressante, il est convenu de noter que dans l'étude de Cho, tous les télomères endommagés ne présentaient pas des foyers de Rad51 (Cho et al., 2014). D'autre part, la CDB générée par le système TRF1-FokI a induit une augmentation de la synthèse des télomères par la voie de BIR en réponse au dommage à l'ADN télomérique (Dilley et al., 2016). En plus, cette synthèse mesurée par l'incorporation de BrdU télomérique n'a pas été altérée suite à la délétion de Rad51 et Hop2 (Homologous Pairing). Dans les cellules ALT, plusieurs mécanismes de recombinaison indépendants de Rad51 y compris la recombinaison intra-téломérique se servant de la boucle T ou bien des ECTR comme matrice, sont abondants au niveau des télomères endommagés, et peuvent éviter le recours à la protéine Rad51 pour la synthèse de l'ADN télomérique (Figure 18).



**Figure 18 : Modèle hypothétique pour l'activité de recombinaison intra-téломérique médiée par la voie de BIR au niveau des télomères des cellules ALT**

L'ADN télomérique simple brin généré par la résection induit une réponse de dommage à l'ADN qui est détectée rapidement par le complexe PCNA/RFC1/POLD3(Pol $\delta$ ), ce qui aboutit à une activation de la recombinaison intra-téломérique indépendante de Rad51. Le mécanisme n'est pas très bien connu. Plusieurs études suggèrent que l'extrémité simple brin créée envahit l'ADN double brin du même télomère pour former une boucle en T. Cette dernière peut subir aussi une excision pour produire un télomère tronqué et un cercle télomérique, marqueur du phénotype ALT. La configuration de boucle en T ainsi qu'un télomère (en rouge) dont le brin a envahi un cercle d'ADN télomérique peuvent servir de matrice pour la recombinaison intra-téломérique médiée par la voie de BIR qui utilise le réplisome PCNA/RFC1/POLD3(Pol $\delta$ ) pour la synthèse des télomères. (Inspiré de Claussin et Chang., 2015, Dilley et al., 2016, Sobinoff et al., 2017)

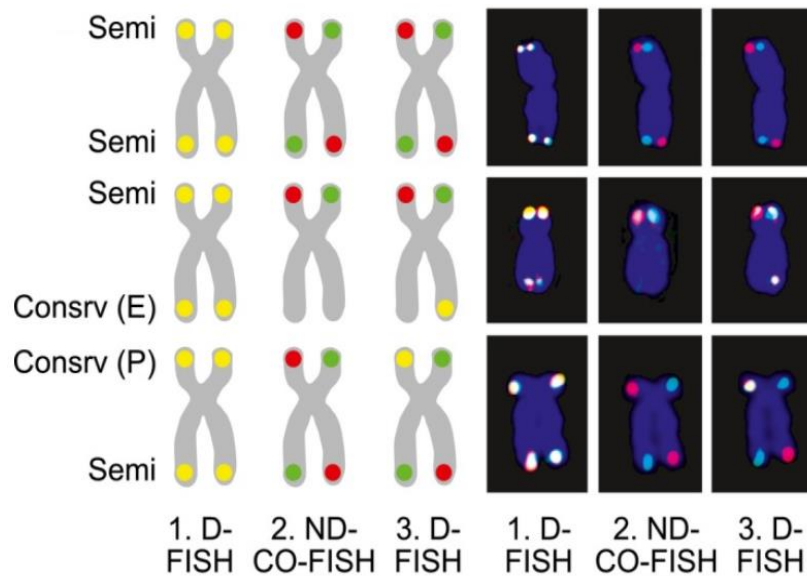
L'ensemble de toutes ces données suggère que les lésions aiguës de l'ADN télomérique impliquent un mécanisme de recombinaison intra-télomérique indépendant de Rad51 et médié par la voie de BIR pour la synthèse des télomères. Ce mécanisme serait analogue à celui des survivants de Type II chez la levure, et ne nécessite pas de recherche d'homologie à longue distance pour l'élongation des télomères.

Ces études indiquent collectivement que le mécanisme ALT peut impliquer à la fois des voies dépendantes et indépendantes de Rad51, conduisant à la recombinaison inter et intra-télomérique respectivement. On ne sait toujours pas quelles sont les conditions qui déclenchent l'activation de chacune de ces deux voies de synthèse des télomères dans les cellules ALT, et s'il s'agit d'une activation simultanée ou pas des deux mécanismes dans la cellule.

#### **4.3.2.1.3. Les détails moléculaires de la synthèse des télomères dans les cellules ALT**

Les détails moléculaires de l'extension des télomères dans les cellules ALT ont longtemps été considérés comme une énigme. La réplication génomique induite par la voie de BIR dans les cellules humaines dépend de la sous-unité POLD3 de la polymérase Pol $\delta$  (Costantino et al., 2014). POLD3 est nécessaire pour stabiliser le complexe Pol $\delta$  et interagit directement avec PCNA, appelée protéine à pince coulissante qui se lie aux ADN polymérases afin d'augmenter leur processivité pour l'ADN (Ducoux et al., 2001). PCNA est aussi impliquée dans le déplacement des brins lors de la recombinaison, elle participe à la réplication en se fixant sur l'ADN par le facteur RFC (Replication factor C). Deux articles récents ont identifié POLD3 comme étant le principal constituant d'un replisome requis pour la synthèse conservatrice des télomères endommagés par la voie de BIR dans les cellules ALT. La première étude a utilisé un protocole de triple FISH pour distinguer les deux types de réplication de l'ADN télomérique : semi-conservatrice et conservatrice (Roumelioti et al., 2016) (Figure 19). En effet, la délétion de POLD3 a diminué la fréquence des télomères ALT répliqués de façon

conservatrice, marqueurs de la voie de BIR, ainsi que le signal télomérique dans les cellules métaphasiques, suggérant une baisse de la longueur des télomères induite par la voie de BIR.



**Figure 19 : Réplication conservatrice de l'ADN au niveau des télomères des cellules humaines ALT**

La technique de triple FISH est utilisée pour distinguer entre la réplication semi conservatrice et conservatrice de l'ADN télomérique. Les exemples de chromosomes illustrés en représentation schématique (à gauche) ainsi qu'en image réelle (à droite) montrent la réplication télomérique semi-conservatrice (Semi) et conservatrice (Consrv) sur la totalité du télomère (E) ou bien sur une partie du télomère (P). D-FISH, denaturing FISH; ND-CO-FISH, non-denaturing CO-FISH (Roumelioti et al., 2016).

La deuxième étude a montré un recrutement intense de POLD3 au niveau des CDB télomériques générées par le système TRF1-FokI, et l'absence de POLD3 entraînait une diminution de la synthèse des télomères induite par la voie de BIR (Dilley et al., 2016). Cette dernière étude a révélé aussi que le chargement rapide de PCNA médié par le facteur RFC au niveau des télomères endommagés semblerait le premier senseur du dommage à l'ADN sur lequel le replisome non canonique comprenant Pol $\delta$ -PCNA-RFC1 s'assemblerait afin d'initier la synthèse des télomères par la voie de BIR indépendante de rad51. D'autre part, le chargement de Rad51 et de Hop2 au niveau des télomères endommagés ainsi que les recherches

d'homologie à distance qui en résultent se produisent plus lentement et ne sont pas essentiels pour la majeure partie de la synthèse de l'ADN télomérique médiée par la voie de BIR.

D'une manière intéressante, une étude a montré que les télomères des cellules ALT étaient enrichis par plusieurs facteurs impliqués dans la synthèse de l'ADN translésionnelle (TLS), tel que l'ADN polymérase Pol $\eta$  (Garcia-Exposito et al., 2016). TLS constitue un processus par lequel les ADN polymérases de basse-fidélité sont capables de contourner les lésions de l'ADN lors de la réplication (Sale, 2013). L'absence de Pol $\eta$  conduisait à une synthèse tardive de l'ADN télomérique par POLD3 dans les cellules ALT. Les auteurs ont proposé un rôle important de Pol $\eta$  dans le control du stress réplcatif au niveau des télomères ALT stimulant par la suite la synthèse de l'ADN télomérique par la polymérase Pol $\delta$  (Garcia-Exposito et al., 2016).

Une fois l'étape de synthèse télomérique accomplie, la structure intermédiaire ou D-loop subit soit une résolution soit une dissolution générant des produits croisés et/ou non croisés, comme déjà mentionné. Dans les cellules humaines, la résolution est catalysée par la nucléase SLX4, qui recrute les endonucléases spécifiques tel que SLX1, MUS81-EME1 et ERCC1 / ERCC4 (Svendsen et al., 2009, Sarbajna et al., 2014). En revanche, la dissolution est catalysée par l'hélicase BLM de type RecQ ainsi que d'autres protéines associées tel que TOP3A et RMI1/2 formant un complexe appelé BTR (Wu and Hickson, 2003, Wu et al., 2006). Sobinoff et ses collaborateurs ont révélé que BLM et SLX4 sont activement engagées pour traiter les structures intermédiaires de la recombinaison au niveau des télomères ALT (Sobinoff et al., 2017). En effet, SLX4 augmentait la fréquence des T-SCE détectées par CO-FISH au niveau des télomères ALT, cela a été considéré comme un marqueur positif de l'activité ALT. Toutefois, cette augmentation de l'échange télomérique est contrecarrée par BLM, qui, en plus de son activité hélicases, catalysait la dissolution grâce au complexe BTR (Figure 17).

D'autre part, SLX4 empêchait le recrutement de POLD3 au niveau des télomères inhibant ainsi l'allongement télomérique dans les cellules ALT, alors que BLM favorisait ce recrutement conduisant à une synthèse de longues séquences télomérique médiée par la voie de BIR. Cette synthèse induite par BLM est partiellement dépendante de Rad51 prouvant l'implication d'une recombinaison inter-télomérique. Par conséquent, les auteurs ont apporté

une preuve supplémentaire sur le rôle de BLM et SLX4 dans la recombinaison inter-télomérique (Figure 17). En effet, en marquant les télomères par une étiquette, la surexpression de BLM a provoqué une augmentation des étiquettes inter-télomériques, alors que la surexpression de SLX4 a conféré l'effet opposé. Bien que Rad51 déclenche les événements de synthèse des télomères, BLM était toujours capable de promouvoir l'extension télomérique en absence de Rad51. Ils ont proposé que les événements de synthèse indépendants de Rad51 peuvent être le résultat d'une recombinaison intra-télomérique où le chargement de POLD3-PCNA-RFC1 au niveau des télomères endommagés est plus rapide que celui de Rad51 et de Hop2 (Dilley et al, 2016), et que BLM facilite ces événements intra-télomérique en éliminant les structures télomériques qui gênent la synthèse des télomères (Biffi et al, 2013) (Figure 18).

Ces données évoquent ensemble que le complexe BTR favorise la synthèse des télomères par la voie de BIR suivie par la dissolution télomérique et que BLM nécessite à la fois POLD3 et Rad51 pour initier ces événements. Toutefois, la synthèse des télomères est contrecarrée par le complexe SLX4-SLX1-ERCC4, qui inhibe l'association de POLD3 au niveau des télomères favorisant ainsi la résolution télomérique. Par conséquent, la résolution ou la dissolution des intermédiaires de recombinaison formés suite à l'invasion des brins pourrait représenter un moyen de contrôle pour empêcher la synthèse télomérique incontrôlée par la voie de BIR.

## **5. La répression du phénotype ALT dans les cellules normales**

L'activité ALT résulte de la perte de répresseurs dans les cellules somatiques normales et également dans les cellules télomérase-positives. Ceci a été démontré en fusionnant des cellules ALT GM847 avec des fibroblastes normaux, ou avec des cellules immortalisées télomérase-positives résultant en une suppression de l'activité ALT (Perrem et al., 1999). Cette hypothèse a été évoquée à la suite des résultats de Nakabayashi et ses collaborateurs qui ont montré que l'introduction du chromosome 7 dans les cellules SUSM-1 ALT provoquait la sénescence et la perte de télomères hétérogènes (Nakabayashi et al., 1997). D'autres preuves tel que les pertes



d'hétérozygotie sur des régions du chromosome 6 et 8 ont permis l'induction du phénotype ALT (Kumata et al., 2002, Shigeeda et al., 2003), ainsi la répression du mécanisme ALT dans les cellules normales ou les cellules télomérase-positives peut être le résultat de plusieurs mutations ou plusieurs gènes indépendants.

Plusieurs études suggèrent que la perte de gènes suppresseurs d'ALT conduirait à l'établissement du phénotype ALT dans les cellules télomérase-négatives. Bien que ces gènes ne soient pas encore bien élucidés plusieurs candidats ont été proposés. En effet, la grande majorité des lignées cellulaires ALT présentent une mutation dans le gène P53 qui est supposée réprimer le mécanisme ALT par sa capacité d'inhiber la recombinaison homologue au niveau des télomères (Razak et al., 2004). Rogan et ses collaborateurs ont montré que des cellules ALT immortalisées peuvent dériver de cellules de patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni suite à une perte d'expression de P53 et P16INKA (Rogan et al., 1995). Ces données sont cohérentes avec d'autres travaux qui ont suggéré que la principale voie d'oncosuppresseurs altérée dans les cellules ALT soit p53 / Rb / INK4 (Sakellariou et al., 2013). D'autre part, la machinerie du système du Mis Match Repair (MMR) représente un autre exemple de gène répresseur d'ALT. Il a été montré qu'une élongation des télomères par le mécanisme ALT est possible lorsque la télomérase est inhibée dans des cellules de cancer de colon déficientes en MMR (Bechter et al., 2004).

Une étude a évalué l'effet de la sous-expression d'ATRX dans les fibroblastes et les cellules épithéliales, afin de déterminer si la perte de ce gène induisait le phénotype ALT (Napier et al., 2015). Ils ont constaté que la déplétion d'ATRX dans les cellules épithéliales ne favorisait pas l'activation du mécanisme ALT. Cependant, son absence dans les fibroblastes conduisait à l'effet inverse. Bien que la perte d'ATRX soit liée au mécanisme ALT, il semble qu'elle n'est pas suffisante pour l'activer complètement, même dans les lignées cellulaires de fibroblastes. Il existe d'autres changements épigénétiques ainsi que d'autres protéines pouvant interagir avec ATRX afin d'induire ce phénotype. L'étude menée par Clynes et ses collaborateurs dans des cellules ALT U2OS, déficientes en ATRX, a révélé que la réexpression de cette protéine supprime le phénotype ALT et si elle est désactivée le phénotype est acquis à nouveau (Clynes et al., 2015). Cependant, une stabilisation des G quadruplex (en utilisant la pyridostatine) a empêché ATRX d'inhiber le mécanisme ALT. Cette dernière étude a également révélé que cette

inhibition dépendait de DAXX du fait que la réexpression d'ATRX dans les cellules déficientes en DAXX n'était pas capable de bloquer le phénotype ALT (Clynes et al., 2015).

En se basant sur les travaux de plusieurs études, plusieurs facteurs, qui représentent en partie des sources de stress réplicatif, ont contribué d'une manière directe ou indirecte à la mise en place et la régulation du mécanisme ALT. On note les facteurs génétiques, le recouvrement des télomères par les protéines du complexe shelterin et surtout l'état de la chromatine qui ont participé dans l'activation du phénotype ALT en favorisant un état plus permissif à la recombinaison homologue dans ces cellules (Figure 20).

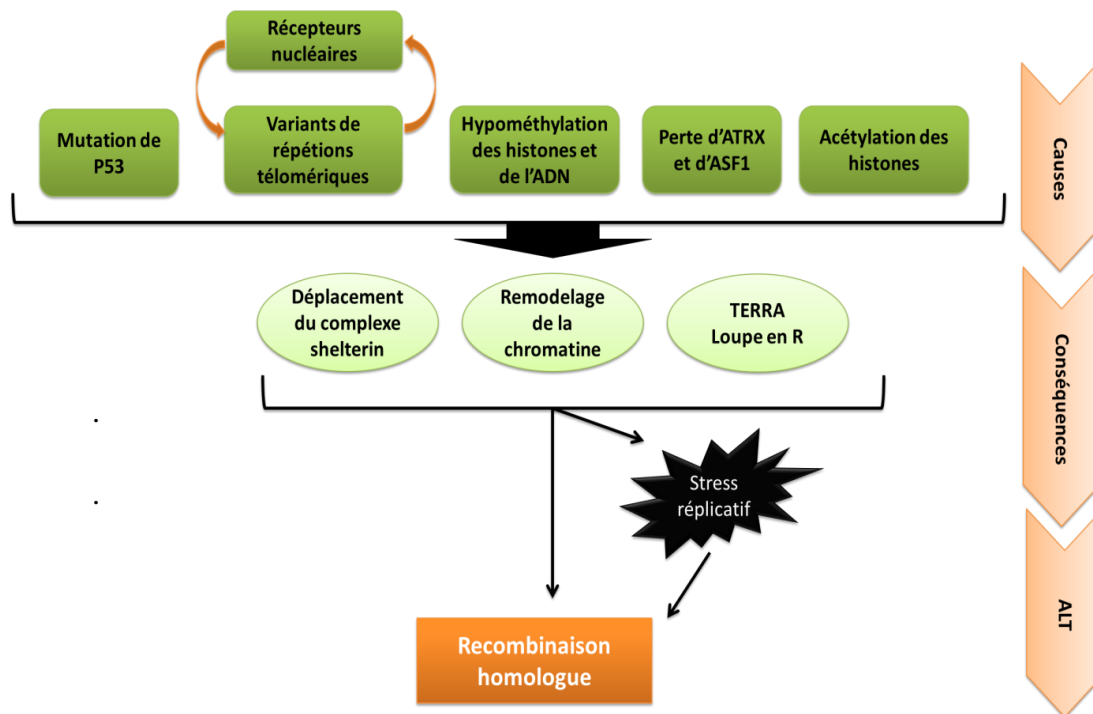


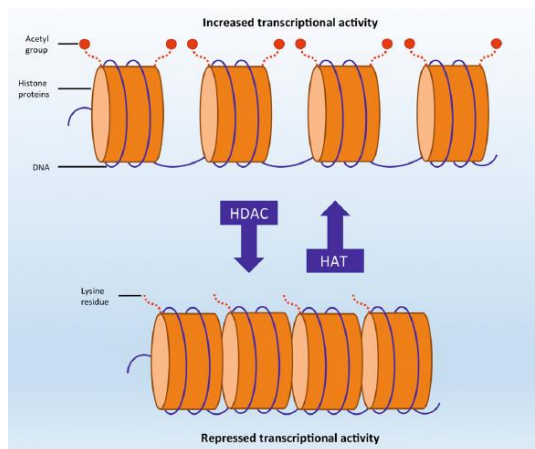
Figure 20 : Les événements moléculaires pour l'établissement du mécanisme ALT

### III. PCAF ET GCN5

#### 1. Acétylation: généralité

Le premier niveau d'organisation de la chromatine dans le noyau des cellules eucaryotes repose sur son empaquetage sous forme d'unités de base appelées nucléosomes. Il s'agit d'un octamère d'histones, formé de deux copies de chacune des histones H2A, H2B, H3 et H4, autour duquel s'enroule un segment d'ADN de 147 paires de bases (pb) (Kornberg and Lorch, 1999, Kouzarides, 2007). La structure de la chromatine est connue pour avoir un impact majeur sur les niveaux de transcription. Certaines enzymes et complexes protéiques régulent l'expression des gènes en modifiant l'état de la chromatine par de nombreux mécanismes. Ces modifications regroupent la phosphorylation, l'ubiquitination, la ribosylation et la méthylation (Morton Bradbury, 1992), mais le mécanisme le mieux caractérisé est l'acétylation catalysée par les enzymes histone acétyl transférase (HAT). Ces diverses modifications peuvent avoir lieu sur des résidus spécifiques et adjacents des histones, leurs différentes combinaisons définiraient un code épigénétique qui serait lu par des co-régulateurs transcriptionnels et traduit en un état de chromatine particulier : actif ou inactif.

L'action de ces HAT consiste à transférer un groupe acétyle de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) à un groupe  $\epsilon$ -amino de la lysine dans la région N-terminale d'une histone (Loidl, 1994). L'acétylation qui neutralise une partie de la charge positive portée par la lysine, est supposée affaiblir les interactions ADN-histone ou nucléosome-nucléosome et provoquer un changement de conformation de la structure des nucléosomes rendant la chromatine plus relâchée et plus accessible aux facteurs de transcription (Hong et al., 1993, M. Fletcher and Hansen, 1996). Par conséquent, une chromatine acétylée est associée à une activation de la transcription (Figure 19). Finalement, l'acétylation des histones est un processus réversible, et les désacétylases font également partie intégrante des cycles de transcription. Bien que l'acétylation soit généralement associée à l'activation de la transcription, la désacétylation a tendance à être en corrélation avec la répression de la transcription – ces deux processus fonctionnent en harmonie pour réguler et atteindre des niveaux de transcription appropriés dans la cellule (Kuo and Allis, 1998) (Figure 19).



**Figure 21: La régulation de l'expression des gènes en changeant la conformation de la chromatine par des enzymes modifiant les histones.** L'addition du groupe acétyle sur les résidus de lysine par les HAT, réduit l'affinité entre les histones et l'ADN, libérant ainsi la chromatine (euchromatine) et activant des facteurs de transcription. En revanche, la désacétylation mediée par les HDAC conduit à un état plus compact de la chromatine (hétérochromatine) et donc à la répression de l'expression des gènes. (van den Bosch et al., 2016)

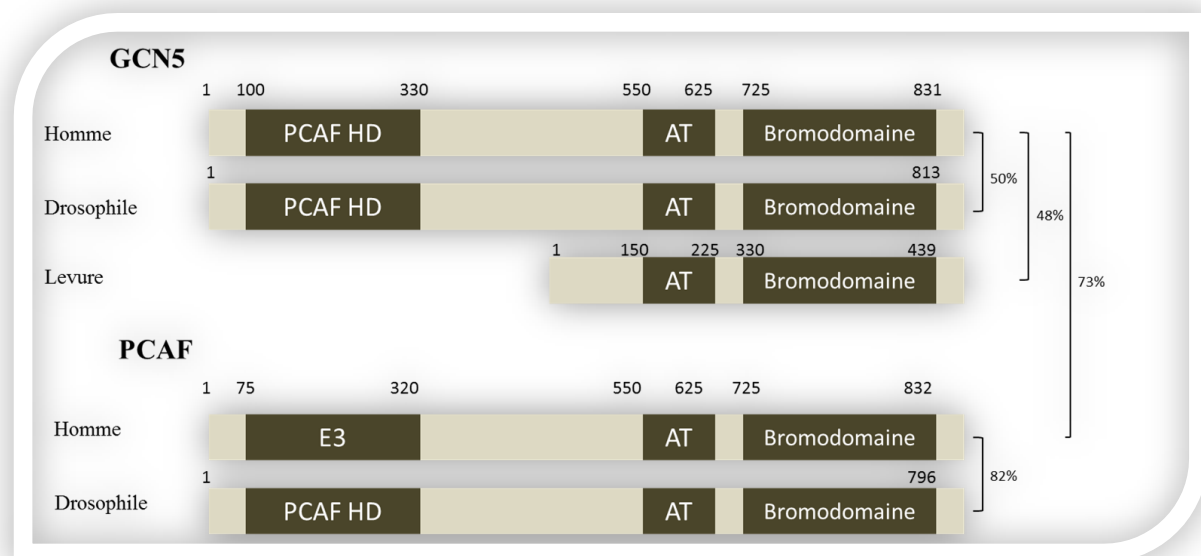
## 2. PCAF et GCN5 : généralités

Les premières histones acétyl-transférases (HAT), HAT A chez *tetrahymena* et Gcn5 chez la levure, ont été évoquées il y a moins de 20 ans par Allis et ses collègues (Brownell et al., 1996).

Les HAT sont classées en fonction de leur localisation cellulaire, elles sont divisées en nucléaires (type A) et cytoplasmiques (type B) (Garcea and Alberts, 1980). Alors que les HAT cytoplasmiques sont très peu connues, plusieurs HAT nucléaires ont été identifiées et divisées en trois grandes familles par homologie de leur structure primaire: la famille MYST, qui comprend MOZ, YBF2 / SAS3, SAS2 TIP60 et autres protéines (Sapountzi and Côté, 2011); la famille P300/CBP qui est formée de P300 et de CBP (Ogryzko et al., 1996), et la famille GNAT (Gcn5 related N-acetyltransferase) représentée principalement par GCN5 (General Control Nonderepressible et PCAF (p300/CBP-Associated Factor) (Neuwald and Landsman, 1997, Vetting et al., 2005). Bien que d'autres familles de HAT nucléaires aient été identifiées, elles n'ont pas fait l'objet d'études approfondies. Ceci montre que malgré des efforts significatifs, le domaine des HAT n'est toujours pas complètement exploré. Dans cette thèse, on s'intéresse aux

HAT PCAF et GCN5 qui généralement jouent un rôle majeur dans la régulation de la transcription de plusieurs gènes. Etant capables d'acétyler des résidus lysine sur des protéines non-histones telles que HMG17, HMGI(Y), MyoD, p53 ET c-Myb, ces HAT PCAF et GCN5 sont qualifiées de lysine (K) acétyl-transférases (KAT) (Imhof et al., 1997).

Le gène *gcn5* (ou *Kat2a* situé en q21 sur le chromosome 17) code pour la protéine qui s'avère fortement conservée au cours de l'évolution, et cela des protozoaires à la levure jusqu'à l'homme. Toutefois, il est intéressant de noter que chez les métazoaires GCN5 dispose d'une partie N-terminale en plus et qui est absente chez la levure et les protozoaires (Figure 21) (Nagy and Tora, 2007). En recherchant des homologues à la protéine Gcn5 de levure, deux gènes paralogues ont été découverts chez les vertébrés : GCN5 et PCAF. Le gène *pcaf* ou *Kat2b* situé en p24 sur le chromosome 3, code pour une protéine qui interagit avec p300/CBP, d'où son nom PCAF pour P300/CBP Associated Factor.



**Figure 21 : Structure des protéines GCN5 et PCAF.**

Représentation schématique et organisation des différents domaines de PCAF et GCN5 chez l'homme, la drosophile et la levure. Le pourcentage d'homologie entre les deux protéines est représenté à droite. PCAF HD= PCAF homology domain, AT= acetyl transferase et E3= Ubiquitin E3 ligase domain (inspiré de Nagy and Tora, 2007)

GCN5 et PCAF présentent 73 % d'identité ainsi que la même organisation structurale (Figure 21). De même, la structure de leurs domaines est aussi très conservée (Nagy and Tora,

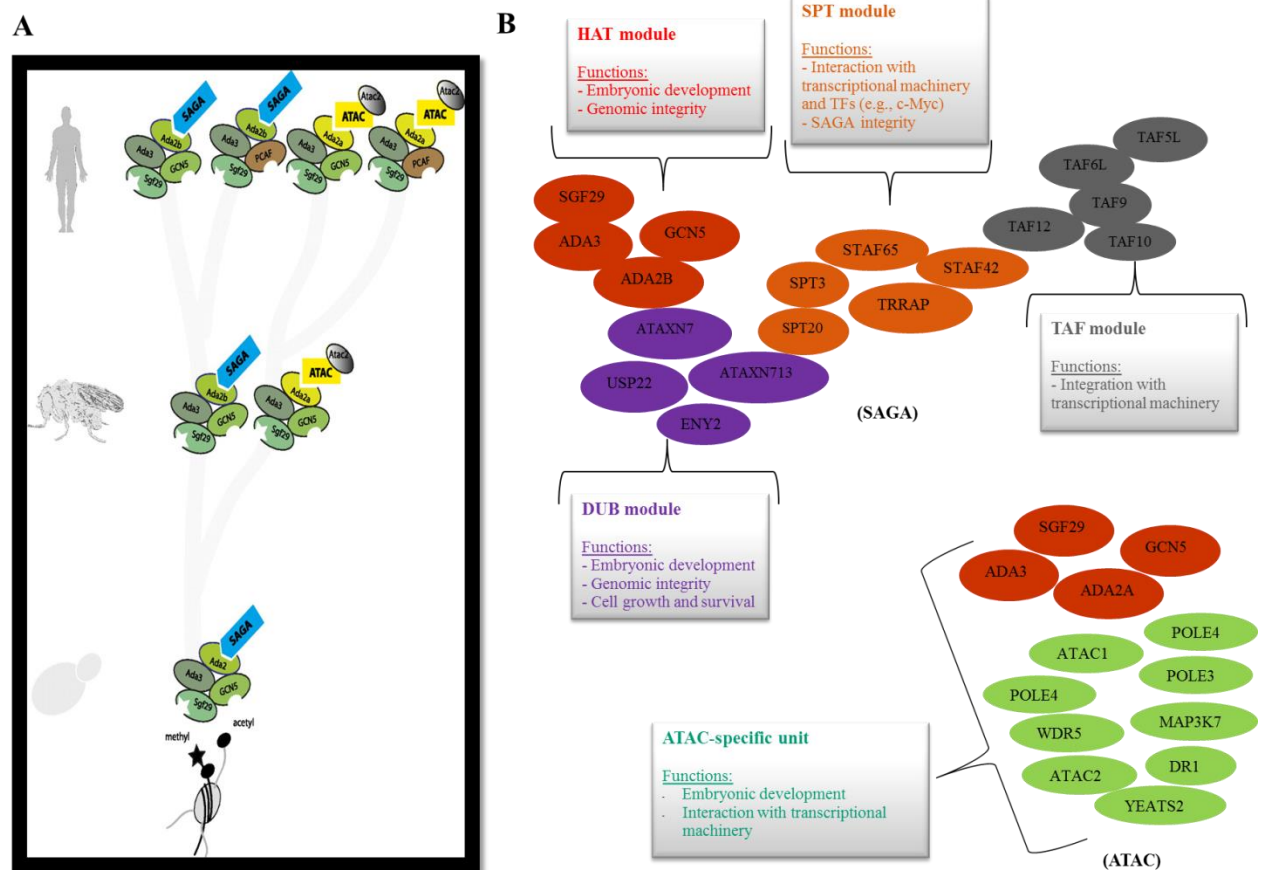
2007). La région C terminale contient un domaine catalytique acétyl-transférase (AT) et un bromodomaine permettant la liaison aux lysines acétylées afin de promouvoir l'activité HAT de PCAF et GCN5 (Figure 19). Une région N-terminale contenant un domaine d'homologie PCAF (PCAF-HD : PCAF homology domain) qui n'est pas présent dans la protéine Gcn5 de levure. PCAF possède un domaine d'ubiquitine E3 ligase fonctionnel au sein du domaine PCAF-HD, lui conférant une activité d'ubiquitine ligase supplémentaire à celle de HAT (Linares et al., 2007). En effet, par son domaine E3 ligase, PCAF joue un rôle par exemple dans la voie de régulation de p53. Ainsi, elle peut activer p53 en l'acétylant et, en parallèle, ubiquitiner Hmd2, un régulateur négatif de p53, qui sera dégradée empêchant ainsi la destruction de p53.

GCN5 et PCAF partagent des activités partiellement redondantes, toutefois elles montrent également des fonctions spécifiques. En effet, leur absence chez la souris n'induit pas les mêmes phénotypes. Les cellules déficientes en GCN5 sont létales et les embryons meurent au stade E10.5 tandis ce que les souris mutantes PCAF<sup>-/-</sup> sont viables et se développent normalement (Xu et al., 2000). D'autre part, il a été montré que ces deux protéines acétylent préférentiellement les histones 3 en particulier la lysine 14, avec GCN5 ayant la capacité d'acétyler en plus les lysines K8 et K16 de l'histone H4 (Kuo et al., 1996, Schiltz et al., 1999). En se basant sur une technique avancée de spectrométrie de masse, Kuo et ses collaborateurs ont trouvé que Gcn5 acétyle six lysines sur l'histone 3 avec l'efficacité suivante: Lys-14 > Lys-9 > Lys-23 > Lys-18 > Lys-27 ≈ Lys-36 (Kuo and Andrews, 2013).

Il est également intéressant de noter que GCN5 et PCAF sont toutes les deux exprimées dans la majorité des tissus humains et sont très abondantes dans les muscles squelettiques. Bien que GCN5 soit prédominante dans le pancréas, PCAF se trouve fortement exprimée dans le cœur (Yang et al., 1996).

Chez les mammifères il existe deux complexes : ATAC et SAGA (aussi nommés STAGA ou TFTC), qui chacun possède une activité HAT portée par GCN5 ou PCAF (Wang et al., 2008, Spedale et al., 2012). ATAC a émergé plus tard au cours de l'évolution de SAGA et il est présent exclusivement chez les eucaryotes multicellulaires (Figure 22A). Jusqu'à nos jours le complexe ATAC est moins caractérisé que le complexe SAGA. Bien que les deux complexes partagent plusieurs composants catalytiques surtout du module HAT, ils possèdent des sous-

unités spécifiques représentées dans la figure 22 B. En résumé, le complexe SAGA se distingue par son module de deubiquitination (DUB) formé des protéines USP22, ATXN7L3, ATXN7 et ENY2, son module TAF (TATA-binding-protein-Associated Factor) contenant des protéines liées au facteur de transcription ainsi que son module SPT caractérisé surtout par la protéine TRRAP (Transformation/transcription domain-associated protein) et d'autres protéines associées. D'autre part, ATAC dispose de deux sous-unités à activité HAT, Gcn5 / Pcaf et Atac2, il comporte la sous-unité Ada2a au lieu d'Ada2b et d'autres composants absents dans le complexe SAGA (Spedale et al., 2012, Wang and Dent, 2014).



**Figure 22 : Représentation schématique des complexes SAGA et ATAC**

A. Divergence et multiplication du complexe SAGA durant l'évolution, l'incorporation des sous-unités Ada2a ou Ada2b détermine s'il s'agit du complexe ATAC ou SAGA, respectivement. B. Illustration des complexes SAGA et ATAC contenant chacun la sous-unité Gcn5, et de leurs fonctions chez les mammifères. Contrairement à SAGA, les interactions physiques entre les sous-unités d'ATAC sont moins bien définies (adapté de Spedale et al., 2012, Wang and Dent, 2014).

### **3. Les rôles de PCAF et GCN5 dans l'oncogénèse**

Bien que PCAF et GCN5 semblent inhiber l'oncogénèse en potentialisant l'activité des suppresseurs de tumeurs ou bien des protéines pro-apoptotique, ils peuvent servir aussi des cofacteurs pour plusieurs oncoprotéines et avoir ainsi un rôle oncogène.

#### **3.1. Rôle de PCAF/GCN5 comme inhibiteurs de l'oncogénèse**

PCAF et/ou GCN5 régulent l'activité de plusieurs protéines telles que p53, Ku70 et RPA1, impliquées principalement dans la réponse et la réparation des dommages à l'ADN. Les stress cellulaires, y compris les dommages à l'ADN déclenchant l'acétylation de p53 par p300 / CBP et PCAF, sont connus pour activer la protéine p53 (Liu et al., 1999). p53 acétylée est capable d'induire la transcription de gènes cibles tels que p21, une protéine qui contrôle le cycle cellulaire (Scolnick et al., 1997). En outre, PCAF est impliquée dans l'activation de la transcription de p21 médiée par p53, ceci en acétylant les histones du promoteur de p21 suite au dommage à l'ADN (Love et al., 2012). Il est important de noter que PCAF favorise la stabilité de p53 non seulement par son activité d'acétylation, mais aussi en agissant sur la dégradation de MDM2 comme plus haut. De même, GCN5 peut modifier la chromatine afin de réguler l'activité transcriptionnelle de p53 (Candau et al., 1997). Une étude récente a montré que l'acétylation de RPA1 par PCAF/GCN5 joue un rôle important dans la réponse au dommage à l'ADN induite par la voie de réparation NER (Nucleotide Excision Repair) suite à l'exposition aux rayons UV (Zhao et al., 2017).

D'autre part, Ku70 est impliquée dans la réparation par la voie NHEJ en se liant aux extrémités des cassures double brin ainsi que dans l'apoptose médiée par Bax, une protéine pro-apoptotique. En effet, face à un dommage à l'ADN, Ku70 se détache de la protéine SET / TAF-I $\beta$  (une sous-unité d'un complexe inhibiteur de l'activité HAT), elle sera acétylée par PCAF puis recrutée au niveau de la CDB pour induire la réponse par la voie NHEJ (Kim et al., 2014).



De même, il a été révélé que l'acétylation de Ku70 par PCAF pourrait perturber l'interaction entre Bax et Ku70, entraînant ainsi la mort cellulaire par apoptose (Cohen et al., 2004).

### **3.2. Rôle de PCAF/GCN5 dans l'oncogenèse**

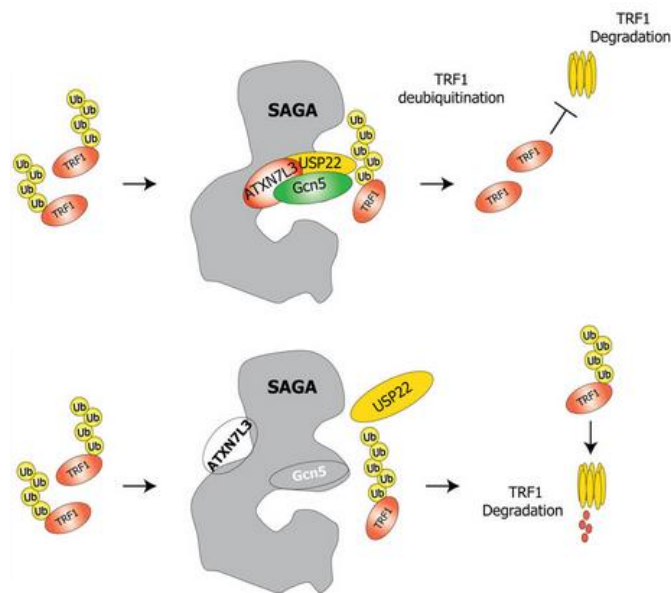
PCAF/ GCN5 ils peuvent servir aussi des cofacteurs pour plusieurs oncoprotéines telles que c-Myc et participer ainsi dans l'oncogenèse (Frank et al., 2001). Il a été révélé que PCAF et GCN5 participent dans le développement du cancer de l'ovaire et du sein en interagissant avec BRCA1 et BRCA2 (Fuks et al., 1998, Oishi et al., 2006). En plus des études ont mis en évidence l'implication de PCAF et de GCN5 dans la progression de divers types de cancer tel que le cancer du poumon et le cancer hépatique respectivement (Wan et al., 2015, Majaz et al., 2016). D'autre part, il semble que PCAF et GCN5 jouent un rôle important dans le cancer du cerveau. Il a été montré que PCAF est surexprimée dans les astrocytomes pédiatriques en comparaison avec le tissu normal du cerveau (Eguía-Aguilar et al., 2013). Ces deux protéines servent de cofacteurs clés pour stimuler la prolifération des cellules de médulloblastomes, de glioblastomes ou de neuroblastomes (Malatesta et al., 2013, Secci et al., 2014, Zhang et al., 2015). Toutes ces données soulignent l'importance de PCAF et GCN5 comme cibles thérapeutiques potentielles pour différents type de cancers, elles servent d'atouts pour le développement de plusieurs types d'inhibiteurs de ces deux protéines.

## **4. Les lysines acétyl transférases et les télomères**

Le rôle de PCAF dans la maintenance des télomères n'a pas été décrit jusqu'à présent. Cependant, Atanassov et al ont montré que l'inhibition de GCN5 génèrait des fusions et des dommages à l'ADN au niveau des télomères dans des lignées télomérase positives et dans des cellules embryonnaires murines. Par des approches biochimiques, ils ont démontré que l'association de GCN5 dans le complexe SAGA est nécessaire pour l'activité d'USP22 qui en

déubiquitinant TRF1 empêche sa dégradation par le protéasome ce qui aboutit à la protection des télomères (Atanassov et al., 2009) (Figure 23).

De manière intéressante, Her et al ont trouvé que P300 et non pas PCAF est présent au niveau de l'ADN télomérique. P300 contribue au maintien de télomères fonctionnels en acétylant le résidu lysine 293 de la protéine télomérique TRF2 inhibant ainsi sa protéolyse et stabilisant sa présence sur les télomères (Her and Chung, 2013)



**Figure 23 : Un modèle proposé pour le rôle de GCN5 et USP22 dans le turnover de TRF1**  
(inspiré d'Atanassov et al., 2009)

# **Les objectifs des travaux de thèse**

Les quinze dernières années de recherches fondamentales et cliniques ont permis d'immenses progrès dans l'efficacité des traitements anticancéreux. Malgré ces avancées thérapeutiques considérables, plusieurs défis restent à surmonter, tels que la diversité des mécanismes d'oncogenèse et le développement de différents types de résistance par les cellules cancéreuses qui réduit l'efficacité des traitements conventionnels. La recherche s'oriente ainsi de plus en plus vers l'identification de traitement personnalisé.

Parmi les différents types de cancers, ceux utilisant le mécanisme ALT occupent une place à part. Ce mécanisme est particulièrement mal connu est pourrait pourtant représenter une cible thérapeutique spécifique. En effet, à l'instar de la télomérase, il confère aux cellules une caractéristique essentielle des cellules cancéreuses, leur capacité de prolifération de manière quasi-illimitée.

La première partie de ma thèse a porté sur la recherche de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans ALT. En se basant sur une étude transcriptomique entre des modèles de cellules souches de gliomes ALT et non ALT dont nous disposions dans le laboratoire, nous avons identifié l'implication de deux lysines acétyl transférases homologues PCAF et GCN5 dans les mécanismes alternatifs à la télomérase. J'ai cherché à comprendre le rôle de ces deux protéines ainsi que les mécanismes moléculaires qu'ils utilisent pour réguler le phénotype ALT.

Dans un second temps à évaluer l'intérêt thérapeutique de l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité lysine activité acétyl transférase de PCAF et/ou GCN5 seuls ou en combinaison avec l'irradiation pour le traitement des tumeurs ayant le phénotype ALT.

# **Résultats et discussion**

# Résultats et discussion - I

---

## I. Introduction

Bien qu'il soit convenu que la recombinaison homologue soit le mécanisme majeur utilisé par les cellules ALT pour maintenir leurs télomères, ses acteurs moléculaires sont encore mal connus. Dans le but de caractériser de nouvelles protéines régulatrices de la voie ALT, notre équipe a réalisé une étude comparative de transcriptome de CSG ALT TG20 versus d'autres lignées de CSG télomérase-positives. Cette analyse a permis d'obtenir une liste de gènes surexprimés ou sous-exprimés dans les cellules ALT dont les variations d'expression reliées au mécanisme ALT ont été confirmées par la suite avec une autre lignée ALT de référence (SAOS-2). L'équipe s'est ainsi intéressée à PCAF, une lysine acétyl transférase surexprimée dans les cellules ALT mais dont le rôle dans la maintenance des télomères n'avait pas été rapporté.

Pour évaluer l'implication de PCAF dans la régulation de la maintenance des télomères, nous avons réduit l'expression du gène correspondant en traitant nos cellules ALT avec des siRNA spécifiques. En parallèle, nous avons évalué l'effet de l'inhibition de GCN5, une lysine acétyl transférase homologue de PCAF, sur le phénotype ALT en utilisant la même stratégie. En effet, bien que GCN5 ne figurait pas dans la liste des gènes d'intérêt mis en évidence par l'étude transcriptomique, il avait été montré comme un régulateur de la protection des télomères dans les cellules télomérase-positives. En effet, Atanassov et ses collaborateurs avaient proposé un rôle de GCN5 dans la maintenance des télomères en régulant le « turn-over » de la protéine télomérique TRF1 dans les cellules télomérase-positives, via ses interactions avec le module de déubiquitination USP22 et le complexe SAGA (Atanassov et al, 2009).

Les résultats de notre étude ont montré que les inhibitions de PCAF et de GCN5 induisaient des effets opposés sur différents marqueurs du mécanisme ALT. Sachant que PCAF et GCN5 sont mutuellement exclusives dans le complexe SAGA, l'étape suivante de notre travail a consisté à chercher à comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels PCAF et GCN5 pourraient réguler la voie ALT.

## II. Publication

### Opposite Effects of GCN5 and PCAF Knockdowns on the Alternative Mechanism of Telomere Maintenance

Maya Jeitany<sup>1,2,3,4,#</sup>, Dalal Bakhos-Douaihy<sup>1,2,3,4,#</sup>, David C. Silvestre<sup>1,2,3,4</sup>, Jose R. Pineda<sup>1,2,3,4</sup>, Nicolas Ugolin<sup>5</sup>, Angela Moussa<sup>1,2,3,4</sup>, Laurent R. Gauthier<sup>1,2,3,4</sup>, Didier Busso<sup>2,6</sup>, Marie-Pierre Junier<sup>7,8,9,#</sup>, Hervé Chneiweiss<sup>7,8,9,#</sup>, Sylvie Chevillard<sup>5</sup>, Chantal Desmaze<sup>1,2,3,4</sup>, François D. Boussin<sup>1,2,3,4,\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire de Radiopathologie, CEA, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>2</sup>INSERM UMR967, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>3</sup>Université Paris VII, UMR967, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>4</sup>Université Paris XI, UMR967, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>5</sup>Laboratoire de Cancérologie Expérimentale, iRCM, DSV, CEA, Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>6</sup>CIGEx, IRCM, 18 route du Panorama, 92265 Fontenay-aux-Roses

<sup>7</sup>CNRS UMR8246 Neurosciences Paris Seine - IBPS; Team Glial Plasticity; 7 quai

Saint-Bernard, 75005 Paris, France.

<sup>8</sup>Inserm U1130, Neurosciences Paris Seine - IBPS; Team Glial Plasticity; 7 quai Saint-Bernard, 75005 Paris, France.

<sup>9</sup>University Pierre and Marie Curie UMCR18, Neurosciences Paris Seine - IBPS; Team Glial Plasticity; 7 quai Saint-Bernard, 75005 Paris, France.

#Contributed equally to this work.

\* For correspondence: François Boussin, Tel.: +33 1 46 54 97 91; E-mail: [boussin@cea.fr](mailto:boussin@cea.fr). Maya Jeitany, E-mail: [maya\\_jjy@hotmail.com](mailto:maya_jjy@hotmail.com).

**KEY WORDS:** PCAF, GCN5, telomere recombination, ALT.

## Opposite effects of GCN5 and PCAF knockdowns on the alternative mechanism of telomere maintenance

Maya Jeitany<sup>1,2,3,4,\*</sup>, Dalal Bakhos-Douaihy<sup>1,2,3,4,\*</sup>, David C. Silvestre<sup>1,2,3,4</sup>, Jose R. Pineda<sup>1,2,3,4</sup>, Nicolas Ugolin<sup>5</sup>, Angela Moussa<sup>1,2,3,4</sup>, Laurent R. Gauthier<sup>1,2,3,4</sup>, Didier Busso<sup>2,6</sup>, Marie-Pierre Junier<sup>7,8,9,\*</sup>, Hervé Chneiweiss<sup>7,8,9,\*</sup>, Sylvie Chevillard<sup>5</sup>, Chantal Desmaze<sup>1,2,3,4</sup>, François D. Boussin<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Radiopathologie, CEA, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>2</sup>INSERM UMR967, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>3</sup>Université Paris VII, UMR967, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>4</sup>Université Paris XI, UMR967, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>5</sup>Laboratoire de Cancérologie Expérimentale, iRCM, DSV, CEA, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>6</sup>CIGEx, IRCM, Fontenay-aux-Roses, France

<sup>7</sup>CNRS UMR8246 Neuroscience Paris Seine-IBPS, Team Glial Plasticity, Paris, France

<sup>8</sup>Inserm U1130, Neuroscience Paris Seine-IBPS, Team Glial Plasticity, Paris, France

<sup>9</sup>University Pierre and Marie Curie UMCR18, Neuroscience Paris Seine-IBPS, Team Glial Plasticity, Paris, France

\* These authors contributed equally to this work

**Correspondence to:** François D. Boussin, **email:** boussin@cea.fr  
Maya Jeitany, **email:** maya\_jjy@hotmail.com

**Keywords:** PCAF, GCN5, telomere recombination, ALT

**Received:** June 07, 2016

**Accepted:** February 06, 2017

**Published:** February 17, 2017

**Copyright:** Jeitany et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### ABSTRACT

**Cancer cells can use a telomerase-independent mechanism, known as alternative lengthening of telomeres (ALT), to elongate their telomeres. General control non-derepressible 5 (GCN5) and P300/CBP-associated factor (PCAF) are two homologous acetyltransferases that are mutually exclusive subunits in SAGA-like complexes. Here, we reveal that down regulation of GCN5 and PCAF had differential effects on some phenotypic characteristics of ALT cells. Our results suggest that GCN5 is present at telomeres and opposes telomere recombination, in contrast to PCAF that may indirectly favour them in ALT cells.**

### INTRODUCTION

Telomere elongation capacity has been shown to be one of the prominent features of cancer cells. While telomerase activity is required for most cancer cells, others use a different telomere maintenance mechanism, referred to as alternative lengthening of telomeres (ALT). ALT is thought to be based on homologous recombination (HR)-dependent DNA replication. Some of the main characteristics of ALT cells are the absence of telomerase activity, heterogeneity in telomere length, formation of ALT-associated promyelocytic leukaemia (PML) nuclear bodies (APBs) containing telomeres, and a high frequency of telomere sister chromatid exchanges (T-SCEs) [1].

The shelterin proteins are key players in the homeostasis of chromosome ends that function by capping and thus protecting telomeres and also by modulating the recruitment of telomerase [2]. Shelterin proteins are subject to post-translational modifications, such as phosphorylation, SUMOylation or ubiquitination [3]. These modifications can affect their recruitment to telomeres or their interactions with other proteins or regulate their turnover, resulting in telomeric changes. In ALT cells, formation of APBs can thus be prevented by disrupting the SUMOylation of both the shelterin proteins TRF1 and TRF2 [4]. In telomerase-positive cells, the lysine acetyltransferase general control non-derepressible 5 (GCN5), which is a *bona fide* component of the large



multi-subunit complex SAGA (SPT-ADA-GCN5 acetyltransferase), regulates the turnover of TRF1 [5]. GCN5 is required for the association of SAGA with USP22, which is the component of its deubiquitination module, and the subsequent USP22-mediated deubiquitination of TRF1, which inhibits TRF1 degradation by proteasomes, thereby preventing signalling associated with telomere DNA damage and protecting telomeres from fusions.

P300/CBP-associated factor (PCAF) is another lysine acetyltransferase that shares ~73% amino acid sequence identity with GCN5 [6]. GCN5 and PCAF are mutually exclusive subunits of different SAGA-like or Ada-Two-A-containing (ATAC)-like complexes [7–11]. These complexes contain mutual subunits but are responsible for regulating distinct substrates or targets and thus have different biological roles. PCAF, which possesses an intrinsic ubiquitination activity [12], is involved in many cellular processes, such as transcription, differentiation, proliferation and apoptosis [8, 13]. It modulates the activities of several oncogenes and tumour repressors through acetylation of either histones or transcription factors, consequently impacting cancer progression. In contrast with GCN5, PCAF has not been shown to have a role in telomere maintenance to date.

Down-regulation of *gcn5* has been reported in ALT cell lines [14], whereas upregulation of its homologue *pcaf* expression has been shown to be associated with ALT in mice with lymphoma [15]. Here, we show that the depletion of GCN5 or PCAF in ALT cell lines induces differential effects on some ALT features, which suggests that GCN5 down-regulates ALT through its interactions with USP22, whereas PCAF may indirectly increase telomere recombination in ALT cells.

## RESULTS

### GCN5 but not PCAF interacts with telomeric proteins in both ALT and telomerase-positive cells

We used the human osteosarcoma ALT cell line SAOS-2 and the human ALT glioma stem cells (GSC) line TG20 [16, 17] to investigate the importance of GCN5 and PCAF in ALT cells. These cell lines express *gcn5* and *pcaf* genes at both mRNA and protein levels (Supplementary Figure 1A–1E). Noticeably, PCAF to GCN5 protein ratio was higher in TG20 cells, than in telomerase-positive (non ALT) human GSCs (TG16, TG1N, OB1 and TG10 [17], Supplementary Figure 1C).

Immunostaining of GCN5 resulted in diffuse nuclear staining, and that of PCAF led to the formation of very large nuclear foci, preventing the investigation of their localization at telomeres (Supplementary Figure 1D–1E). We therefore performed *in situ* Proximity Ligation Assay (PLA, [18, 19]) to search for potential interactions between GCN5 and PCAF and the telomeric proteins TRF1 and TRF2 (Figure 1).

*In situ* PLA enables the detection of interactions of two distinct proteins by using primary antibodies raised from different species and species-specific secondary antibodies coupled to oligonucleotides. When the two proteins are in close proximity, the oligonucleotides from the secondary antibodies form a circular DNA molecule that can be amplified by rolling circular amplification (RCA) and visualized by the fluorescent labelling of oligonucleotides [18, 19].

PLA signals were observed using the anti-GCN5 and anti-TRF2 antibodies (Figure 1B) and were found to be present at a higher frequency using the anti-GCN5 and anti-TRF1 antibodies in both ALT and telomerase-positive cells (Figure 1C), which is consistent with a previous report showing that GCN5 interacts with telomeric proteins [5]. Consistent with the well-known association of these two lysine acetyltransferases [6], PLA revealed many interactions of PCAF with P300 (Figure 1D). However, no PLA signals were detected using the anti-PCAF and anti-TRF2 (Figure 1E) or the anti-TRF1 (Figure 1F) antibodies in ALT or non-ALT cells.

Proteasome inhibition has been shown to increase the interactions between TRF1 and GCN5 in telomerase-positive cells [5]. Consistently, we showed that treatment with a proteasome inhibitor, MG132, dramatically increased the number and intensity of PLA signals using GCN5 and TRF1 antibodies in both ALT and non-ALT cells (Figure 1C). However, this treatment did not promote any interactions between PCAF and TRF1 (Figure 1F).

These results confirmed the interactions of GCN5 with telomeric proteins in ALT cells as in telomerase-positive cells, contrary to PCAF that does not directly interact with telomeres.

### Opposite effects of GCN5 and PCAF knockdown on T-SCE in ALT cells

To investigate the importance of GCN5 and PCAF in ALT cells, we knocked down their expression using specific siRNAs (siGcn5 and siPcaf, respectively). As shown in Figure 2A, both GCN5 and PCAF were down-regulated at the RNA level by more than 80% compared to their expression in cells transfected with siCtrl at 48 h after transfection. We found that siGcn5 did not alter the *pcaf* mRNA level and that siPcaf did not affect the *gcn5* mRNA level (Figure 2A), ruling out both cross-reactions of the siRNAs due to the high level of homology between *gcn5* and *pcaf* and transcriptional cross-regulation between these two lysine acetyltransferases. The siRNA-mediated down-regulation of these mRNAs was further confirmed at the protein level (Figure 2B).

Inhibition of *gcn5* or *pcaf* expression did not have any significant short-term effect on cell viability or cell cycle progression in SAOS-2 ALT cells or HeLa cells (Supplementary Figure 2A–2D).

ALT-mediated telomeric elongation is related to frequent HR events, commonly referred to as T-SCEs [20]. We thus assessed whether GCN5 and PCAF knockdowns interfere with T-SCEs by performing CO-FISH on metaphase chromosomes [21, 22].

As previously described, T-SCEs are detected at high frequencies in metaphase spreads of ALT cells [20], such as TG20 and SAOS-2 cells (Figure 2C), but they are rare or absent in non-ALT cells, such as HeLa cells (Supplementary Figure 3A–3B). As shown in Figure 2D, GCN5 knockdown increased the frequency of T-SCEs by  $1.41 \pm 0.06$ -fold in the TG20 cells and by  $1.77 \pm 0.16$ -fold in the SAOS-2 cells (Figure 2D). By contrast, PCAF knockdown significantly decreased the frequency of T-SCEs by  $0.39 \pm 0.04$ -fold ( $p < 0.001$ ) in TG20 cells and by  $0.42 \pm 0.06$ -fold ( $p < 0.001$ ) in SAOS-2 cells compared to that in the cells transfected with siCtrl (Figure 2D).

GCN5 knockdown had no effect on the frequency of T-SCEs in telomerase-positive HeLa cells (Supplementary

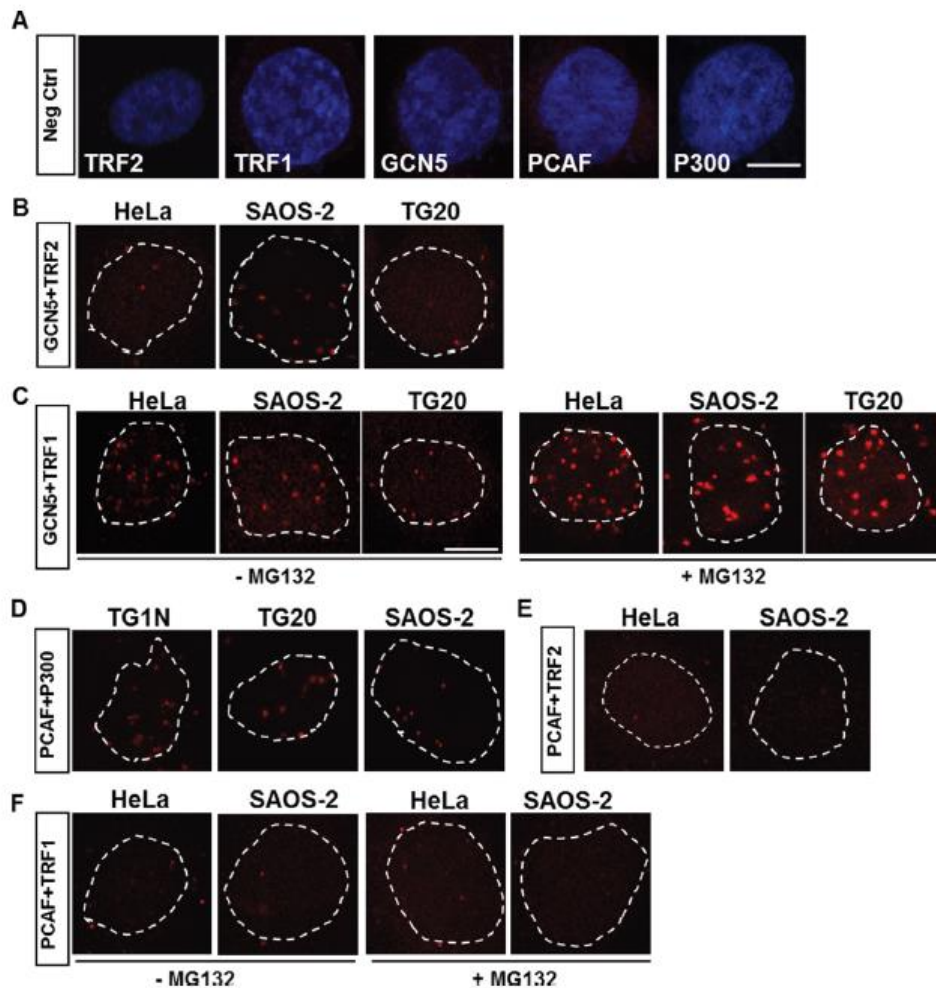
Figure 3B), demonstrating that the increase in T-SCEs caused by GCN5 knockdown was specific to ALT cells.

These data suggest thus that GCN5 may down-regulate telomere recombination in ALT cells, contrasting with PCAF, which may favour them.

### PCAF knockdown or GCN5 over-expression decreases the number of APBs in ALT cells

We next investigated the effects of the knockdown of these genes on another hallmark of ALT cells, APBs, which are PML bodies in which telomeres are elongated, that are present in ALT cells and absent in non-ALT cells [23]. The co-localization of PML bodies with telomeres was scored at 48 h after transfection with siCtrl, siGcn5 or siPcaf (Figure 3A).

GCN5 depletion did not induce a significant change in the number of APBs in TG20 cells ( $5.93 \pm 0.28$  and  $5.71 \pm 0.3$  for siGcn5 and siCtrl, respectively,  $p = 0.59$ ,



**Figure 1: In situ proximity ligation assays (PLAs) for detection of protein-protein interactions.** (A) Representative PLA results for negative controls using only one of the primary antibodies against TRF2, TRF1, GCN5, PCAF or P300. The nuclei were stained with DAPI (blue). (B–F) Representative PLA results for telomerase-positive (TG1N and HeLa) and ALT (SAOS-2 and TG20) cell lines, using different combinations of primary antibodies. An interaction or close proximity between two proteins is demonstrated by a red spot resulting from a rolling circular amplification (RCA) reaction performed using labelled oligonucleotides. Nuclei are outlined with dashed white lines. In C and F, cells were treated or not with a proteasome inhibitor, MG132, at 1.5 h prior to fixation. Scale bar = 10 μm.

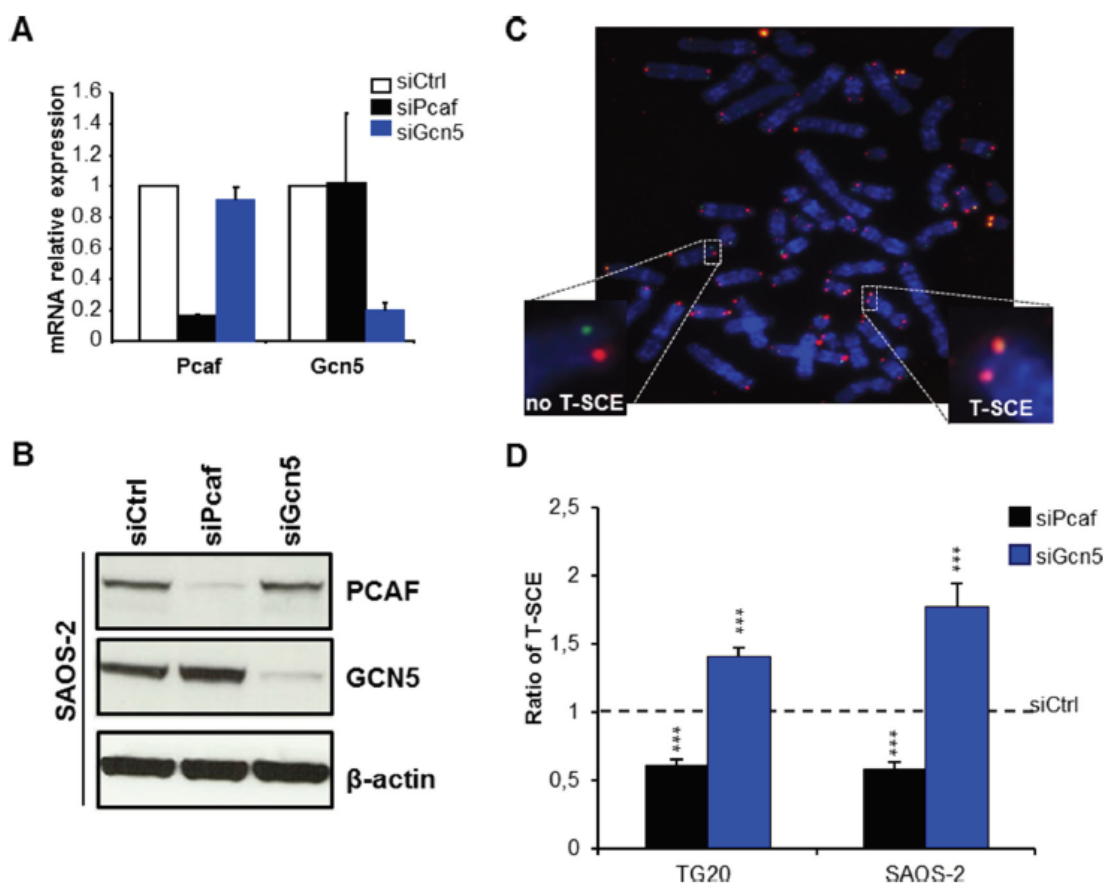


Figure 3B–3C) or SAOS-2 cells ( $5.05 \pm 0.17$  and  $5.56 \pm 0.23$  for siGcn5 and siCtrl, respectively,  $p = 0.07$ , Figure 3D–3E). In contrast, PCAF knockdown decreased the average numbers of APBs in both the TG20 cells ( $4.29 \pm 0.25/\text{cell}$  and  $5.3 \pm 0.31/\text{cell}$  for siPcaf and siCtrl, respectively,  $p = 0.012$ , Figure 3F–3G) and SAOS-2 cells ( $3.1 \pm 0.15/\text{cell}$  and  $4.33 \pm 0.18/\text{cell}$  for siPcaf and siCtrl, respectively,  $p < 0.001$ , Figure 3H–3I). We then tested whether overexpressing GCN5 in SAOS-2 ALT cells can affect APB formation. We found a decrease in the average number of APBs in cells overexpressing GCN5 48h after transfection ( $5.89 \pm 0.40$  and  $7.11 \pm 0.44$  for GCN5-GFP and Ctrl-GFP transfected SAOS-2 cells, respectively,  $p = 0.0173$ , Figure 3J–3K and Supplementary Figure 4).

Thus, our data showed that the increase in T-SCEs was not associated with an increase in the number of APBs in GCN5 knockdown cells, however, overexpressing GCN5 altered APB formation in ALT cells. On the other

hand, the decrease in T-SCEs in PCAF knockdown cells seems to be associated with a decrease in APBs. This last finding is consistent with a previous report showing that inactivation of the ALT mechanism is associated with the suppression of APB formation [23, 24].

P300, an interactor of PCAF, can bind to and acetylate the telomeric protein TRF2 [30]. To test whether P300 mediates the effect of PCAF on APBs, we scored the number of APBs in the absence of P300, PCAF or both P300 and PCAF. We found that depleting P300 alone reduced the APB formation in SAOS-2 and TG20 ALT cells but did not further decrease the number of APBs in combined absence of PCAF (Supplementary Figure 5A, 5C and 5F). The efficiency of siRNAs and transcripts of PCAF and P300 were verified in all conditions by qRT-PCR (Supplementary Figure 5B, 5D–E, 5G–H). These results indicate that PCAF and P300 may be cooperating in regulating APB formation.



**Figure 2: Opposite effects of PCAF and GCN5 down-regulation on telomere sister chromatid exchanges (T-SCEs) in ALT cells.** (A) mRNA expression levels of PCAF and GCN5 in TG20 cells transfected with siPcaf or siGcn5 relative to their expression in cells transfected with siCtrl, demonstrating the efficiency and specificity of the siRNAs. The error bars are the SEM from two independent experiments performed in duplicate. (B) Protein expression of PCAF and GCN5 in SAOS-2 cells transfected with siCtrl, siPcaf or siGcn5, also demonstrating the efficiency and specificity of the siRNAs. (C) Representative metaphase of SAOS-2 cells labelled using the CO-FISH technique. Successive hybridizations with an FITC-labelled (TTAGGG)<sub>3</sub> PNA probe (green) and then with a Cy-3-labelled (CCCTAA)<sub>3</sub> PNA probe (red) allowed for detection of the parental telomere C and G strands, respectively, by fluorescence microscopy. Yellow-stained telomeres were scored as T-SCE events. (D) T-SCE ratio after PCAF or GCN5 down-regulation. T-SCE ratios in TG20 and SAOS-2 cells transfected with siCtrl and siPcaf or siGcn5. The values are the ratio of T-SCE events (+SEM) relative to siCtrl for each cell line (ns=not significant, \*\*\* $p < 0.001$ , as determined by Student's *t*-test). Between 2000 and 3500 chromosome extremities were analysed.

## Opposite effects of GCN5 and PCAF knockdown on telomere instability in ALT cells

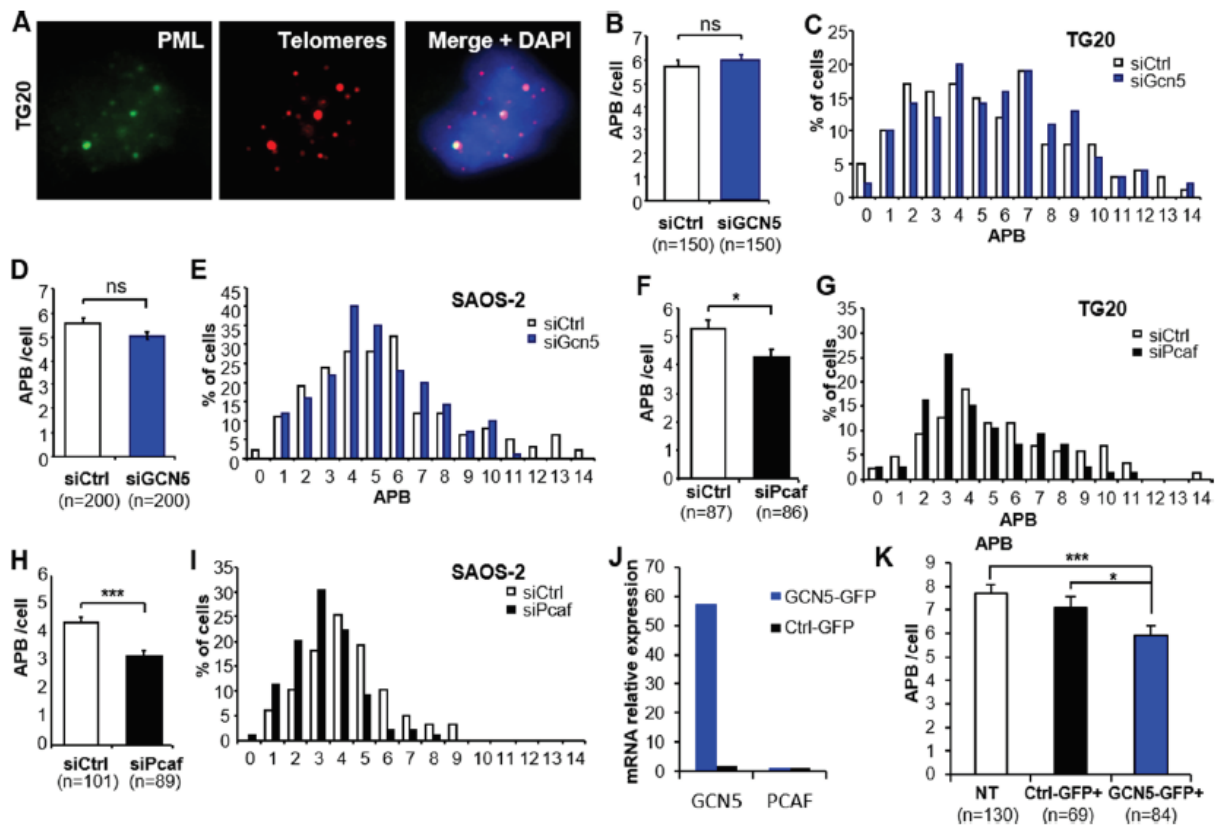
We assessed whether GCN5 or PCAF knockdown had an effect on telomere stability. We performed Telo-FISH on metaphase cells obtained at 48 h after transfection as previously described [22, 25].

Telomeres of ALT cells have been shown to display an “intermediate state” of capping, in which the telomeres are less saturated with shelterin, thereby inducing a DNA-damage response but still inhibiting end-to-end fusions [26]. Dicentric chromosomes are rare in metaphases of TG20 and SAOS-2 cells. Interestingly, they were not induced neither after PCAF knockdown nor after GCN5 knockdown, suggesting that neither PCAF nor GCN5 knockdown altered the function of shelterin in protecting telomeres from fusions.

As previously reported [17, 24], metaphases of ALT cells had a high number of telomere aberrations in which

one or both sister chromatids lacked telomeric sequences, referred to as sister telomere losses and terminal deletions, respectively, showing a high telomere instability (Figure 4A). Interestingly, PCAF and GCN5 knockdown had opposite effects on these aberrations. While PCAF knockdown decreased sister telomere losses and terminal deletions in TG20 (Figure 4B) and SAOS-2 ALT cells (Figure 4C), GCN5 knockdown increased the frequencies of these telomere aberrations (Figure 4D–4E).

As these telomere aberrations increased or decreased very rapidly after GCN5 or PCAF knockdown, at the first or second metaphase after siRNA transfection, they are unlikely to be attributed to effects of these knockdowns on telomere erosion with cell divisions. Rather, changes in the frequencies of these aberrations likely reflect an increase or decrease in telomere instability allowing telomere recombination. Consistently, we showed that GCN5 knockdown increased telomere instability concomitant with an increase in T-SCEs, whereas PCAF knockdown



**Figure 3: Down-regulation of PCAF or overexpression of GCN5 impairs ALT-associated PML body (APB) formation.** (A) Representative staining of APBs. One APB is scored when one PML focus (green) co-localizes with one red-stained telomere (Cy-3-labeled (CCCTAA)<sub>3</sub> PNA probe). The images are reconstructed Z-stacks captured with confocal microscopy. (B–I) APB staining after GCN5 or PCAF down-regulation. APBs were scored in TG20 (B–C and F–G) and SAOS-2 (D–E and H–I) cells at 48 h after transfection with siCtrl and siGcn5 (B–E) or siCtrl and siPcaf (F–I). “n” indicates the number of counted cells. The values in B, D, F and H represent the average number of APBs per cell (+SEM). C, E, G and I show the distribution of transfected cells according to the number of APBs. (J–K) APB scoring after GCN5 overexpression in SAOS-2 cells. GCN5 and PCAF mRNA levels were determined by qRT-PCR in GCN5-GFP or Ctrl-GFP transfected SAOS-2 cells (J). APBs were scored as in A in non-transfected cells (NT) or cells transfected with control plasmid (Ctrl-GFP+) or GCN5 expressing plasmid (GCN5-GFP+). “n” indicates the number of counted cells. The values in B, D, F, H and K represent the average number of APBs per cell (+SEM). (ns = not significant, \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, and \*\*\**p* < 0.001, as determined by Student’s *t*-test).

decreased telomere instability concomitant with decreases in APBs and telomere recombination in ALT cells.

### Down-regulation of USP22 increased T-SCEs in ALT cells but had no effect on APBs

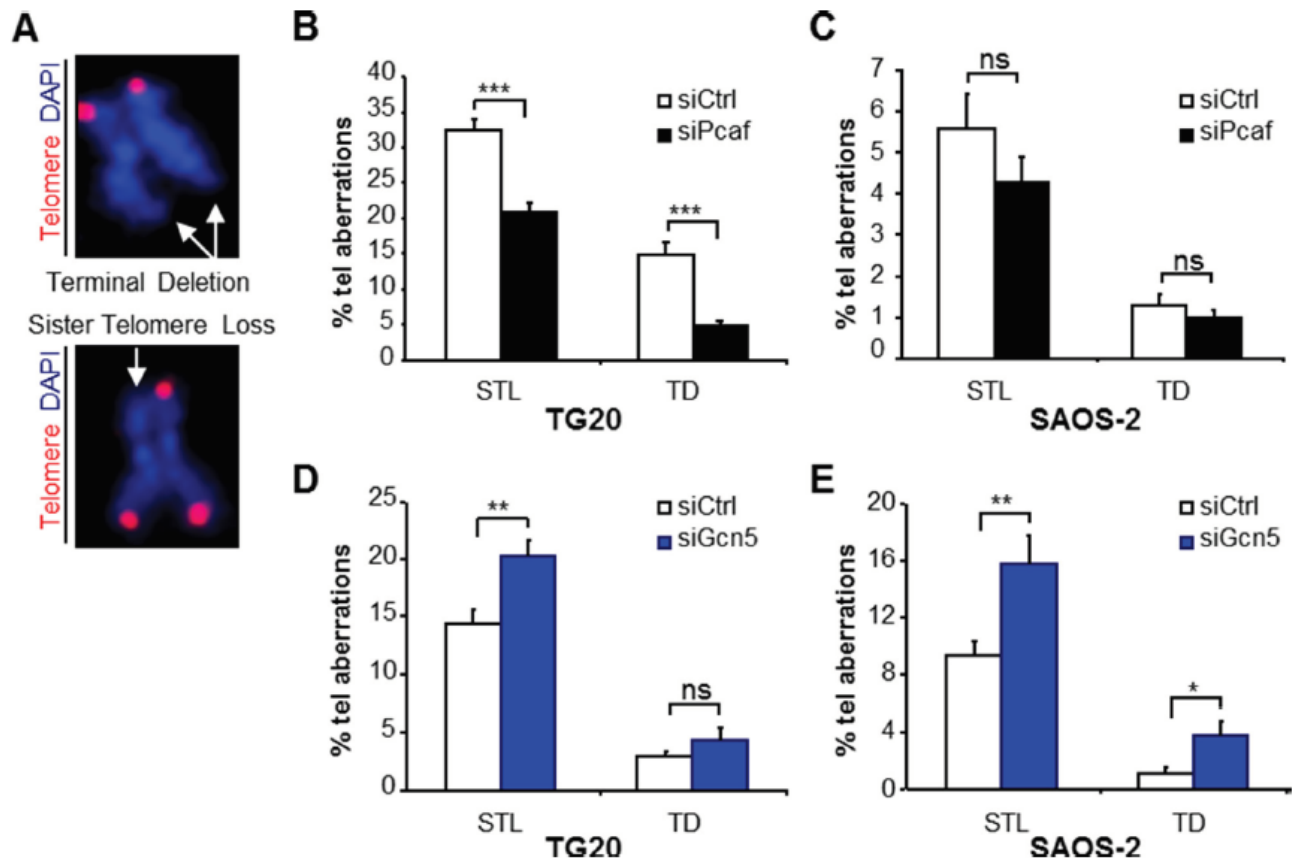
GCN5 has been reported to control TRF1 turnover via its deubiquitination by ubiquitin-specific protease 22 (USP22) [5]. Interestingly, immunostaining revealed that USP22 formed large nuclear foci that co-localized with PML bodies in telomerase-positive cells as well as in ALT cells, suggesting that USP22 is a constitutive component of PML bodies (Figure 5A). Furthermore, we showed that USP22 also co-localized with large TRF2 foci detected in ALT cells but not in HeLa telomerase-positive cells (Figure 5B), demonstrating that USP22 is also present in APBs.

Therefore, we transfected SAOS-2 cells with siUsp22, which resulted in the downregulation of USP22 mRNA by more than 97% after 48 h (Figure 6A). Interestingly we showed that USP22 knockdown increased

T-SCEs by more than 1.5-fold compared with cells treated with siCtrl (Figure 6B) but had no effect on APB formation in both SAOS-2 and TG20 cells (Figure 6D–6F). USP22 knockdown had thus the same effect on ALT characteristics as GCN5 knockdown, suggesting that GCN5 may downregulate telomere recombination in ALT cells through its interaction with USP22.

## DISCUSSION

GCN5 and PCAF are known to have different roles and targets, functioning in large multi-subunit complexes, such as SAGA-like complexes, in a mutually exclusive manner [7–11]. Here we show in two ALT cell lines that GCN5 knockdown increased T-SCE and telomere instability, whereas PCAF knockdown decreased T-SCE, APBs formation and telomere instability in ALT cells. GCN5 and PCAF knockdowns had thus differential effects on ALT, up-regulating it or down-regulating it respectively. These data support thus the hypothesis that these homologous lysine acetyl-transferases may have



**Figure 4: Opposite effects of PCAF and GCN5 down-regulation on telomere instability in TG20 GSCs and SAOS-2 cells.** (A) Telomere staining (red, Cy-3-labeled (CCCTAA)<sub>3</sub> PNA probe) of metaphase chromosomes (blue, DAPI), showing the two main types of telomere aberrations (white arrows) found in metaphase spreads of TG20 and SAOS-2 with siCtrl, siPcaf or siGcn5: terminal deletion (TD) (upper panel) and sister telomere loss (STL) (lower panel). (B–E) STL and TD frequencies (+SEM) in TG20 and SAOS-2 cells transfected with siCtrl, siPcaf (B and C) or siGcn5 (D and E). The total numbers of analysed extremities were  $n = 1914$ ,  $n = 2094$ ,  $n = 2876$  and  $n = 2788$  for siCtrl and siPcaf in B and C, respectively, and  $n = 1882$ ,  $n = 1702$ ,  $n = 2044$  and  $n = 1794$  for siCtrl and siGcn5 in D and E, respectively.

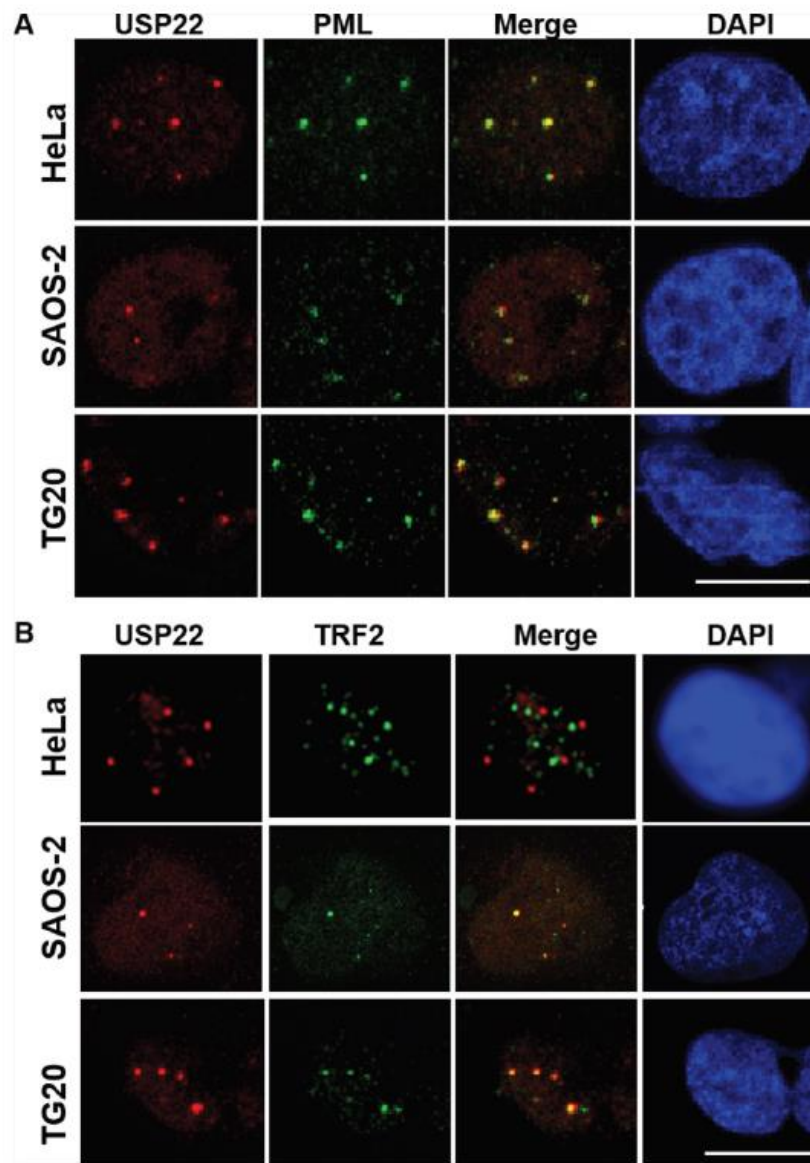


a role in the regulation of this mechanism of telomere maintenance.

We have shown that GCN5 interacts with TRF1 in ALT cells, as previously reported in telomerase-positive cells [5]. The TRF1 steady state is tightly regulated by post-translational modifications such as ubiquitination [3]. According to Atanassov et al. [5], GCN5 contributes to telomere stability in telomerase-positive cells by regulating TRF1 turnover via interacting with USP22. GCN5 has been shown to support the association of USP22 with the SAGA complex. This association allows USP22 to deubiquitinate TRF1 and to promote the binding of TRF1 to telomeres rather than undergoing ubiquitin-mediated proteolysis [5]. We have reported for the first time that USP22 is present in PML bodies and APBs in

ALT cells. Interestingly, USP22 knockdown increases T-SCEs in ALT cells but has no effect on APB and has thus similar effects to GCN5 knockdown. These findings support the hypothesis that GCN5 and USP22 act together in APBs to oppose the ALT mechanism.

TRF1 has been shown to control the association of POT1, another telomeric protein, with single-stranded telomeric DNA [27]. When present at telomeres, POT1 prevents the activation of ATR at telomeres [28], which we have recently demonstrated is critical for ALT cells [29]. This raises the hypothesis that once USP22 associates with SAGA and GCN5, it may oppose telomere recombination in APBs by promoting the binding of POT1 to telomeres via TRF1, thereby inhibiting ATR activation. Importantly, GCN5 knockdown did not increase T-SCEs in HeLa cells,



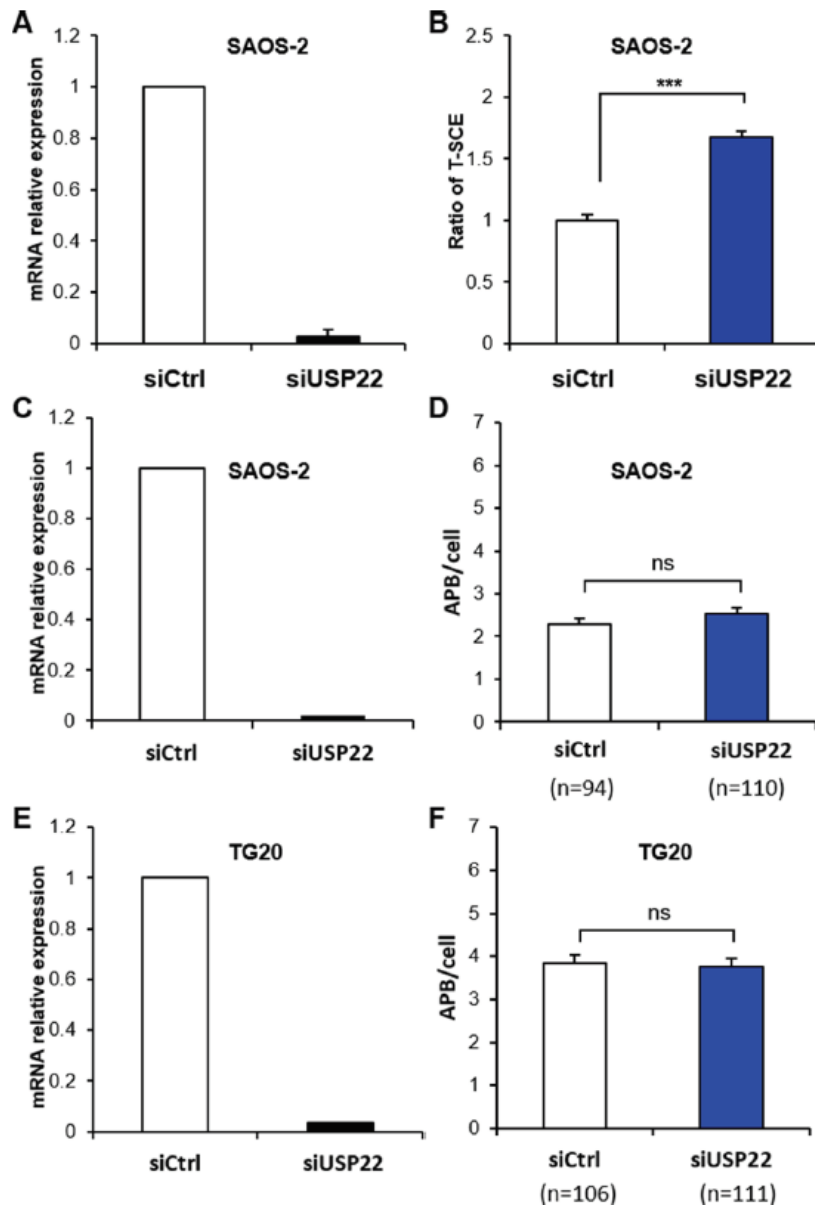
**Figure 5: USP22 is a component of PML bodies and co-localizes with telomeric proteins in ALT cells.** (A) Immunofluorescence staining for USP22 (red) and PML (green), showing the co-localization of both proteins in telomerase-positive HeLa cells and TG20 and SAOS-2 ALT cells. The nucleus is shown in blue by DAPI staining. (B) Immunofluorescence staining for USP22 (red) and TRF2 (green), showing their co-localization in SAOS-2 and TG20 ALT cells but not in HeLa telomerase-positive cells. Scale bar = 10  $\mu$ m.

showing that the downregulation of GCN5 is not able to induce the ALT mechanism in telomerase-positive cells.

In contrast with GCN5 and P300 [30], PCAF has not been shown to participate in telomere maintenance. We found that PCAF did not interact directly with telomeric proteins in ALT cells, similarly as a previous report showing that PCAF is not present at telomeres in telomerase-positive cells [30]. These findings suggest that the effects of PCAF knockdown on ALT are indirect. We have shown that both siPcaf and siP300 decreased the

number of APBs suggesting that they are involved together in APBs formation. P300 acetylates TRF2, stabilizing telomeres [30]. Further experiments are required to determine whether P300-mediated TRF2 acetylation is involved in APBs formation in ALT cells.

GCN5- and PCAF complexes share many common subunits [7–11], suggesting that GCN5 and PCAF may compete for interactions with these subunits. Knockdown of PCAF could thus increase the formation of GCN5-complexes, thereby increasing the activities of GCN5/



**Figure 6: Down-regulation of USP22 increases T-SCEs in ALT cells but has no effect on APB formation.** (A, C and E) mRNA expression level of USP22 in SAOS-2 or TG20 cells transfected with siCtrl or siUsp22, demonstrating the efficiency of the siRNAs. The error bars are the SEM from two independent experiments performed in duplicate. (B) T-SCE scoring after USP22 down-regulation in SAOS-2 cells. The values are the ratio of T-SCE events (+SEM) relative to siCtrl for each cell line. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , as determined by Student's *t*-test. (D and F) APB scoring after USP22 down-regulation. APBs were scored in SAOS-2 (D) and TG20 (F) cells at 48 h after transfection with siCtrl and siUSP22. "n" indicates the number of counted cells. The values represent the average number of APBs per cell (+SEM). (ns = not significant, as determined by Student's *t*-test).

USP22 at telomeres and, in the end, down-regulating ALT. This hypothesis is sustained by the overexpression of GCN5, showing a down regulation of the ALT mechanism as well.

Our data raise the hypothesis that the relative expressions of GCN5 and PCAF may be involved in ALT regulation. In this model, PCAF would increase ALT by competing with GCN5 for interactions with common partners, which prevents the stabilizing activities of GCN5/USP22 at telomeres. Although further studies are required to challenge this hypothesis and investigate other putative roles of GCN5 and PCAF, for instance at the transcriptional level, our data suggest that stimulating GCN5/USP22 activity can oppose to maintenance of telomeres in ALT cells and thus could be considered for the development of new therapeutic strategies in ALT cancers.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

Human glioma stem-like cells (GSCs) were derived from tumour samples and grown as previously described [16, 17, 31]. Telomerase-positive HeLa cells and SAOS-2 osteosarcoma ALT cells were also grown as previously described [16].

### Quantitative real-time PCR (qPCR)

RNA was extracted using an RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Isolated RNA was transcribed to cDNA using High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems). Quantitative PCR reactions were performed in 96-well plates in duplicate using SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) and the following primers: *gapdh* primers: forward: 5'-GTCGCCAGCCGAGCCACATC-3', reverse: 5'-GGTGACCAGGCGCCCAATACG-3'; *pcfaf* primers: forward: 5'-GCCACAGTTCTGCGACAGTCT-3', reverse: 5'-CCGAGCGAAGCAATGTTCTC-3'; *gen5* primers: forward: 5'-GTGCTGTACCTCGAATGAG-3', reverse: 5'-TGGAGAAACCCTGCTTTTTGA-3'; *p300* primers: forward: 5'-CGCTTTGTCTACACCTGCAA-3', reverse: 5'-TGCTGGTTGTTGCTCTCATC-3', and *usp22* primers, forward: 5'-CTCCTGTCTGGTCTGTGAGATG-3', reverse: 5'-CAGCAACTTATACGGGATGTGA-3' (EuroGentec).

### siRNA transfection

The *pcfaf*, *p300*, *usp22* and *gen5* genes were knocked down using stealth siRNAs (Life Technologies). Cells were dissociated and transfected with a final concentration of 20 nM siRNAs targeting PCAF (siPcaf),

P300 (siP300), USP22 (siUSP22) or GCN5 (siGen5) or negative control siRNAs (siCtrl) by electroporation at 1050 V for 40 ms using a Neon Transfection System (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Transfected cells were then plated on laminin-coated flasks (for chromosome orientation-fluorescence *in situ* hybridization (CO-FISH) experiments), 96-well plates (for cell proliferation assays) or Millicell EZ slides (PEZGS0816, Millipore, for immunofluorescence (IF) assays). Knockdown efficiency was verified at 48 h after transfection by qPCR, western blotting or IF. The siRNA sequences were as follows:

siPcaf:

Sense sequence: 5'-CCACUUUAAUGGGAUGUGAGCUAAA-3',

Antisense sequence: 5'-UUUAGCUCACAUCCCAUAAAGUGG-3';

siGen5:

Sense sequence: 5'-CCAAGCAGGUCUAUUUCUACUCUU-3',

Antisense sequence: 5'-AAGAGGUAGAAAUAGA CCUGCUUGG-3';

siUsp22:

Sense sequence: 5'-GGAGAGAAGUUUCAACUUtt-3',

Antisense sequence: 5'-AAGUUGAAAACUUCUCUCCaa-3'.

sip300-1:

Sense sequence: 5'-GGAUUCGUCUGUGAUGGCUGUUUAA-3'

sip300-2:

Sense sequence: 5'-CAGGUAUGAUGAACAGUCAGUAAA-3'

### Transient over-expression of GCN5 in SAOS-2 cells

The plasmid pEGFP- GCN5 (here GCN5-GFP) and the control plasmid pEGFP (here Ctrl-GFP) have been constructed as follow: the HsGCN5-1-837 encoding sequence has been amplified from Addgene plasmid # 74784. The resulting PCR product was inserted by SLIC [33] in pEGFP-N1 plasmid digested by Acc65I-NheI. In order to express the gene of interest independently of the GFP, the stop codon was included in the amplicon and the pEGFP-N1 vector backbone was modified in order to add an internal ribosome entry site (IRES) sequence. Thus, a DNA fragment encompassing an internal ribosome entry site (IRES) followed by 3 NLS and the GFP encoding sequence obtained by amplifying the pCIG plasmid (a derivative of pIRES2-AcGFP obtained from G. Livera) was inserted by SLIC in the previously obtained plasmid digested by AgeI-BsrGI. As a control plasmid, the PCR product encompassing the IRES sequence, the 3 NLS and the GFP encoding sequence was inserted in pEGFP-N1 plasmid as just described above. The resulting plasmids



were sequence verified. All enzymes were from New England Biolabs (Beverly, MA).

Primers for amplifying HsGCN5-1-837

SP0678: 5' – GTTTAGTGAACCGTCAGATCCGC  
TAGCATGGCGGAACCTTCC – 3'

SP0679: 5' – CCGGTGGATCCCGGGCCCGCGG  
TACCTACTTGCAATGAGGCCTC – 3'

Primers for amplifying IRES-3NLS-GFP

SP0680: 5' – GGGCCCGGGATCCACCGGTGCC  
CTCTCCCTCC – 3' SP0681: 5' – GGCCGCTTAC  
TTGTACA – 3'

Annealing sequences on target sequence were underlined. Homology sequences with plasmid used for SLIC cloning were in italics. Restriction sites were bolded (*NheI* for SP0678, *Acc65I/KpnI* for SP0679, *AgeI* for SP0680 and *BsrGI* for SP0681). Transient transfection of DNA plasmids into SAOS-2 cells were performed using lipofectamine 3000 (Invitrogen) according to manufacturers' instructions. Briefly, SAOS-2 cells were grown to 70–80% confluence in 6 well plates and a mix of plasmid DNA and lipofectamine was applied for 2 hours before changing the medium. Quantitative RT-PCR, immunofluorescence and detection of APBs were performed 48h post transfection as described elsewhere in Material and Methods.

## Western blot

Cell pellets were dried, and then cells were lysed in RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors. The following antibodies were used for detection of the desired proteins: PCAF (1:1000, sc13124, Santa Cruz), anti-GCN5 (1:1000, #3305, Cell Signalling), anti-PML (1:1000, sc966, Santa Cruz),  $\alpha$ -tubulin (1:1000, T6199, Sigma-Aldrich), and  $\beta$ -actin (1:1000, A1978, Sigma-Aldrich).

## Immunofluorescence

At 48 h after transfection with siRNAs, adherent cells were fixed by incubation for 10 min in 4% paraformaldehyde and were then permeabilized by incubation with 0.1% Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min at room temperature. For blocking, cells were incubated for 1 h at room temperature in PBS containing 7.5% goat serum and 7.5% foetal bovine serum and then incubated overnight at 4°C with the indicated primary antibody. The following antibodies were used for IF: GFP (1/200, ab6673, abcam), PML (1:100, sc966, Santa Cruz), PCAF (1:50, ab12188, Abcam), GCN5 (1:100, 3305, Cell signaling), TRF2 (1:100, IMG-124A, Imgenex), and USP22 (ab4812, Abcam). Secondary labelling was performed using an Alexa Fluor 488- or 594-conjugated antibody (Molecular Probes) at room temperature for 1 h.

## WST-1 cell proliferation assay

Transfected cells were plated in 96-well plates. A total of 2,000 cells were used per well. WST-1 assay (11644807001, Roche) was then performed at 24 and 48 h following transfection according to the manufacturer's instructions.

## Cell cycle

Cell cycle analysis was performed using propidium iodide. Cells were trypsinized and fixed with cold ethanol (70°) for 10 min at –20°C and then incubated with propidium iodide (50  $\mu$ g/mL) and RNase for 1 h at 37°C. The DNA concentrations in the stained samples were subsequently measured by flow cytometry using an LSRII cytometer (BD Bioscience), and cell cycle distribution was analysed using Flowjo software.

## T-SCE analysis

CO-FISH was performed as previously described [32]. Cells were cultured in complete medium supplemented with 10  $\mu$ M BrdU for one cell cycle. Metaphase spreads were stained with Hoechst 33258, exposed to UV light and digested with exonuclease III (Promega). Successive hybridizations with an FITC-labelled (TTAGGG)<sub>3</sub> PNA probe and then with a Cy-3-labelled (CCCTAA)<sub>3</sub> PNA probe (Applied Biosystems) allowed for detection of the parental telomere C and G strands, respectively. Metaphases were captured and analysed using an Axio Imager Z.2 (Zeiss, Oberkochen, Germany) coupled to a Metafer Image Analysis System (MetaSystems, Altlussheim, Germany).

## Telomere staining

Telomere staining was performed by fixation for 2 min in 4% formaldehyde and dehydration with ethanol (50°-80°-100°) on ice. The dehydrated slides were then stained with a (CCCTAA)<sub>3</sub> PNA probe (Applied Biosystems) in PNA hybridization solution (70% formamide, 10 mM Tris, pH 7.2, and 1% BSA) by denaturation at 80°C for 3 min and then hybridization at room temperature for 2 h. Next, the slides were washed with 70% formamide and 10 mM Tris, pH 7.2, and washed 3 times with 50 mM Tris, pH 7.2, 150 mM NaCl, and 0.05% Tween-20, counterstained with DAPI and mounted. Images of APBs were taken using a Leica DM 2500 microscope and analysed using LAS AF Lite Leica software. Metaphases were captured and analysed using an Axio Imager Z.2 (Zeiss, Germany) coupled to a Metafer Image Analysis System (MetaSystems, Germany).

## Proximity ligation assay (PLA)

PLA (Duolink II Fluorescence, Olink Bioscience) was used for the detection of protein-protein interactions according to the manufacturer's instructions. Briefly, adherent cells grown on round glass slides in 24-well plates were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde, permeabilized in PBS containing 0.5% Triton X-100 for 20 min at room temperature, and then blocked by incubation in PBS containing 7.5% goat serum and 7.5% foetal bovine serum for 1 h at room temperature. Next, the cells were incubated overnight at 4°C with two antibodies against the two proteins of interest. The following primary antibodies were used: TRF2 (1:100, IMG-124, Imgenex), PCAF (1:100, AB9962, Millipore), GCN5 (1:100, H-75, Santa Cruz), TRF1 (1:100, ab10579, Abcam), and P300 (1:100, NA 46, Calbiochem). The slides were then washed three times with 0.1% Triton X-100 in PBS and incubated with two PLA probes (PLA probe MINUS stock and PLA probe PLUS stock; Duolink II) for 1 h at room temperature. Subsequently, the slides were washed three times with 0.1% Triton X-100 in PBS. Ligation was conducted for 30 min at 37°C, followed by two washes with 0.1% PBS and Triton X-100 and amplification using DNA polymerase (Duolink II) for 100 min at 37°C. The slides were then washed, dried and mounted with Dapi-Fluoromount-G (Southern Biotech). Images were captured using a Leica DM 2500 microscope.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank all members of the LRP for their helpful discussions and comments on this work. We are grateful to Dr. Rachel Litman Flynn for commenting on our manuscript. We acknowledge Olivier Etienne and Céline Levalois for technical help and Thierry Kortulewski and Lanya Irbah for use of the iRCM imaging facility.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## GRANT SUPPORT

This work was supported by Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives [Programme Plasticité et Instabilité des Génomes to FB, IRTELIS PhD program to MJ and DB], La Ligue Nationale Contre le Cancer to MJ, and La Fondation de France to FB and JRP.

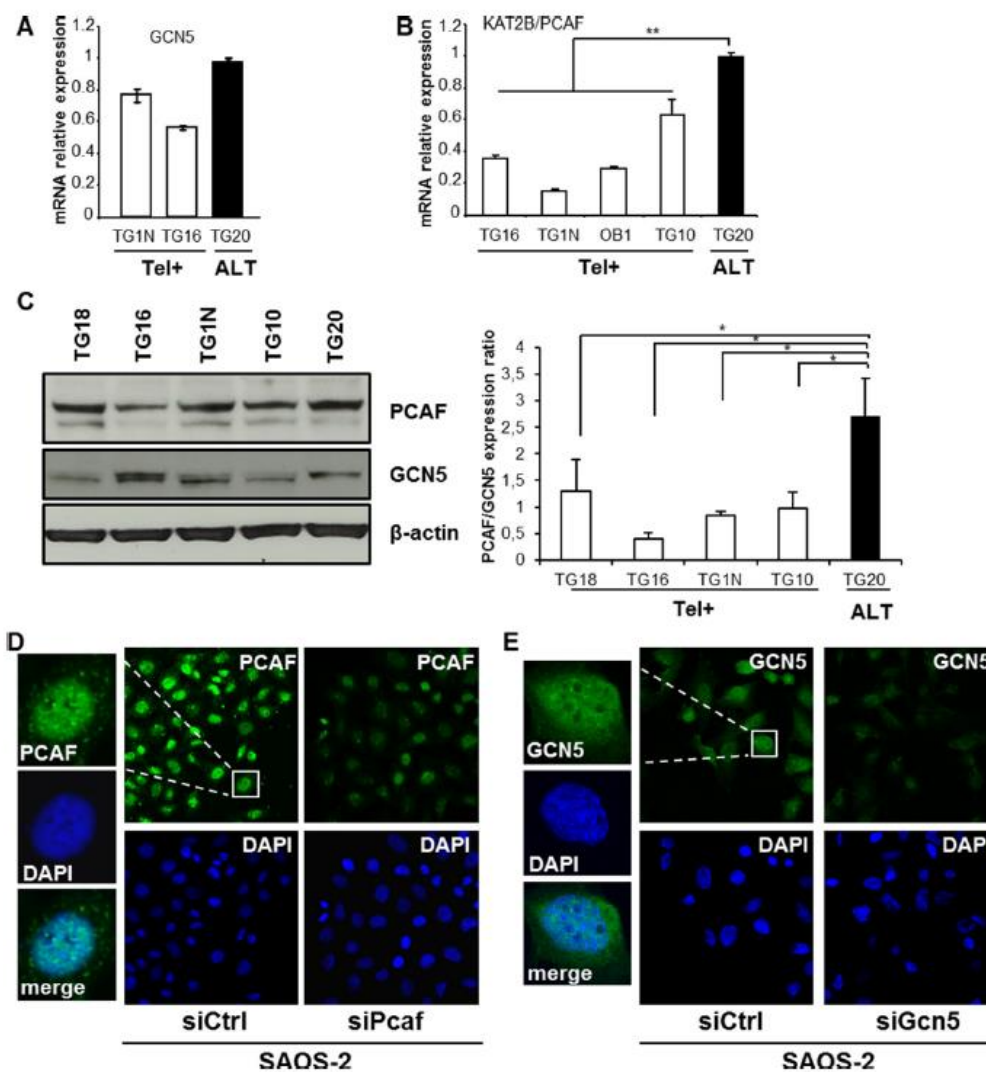
## REFERENCES

1. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet.* 2010; 11:319–330.
2. de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* 2005; 19:2100–2110.
3. Walker JR, Zhu XD. Post-translational modifications of TRF1 and TRF2 and their roles in telomere maintenance. *Mech Ageing Dev.* 2012; 133:421–434.
4. Potts PR, Yu H. The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 2007; 14:581–590.
5. Atanassov BS, Evrard YA, Multani AS, Zhang Z, Tora L, Devys D, Chang S, Dent SY. Gcn5 and SAGA regulate shelterin protein turnover and telomere maintenance. *Mol Cell.* 2009; 35:352–364.
6. Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y. A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature.* 1996; 382:319–324.
7. Krebs AR, Karmodiya K, Lindahl-Allen M, Struhl K, Tora L. SAGA and ATAC histone acetyl transferase complexes regulate distinct sets of genes and ATAC defines a class of p300-independent enhancers. *Mol Cell.* 2011; 44:410–423.
8. Nagy Z, Tora L. Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene.* 2007; 26:5341–5357.
9. Spedale G, Timmers HT, Pijnappel WW. ATAC-king the complexity of SAGA during evolution. *Genes Dev.* 2012; 26:527–541.
10. Sterner DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64:435–459.
11. Wang YL, Faiola F, Xu M, Pan S, Martinez E. Human ATAC Is a GCN5/PCAF-containing acetylase complex with a novel NC2-like histone fold module that interacts with the TATA-binding protein. *J Biol Chem.* 2008; 283:33808–33815.
12. Linares LK, Kiernan R, Triboulet R, Chable-Bessia C, Latreille D, Cuvier O, Lacroix M, Le Cam L, Coux O, Benkirane M. Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2. *Nat Cell Biol.* 2007; 9:331–338.
13. Lehrmann H, Pritchard LL, Harel-Bellan A. Histone acetyltransferases and deacetylases in the control of cell proliferation and differentiation. *Adv Cancer Res.* 2002; 86:41–65.
14. Lafferty-Whyte K, Cairney CJ, Will MB, Serakinci N, Daidone MG, Zaffaroni N, Bilisland A, Keith WN. A gene expression signature classifying telomerase and ALT immortalization reveals an hTERT regulatory network and suggests a mesenchymal stem cell origin for ALT. *Oncogene.* 2009; 28:3765–3774.
15. Hu J, Hwang SS, Liesa M, Gan B, Sahin E, Jaskelioff M, Ding Z, Ying H, Boutin AT, Zhang H, Johnson S, Ivanova E, Kost-Alimova M, et al. Antitelomerase therapy provokes

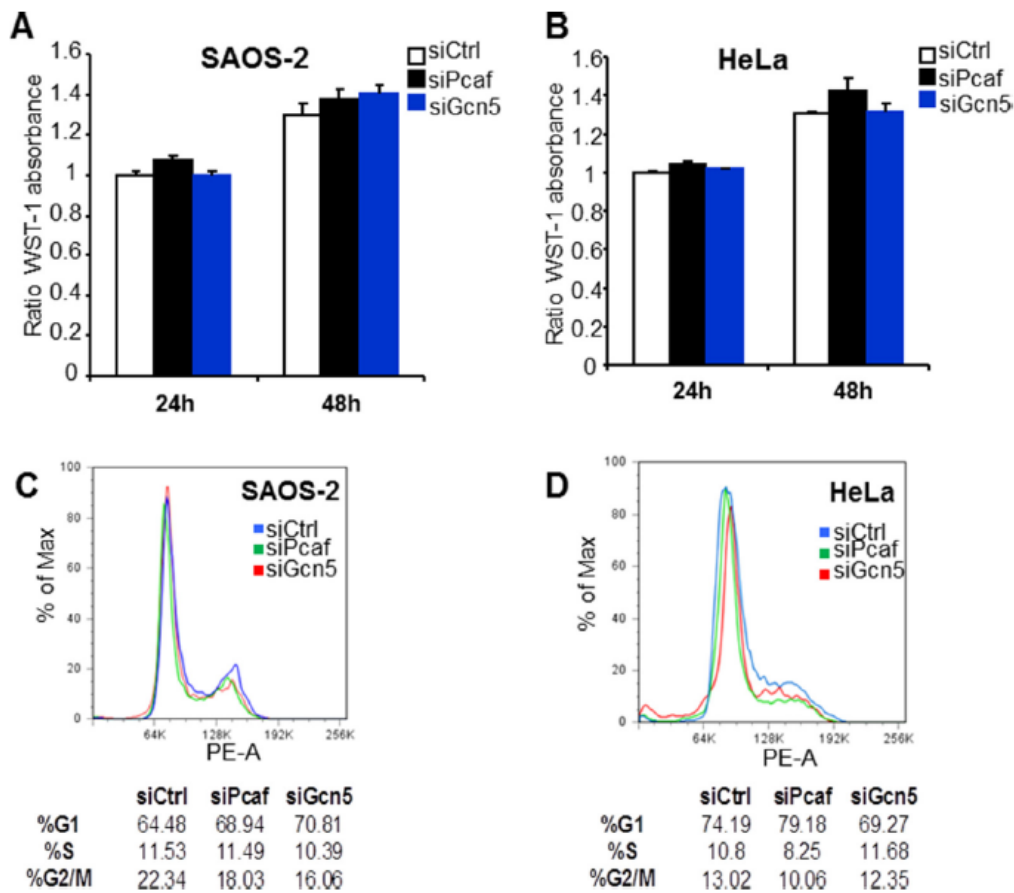
- ALT and mitochondrial adaptive mechanisms in cancer. *Cell*. 2012; 148:651–663.
16. Jeitany M, Pineda JR, Liu Q, Porreca RM, Hoffschir F, Desmaze C, Silvestre DC, Mailliet P, Junier MP, Londono-Vallejo A, Segal-Bendirdjian E, Chneiweiss H, Boussin FD. A preclinical mouse model of glioma with an alternative mechanism of telomere maintenance (ALT). *Int J Cancer*. 2015; 136:1546–1558.
  17. Silvestre DC, Pineda JR, Hoffschir F, Studler JM, Mouthon MA, Pflumio F, Junier MP, Chneiweiss H, Boussin FD. Alternative lengthening of telomeres in human glioma stem cells. *Stem Cells*. 2011; 29:440–451.
  18. Soderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstrale K, Leuchowius KJ, Jarvius J, Wester K, Hydbring P, Bahram F, Larsson LG, Landegren U. Direct observation of individual endogenous protein complexes *in situ* by proximity ligation. *Nat Methods*. 2006; 3:995–1000.
  19. Weibrecht I, Leuchowius KJ, Clausson CM, Conze T, Jarvius M, Howell WM, Kamali-Moghaddam M, Soderberg O. Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox. *Expert Rev Proteomics*. 2010; 7:401–409.
  20. Londono-Vallejo JA, Der-Sarkissian H, Cazes L, Bacchetti S, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange. *Cancer Res*. 2004; 64:2324–2327.
  21. Bailey SM, Williams ES, Cornforth MN, Goodwin EH. Chromosome Orientation fluorescence *in situ* hybridization or strand-specific FISH. *Methods Mol Biol*. 2010; 659:173–183.
  22. Pennarun G, Hoffschir F, Revaud D, Granotier C, Gauthier LR, Mailliet P, Biard DS, Boussin FD. ATR contributes to telomere maintenance in human cells. *Nucleic Acids Res*. 2010; 38:2955–2963.
  23. Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res*. 1999; 59:4175–4179.
  24. Perrem K, Colgin LM, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Coexistence of alternative lengthening of telomeres and telomerase in hTERT-transfected GM847 cells. *Mol Cell Biol*. 2001; 21:3862–3875.
  25. Gauthier LR, Granotier C, Hoffschir F, Etienne O, Ayoubz A, Desmaze C, Mailliet P, Biard DS, Boussin FD. Rad51 and DNA-PKcs are involved in the generation of specific telomere aberrations induced by the quadruplex ligand 360A that impair mitotic cell progression and lead to cell death. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69:629–640.
  26. Cesare AJ, Kaul Z, Cohen SB, Napier CE, Pickett HA, Neumann AA, Reddel RR. Spontaneous occurrence of telomeric DNA damage response in the absence of chromosome fusions. *Nat Struct Mol Biol*. 2009; 16:1244–1251.
  27. Loayza D, De Lange T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*. 2003; 423:1013–1018.
  28. Denchi EL, de Lange T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*. 2007; 448:1068–1071.
  29. Flynn RL, Cox KE, Jeitany M, Wakimoto H, Bryll AR, Ganem NJ, Bersani F, Pineda JR, Suva ML, Benes CH, Haber DA, Boussin FD, Zou L. Alternative lengthening of telomeres renders cancer cells hypersensitive to ATR inhibitors. *Science*. 2015; 347:273–277.
  30. Her YR, Chung IK. p300-mediated acetylation of TRF2 is required for maintaining functional telomeres. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41:2267–2283.
  31. Patru C, Romao L, Varlet P, Coulombel L, Raponi E, Cadusseau J, Renault-Mihara F, Thirant C, Leonard N, Berhneim A, Mihalescu-Maingot M, Haiech J, Bieche I, et al. CD133, CD15/SSEA-1, CD34 or side populations do not resume tumor-initiating properties of long-term cultured cancer stem cells from human malignant glio-neuronal tumors. *BMC Cancer*. 2010; 10:66.
  32. Pennarun G, Granotier C, Hoffschir F, Mandine E, Biard D, Gauthier LR, Boussin FD. Role of ATM in the telomere response to the G-quadruplex ligand 360A. *Nucleic Acids Res*. 2008; 36:1741–1754.
  33. Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods*. 2007; 251–256.



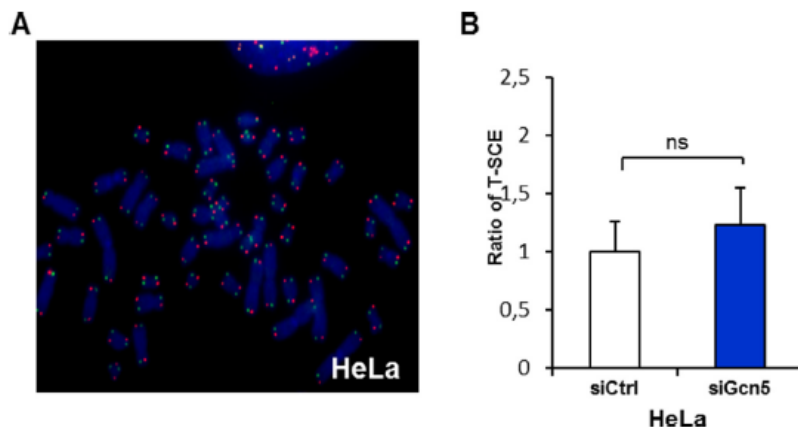
## Supplementary Materials



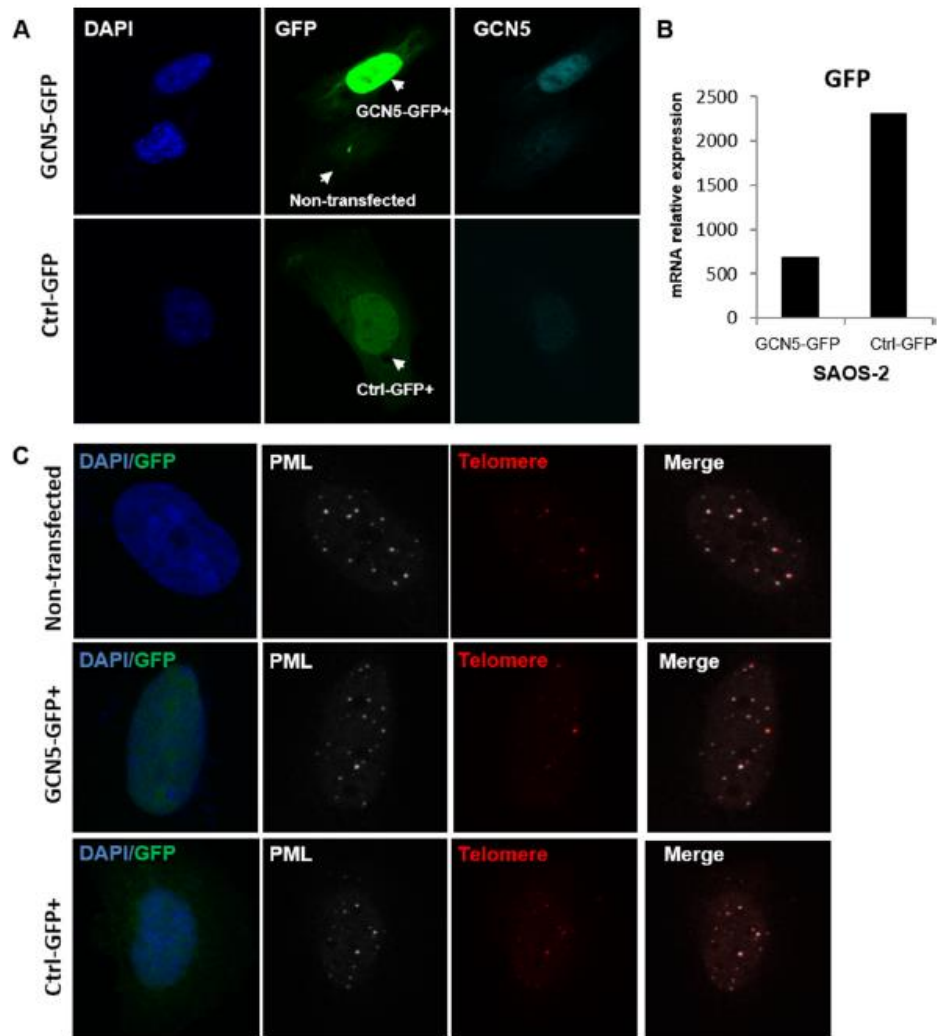
**Supplementary Figure 1: Expression profiles of PCAF and GCN5 in used cell lines.** (A–B) Expression profiles of GCN5 and PCAF, as determined by qRT-PCR. mRNA expression levels of GCN5 (A) in telomerase-positive GSCs (TG1N and TG16) and of KAT2B/PCAF (B) in telomerase-positive GSCs (TG16, TG1N, OB1, and TG10) relative to their expression in TG20 ALT GSCs. The error bars are + SEM from at least two independent experiments performed in duplicate. (\*\* $p < 0.01$ , as determined by Student's *t*-test). (C) PCAF and GCN5 protein expression, as determined by Western blotting, in GSCs. The graph shows the expression ratio of PCAF relative to GCN5 after normalization by actin as a loading control. The values (+SD) were calculated from three independent experiments (\* $p < 0.05$  as determined by the Mann-Whitney test). (D) Immunostaining for PCAF (green) in SAOS-2 cells transfected with siCtrl or siPcaf, showing PCAF down-regulation. (E) Immunostaining for GCN5 (green) in SAOS-2 cells transfected with siCtrl or siGcn5, showing GCN5 down-regulation. The left panels in D and E depict a magnification of one cell. The nucleus is stained with DAPI (blue).



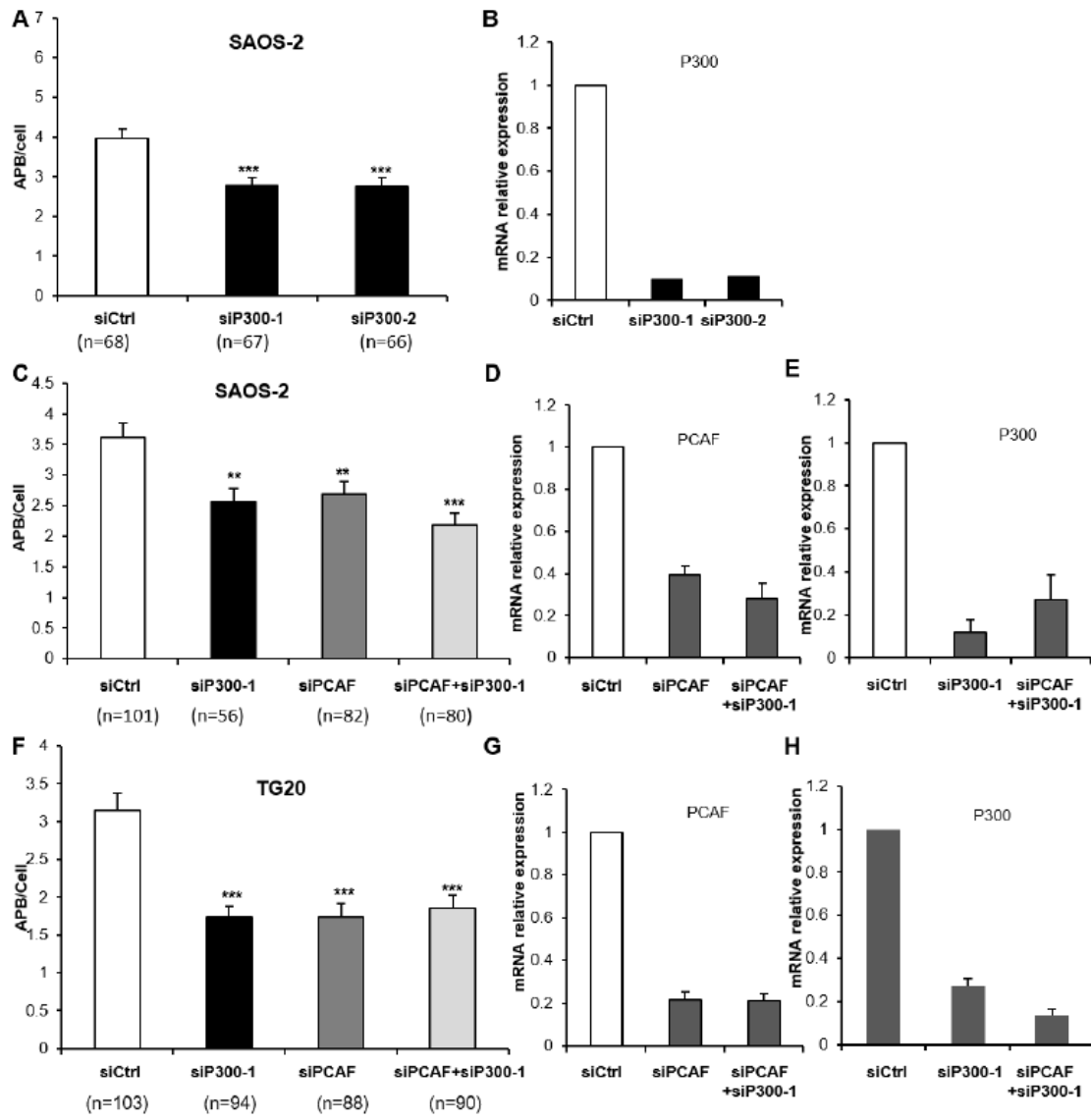
**Supplementary Figure 2: Effects of PCAF and GCN5 down-regulation on proliferation and the cell cycle.** (A–B) WST-1 proliferation assays of SAOS-2 and HeLa cells at 24 and 48 h after transfection with siCtrl, siPcaf or siGcn5. The values were calculated relative to WST-1 absorbance in cells transfected with siCtrl at 24 h. The error bars are the SEM from 4 replicates. (C–D) Cell cycle distributions of SAOS-2 and HeLa cells transfected with siCtrl, siPcaf or siGcn5 at 48 h after transfection. The lower panels show the percentages of cells in each cell cycle phase (G1, S and G2/M) for each condition.



**Supplementary Figure 3: T-SCEs in HeLa cells after down-regulation of GCN5.** (A) Representative metaphase HeLa cells labelled with the CO-FISH technique. Successive hybridizations with a FITC-labelled (TTAGGG)<sub>3</sub> PNA probe (green) and then with a Cy-3-labelled (CCCTAA)<sub>3</sub> PNA probe (red) allowed for detection of the parental telomere C and G strands, respectively, by fluorescence microscopy. No yellow-stained telomeres corresponding to T-SCE events were observed. (B) The T-SCE ratio after GCN5 down-regulation. The T-SCE ratios in HeLa cells transfected with siCtrl and siGcn5. The values are the ratio of T-SCE events (+SEM) relative to siCtrl. (ns = not significant, as determined by Student's *t*-test).



**Supplementary Figure 4: APB scoring in GCN5 over-expressing SAOS-2 cells.** (A) Representative images showing GFP and GCN5 staining in GCN5-GFP transfected cells (GCN5-GFP+), control cells (Ctrl-GFP+) or non-transfected cells. (B) qRT-PCR results showing GFP mRNA levels in SAOS-2 GCN5-GFP or Ctrl-GFP transfected cells. *eGFP* primers: forward: 5'-GCAAAGACCCCAACGAGAAG-3', reverse: 5'-TCACGAACTCCAGCAGGACC-3'; (C) Representative images showing APB staining in cells from A. One APB is scored when one PML focus (white) co-localizes with one red-stained telomere (Cy-3-labeled (CCCTAA)<sub>3</sub> PNA probe). GFP staining (green) was used to label transfected cells.



**Supplementary Figure 5: APB scoring after P300 or P300 and PCAF down-regulation in ALT cells.** (A, C and F) APBs were scored in SAOS-2 (A,C) and TG20 (F) cells at 48 h after transfection with siCtrl, siP300 (1 or 2 referring to two different siRNAs), siPCAF or siP300-1 +siPCAF. “n” indicates the number of counted cells. The values in the graph represent the average number of APBs per cell (+SEM). (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , as determined by Student’s *t*-test). (B, D–E) and (G–H) qRT-PCR results showing mRNA expression levels of PCAF and P300 in cells used in A, C and F.

## III. Discussion

### 1. Récapitulation des résultats obtenus sur l'importance de PCAF et GCN5 ainsi que les mécanismes qu'ils contrôlent dans la régulation de la voie ALT

#### 1.1. Impact de l'absence de PCAF ou de GCN5 sur le phénotype ALT

GCN5 et PCAF sont deux protéines homologues aux propriétés fonctionnelles bien distinctes et appartenant à différents complexes, tels que les complexes de type SAGA où elles sont mutuellement exclusives. Nos résultats ont montré que le traitement de nos cellules ALT avec des siRNA dirigés contre PCAF ou GCN5 induit des effets opposés sur les différentes caractéristiques du mécanisme ALT :

- **Les échanges télomériques**

Nous avons utilisé la technique de CO-FISH pour mesurer les échanges qui ont eu lieu durant la réplication télomérique entre les chromatides. Elle consiste en l'incorporation du Brdu dans le brin néo-synthétisé suivi de sa dégradation et du marquage des deux brins matriciels chacun avec une sonde spécifique. Bien que les échanges puissent toucher des chromatides différentes, nous avons mesuré uniquement les échanges entre deux chromatides sœurs appelés aussi T-SCE, et nous avons trouvé qu'ils étaient diminués en absence de PCAF et augmentés en absence de GCN5.

- **L'instabilité télomérique**

Le premier marqueur de l'instabilité télomérique est mesuré par la fréquence des pertes télomériques détectées par hybridation *in situ* de sondes télomériques sur une préparation chromosomique. Ces pertes télomérique peuvent avoir lieu soit sur une seule chromatide soit sur les chromatides sœurs et par conséquent ils auront les terminologies de « TD » (Terminal



Deletion) ou de « STL » (Sister Telomere Loss) respectivement. Les foci de dommages associés aux télomères (TIF) représentent une deuxième source d'instabilité télomérique et seront à la base de la déprotection télomérique. La détection de ces foyers de dysfonctionnements télomériques a été réalisée, par immunofluorescence, en comptant le nombre de co-localisation d'une protéine télomérique (TRF2) avec un facteur de réparation de l'ADN (53BP1) dans nos cellules transfectées. Nos résultats ont montré que l'absence de PCAF réduisait les pertes télomériques alors que celle de GCN5 en produisait plus, avec une augmentation des TIF.

- **Les APB**

La détection par immunofluorescence des APB, sites de recombinaisons télomériques des cellules ALT, a été matérialisée par la localisation aux télomères des protéines PML. Nous avons montré que le nombre d'APB était diminué en absence de PCAF, mais non affecté par l'absence de GCN5.

Ces données suggèrent que PCAF favorise la recombinaison télomérique, alors que GCN5 tendrait à l'opposer protégeant ainsi les télomères de ces événements. Bien que la recombinaison induise normalement un gain de télomères, elle est aussi accompagnée de pertes télomériques qui peuvent être générées par des T-SCE inégaux. Il est important de rappeler que l'absence de GCN5, facilite les échanges télomériques, augmente les pertes télomériques ainsi que les TIF, cependant elle n'affecte pas le nombre d'APB. Par conséquent, GCN5 ne serait pas impliquée directement, au contraire de PCAF, dans la formation des APB, mais tendrait plus à contrôler l'état de protection des télomères.

## **1.2. Résultats complémentaires**

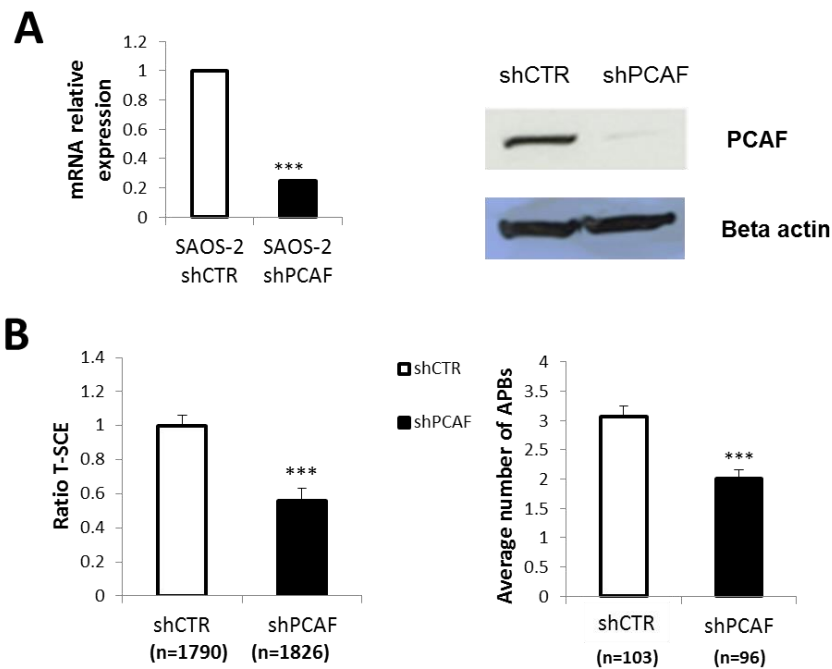
### **La sous-expression à long terme de PCAF dans la lignée ALT SAOS-2 permet d'inhiber le mécanisme ALT mais ne tue pas les cellules**

Après avoir montré que le traitement de 48h avec des siRNA dirigés contre PCAF diminuaient les caractéristiques du phénotype ALT, nous avons testé si les conséquences d'une inhibition prolongée de cette protéine sur la lignée ALT SAOS-2.

En collaboration avec DS Biard (CEA, DSV, iMETI, SEPIA), nous avons généré à partir de la lignée cellulaire humaine SAOS-2 deux lignées stables l'une transfectée avec un plasmide codant pour un shRNA dirigé contre PCAF et l'autre avec un plasmide contenant une séquence de shRNA aléatoire non relevante, utilisé comme témoin négatif (Biard et al., 2005 ou Gauthier et al. 2014).. Ces plasmides contiennent un gène de résistance à la puromycine permettant la sélection des cellules ayant intégrées de manière stable la construction dans leur génome. La séquence de shPCAF était 5'-GCAAATAATTGTCAGTCAGTCAGTCTA-3' (position dans l'ORF : 378-396), et donc différente de celle des siPCAF utilisés dans l'article. Brièvement, les lignées SAOS-2 ont été transfectées par les plasmides, par électroporation (1050V pendant 40ms) en utilisant le système de transfection Neon (Invitrogen Life Technologies) selon les instructions du fabricant. Afin de sélectionner les lignées stables, il est important de choisir la concentration minimale d'antibiotique, ici la puromycine, capable d'exclure toutes les cellules n'ayant pas intégré le plasmide portant la résistance à la puromycine. 48 h après la transfection, les lignées transfectées ont donc été traitées avec la dose de sélection de l'antibiotique, qui a été maintenue par la suite tout au long de la culture.

Nous avons vérifiée par RT-qPCR l'efficacité des shPCAF à inhiber leur cible correspondante à partir de cellules stables ayant intégré durant un mois le vecteur. Comme le montre la figure IA, le niveau d'expression de l'ARNm de PCAF diminue jusqu'à 80% (Figure IA, à gauche). Le résultat a été ensuite confirmé par l'observation d'une diminution significative de l'expression protéique de PCAF par la technique de Western blot dans les cellules SAOS-2 shPCAF en comparaison avec les cellules contrôles (Figure IA, à droite).

Nous avons évalué ensuite l'effet de l'inhibition prolongée de PCAF sur les T-SCE et les APB, deux caractéristiques importantes du mécanisme ALT. De manière intéressante, les lignées SAOS-2 shPCAF montrent une inhibition significative des T-SCE par la technique de COFISH, ainsi que du nombre moyen des APB par rapport aux lignées contrôles (Figure IB). Cet effet sur le phénotype ALT se reproduit de manière identique à J72 et J126 (résultats non représentés). Ces données montrent que l'inhibition à long terme de PCAF reproduit les mêmes effets que ceux observés à l'aide de siRNA à court terme sur le mécanisme ALT, confirmant l'importance de PCAF pour le mécanisme ALT.

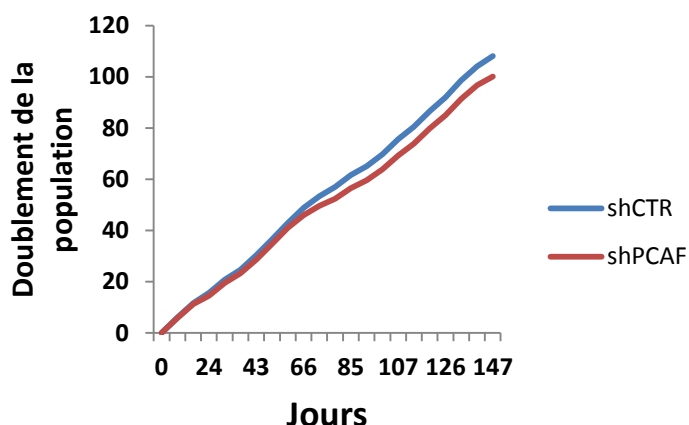


**Figure I: Déterminer l'effet de l'inhibition à long terme de PCAF sur le mécanisme ALT**

- A. Le niveau d'expression des ARNm (à gauche) ainsi que le niveau protéique de PCAF (à droite) sont déterminés par qRT-PCR et par western blot respectivement, dans les cellules shPCAF et shCTR
- B. Quantification des T-SCE (à gauche) par la technique de CO-FISH dans les cellules shPCAF et shCTR, Les valeurs sont le rapport des événements de T-SCE (+ SEM) par rapport au control, 'n' représente le nombre d'extrémités comptées. Quantification de la moyenne des APB (à droite) dans les cellules shPCAF et shCTR, 'n' représente le nombre de cellules comptées (\*\*\*)  $p < 0.001$  comme déterminé par le *t-test*).

*Les expériences dans A et B sont réalisées à partir de cellules stables ayant intégrées durant un mois soit le plasmide codant pour des siPCAF, soit le plasmide vide et sont nommées SAOS-2 shPCAF et SAOS-2 shCTR respectivement.*

Cependant, bien que les réductions du nombre d'APB et des T-SCE aient été maintenues avec le temps dans les cellules SAOS-2 shPCAF, nous avons montré que ces dernières continuaient à proliférer ne montrant qu'un léger ralentissement de croissance (Figure II). Cette observation suggérant que l'inhibition du mécanisme ALT dans ces cellules n'était pas suffisante pour altérer de manière importante la prolifération cellulaire, nous n'avons décidé de ne pas poursuivre la caractérisation de ce modèle.



**Figure II: Déterminer l'effet de l'inhibition à long terme de PCAF sur la prolifération des cellules**

Courbes de doublement de la population (PD) des lignées cellulaires shPCAF et shCTR, qui étaient maintenues en culture en présence de la dose de sélection de l'antibiotique. Les cellules viables ont été comptées chaque semaine par une coloration au bleu de trypan sur une cellule de Malassez. Les doublements de population ont été calculés à l'aide de la formule  $\log [(nombre\ de\ cellules\ récoltées)/(nombre\ de\ cellules\ ensemencées)]/\log 2$ .

### 1.3. Le mécanisme d'Atanassov existe-t-il dans les cellules ALT ?

D'après Atanassov et ses collaborateurs, l'action GCN5/USP22/TRF1 sur TRF1 favoriserait le *capping* des télomères dans les cellules télomérase-positives. La stabilité de TRF1 est étroitement régulée par des modifications post-traductionnelles telles que l'ubiquitination. GCN5 a été montrée comme un facteur indispensable pour qu'USP22 s'associe au complexe SAGA et soit capable de deubiquitiner TRF1 et d'empêcher ainsi sa dégradation par le protéasome. Nous nous sommes intéressés à vérifier si ces mécanismes sont aussi retrouvés dans nos cellules ALT. Par conséquent, nous avons tenté à rechercher des interactions potentielles entre PCAF et GCN5 et les protéines télomériques TRF1 et TRF2, en utilisant la technique de Proximity Ligation Assay (PLA) qui permet de visualiser *in situ* des interactions entre deux protéines distinctes et situées à une distance de moins de 40 nm. Nous avons trouvé aussi bien dans les cellules ALT que dans les cellules télomérase-positives de nombreuses interactions GCN5-TRF1 et USP22-TRF1 qui étaient augmentées après inhibition du protéasome par MG132, probablement à cause

d'une accumulation de TRF1 sous sa forme ubiquitinilée. Nos résultats suggèrent que le mécanisme décrit par Atanassov peut aussi exister dans les cellules ALT

#### **1.4. Comment PCAF pourrait réguler la voie ALT ?**

Contrairement à GCN5 et à P300, il n'y a aucune preuve jusqu'à présent de l'implication de PCAF dans la maintenance des télomères (Her and Chung, 2013). L'absence de PCAF au niveau des télomères a été également confirmée dans notre étude par le manque d'interaction entre PCAF et chacune des protéines télomériques TRF1 et TRF2. Ces données laissent penser que les effets sur la voie ALT de l'élimination de PCAF sont indirects. Cependant, PCAF a été identifiée grâce à ses interactions avec P300, qui s'est avérée responsable de l'acétylation de TRF2. Par conséquent, nous nous sommes intéressés à mesurer les effets de la délétion de P300 sur le phénotype ALT. Les résultats ont montré une diminution significative de la formation des APB dans les lignées ALT transfectées par siP300 seul. De manière intéressante, l'effet combiné de l'absence de PCAF et de P300 était similaire à celui retrouvé par chacun des deux seuls. On peut donc conclure que ces deux protéines pourraient agir ensemble pour stimuler la formation des APB dans les lignées cellulaires ALT. D'autres expériences complémentaires sont nécessaires pour comprendre leurs rôles dans la régulation de la maintenance des télomères dans les cellules ALT

#### **1.5. Importance d'USP22 dans le mécanisme ALT**

Nous avons signalé pour la première fois qu'USP22 est présent dans les corps de PML et les APB dans les cellules ALT. USP22 appartient à une grande famille de protéines qui catalysent la déubiquitination de différents substrats. Elle a été identifiée comme étant une sous-unité importante du complexe SAGA, qui une fois liée à ce complexe elle élimine l'ubiquitine de l'histone H2B/H2A régulant ainsi la transcription de gènes en aval (Zhang et al., 2008a, Zhang et al., 2008b). En plus, elle déubiquitine des substrats non-histones, tels que TRF1 come déjà évoqué dans l'étude d'Atanassov, conduisant à leur stabilité en empêchant leur dégradation par

le protéasome (Atanassov et al, 2009). De manière intéressante, nous avons trouvé que la sous-expression d'USP22 est associée à une augmentation des T-SCE sans affecter le nombre d'APB dans les cellules ALT. Ces résultats reproduisent l'effet obtenu en absence de GCN5 confirmant l'hypothèse que GCN5 et USP22 pourraient agir ensemble pour stabiliser TRF1 dans les APB et s'opposer par la suite au mécanisme ALT. Ceci suggère que PCAF entrerait en compétition avec GCN5 pour s'associer au complexe SAGA, il limiterait indirectement l'activité de déubiquitination de TRF1 médiée par la protéine USP22, les télomères seraient déprotégés et plus aptes à recombinaison.

## **2. La régulation du mécanisme ALT par PCAF et GCN5 dépend-elle de leur exclusion mutuelle dans le complexe SAGA ?**

Comme on l'a déjà mentionné, le complexe SAGA possède une activité lysine acétyl transférase portée par GCN5 ou PCAF (Wang et al., 2008, Spedale et al., 2012). Cette exclusion mutuelle des deux protéines dans le complexe SAGA montre que bien qu'elles soient homologues elles peuvent avoir des fonctions bien différentes qui peuvent se concurrencer. Nous avons proposé un modèle dans lequel PCAF et GCN5 entreraient en compétition pour s'associer au complexe SAGA, conduisant par la suite à la régulation du turnover des protéines télomériques et donc des événements de recombinaison télomériques liées au mécanisme ALT.

A l'issue de notre analyse transcriptomique, PCAF était surexprimée dans les cellules ALT. L'association entre une surexpression de PCAF et le mécanisme ALT a déjà été établie chez les souris atteintes d'un lymphome, alors qu'une sous-expression de son homologue GCN5 a été observée dans les lignées cellulaires ALT (Lafferty-Whyte et al., 2009, Hu et al., 2012). Dans notre étude nous avons montré par qRT-PCR que nos cellules ALT expriment des ARNm de PCAF mais également des ARNm de GCN5, ce résultat était confirmé par Western Blot en utilisant des anticorps suffisamment spécifiques pour ne reconnaître que des épitopes propres à chacune de ces deux protéines. Cependant, et d'une manière intéressante, nous avons constaté que le rapport protéique de PCAF sur celui de GCN5 était plus élevé dans les cellules ALT que dans les lignées télomérase-positives. Ces résultats nous ont amené à considérer une éventuelle

compétition entre PCAF et GCN5, en fonction de leur niveau d'expression dans les cellules ALT.

Par la suite, nous avons essayé de surexprimer GCN5, dans un premier temps dans des cellules SAOS-2 qui étaient plus faciles à transfecter que les cellules TG20. De manière intéressante, cette surexpression de GCN5 était associée à une suppression du mécanisme ALT révélée par une diminution de la formation des APB. Ce résultat intéressant nous a permis de confirmer en quelque sorte cette concurrence d'expression entre PCAF et GCN5 pour s'associer au complexe SAGA, où la formation de complexes PCAF-GCN5 serait privilégiée pour réguler le phénotype ALT, probablement en limitant l'action de GCN5/USP22 sur les télomères.

### **3. Importance de la régulation de TRF1 par le complexe SAGA pour le mécanisme ALT**

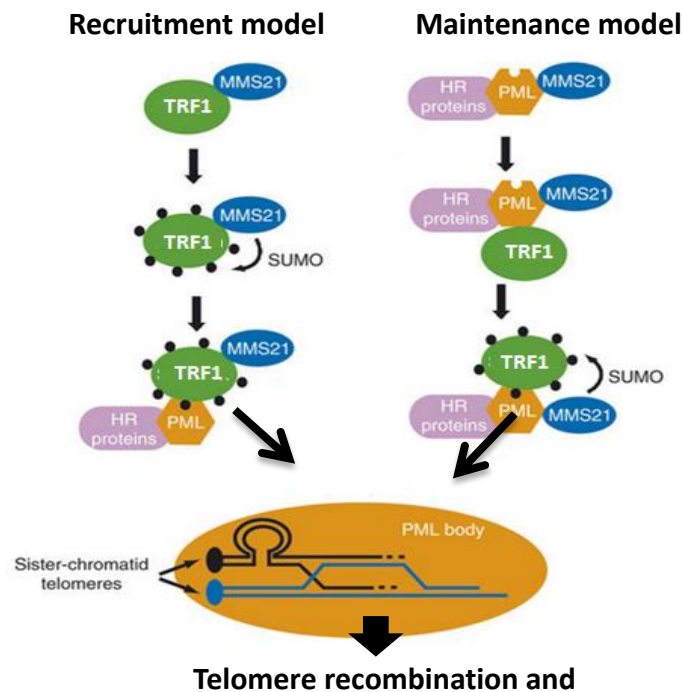
Dans les cellules télomérase-positives, TRF1 agit comme un régulateur négatif de la maintenance de la longueur des télomères en inhibant l'accès de la télomérase au niveau de l'ADN télomérique. La délétion de TRF1 induit des fusions télomériques (Martinez et al., 2009), ceci a été aussi retrouvé dans les cellules déletées pour GCN5 (Atanassov et al, 2009). Cependant, l'implication de TRF1 dans le mécanisme ALT n'a pas été autant investiguée.

TRF1 est contrôlée par de nombreuses modifications post-traductionnelles dont l'ajout de groupements phosphate, de SUMO, d'ADP-ribose ou encore d'ubiquitine (Peuscher and Jacobs, 2012, Walker and Zhu., 2012). Ces modifications moduleraient leur stabilité et leur dégradation, leur recrutement au niveau des télomères ou leur interaction avec d'autres protéines. Il a été montré que l'ubiquitination, la SUMOylation ainsi que la phosphorylation de TRF1 sont importants pour le maintien des télomères par le mécanisme ALT.

Tout d'abord, TRF1 participerait dans l'initiation de la formation des APB et leur assemblage ainsi que dans la production des c-circles et l'élongation des télomères dans les

cellules ALT (Wilson et al., 2016, Ho et al., 2016, Potts et al., 2007). Sa phosphorylation sur T371 favoriserait son recrutement au niveau des PML pour former les APB et produire les c-circles (Wilson et al., 2016). En outre, sa sumoylation jouerait un rôle majeur dans la formation des APB ainsi que dans l'élongation des télomères. TRF1 est sumoylée par MMS21, le composant E3 SUMO ligase du complexe SMC5/6 (Potts et Yu, 2007). Bien que le mécanisme détaillé par lequel la SUMOylation de TRF1 favoriserait la formation d'APB, ne soit pas très bien connu, deux modèles ont été proposés pouvant se compléter mutuellement (Figure 24) :

- Le modèle de recrutement, où la sumoylation de TRF1 induite par MMS21 dans le nucléoplasme, favoriserait son recrutement avec les télomères dans les PML.
- Le modèle de maintenance, où la sumoylation médiée par MMS21 de TRF1, TRF2, TIN2 et RAP1 affecterait la stabilité du complexe shelterin; par conséquent, induirait la dissociation de ses composants des télomères dans les APB. Cet effet serait suivi d'une déprotection des télomères, facilitant ainsi leur recombinaison et leur maintien par la voie ALT.



**Figure 24 : Deux modèles proposés pour la formation des APB induite par la sumoylation de TRF1 (inspiré de Potts et Yu, 2007).**



Grace à ces modifications post-traductionnelles, nous pouvons supposer que TRF1 joue un rôle dans l'initiation de la formation des APB qui une fois assemblés, déstabilisera et dissociera TRF1 des télomères, les rendant plus aptes à la recombinaison.

Dans notre étude nous nous sommes focalisés sur la régulation du turnover de TRF1 par le complexe SAGA. Les niveaux de TRF1 sont régulés par une dégradation induite par l'ubiquitination qui serait facilitée par trois ligases E3: RLIM, FBX4 et  $\beta$ -TRCP1 (Lee et al., 2006, Wang et al., 2013, Her and Chung, 2009). Contrairement à ces ligases favorisant le renouvellement de TRF1, les composants GCN5 et USP22 du complexe SAGA s'opposeraient à l'ubiquitination de TRF1 dans les cellules télomérase-positives (Atanassov et al., 2009). L'absence d'USP22 ou de GCN5 entraînerait une diminution des taux de TRF1, qui est empêchée par l'inhibition du protéasome. Selon notre hypothèse, PCAF entrerait en compétition avec GCN5 pour favoriser la dégradation de TRF1 dans les cellules ALT. Bien qu'on a émis et prouvé en une partie l'importance de la régulation négative de TRF1 pour l'activation d'ALT, nous ne pouvons pas écarter son rôle, déjà décrit, d'inducteur du phénotype ALT. Cependant, il a été montré que TRF1 peut être ubiquitinée par  $\beta$ -TRCP1 qui s'est également avérée essentielle à la formation des APB, cela été révélé par une diminution du pourcentage des APB en absence de  $\beta$ -TRCP1 (Wang C. et al., 2013). Bien que  $\beta$ -TRCP1 joue le rôle de régulateur négatif de TRF1, elle ne dégradera que la protéine non liée aux télomères qui a été montrée comme la seule forme de TRF1 régulée par l'ubiquitination (Chang et al, 2003).

Partant de toutes ces observations, nous avons proposé un modèle (Figure 25) dans lequel TRF1 serait recrutée au niveau des PML pour favoriser la formation des APB, sa sumoylation entraînerait sa dissociation des télomères. L'occupation dominante de PCAF dans le complexe SAGA limiterait l'action de GCN5/USP22 sur TRF1 non liée aux télomères qui sera à son tour dégradée par le protéasome, réduisant le pool de TRF1 disponible pour s'assembler à nouveau au niveau des télomères.

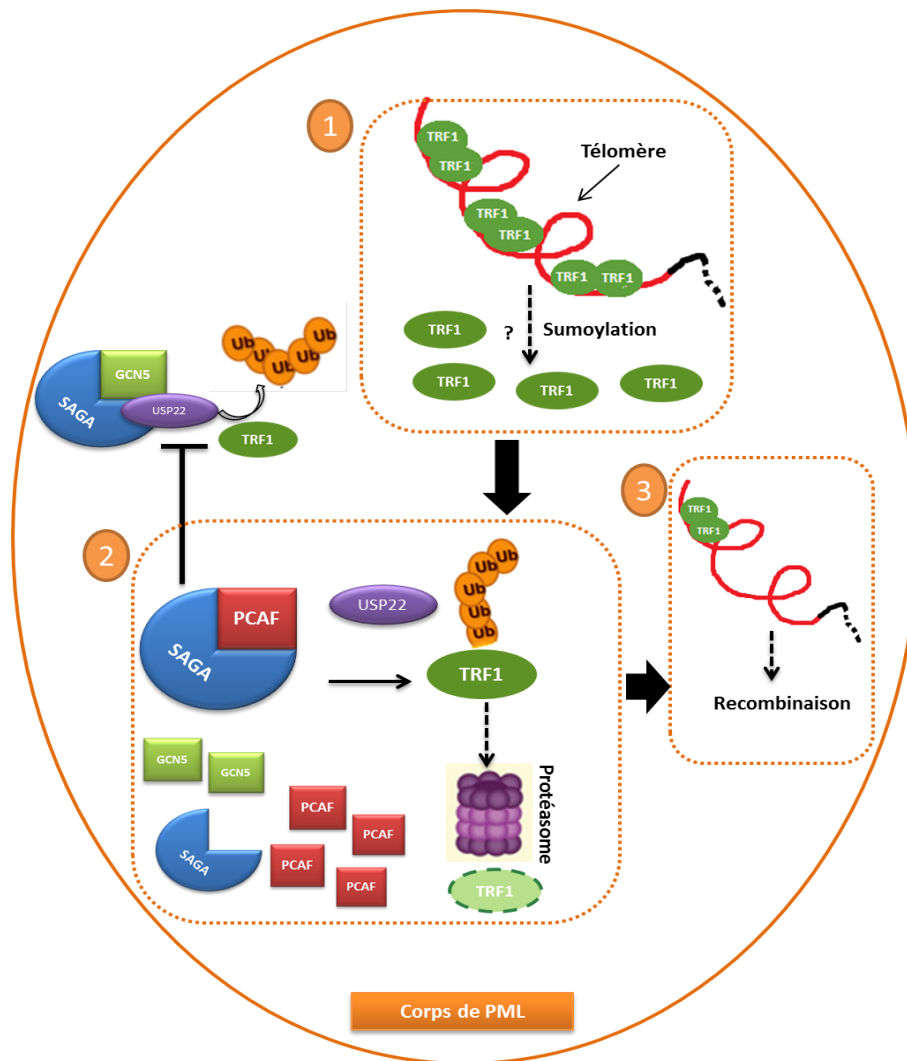


Figure 25 : Modèle proposé pour la régulation du mécanisme ALT par PCAF et GCN5

#### 4. D'autres protéines télomériques peuvent-elle représenter des acteurs importants pour la régulation du mécanisme ALT par le complexe SAGA ?

Nous avons montré que GCN5 agit non seulement avec TRF1, mais aussi avec TRF2. Cependant, notre étude était centralisée sur TRF1 dont l'interaction avec GCN5 était plus fréquente et augmentée après inhibition du protéasome. TRF2 comme TRF1 représentent des

acteurs moléculaires qui régulent négativement la recombinaison homologe. Une fois liée à l'ADN télomérique, TRF2 s'engage dans le traitement des structures intermédiaires de la recombinaison, il limite par exemple l'activité endonucléase du complexe SLX4 qui, comme déjà mentionné, favoriserait le mécanisme ALT en augmentant la fréquence des T-SCE (Sarkar et al., 2015, Sobinoff et al., 2017). Etant donné que le rapport entre le niveau total de TRF2 et la quantité de la protéine liée à l'ADN télomérique est significativement plus faible dans les lignées cellulaires ALT que dans les lignées cellulaires télomérase-positives, César et ses collaborateurs ont proposé que la perte de TRF2 pourrait déprotéger les télomères favorisant ainsi la réparation par le mécanisme ALT (Cesar et al, 2009). D'autre part, TRF2 joue un rôle essentiel dans la suppression des fusions chromosomiques médiées par NHEJ (Ribes-Zamora et al., 2013). En outre, la déplétion à long terme de TRF2 dans les cellules ALT conduit à des fusions télomériques, au raccourcissement des télomères et à l'induction de la sénescence (D'Alcontres et al., 2007). Ainsi, nous revenons à l'hypothèse déjà émise, qu'une déprotection partielle des télomères qui peut être contrôlée par la balance PCAF/GCN5, serait indispensable pour la recombinaison des télomères dans les cellules ALT.

Les études menées par Atanassov et coll ont également révélé que l'extinction de Gcn5 a réduit le niveau d'une autre protéine du complexe shelterin, POT1a (Atanassov et al., 2009). Bien que l'ubiquitination de POT1 n'ait pas été décrite jusqu'à présent (Chang et al., 2003), nous ne puissions pas écarter le fait que POT1 puisse être affectée de la même manière que TRF1 par la perte de GCN5. Par ailleurs, il a été montré que TRF1 interagit avec POT1 pour contrôler son dépôt au niveau de l'ADN télomérique simple brin (Loayza and de Lange, 2003). Lorsqu'il est présent au niveau des télomères, POT1 empêche l'activation d'ATR, un facteur critique pour la régulation du mécanisme ALT (Denchi and de Lange 2007, Flynn et al. 2015). Ces études nous amènent à suggérer que lorsque USP22 s'associe à GCN5 dans le complexe SAGA, il stabilise TRF1 au niveau des télomères qui à son tour favorise le dépôt de POT1 au niveau de l'ADN télomérique simple brin, inhibant ainsi la recombinaison médiée par ATR au niveau des APB. Partant de toutes ces observations, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les effets retrouvés sur le phénotype ALT soient liés à POT1 directement ou bien indirectement par le biais de TRF1. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour vérifier ces hypothèses.

## **5. Régulation du turnover des protéines télomériques dans les APB?**

Les APB constituent une plateforme pour la recombinaison et l'élongation des télomères dans les cellules ALT. Ils regroupent un ensemble de protéines impliquées dans le mécanisme ALT. Nous avons montré qu'USP22 est un constituant des APB et des corps PML en général. Bien que la protéine PML soit le composant principal des corps de PML, plusieurs autres protéines ont été retrouvées dans ces corps qui exécutent des fonctions bien définies et spécialisées dans la cellule (Van Damme et al., 2010). Les corps PML s'accumulent dans le noyau (Negorev and Maul, 2001). D'une manière intéressante, ces corps fonctionnent comme des centres protéolytiques régulant la dégradation des protéines ubiquitinylées, médiée par le protéasome. En effet, cette fonction est facilitée du fait que ces corps de PML sont enrichis par les composants du protéasome ainsi que par un ensemble de protéines qui contrôlent des modifications post-traductionnelles, telles que la SUMO et l'Ubiquitine (Everett et al., 1997, Van Damme et al. 2010, Lallemand-Breitenbach et al., 2001, Mattsson et al., 2001).

Dans notre modèle, nous avons privilégié les APB comme des sites de régulation des modifications post-traductionnelles de TRF1 y compris le contrôle de sa dégradation et de son turnover par le complexe SAGA. Cette hypothèse est soutenue par la présence de plusieurs acteurs importants et identifiés au niveau de ces corps d'APB. Tout d'abord, nos résultats ont montré qu'USP22 fait partie intégrante des PML et particulièrement des APB, et de manière intéressante son partenaire Ataxin-7 a été aussi retrouvé au niveau des PML (Janer et al., 2010). En plus, il a été révélé que TRRAP, un constituant constitutif du complexe SAGA, colocalisait avec les corps de PML, et son accumulation était augmentée suite à l'inhibition du protéasome (Xu et al., 2008, Vilotti et al., 2012). Partant de cette observation, il est intéressant de détecter dans notre modèle si l'inhibition du protéasome, qui a provoqué une augmentation des interactions GCN5-TRF1, pourrait induire une accumulation de GCN5 ou même de PCAF dans les corps PML. Enfin, le complexe SMC5/6, contenant la ligase MMS2, a été identifié au niveau des APB des cellules ALT (Potts and Yu 2007). Par conséquent, la sumoylation des protéines TRF1 et TRF2, médiée par MMS2 et impliquée dans la régulation du mécanisme ALT comme nous l'avons discuté, peut se faire au niveau des APB.

# Résultats et discussion - II

---

## I. Introduction

En fonction des résultats obtenus dans notre première publication, nous avons pu montrer le rôle opposé de deux HAT, PCAF et GCN5, dans la régulation du mécanisme ALT. Dans le but de caractériser d'avantage le rôle de ces deux protéines, nous avons étudié dans cette deuxième partie de ma thèse l'implication de leurs activités lysines acétyl transférase dans le phénotype ALT. Parmi les inhibiteurs d'HAT disponibles, nous avons testé l'effet de l'Acide Anacardique, un inhibiteur naturel à large spectre inhibant l'activité de PCAF et GCN5, sur le phénotype ALT et la prolifération des cellules ALT. L'acide anacardique est l'un des composés naturels les plus connus, il est présent dans les noix de cajou mais également dans les mangues. L'AA présente plusieurs effets biologiques tels que l'effet antibactérien et il a été utilisé comme un agent thérapeutique contre le cancer de prostate, le cancer du sein et autres (Balasubramanyam et al., 2003, Yao et al., 2015, Schultz et al., 2010).

Dans une seconde approche, nous avons cherché à comprendre si l'effet de l'AA sur le phénotype ALT était lié à une activité spécifique de l'une des deux HAT en question, ceci a été réalisé en traitant nos cellules ALT par des siRNAs dirigés contre PCAF ou GCN5 en combinaison avec le traitement de l'AA. Nos résultats ont mis en évidence l'importance de l'activité lysine acétyl transférase, probablement de PCAF, dans l'activation du mécanisme ALT. Par ailleurs, il a été montré que l'AA radiosensibilise diverses lignées cellulaires cancéreuses, y compris la lignée cellulaire ALT d'ostéosarcome U20S (Sun et al., 2006, CATE et al., 2010). De plus, il est connu que PCAF joue un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN, grâce à son activité d'acétylation. Ceci nous a permis d'explorer davantage comment l'AA pourrait interférer avec la réponse de nos cellules ALT au rayonnement ionisant. Par conséquent, nous avons prétraité avec la molécule nos cellules ALT d'ostéosarcomes (SAOS-2) et de gliomes (TG20), et par la suite évalué l'efficacité de ce prétraitement sur leur

radiosensibilité en mesurant la croissance par la technique de formation de colonies. En parallèle, des cellules de gliome télomérase-positives ont subi la même combinaison de traitement, afin d'évaluer si l'effet radiosensibilisateur de l'AA est spécifique aux cellules ALT ou bien il peut être aussi retrouvé dans des cellules télomérase-positives.

## II. Publication

### **ALT Cancer Cells are Specifically Sensitive to Lysine Acetyl Transferase Inhibition**

Dalal Bakhos-Douaihy<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Chantal Desmaze<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Maya Jeitany<sup>1, 2, 3, 4</sup>, Marie-Pierre Junier<sup>5</sup>, Hervé Chneiweiss<sup>5</sup>, and François D. Boussin<sup>1, 2, 3, 4,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Radiopathologie, CEA, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire, Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>2</sup> INSERM UMR967, Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>3</sup> Université Paris VII, UMR967, Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>4</sup> Université Paris XI, UMR967, Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>5</sup> Neuroscience Paris Seine-IBPS, CNRS UMR8246, Inserm U1130, Sorbonne Université, Paris, France.

\* Corresponding author: Phone: (+33) 1 46 54 97 91, Fax: (+33) 1 46 54 91 38, E-mail: [boussin@cea.fr](mailto:boussin@cea.fr)

*(Article en revision, Oncotarget)*

**Running title: ALT cells are sensitive to Anacardic Acid**

**Key words:** Alternative mechanism of telomere maintenance, PCAF, GCN5, ionizing radiation

**Abstract**

Some cancer cells elongate their telomeres through the ALT (alternative lengthening of telomeres) pathway, which is based on homologous recombination for the addition of telomere repeats without telomerase activity. *General control non-derepressible 5 (GCN5) and P300/CBP-associated factor (PCAF)*, two homologous lysine acetyltransferases, exert opposite effects on the ALT pathway, inhibiting or favoring it respectively. Here we show that ALT cells are particularly sensitive to the inhibition of acetyltransferases activities using Anacardic Acid (AA). AA treatment recapitulates the effect of PCAF knockdown on several ALT features, suggesting that AA decreased the ALT mechanism through the inhibition of lysine transferase activity of PCAF, but not that of GCN5. Furthermore, AA specifically sensitizes human ALT cells to radiation as compared to telomerase-positive cells suggesting that the inhibition of lysine acetyltransferases activity may be used to increase the radiotherapy efficiency against ALT cancers.



## INTRODUCTION

Some cancer cells counteract the telomere attrition occurring through cell division not by activating telomerase but through the ALT (alternative lengthening of telomeres) pathway. ALT pathway has been observed in various types of human tumors such as sarcomas and gliomas (1, 2). ALT is based on homologous recombination for the addition of telomere repeats (Bryan et al., 1997a). Telomeres of ALT cells are highly heterogeneous in length, ranging from undetectable to extremely long (Bryan et al., 1995b). ALT cells contain specialized promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies termed ALT-associated PML bodies (APBs), which are thought to be the main sites of telomere elongation in ALT cells. APBs contain usual PML nuclear bodies components like PML and Sp100 along with telomeric DNA, telomere binding proteins, and a mixture of DNA replication, recombination and repair factors (5, 6). ALT cells are also characterized by the presence of abundant linear and circular extrachromosomal telomere repeats (ECTR) (7, 8). Finally, the ALT telomeres are submitted to a high level of post-replicative exchanges known as telomere-sister chromatid exchanges (T-SCEs) (9).

The histone acetyltransferases (HATs) General control non-derepressible 5 (GCN5) and P300/CBP-associated factor (PCAF) share ~73% amino acid sequence identity and play a major role in the regulation of transcription. Several studies have shown that histones are not the only target substrate for these two enzymes. These two proteins are mutually exclusive subunits of large complexes such a SAGA-like or Ada-

Two-A-containing (ATAC)-like (10, 11). These complexes are involved in the regulation of distinct substrates and they have multiple biological roles such as participating in the *DNA damage response* and telomere maintenance mechanism (12, 13). Indeed, in telomerase-positive cells, GCN5 has been shown to be a key player in the homeostasis of chromosome end by preventing signaling associated with telomere DNA damage and thereby protecting telomeres from fusions (12). We have recently shown that GCN5 knockdown increased T-SCE, and telomere instability in ALT cells, whereas PCAF knockdown had opposite effects it decreased T-SCE, APBs formation and telomere instability (13). However, the impact of the PCAF and GCN5 lysine acetyl transferase activities on the ALT mechanism remains unknown.

In this report, we used anacardic acid (AA), a pan-inhibitor of histone acetyl transferases (HATs) activities (14, 15) to investigate the role of PCAF and GCN5 enzymatic activity in the regulation of ALT. AA occurs naturally in cashew nuts (the most accessible natural dietary source), mangos, and cashew apples. Diverse biological activities for the AAs have been described, including antitumor activity against various cancers such as prostate cancer (Yao et al., 2015), breast cancer cells (17), or pituitary adenoma cells (18). Our results show that AA inhibits ALT, eventually affecting ALT cell growth and viability. We demonstrate that PCAF but not GCN5 acetyl transferase activity, is involved in this process. *Furthermore, we show* that AA specifically radiosensitizes ALT cells, as compared to telomerase-positive cell lines.

## RESULTS

### **AA decreased cell growth and viability of the ALT cell lines TG20 and SAOS2**

We first investigated cell viability after 72 h of treatment with increasing doses of AA by using the WST-1 assay. As shown in Figure 1A, concentrations up to 30  $\mu$ M of AA had no significant effect on the viability of any of the cell lines tested. Interestingly, 100  $\mu$ M AA had no effect on the telomerase-positive GSCs (TG1N and TG16), but dramatically decreased the viability of ALT cells, SAOS-2 and TG20. Consistently, detection of cleaved-caspase 3-positive cells showed the induction of apoptosis in ALT cells treated with 100  $\mu$ M AA, but not with 30  $\mu$ M AA, whereas no increase in apoptosis was detected in telomerase-positive GSCs treated with any concentrations of AA (Supplementary Figure S1).

We then analysed the effects of AA on lysine acetylation in two telomerase-positive cell lines (TG1N and TG16 (19)) and two ALT cell lines (TG20 (19, 20), and SAOS2 (HTB85, ATCC)). To this end, we measured the levels of lysine acetylation of histone H3 known to be the preferred substrate of both PCAF and GCN5 acetyltransferase activities (21, 22). Western blotting using an anti-acetyl-Histone H3 antibody showed that 30  $\mu$ M AA significantly decreased by 55 to 78% Histone H3 acetylation after 72h of treatment in both ALT (SAOS-2 and TG20) and telomerase-positive (TG16 and TG1N) cells (Figure 1B) (Supplementary Figure S2).

We next determined the effects of long-term treatments with 30  $\mu$ M AA on cell growth. As shown in Figure 1C, AA had no effect on population doublings in cultures of the telomerase-positive GSCs TG16. On the opposite, AA significantly decreased the growth of the ALT cell lines (SAOS-2 and TG20), with TG20 being the most sensitive.

Altogether, these data suggest that ALT cell lines are specifically sensitive to Lysine acetyl transferases inhibition by AA as compared to telomerase-positive cell lines.

### **AA downregulates ALT**

We thus sought to determine whether the effects of AA on cell growth and viability were associated with interferences with the ALT pathway. To this end we scored the number of APBs in cells treated with AA for different time periods. APBs are PML bodies in which telomeres are elongated and are thus specific of ALT cells (Yeager et al., 1999a). As shown in Figure 2A, the mean numbers of PML bodies co-localizing with telomeres, were constantly decreased by nearly 50% in both TG20 and SAOS2 cells treated with 30  $\mu$ M AA as compared to untreated controls.

We next investigated whether AA interfered with T-SCE, another hallmark of ALT cells, by performing chromosome orientation fluorescence in situ hybridization (Co-FISH) on metaphase chromosomes as previously described (23, 24). As shown in Figure 2B, the frequency of T-SCE was significantly decreased by 30 to 56% in SAOS-2 and TG20 cells treated with for 2 to 17 days with 30  $\mu$ M AA.

The decrease in cell growth and viability induced by inhibition of lysine acetyl transferases in AA-treated SAOS2 and TG20 cells is thus clearly associated to a down regulation of the ALT mechanism.

**AA decreased ALT through the inhibition of the lysine acetyl transferase activity of PCAF, but not that of GCN5.**

In order to determine whether the lysine acetyl transferase activities of PCAF and GCN5 are involved in the regulation of ALT, we analyzed the effects of AA on APB formation and T-SCEs in TG20 and SAOS-2 cells knocked down for either PCAF or GCN5 using specific siRNAs (siPCAF or siGCN5 respectively) as previously described (13) (Figure 3A).

As shown in Figure 3, similar data were obtained with TG20 and SAOS-2 cells. Consistently with our previous report (13), PCAF knockdown significantly decreased the number of APBs, as compared to that found in cells transfected with control siRNAs (SiCtrl), whereas GCN5 knockdown had no effect (Figure 3B). Interestingly, treatment with 30  $\mu$ M AA decreased APBs formation in cells transfected with either siCtrl, siPCAF or siGCN5 at a level similar to that found in vehicle-treated PCAF knockdown cells.

As previously demonstrated (13), PCAF knockdown decreased T-SCE as compared to siCtrl transfected cells (Figure 3C). T-SCE were also decreased to similar extents in AA-treated cells transfected with either siCtrl-treated or siPCAF (Figure 3C). AA mimicked thus the inhibitory effects of PCAF knockdown on the formation of APBs and T-SCEs, two hallmarks of ALT. No additive or synergistic effects were observed when treating cells with both siPCAF and AA. As previously reported (13), GCN5

knockdown increased significantly the numbers of T-SCE as compared to siCtrl in both cell lines, but addition of 30  $\mu$ M AA decreased T-SCE at the same levels as the ones observed with siPCAF or with AA or combination of both (Figure 3C).

Altogether our data suggest that AA decreased the ALT mechanism through the inhibition of lysine transferase activity of PCAF, but not that of GCN5.

### **AA sensitizes ALT cells to irradiation**

AA has been previously shown to sensitize various cancer cell lines to ionizing radiation, including the ALT cell line U2OS (25, 26). In order to investigate further how AA interferes with the cell response to radiation, SAOS-2 and TG16 cells were treated either with 30  $\mu$ M or 100  $\mu$ M AA for 3 days prior to be irradiated at 2 or 4 Gy. A clonogenicity assay was then performed in fresh medium without AA. As shown on Figure 4A, the colony formation assay confirmed the dose-dependent effect of AA on SAOS-2 cell viability and the lack of AA effect on the telomerase-positive TG16 cells. By contrast, irradiation similarly impaired the clonogenicity of both cell lines in a dose-dependent manner. Combining the two treatments revealed additive effects on ALT cells, whereas AA did not radio-sensitize the telomerase-positive cell lines tested. Since in these experiments radiosensitization could have been masked by the effects of AA on ALT cell proliferation and viability at the time of irradiation, we performed the irradiation and the clonogenicity assay after 24h of treatment with AA. Results showed that the treatment with AA alone did not impair the clonogenicity of TG20 and SAOS-2 (Figure 4B), but induced a significant decrease in the number of APBs in both cell lines (Figure 4D). No radiosensitization of the telomerase-positive GSC lines TG16 was observed

(Figure 4C). However, 24 h pretreatment with AA clearly radiosensitized the two ALT cell lines, TG20 and SAOS-2 (Figure 4B), reducing their clonogenicity in a dose-dependent manner. Altogether, these data reveal that AA specifically sensitizes human ALT cells to ionizing radiation as compared to telomerase-positive cell lines.

## DISCUSSION

We have previously shown that the knockdowns of the two homologous lysine acetyl transferases GCN5 and PCAF had opposite effects on the alternative mechanism of telomere maintenance, suggesting that PCAF, which is absent from telomeres may indirectly favor ALT, whereas GCN5, which is present at telomeres, may oppose to telomere recombination (13). Here, we report that the pan-inhibitor of lysine acetyl transferases AA recapitulates only the effects of PCAF knockdown on ALT cells. These results indicate that PCAF favors ALT through its lysine acetyltransferase activity whereas GCN5 opposes ALT by another mechanism. This supports the hypothesis that GCN5 acts through its interaction via the SAGA complex with the deubiquitinase USP22 in APBs to prevent ubiquitin-mediated proteolysis of telomere proteins and therefore to oppose telomere recombination (13, 12).

PCAF forms activating transcriptional complexes with other partners, including p300, which bind promoters and activate transcription by prompting histone acetylation (27, 28). AA decreased APBs formation similarly to PCAF or P300 knockdowns (13), suggesting that PCAF and P300 are involved together in APBs formation through the transcriptional modulation of genes implicated in APB formation and homologous recombination hence in the regulation of the ALT telomere lengthening. Interactions of PCAF and p300 have for example been shown to activate the expression of BRCA1 (29), known to be recruited in APBs and to promote ALT activity (30, 31, 32). Transcriptional downregulation of BRCA1 expression by the inhibition of the lysine acetyl transferase activity of the PCAF and P300 complex may thus be part of an



integral signaling pathway that determines and explains the downregulation of the ALT phenotype upon AA treatment.

Several studies have shown that AA radiosensitizes various cancer cell lines, cervical adenocarcinoma, squamous carcinoma cell lines and the ALT cell line U2OS (human ALT osteosarcoma) (25, 26). Among the possible mechanisms, AA has been proposed to repress H2AX expression in prostate cancer cells (Yao et al., 2015) or to reduce the expression of anti-apoptotic proteins associated with cell survival and radioresistance in pituitary adenoma cells (18). Here we show that ALT cells are particularly radiosensitized by AA as compared to telomerase-positive cells, suggesting that ALT inhibition enhances the cell sensitivity to radiation. This is consistent with previous reports showing that telomere dysfunction impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation (33). In particular, suppression of telomere-binding protein TPP1 (TIN2 and POT1 interacting protein) has been shown to result in telomere dysfunction and to enhance radiation sensitivity in ALT cell lines (Qiang et al., 2014).

Our data suggest that inhibition of lysine acetyl transferases could represent a new therapeutic target against ALT cancer cells. ALT is frequent in Glioblastoma multiforme (GBM) (1, (Henson et al., 2005), a primary brain tumor with a very poor prognosis. Tumor relapses are attributed to the resistance of GSCs to standard treatments, which include surgical resection, radiotherapy and chemotherapy using Temolozomide (TMZ). We have shown that AA not only impaired the viability of the ALT GSC line TG20, but also markedly increased its radiosensitivity. Interestingly, TG20 has

been previously shown to be particularly radiation resistant (19) and resistant to TMZ (35). Our data suggest therefore that the targeting of the lysine acetyl transferases may represent a promising alternative to the treatment of ALT cancers.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture and reagent**

Telomerase-positive GSCs, including the TG16, TG1N and TG10 cell lines, and the ALT GSC TG20 line were maintained in culture as previously described (19). The human osteosarcoma ALT *cell line* SAOS-2 was *obtained* from the American Type Culture Collection (HTB85, ATCC) and was grown in DMEM (Gibco, Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (PAA Laboratories). For AA exposure, the drug was purchased from Cell Signaling and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (maximum concentration: 143 mM) as a stock solution and prepared in dilution with culture when necessary. Effects of AA were systematically compared to DMSO controls.

### **WST-1 cell proliferation assay**

Cells were plated in 96-well plates for 72h with the AA treatment. A total of 2,000 cells were used per well. After 72h of AA treatment, 10  $\mu$ l of WST-1 (ref 11644807001, Roche) reagent was added to each well and incubation was continued for an additional 2–3 h. The absorbance was determined using a spectrophotometer (Bio-Tek uQuant MQX200 Microplate Reader Spectrophotometer) at a wavelength of 450 nm.

### **Cleaved-caspase 3 detection**

Anti-activated Caspase-3 antibody (1:200, Cell Signalling Technology #9661) was used to examine apoptosis induced in different cells. Briefly, cells were grown on Labteck chamber slides (PEZGS0816, Millipore) for 24 hours, and then treated with AA for 72h. After that, treated and controls cells were fixed with 4% paraformaldehyde and incubated with the antibody and then examined under fluorescence microscope (Olympus U-RFL-T).

### **Population Doubling Assay**

Cells were seeded on 6-well plates and passaged every 3 days upon reaching 70% confluence. The number of cells at every passage was counted by the Trypan Blue

exclusion method and the AA was added after each passage. The PD was calculated using equation  $\log_2$  (harvested cells number/ plated cells number). The final PD for each passage was determined by successive addition of total numbers in each passage.

### **Western blot**

After 72h of AA treatment cells were lysed by RIPA Lysis Buffer containing protease and phosphatase inhibitor. An equal amount of each protein sample was separated by 8–12% SDS–PAGE and transferred onto PVDF membranes. The following antibodies were incubated with the blocked membrane to detect the proteins of interest: anti-acetyl histone 3 (1:1000, Millipore 06-599) and anti-histone 3 (1:2500, ABCAM ab1791).

### **PCAF and GCN5 knockdowns**

Selected small interfering RNA (siRNAs) targeting PCAF and GCN5 also negative control duplex siRNAs (siCtrl) (Life Technologies) used in this study were previously described and validated in Jeitany et al 2017. The following siRNA constructs were as follows: siPCAF sense, 5'-CCACUUUAAUGGGAUGUGAGCUAAA-3' and antisens, 5'-UUUAGCUCACAUCCCAUUAAAGUGG-3'; siGCN5 sense, 5'-CCAAGCAGGUCUAUUUCUACCUCUU-3' and antisense 5'-AAGAGGUAGAAAUAGACCUGCUUGG-3' (Life Technologies). Briefly, cells were dissociated and transfected via electroporation with a Neon Transfection System (Life Technologies) using the manufacturer's protocol. Transfected cell combined or not with AA treatment were plated 72 hours on laminin-coated flasks (for chromosome orientation-fluorescence *in situ* hybridization (CO-FISH) experiments) or Millicell EZ slides (PEZGS0816, Millipore, for immunofluorescence (IF) assays).

### **Detection of ALT associated PML bodies (APBs)**

Cells were treated with AA or DMSO and fixed in 4% paraformaldehyde. Cells were then permeabilized in 0.5% Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBS) and

blocked in 7.5% Goat Serum + 7.5%. The blocked cells were then incubated with anti-PML (1:100; Santa Cruz Biotechnology sc-966) overnight at 4°C. The next day, cells were washed with PBS and incubated with secondary antibody for 1h at room temperature. The immuno-staining of telomeres was performed after the staining of PML protein by fixation in 4% formaldehyde and dehydration with ethanol (50°- 80°- 100°). The dehydrated slides were overlaid with Cy3-(CCCTAA)<sub>3</sub> PNA probe (Applied Biosystems) prepared in PNA hybridization solution (70% formamide- 10 mM Tris pH 7.2, BSA 1%), then incubated at 80°C for 3 min and hybridized at room temperature for 2 hours. The slides were washed twice in 70% formamide-10 mM Tris pH 7.2 and three times with 50 mM Tris pH 7.2-150 mM NaCl-0.05% Tween-20. Finally the slides were mounted with Dapi Fluoromount-G (Southern Biotech). Images were taken using the Leica DM 2500 microscope.

## **CO-FISH**

CO-FISH allows the detection of T-SCEs and was performed as previously described (36). Using this technique, the chromosome telomere lagging strands (TTAGGG) and telomere leading strands (CCCTAA) can be differentiated after selective degradation of the neosynthesized strands and the use of specific fluorescent PNA probes. Briefly, cells were grown in the presence of BrdU for one cell cycle. The cells were spread on SuperFrost Plus glass slides (Menzel-Glaser) and stained with Hoechst 33258. Then, they were exposed to UV light and degraded by exonuclease Exo III (Promega). After dehydration with ethanol (50°-75°-100°) slides were hybridized (2 hours at room temperature) with a telomeric FITC-conjugated (T<sub>2</sub>AG<sub>3</sub>) PNA probe (Applied Biosystems) that is complementary to the C-rich telomeric strand (leading strand). Incubation (2 hours at room temperature) with a telomeric Cyanine-3-conjugated (C<sub>3</sub>AT<sub>2</sub>)<sub>3</sub> PNA probe (Applied Biosystems) that is complementary to the G-rich telomeric strand (lagging strand) followed. Metaphases were captured and analysed using an Axio Imager Z.2 (Zeiss, Oberkochen, Germany) coupled to a Metafer Image Analysis System (MetaSystems, Altlussheim, Germany).

### Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was extracted using an RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and reverse-transcribed to cDNA using High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems). The following primers were used *pcaf* primers: forward: 5'-GCCACAGTTCTGCGACAGTCT-3', reverse: 5'-CCGAGCGAAGCAATGTTCTC-3'; *gcn5* primers: forward: 5'-GTGCTGTCACCTCGAATGAG-3', reverse: 5'-TGGAGAAACCCTGCTTTTTGA-3 (EuroGentec). The results were normalized to *gapdh* levels, which were determined with the primers: forward: 5'-GTCGCCAGCCGAGCCACATC-3', reverse: 5'-GGTGACCAGGCGCCCAATACG-3'. The reactions were performed with a SYBR Green Kit (Applied Biosystems).

### Colony formation assay

Clonogenic assay was used to assess the effect of AA in combination with radiation. Cells were plated in 6-well plates. Once they are attached, they were treated with AA for 24h or 72h. Cells were then irradiated with 0, 2 or 4 Gy gamma radiation (GSR D1, gamma service) and then cultured for 14 days, at which point colonies could be identified by the naked eye. The cells were subsequently fixed in acetic acid/methanol and stained with crystal violet. Colonies were counted manually or using the Typhoon software and the clone formation efficiency was calculated as the ratio of clone numbers to plated cell numbers in each well.

## **Statistical analysis**

All statistical tests and graphical drawings were performed on GraphPad PRISM version 7. Results are expressed compared to the vehicle within the same cell line, by the Student's t-tests or by analysis of variance (ANOVA).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank all members of the LRP for their helpful discussions and comments on this work. We acknowledge Olivier Etienne and Michelle Ricoul for technical help and Thierry Kortulewski, Lamy Irbah and Françoise Hoffschir for use of the iRCM imaging facility.

## **CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## **GRANT SUPPORT**

This work was supported by Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives [Segment de radiobiologie to FB, IRTELIS PhD program to DB].

---

## REFERENCES

### REFERENCES

1. Hakin-Smith V, Jellinek DA, Levy D, Carroll T, Teo M, Timperley WR, et al. Alternative lengthening of telomeres and survival in patients with glioblastoma multiforme. *Lancet Lond Engl*. 2003 Mar 8;361(9360):836–8.
2. Henson JD, Hannay JA, McCarthy SW, Royds JA, Yeager TR, Robinson RA, et al. A Robust Assay for Alternative Lengthening of Telomeres in Tumors Shows the Significance of Alternative Lengthening of Telomeres in Sarcomas and Astrocytomas. *Clin Cancer Res*. 2005 Jan 1;11(1):217–25.
3. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med*. 1997 Nov;3(11):1271–4.
4. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J*. 1995 Sep 1;14(17):4240–8.
5. Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res*. 1999 Sep 1;59(17):4175–9.
6. Chung I, Osterwald S, Deeg KI, Rippe K. PML body meets telomere. *Nucleus*. 2012 May 1;3(3):263–75.
7. Henson JD, Cao Y, Huschtscha LI, Chang AC, Au AYM, Pickett HA, et al. DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nat Biotechnol*. 2009 Dec;27(12):1181–5.
8. Cesare AJ, Griffith JD. Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Mol Cell Biol*. 2004 Nov;24(22):9948–57.
9. Londoño-Vallejo JA, Der-Sarkissian H, Cazes L, Bacchetti S, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange. *Cancer Res*. 2004 Apr 1;64(7):2324–7.
10. Wang Y-L, Faiola F, Xu M, Pan S, Martinez E. Human ATAC Is a GCN5/PCAF-containing Acetylase Complex with a Novel NC2-like Histone Fold Module That Interacts with the TATA-binding Protein. *J Biol Chem*. 2008 Dec 5;283(49):33808–15.
11. Krebs AR, Karmodiya K, Lindahl-Allen M, Struhl K, Tora L. SAGA and ATAC Histone Acetyl Transferase Complexes Regulate Distinct Sets of Genes and ATAC Defines a Class of p300-Independent Enhancers. *Mol Cell*. 2011 Nov 4;44(3):410–23.

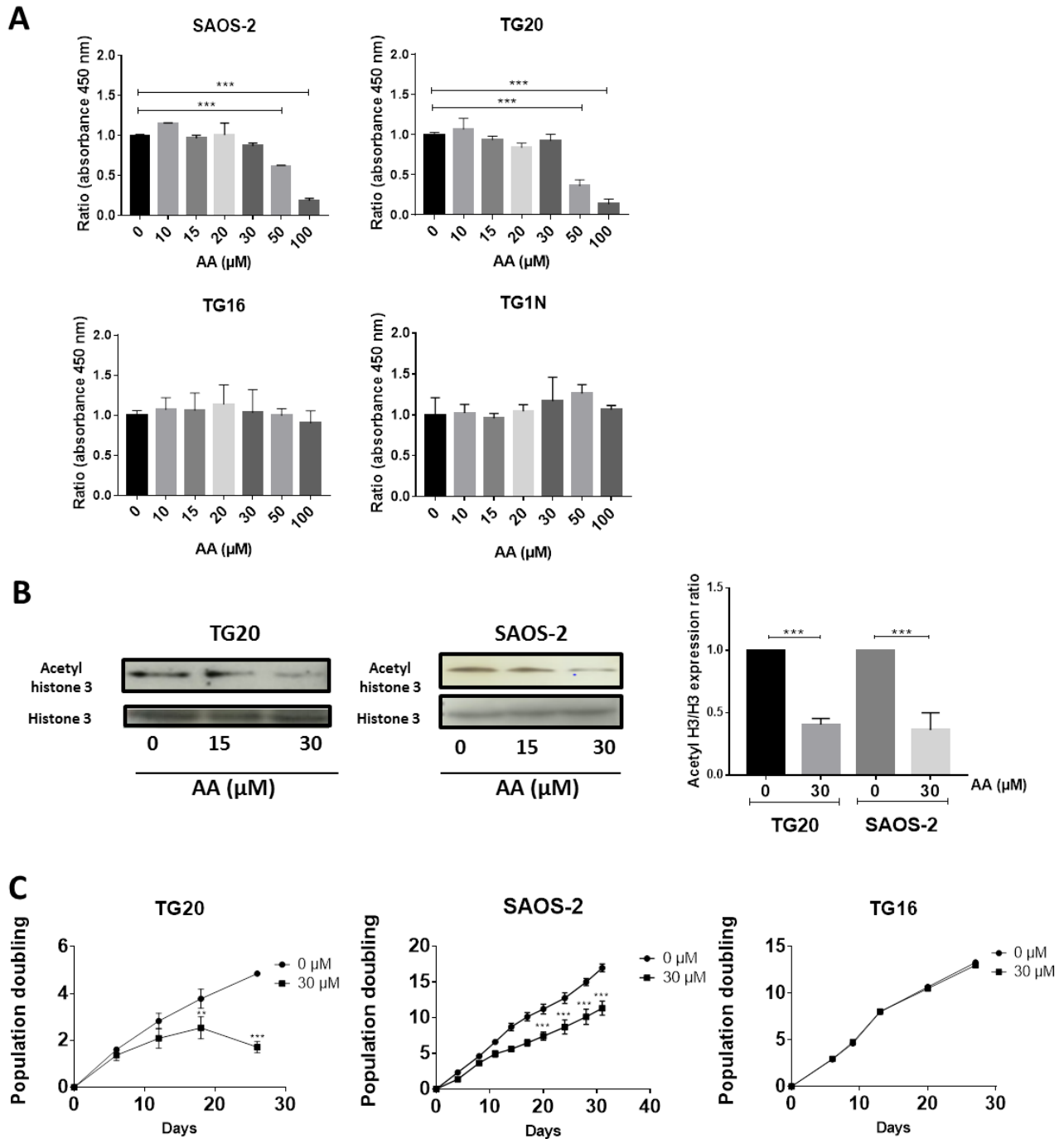


12. Atanassov BS, Evrard YA, Multani AS, Zhang Z, Tora L, Devys D, et al. Gcn5 and SAGA regulate shelterin protein turnover and telomere maintenance. *Mol Cell*. 2009 Aug 14;35(3):352–64.
13. Jeitany M, Bakhos-Douaihy D, Silvestre DC, Pineda JR, Ugolin N, Moussa A, et al. Opposite effects of GCN5 and PCAF knockdowns on the alternative mechanism of telomere maintenance. *Oncotarget*. 2017 Feb 17;8(16):26269–80.
14. Balasubramanyam K, Swaminathan V, Ranganathan A, Kundu TK. Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *J Biol Chem*. 2003 May 23;278(21):19134–40.
15. Cui L, Miao J, Furuya T, Fan Q, Li X, Rathod PK, et al. Histone acetyltransferase inhibitor anacardic acid causes changes in global gene expression during in vitro *Plasmodium falciparum* development. *Eukaryot Cell*. 2008 Jul;7(7):1200–10.
16. Yao K, Jiang X, He L, Tang Y, Yin G, Zeng Q, et al. Anacardic acid sensitizes prostate cancer cells to radiation therapy by regulating H2AX expression. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(12):15926–32.
17. Schultz DJ, Wickramasinghe NS, Ivanova MM, Isaacs SM, Dougherty SM, Imbert-Fernandez Y, et al. Anacardic acid inhibits estrogen receptor alpha-DNA binding and reduces target gene transcription and breast cancer cell proliferation. *Mol Cancer Ther*. 2010 Mar;9(3):594–605.
18. Sukumari-Ramesh S, Singh N, Jensen MA, Dhandapani KM, Vender JR. Anacardic acid induces caspase-independent apoptosis and radiosensitizes pituitary adenoma cells. *J Neurosurg*. 2011 Jun;114(6):1681–90.
19. Silvestre DC, Pineda JR, Hoffschir F, Studler J-M, Mouthon M-A, Pflumio F, et al. Alternative lengthening of telomeres in human glioma stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2011 Mar;29(3):440–51.
20. Jeitany M, Pineda JR, Liu Q, Porreca RM, Hoffschir F, Desmaze C, et al. A preclinical mouse model of glioma with an alternative mechanism of telomere maintenance (ALT). *Int J Cancer J Int Cancer*. 2015 Apr;136(7):1546–58.
21. Kuo Y-M, Andrews AJ. Quantitating the specificity and selectivity of Gcn5-mediated acetylation of histone H3. *PLoS One*. 2013;8(2):e54896.
22. Poux AN, Marmorstein R. Molecular basis for Gcn5/PCAF histone acetyltransferase selectivity for histone and nonhistone substrates. *Biochemistry (Mosc)*. 2003 Dec 16;42(49):14366–74.
23. Bailey SM, Williams ES, Cornforth MN, Goodwin EH. Chromosome Orientation fluorescence in situ hybridization or strand-specific FISH. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2010;659:173–83.

24. Pennarun G, Hoffschir F, Revaud D, Granotier C, Gauthier LR, Mailliet P, et al. ATR contributes to telomere maintenance in human cells. *Nucleic Acids Res.* 2010 May;38(9):2955–63.
25. Sun Y, Jiang X, Chen S, Price BD. Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation. *FEBS Lett.* 2006 Aug 7;580(18):4353–6.
26. CATE RT, KRAWCZYK P, STAP J, ATEN JA, FRANKEN NAP. Radiosensitizing effect of the histone acetyltransferase inhibitor anacardic acid on various mammalian cell lines. *Oncol Lett.* 2010 Jul;1(4):765–9.
27. Love IM, Sekaric P, Shi D, Grossman SR, Androphy EJ. The histone acetyltransferase PCAF regulates p21 transcription through stress-induced acetylation of histone H3. *Cell Cycle.* 2012 Jul 1;11(13):2458–66.
28. Scolnick DM, Chehab NH, Stavridi ES, Lien MC, Caruso L, Moran E, et al. CREB-binding Protein and p300/CBP-associated Factor Are Transcriptional Coactivators of the p53 Tumor Suppressor Protein. *Cancer Res.* 1997 Sep 1;57(17):3693–6.
29. Jin W, Liu Y, Chen L, Zhu H, Di G-H, Ling H, et al. Involvement of MyoD and c-myc in regulation of basal and estrogen-induced transcription activity of the BRCA1 gene. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Feb;125(3):699–713.
30. Acharya S, Kaul Z, Gocha AS, Martinez AR, Harris J, Parvin JD, et al. Association of BLM and BRCA1 during Telomere Maintenance in ALT Cells. *PLoS ONE.* 2014 Aug 1;9(8).
31. Wilson FR, Ho A, Walker JR, Zhu X-D. Cdk-dependent phosphorylation regulates TRF1 recruitment to PML bodies and promotes C-circle production in ALT cells. *J Cell Sci.* 2016 Jul 1;129(13):2559–72.
32. Pan X, Drosopoulos WC, Sethi L, Madireddy A, Schildkraut CL, Zhang D. FANCM, BRCA1, and BLM cooperatively resolve the replication stress at the ALT telomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Jul 18;114(29):E5940–9.
33. Wong K-K, Chang S, Weiler SR, Ganesan S, Chaudhuri J, Zhu C, et al. Telomere dysfunction impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. *Nat Genet.* 2000 Sep;26(1):85–8.
34. Qiang W, Wu Q, Zhou F, Xie C, Wu C, Zhou Y. Suppression of telomere-binding protein TPP1 resulted in telomere dysfunction and enhanced radiation sensitivity in telomerase-negative osteosarcoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Mar 7;445(2):363–8.

35. Jr P, M J, A A, Mp3 J, H3 C, Boussin FD. Intranasal Administration of Temozolomide Delayed the Development of Brain Tumors Initiated by Human Glioma Stem-Like Cell in Nude Mice. *J Cancer Sci Ther.* 2017 Mar 4;9(3):374–8.

Figure 1



---

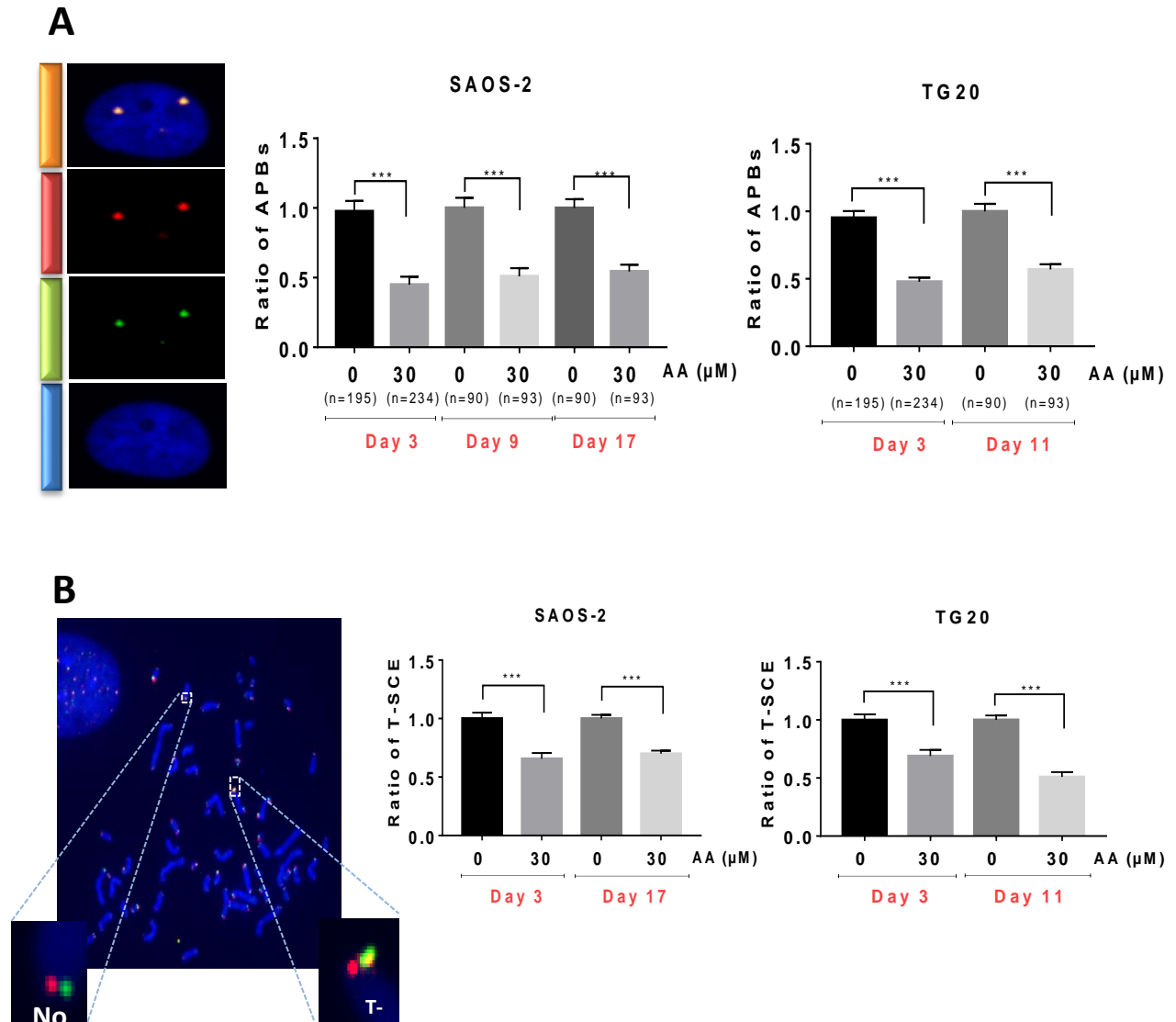
**Figure 1. Comparative short and long-term effects of AA on cell growth of ALT and telomerase positive cells.**

**A)** The short-term cytotoxicity of AA in a broad concentration range in both ALT and telomerase positive cells was evaluated. The percentages of viable SAOS-2, TG20, TG16, and TG1N cells were determined using the cell proliferation reagent WST-1 72h after AA treatment (10 to 100  $\mu$ M). Cultures treated with the vehicle (0.1% DMSO) were used as controls. To calculate cell viability, the value of the signal from the treated culture wells were expressed as a ratio of that of the control wells. Results are shown as mean  $\pm$  SD from triplicates. The experiments were repeated 3 times. \*\*\* $p < 0.001$ , one way Anova.

**B)** The effect of AA on acetylated histone 3 in ALT cells was analyzed. Western blot analysis of acetylated forms of histone H3 and total content of histone H3 was performed in both ALT (SAOS-2 and TG20) cell extracts 72h after 15 and 30  $\mu$ M AA treatments (left). The untreated controls contained DMSO. The quantitative data (right) are shown as relative intensity of acetylated histone band in arbitrary units that was adjusted for total histone 3 intensity and normalized to those of the control untreated. Data are expressed as the means  $\pm$  SD of two independent experiments for each cell line. \*\*\* $P < 0.001$  compared with vehicle-treated cells, Tukey-Kramer one way Anova.

**C)** Population doubling (PD) curves of TG20, SAOS-2 and TG16 cell lines. Cells were continuously cultivated in the presence of AA (30 $\mu$ M) for 30 days, and the cell growth was monitored. Cells treated with DMSO were used as a control. The x-axis indicates the number of incubation days, and the y-axis indicates the number of population doublings. Black circles: vehicle-treated cells. Black squares: AA-treated cells. Viable cells were counted weekly by trypan blue staining using a Malassez cell. Population doublings were calculated by the formula  $\log [(number\ of\ cells\ harvested)/(number\ of\ cells\ seeded)]/\log 2$ . Each curve depicts the averaged results (+SD) from two different experiments. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , 2 way ANOVA test.

Figure 2



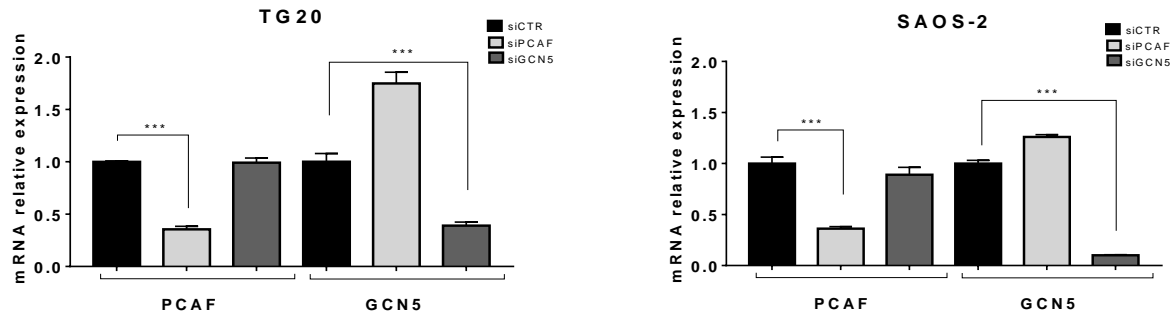
**Figure 2. Long term AA treatment is associated with suppression of ALT activity.**

**A)** Representative images of APB (left) captured with confocal microscopy. One APB is detected by double immunostaining of PML bodies (green) and telomere (Cy-3-labeled (CCCTAA)<sub>3</sub> PNA probe) (red). Cells were treated with 30µM AA for 30 days. Cells treated with DMSO were used as a control. APBs were counted in SAOS-2 (at day 3, day 9 and day 17) (bottom) and TG20 (at day 3 and day 11) (right). “n” indicates the number of counted cells. The values represent the ratio of number of APBs per cell (+SEM) relative to untreated control for each cell line and day of treatment. \*\*\* $p < 0.001$ , Student's *t*-test.

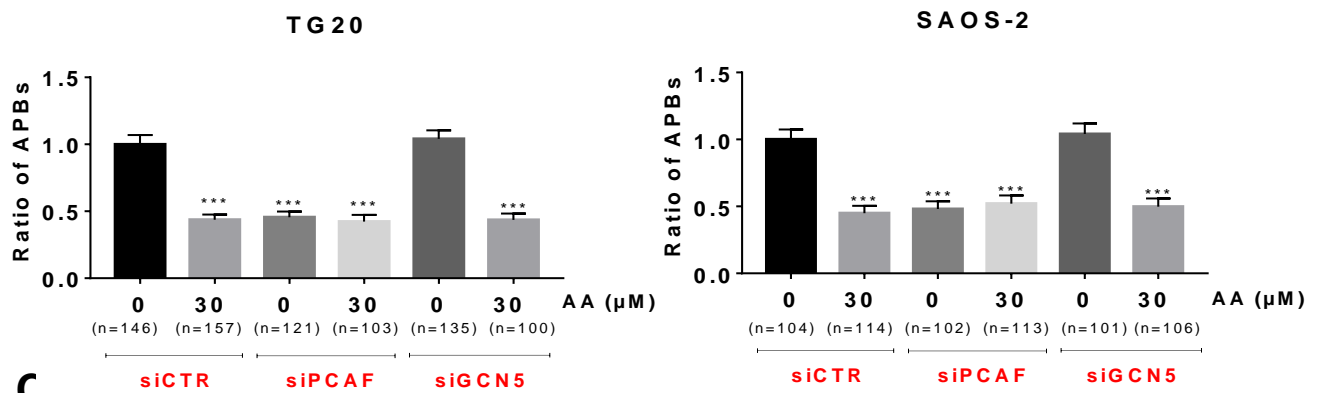
**B)** Illustrative telomeric exchange events (left) at TG20 telomeres using the CO-FISH technique. The differentially-labeled sister chromatids using two parental strand specific probes: an FITC-labelled (TTAGGG)<sub>3</sub> PNA probe (green) and a Cy-3-labeled (CCCTAA)<sub>3</sub> PNA probe (red) were visualized using fluorescence microscopy. In the case of exchange, the two probes will hybridize on the same strand and T-SCE (yellow) can thus be quantified. The T-SCE events were scored at early and late days of AA treatment in TG20 (right) and SAOS-2 (bottom). The values are the ratio of T-SCE events (+SEM) relative to untreated control for each condition. Between 2000 and 3000 chromosome extremities were analyzed (\*\*\* $p < 0.001$ , as reported by Student's *t*-test).

Figure 3

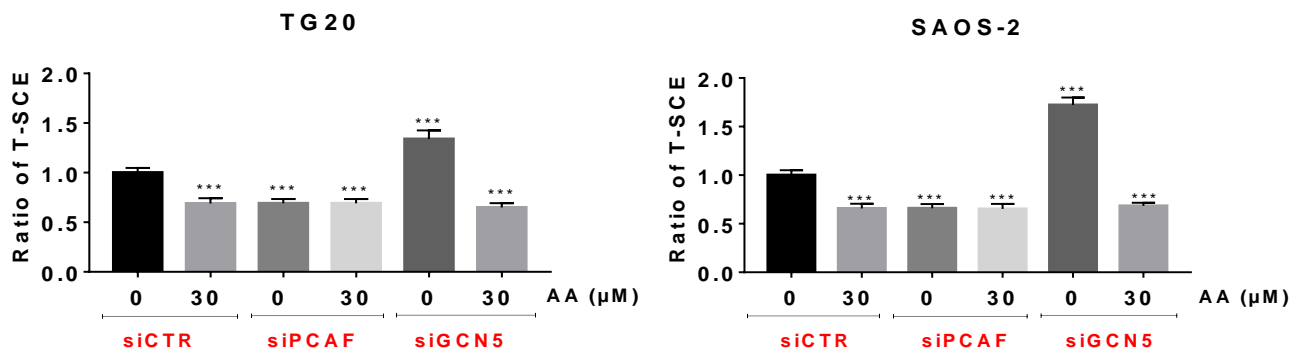
**A**



**B**



**C**





---

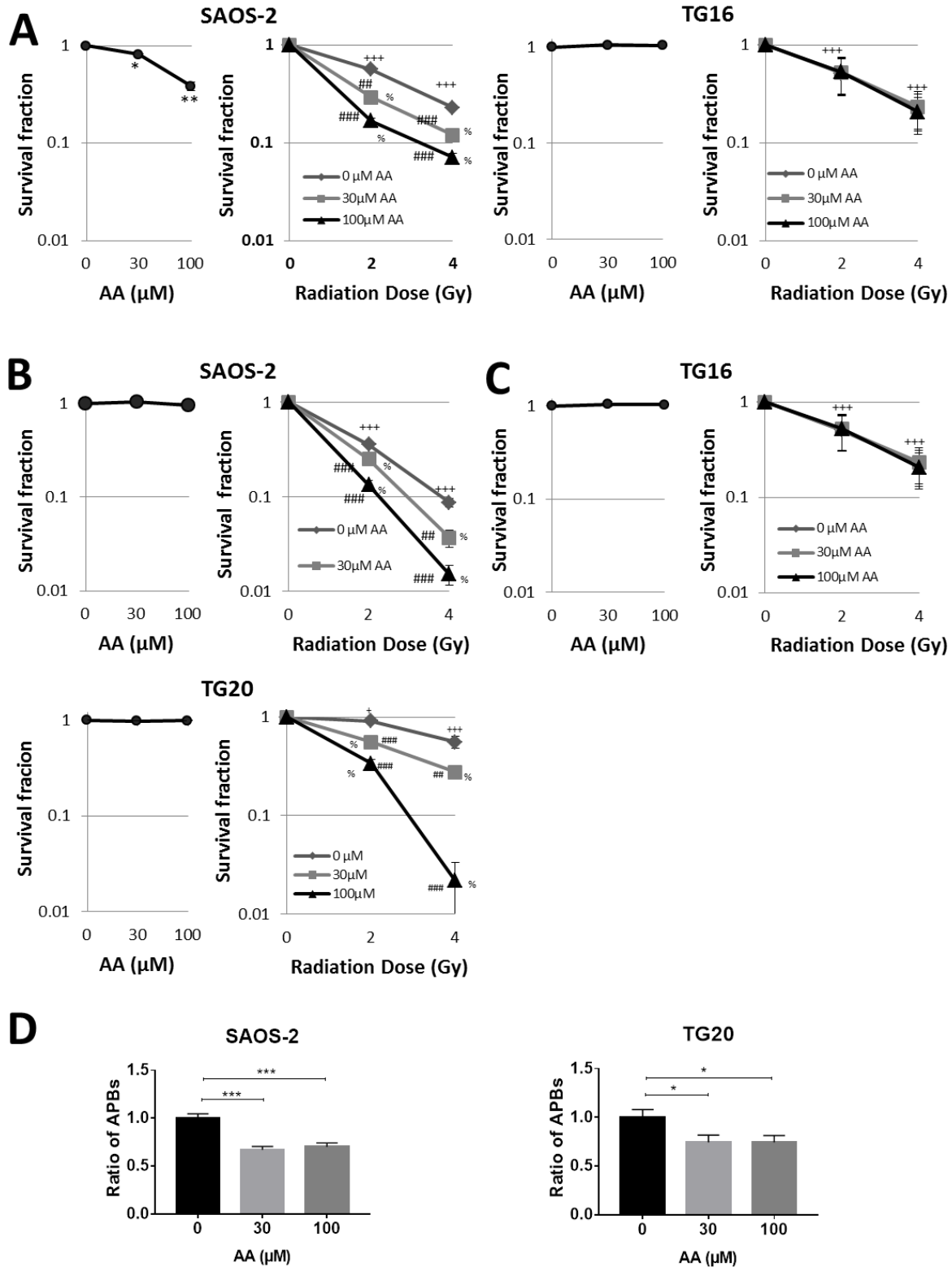
**Figure 3: Specific implication of the lysine acetyl transferase activity of PCAF in the regulation of the ALT mechanism.**

**A)** mRNA expression levels of PCAF and GCN5, as determined by qRT-PCR, in TG20 (upper) and SAOS-2 (lower) cells transfected 72h with siPCAF or siGCN5 relative to their expression in cells transfected with siCtrl, proving the efficiency and specificity of the siRNAs. The error bars are the SEM from three experiments

**B)** Quantification of TSC-E 72h after PCAF or GCN5 down-regulation in TG20 (left) and SAOS-2 (right) cells treated or not with AA. The values are the ratio of T-SCE events (+SEM) relative to untreated siCTR for each cell line. Between 2000 and 3000 chromosome extremities were analyzed (\*\***p** < 0.001, as reported by Student's *t*-test).

**C)** APBs were scored at 72 h after transfection with siCTR, siPCAF and siGCN5 in TG20 (left) and SAOS-2 (right) treated or not with AA. “n” indicates the number of counted cells. The values represent the ratio of number of APBs per cell (+SEM) relative to untreated siCTR for each cell line. (\*\***p**<0.001 as determined by Student's *t*-test).

Figure 4

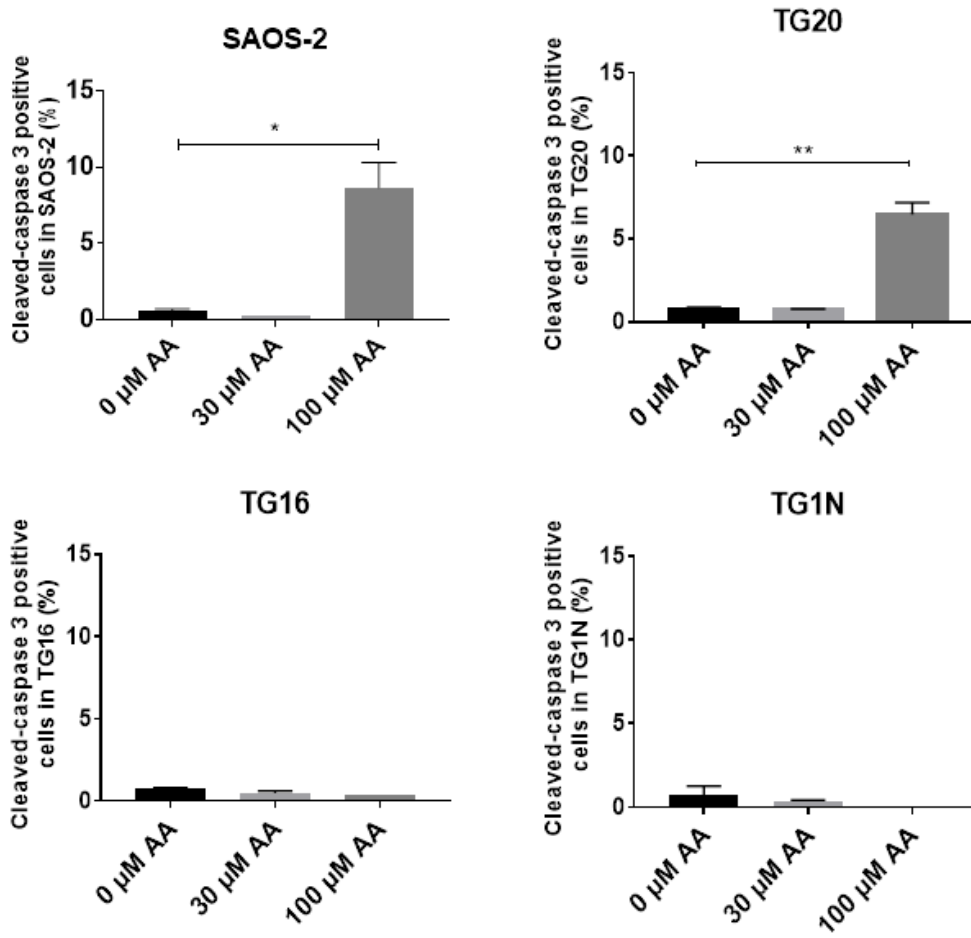


**Figure 4. AA sensitizes ALT cells to irradiation**

**A-C)** The colony formation assay for evaluation of the growth of ALT and telomerase positive cells upon AA treatment combined or not with irradiation was observed. **A)** SAOS-2 ALT cells (left) and TG16 telomerase positive cells (right) were incubated with DMSO or AA for 72h (left curve) and then irradiated at 0, 2 or 4 Gy (0.81Gy/min) (right curve). **B-C)** Cells were incubated with DMSO or AA for 24h (left curve) and then irradiated at the indicated dose (right curve). Cells were then switched to fresh media and allowed to grow for 14 days. The colonies that contained  $n > 10$  cells were then counted to determine the colony formation ratio (number of colonies/number of seeded cells) of each group. The survival fraction was calculated as the colony formation ratio of each treated group divided by the colony formation ratio of the untreated control group. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM from three experiments (\*\*\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.01$  versus untreated controls, + $P < 0.05$ , +++ $P < 0.001$  for each radiation dose versus non-irradiated controls. ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  for each radiation dose in combination with AA versus each radiation dose alone. % $P < 0.001$  for each AA concentration in combination with the same radiation dose versus control untreated, as determined by t-test)

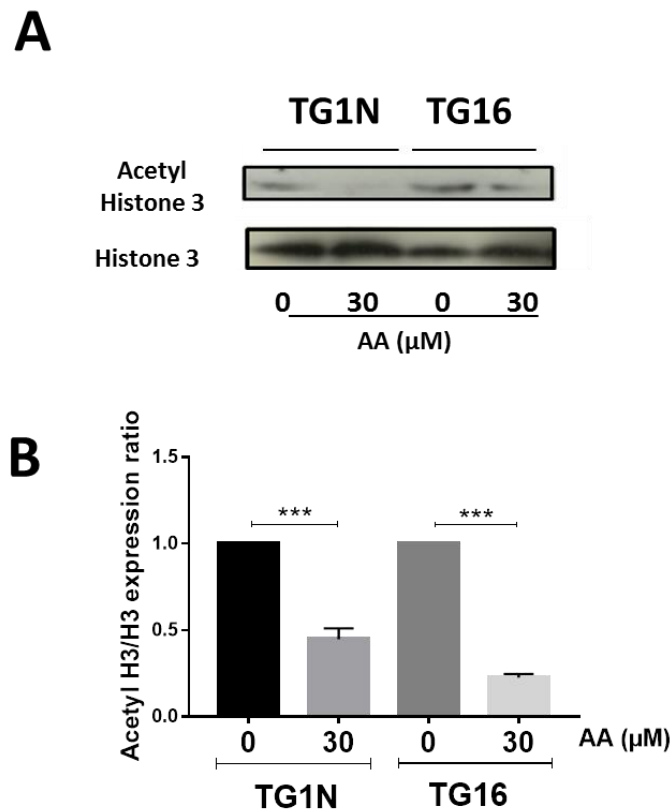
**D)** SAOS-2 and TG20 ALT cells (left and right respectively) were pretreated with AA for 24h. APBs were scored after the treatment. The values represent the ratio of number of APBs per cell (+SEM) relative to untreated, between 150 and 250 cells were counted in each condition. (\*\*\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.01$  and \* $P < 0.05$ , as determined by Student's *t*-test).

## Supplementary Figure S1

**Supplementary Figure S1. Detection of caspase-3 in apoptotic cells after AA treatment**

Quantification of the cleaved caspase-3 positive cells in SAOS-2 (upper left), TG20 (upper right), TG16 (lower left) and TG1N (lower right) after treatment with 30μM or 100μM of AA for 72 hours relative to untreated control cells. Columns represent the average of two different experiments, each done at least in duplicate and for each conditions at least 150 cells were analyzed. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  referred to t-test)

## Supplementary Figure S2

**Supplementary Figure S2. Effect of AA on acetylated histone 3 in telomerase positive cancer cells.**

A) Western blot analysis of acetylated histone H3 performed in telomerase positive (TG1N and TG16). Cell extracts 72h after 30μM AA treatment. The untreated controls contained 0.1% DMSO. B) The quantitative data are shown as relative intensity of acetylated histone band in arbitrary units that was adjusted for total histone 3 intensity and normalized to those of the control untreated. Data are expressed as the means  $\pm$  SD of a least two independent experiments for each cell line. (\*\*\*) $P < 0.001$  compared with the untreated cells as determined by Tukey-Kramer one way Anova).

## III. Discussion

### 1. Récapitulation des résultats obtenus avec l'Acide Anacardique (AA)

Notre première étude nous a permis de déterminer les conséquences de l'inhibition de deux lysines acétyl transférases, PCAF et GCN5 sur le mécanisme ALT (Jeitany et al., 2017). De manière intéressante, la sous-expression de PCAF favorisait le phénotype ALT, alors que celle de GCN5 induisait l'effet opposé. Dans cette deuxième partie, nous avons testé l'impact de l'inhibition de l'activité lysine acétyl transférase sur le mécanisme ALT. Pour cela, nous avons utilisé l'acide anacardique (AA), un inhibiteur à large spectre des activités acétyl transférases de PCAF, GCN5 et P300 ainsi que d'autres HAT.

#### 1.1. Les effets de l'acide anacardique sur le phénotype ALT

Le traitement de nos cellules ALT (SAOS-2 et TG20) avec l'AA a induit une diminution de leur croissance et la mort des cellules TG20 après 30 jours de traitement. Ceci était associé à une inhibition de la formation des APB et une diminution des échanges télomériques ou T-SCE, deux caractéristiques importantes du phénotype ALT, dans les deux lignées cellulaires ALT. De façon intéressante, les effets de l'acide anacardique sur le phénotype ALT étaient similaires à ceux observés dans les cellules transfectées avec des siPCAF. Aucun effet additif ou synergique n'a été observé dans des cellules traitées avec des siPCAF en combinaison avec l'AA. D'autre part, la sous-expression de GCN5 a augmenté de manière significative la fréquence des T-SCE et n'avait aucun effet sur le nombre des APB, un résultat déjà validé dans notre première étude. Cependant, des cellules traitées par de SiGCN5 et traitées en même temps avec l'AA ont montré une diminution de la fréquence des T-SCE quasi-identique à celle retrouvée dans des cellules traitées avec les siPCAF seuls ou avec l'AA seul ou avec la combinaison des deux. Ces résultats révèlent l'importance de l'activité acétyl transférase de PCAF dans la maintenance des cellules cancéreuses ALT de glioblastomes et d'ostéosarcomes. Concernant l'activité de GCN5 dans la

régulation du mécanisme ALT, il se peut qu'elle soit masquée par l'effet de l'inhibition de l'activité de PCAF qui pourrait agir sur une cible en amont de GCN5 ou que GCN5 contrôle le mécanisme ALT *via* des effets fonctionnels qui ne requièrent pas son activité d'acétyltransférase. Ce qui serait en accord avec notre hypothèse défendue dans l'article précédent dans laquelle GCN5 et le complexe SAGA régulent négativement les recombinaisons télomériques via l'activité déubiquitineuse d'USP22.

## **1.2. L'effet radiosensibilisateur de l'acide anacardique sur les cellules ALT**

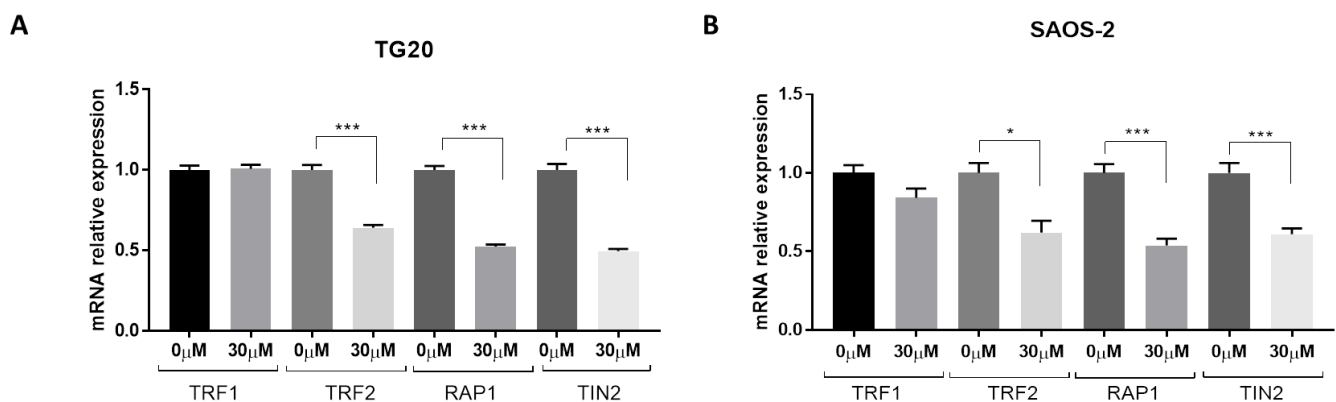
Plusieurs études ont montré que l'AA produisait un effet radiosensibilisateur dans diverses cellules cancéreuses, y compris la lignée ALT d'ostéosarcome, U20S (Sun et al., 2006). Afin d'évaluer davantage l'effet radiosensibilisateur de l'AA dans nos cellules ALT, nous avons commencé par effectuer un prétraitement de 72h avec l'AA, une durée qui a été utilisée pour évaluer les effets à court terme de la drogue sur les caractéristiques ALT. Par conséquent, la combinaison des deux traitements a révélé des effets additifs que sur les cellules ALT et non sur les lignées télomérase-positives qui étaient toujours radiorésistantes. Partant de ces résultats, nous avons pensé que l'effet radiosensibilisateur de l'AA aurait pu être masqué par son effet cytotoxique au moment de l'irradiation. Nous avons donc irradié nos cellules après seulement 24h de traitement avec l'AA. En effet, un traitement de 24 h par l'AA diminue bien le nombre d'APB dans les cellules ALT suggérant une inhibition au moins partielle du mécanisme d'élongation des télomères, mais sans entraîner de mortalité cellulaire, ni d'effet sur la clonogenèse à long terme. Nos résultats ont montré que nos cellules ALT d'ostéosarcomes (SAOS-2) ainsi que celles de gliomes (TG20) étaient spécifiquement sensibles à l'irradiation par comparaison avec des cellules de gliomes télomérase-positives (TG16).

## **1.3. Résultats complémentaires**

**Le traitement par l'acide anacardique est associé à une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la formation des APB.**

Nous avons montré que le traitement par l'AA est associé à une diminution de la formation des APB. Etant un inhibiteur des activités lysines acétyl transférases, le traitement par

cette molécule peut être associée à une inhibition de la transcription de gènes clés régulés par ces enzymes, notamment par leur activité HAT. Nous avons donc cherché à déterminer si l'effet de l'AA pouvait altérer l'expression par exemple des gènes télomériques impliqués dans la formation des APB. Nous avons utilisé la technique de RT-qPCR pour évaluer les niveaux d'expression des ARNm de TRF1, TRF2, TIN2 et RAP1, quatre protéines du complexe shelterin requises pour l'assemblage des APB (Potts et al., 2007). Comme le montre la figure II, en comparant par rapport au témoin non traité, les taux d'ARNm de TRF2, TIN2 et RAP1 ont diminué de 36%, 48% et 50%, respectivement ( $p < 0,05$ ) dans les cellules TG20 traitées et de 38%, 47% et 40% respectivement ( $p < 0,05$ ) dans les cellules SAOS-2 traitées. Il n'y avait pas de changement dans les niveaux d'ARNm de TRF1 dans les cellules ALT traitées et non traitées ( $p > 0,05$ ). Les résultats suggèrent que l'impact de l'AA sur le phénotype ALT peut probablement dépendre de la modulation transcriptionnelle des gènes régulés par les HAT et probablement PCAF et qui sont impliqués dans la formation des APB. Il serait intéressant de confirmer l'implication de PCAF et non pas GCN5 dans cette régulation transcriptionnelle et ceci en évaluant par RT-qPCR l'expression de ces gènes cibles dans des cellules traitées par des siPCAF et siGCN5.



**Figure III : Modulation de l'expression des gènes impliqués dans la formation des APB, suite au traitement par l'AA**

Les niveaux d'ARNm de TRF1, TRF2, TIN2 et RAP1 ont été détectés par RT-PCR 72h après le traitement par AA dans les cellules TG20 (A) et SAOS-2 (B). Les valeurs représentent le rapport entre les nombres de copies du gène cible (TRF1, TRF2, TIN2 et RAP1) par rapport à celui du témoin non traité. Les barres d'erreur sont + SEM d'au moins deux dupliquats (\*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  tel que déterminé par le test t).

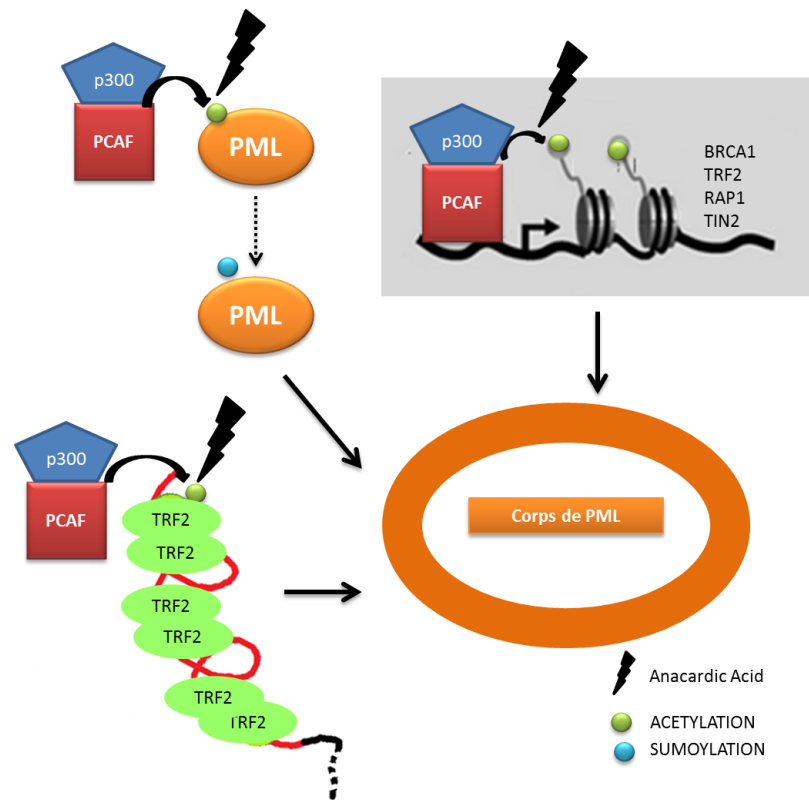


## **2. Des pistes importantes pour comprendre le rôle de l'activité lysine acétyl transférase dans la régulation du mécanisme ALT**

L'acétylation des histones est contrôlée par deux classes d'enzymes aux activités opposées mais en équilibre permanent : les acétyltransférases d'histones (HAT) et les désacétylases d'histones (HDAC). Il est d'ores et déjà convenu qu'un déséquilibre entre leurs activités reflète un contexte pathologique, puisqu'un tel dérèglement a été révélé dans différents types de cancers (Espino et al., 2005). Depuis plusieurs années, de nombreux médicaments ont été synthétisés pour cibler surtout l'activité des HDAC et se sont avérés efficaces dans le traitement de plusieurs tumeurs (Kargbo, 2018). Bien que très rares, certaines études ont étudié l'impact de ces inhibiteurs d'HDAC sur le mécanisme ALT, citons à titre d'exemple l'équipe de Jung et ses collaborateurs qui ont montré que la Trichostatin, un inhibiteur des histones désacétylases, induisait le phénotype ALT, ceci était révélé par une augmentation des T-SCE et des APB. Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'acétylation des histones permettrait de décondenser la chromatine des télomères la rendant ainsi plus apte à recombiner (Jung et al, 2013). Les résultats de cette étude vont dans le même sens que nos résultats obtenus avec l'AA suggérant que ce mécanisme de remodelage de la chromatine peut être l'une des voies adoptées par les lysines acétyl transférases, probablement PCAF et/ou p300, dans la régulation de la voie ALT.

Il est convenu que les HAT agissent au niveau des promoteurs spécifiques où elles modifient les histones via leur activité lysine acétyl-transférase, régulant ainsi la transcription des gènes correspondants. Nos résultats préliminaires ont montré que l'AA induisait une diminution de l'expression de certaines protéines du complexe shelterin telles que TRF2, RAP1 et TIN2 qui sont responsables de la formation des APB (Figure 26). D'autre part, PCAF et p300 sont considérés comme des *co-activateurs* requis pour l'activation de la transcription du gène BRCA1 (Jin et al., 2011), dont l'importance dans la régulation du mécanisme ALT a été déjà rapportée. En effet, BRCA1 est recrutée au niveau des APB favorisant leur formation et spécifiquement au niveau des télomères endommagés où elle serait responsable de la résolution du stress répliatif en stimulant la recombinaison homologue (Acharya et al., 2014, Pan et al.,

2017). Par conséquent, il serait intéressant de chercher à déterminer si PCAF et/ou p300 sont capables de réguler le mécanisme ALT en modulant l'expression de BRCA1 grâce à leur activité lysine acétyl transférase (Figure 26).



**Figure 26 : Représentation schématique des différentes voies qui peuvent être régulées par l'activité lysine acétyl transférase de PCAF**

De manière intéressante, nous avons montré que le traitement par l'AA diminuait significativement le nombre des APB comme dans les cellules transfectées par siPCAF. Cet effet peut être expliqué par une régulation post-traductionnelle de la protéine PML par les HAT dans nos cellules ALT (TG20 et SAOS-2). Comme déjà cité, PML subit diverses modifications post-traductionnelles, y compris la sumoylation qui semble jouer un rôle important dans la formation et la stabilité des agrégats nucléaires PML appelés aussi PML NBs (PML nuclear bodies). La protéine PML est impliquée dans le maintien des télomères dans les cellules ALT, elle représente un composant essentiel des APB (Chung et al. 2011, Jiang et al 2005, Osterwald et al., 2015).

Etant largement étudiées en tant qu'histones acétyl transférases, PCAF, p300 et GCN5 peuvent aussi acétyler des substrats non-histones. Il a ainsi été révélé que p300 acétylait PML sur des lysines spécifiques dans les cellules télomérase-positives. Cette acétylation est accompagnée d'une sumoylation accrue de la protéine PML favorisant ainsi la formation des PML-NB (Hayakawa et al., 2008). Selon notre première étude, PCAF et p300 coopèreraient afin de réguler la formation des APB. La sumoylation pourrait représenter l'un des mécanismes par lesquels l'acétylation médiée par p300 serait responsable de la formation des APB dans les cellules ALT. D'autre part, PCAF et p300 pourraient agir ensemble pour acétyler un même substrat (Liu et al., 1999), dans ce cas nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse que l'effet de l'AA sur la formation des APB peut être le résultat de modifications post-traductionnelles (acétylation et sumoylation) de la protéine PML médiées par PCAF ou p300, seuls ou en combinaison (Figure 26). Finalement, il a été montré que P300 acétylait la protéine TRF2 inhibant ainsi sa protéolyse et stabilisant sa présence sur les télomères (Her et al., 2013), il est fort probable que PCAF interagisse avec p300 pour recruter les télomères dans le APB (Figure 26).

### **3. D'autres pistes importantes pour comprendre le rôle de l'activité lysine acétyl transférase dans la radiorésistance des cellules ALT**

Dans notre étude nous avons montré que le prétraitement de 24h avec l'AA radiosensibilisait nos cellules ALT de gliomes (TG20) et d'osteosarcomes (SAOS-2). Les cellules télomérase-positives de gliomes n'étaient pas sensibles à cet inhibiteur.

D'autres équipes ont déjà rapporté qu'un prétraitement à l'AA était capable d'augmenter la radiosensibilité de diverses lignées cellulaires cancéreuses telles que l'adénocarcinome cervical, les lignées cellulaires du cancer de prostate et la lignée cellulaire ALT U2OS (ostéosarcome ALT humain) (Sun et al., 2006, Yao et al., 2015, CATE et al., 2010). Classiquement, une drogue peut augmenter la radiosensibilité des tumeurs par l'un des mécanismes suivants : l'apoptose radio-induite, l'altération de la réparation des dommages radio-induits ou l'arrêt du cycle cellulaire. Plusieurs mécanismes ont été proposés pour décrire l'effet radiosensibilisateur de l'AA observé dans les différents types de cancers étudiés, on cite à titre

d'exemple la répression de l'expression de H2AX dans les cellules cancéreuses de prostate ou bien la réduction de l'expression de protéines anti-apoptotiques associées à la survie cellulaire et la radiorésistance dans les cellules d'adénome hypophysaire (Yao et al., 2015, Sukumari-Ramesh et al., 2011). Partant de ces observations, nous nous sommes intéressés à rechercher la voie responsable de la sensibilité à l'irradiation de nos cellules ALT de glioblastomes (TG20) et d'ostéosarcomes (SAOS-2) prétraitées par l'AA.

Bien que l'effet radiosensibilisateur de la drogue observé dans nos cellules ALT corrobore celui retrouvé dans la lignée ALT d'ostéosarcome U2OS par une autre équipe (CATE et al., 2010), notre étude a apporté des preuves supplémentaires qu'une suppression du phénotype ALT liée à l'inhibition de l'activité lysine acétyl transférase probablement de PCAF serait plutôt le mécanisme responsable de cette radiosensibilité. En effet, il a été montré que PCAF jouait un rôle essentiel dans la réponse aux dommages à l'ADN en activant et stabilisant la protéine p53, mais ce gène codant pour p53 (Liu et al., 1999, Zhao et al., 2017) est muté dans nos cellules ALT SAOS-2 et TG20 (Silvestre et al., 2011). Par ailleurs, PCAF agirait, grâce à son activité lysine acétyl transférase, comme un inducteur du mécanisme ALT, ainsi, il est fort probable qu'elle activerait la réponse au dommage à l'ADN télomérique pour favoriser les recombinaisons télomériques. Ainsi, nous proposons que l'inhibition de son activité pourrait modifier la réponse au dommage dû à un dysfonctionnement télomérique et par la suite radiosensibiliser nos cellules ALT. Ceci est en parfaite corrélation avec la radiosensibilité induite par une altération de réparation de dommage due à une perte de l'intégrité des télomères, qui a aussi été décrite récemment dans des cellules ALT où l'effet radiosensibilisateur était le résultat d'un dysfonctionnement des télomères induit par l'absence de la protéine télomérique TPP1 (Wong et al., 2000, Qiang et al., 2014).

Bien que le maintien de l'intégrité des télomères soit nécessaire pour la formation des APB dans les cellules ALT, il s'avère qu'il est aussi important pour leur résistance à l'irradiation. Ainsi, la diminution des APB au bout de 24h de prétraitement par l'AA qui peut être expliquée par une diminution de l'expression de composants télomériques, comme le suggèrent nos résultats avec le traitement de 72h, peut entraîner une perte de l'intégrité télomérique dans nos cellules ALT, prouvant ainsi leur radiosensibilité 24h après le traitement

par l'AA. Pour confirmer cette hypothèse, il sera intéressant d'évaluer d'une part la quantité de foci de dommages associés aux télomères, marqueurs de l'instabilité télomérique, et d'autre part l'expression des composants télomériques constitutifs des APB ou pas, tels que TPP1, dans des cellules ALT prétraitées 24h par l'AA en combinaison ou pas avec l'irradiation et les siPCAF pour confirmer l'implication de l'activité spécifiquement de PCAF dans cette radiosensibilité.

Il est important de rappeler que le phénotype ALT est détecté dans 25% des glioblastomes, un cancer de cerveau primaire caractérisé par un mauvais pronostic et que TG20, les cellules souches de gliome, étaient particulièrement résistantes à l'irradiation et au traitement par le Témazolomide en comparaison avec des cellules souches de gliome télomérase-positives appelées TG16 (Silvestre et al., 2011, Jr et al., 2017). De manière intéressante, nous avons montré que le traitement par l'AA était capable non seulement d'inhiber la prolifération des cellules TG20, mais aussi d'augmenter leur sensibilité à l'irradiation. Par conséquent, le traitement par l'AA ou plus spécifiquement l'inhibition de PCAF pourrait être proposé pour développer une nouvelle approche thérapeutique ciblant spécifiquement les glioblastomes ALT en améliorant les effets de la radiothérapie.

Par ailleurs, des travaux menés par d'autres équipes ont révélé que le traitement par cette molécule radiosensibilisait certaines cellules cancéreuses télomérase-positives telles que des cellules du cancer de prostate et les cellules Hela (Yao et al., 2015, Sun et al., 2006). Il est important d'essayer d'interpréter ces résultats en se basant sur le fait que l'AA représente un inhibiteur à large spectre et que son efficacité entre les différents types de cancers peut être liée d'une part à la durée et à la concentration de la drogue et d'autre part à la biologie tumorale où l'inhibition d'une cible spécifique peut jouer un rôle différent selon les cas. Ce principe de l'inhibition sélective dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels on recherche principalement le niveau d'expression de la cible ainsi que le rôle qu'elle peut occuper dans une voie de signalisation responsable de contrôler la survie après l'irradiation. Par exemple, PCAF est surexprimée dans nos cellules ALT de gliomes en comparaison avec des cellules de gliome télomérase-positives, son activité induit le mécanisme ALT rendant les cellules résistantes à l'irradiation, ces données nous expliquent le fait que l'effet radiosensibilisateur de l'AA se

produit uniquement dans les cellules de gliome qui surexpriment PCAF et utilisent le mécanisme ALT et non la télomérase pour proliférer. Par ailleurs, un prétraitement avec une concentration d'AA trois fois plus élevée que celle qu'on a utilisée dans notre étude était capable de radiosensibiliser les cellules cancéreuses de prostate télomérase-positives (Yo et al., 2015), ceci nous laisse penser qu'il s'agit d'autres voies de signalisation régulées par d'autres cibles qui sont impliquées dans la réponse aux radiations ionisantes de ces cellules.

En reliant entre elles les informations issues de notre étude, nous avons pu postuler que l'inhibition de l'activité lysine acétyl transférase, principalement de PCAF, pourrait représenter une stratégie thérapeutique contre les cancers ALT et spécifiquement contre les glioblastomes ALT.

# Discussion générale

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude des mécanismes moléculaires de la voie ALT. Plusieurs protéines avaient déjà été décrites comme étant des acteurs de régulation du mécanisme ALT telles que les protéines de la recombinaison homologue (RPA, RAD51 et RAD52, la protéine BRCA1, BLM/ SLX4 et le complexe MRN constitué de NBS1, MRE11 ou RAD50 (Yeager et al., 1999, Zeng et al., 2009, Wu et al., 2003), des protéines constituant les PML (PML, SP100 (Jiang et al. 2005)), des protéines télomériques du complexe Shelterin (TRF1, TRF2, RAP1, TIN2..), des protéines remodelant la chromatine (ATRX, DAXX (Heaphy et al. 2011, )), et des protéines impliquées dans d'autres fonctions telles que la régulation de la stabilité de certaines protéines (SMC5/6 (Potts and Yu 2007)) et la signalisation par des récepteurs nucléaires (COUP-TF2, TR4 (Dejardin and Kingston 2009)).

Nous avons également mis en évidence l'importance de l'expression relative de deux lysines acétyl transférase homologues, PCAF et GCN5 pour le mécanisme ALT. Ces deux protéines identifiées comme de nouveaux régulateurs de la voie ALT, sont mutuellement exclusives dans les complexes de type SAGA. Nous avons montré que PCAF et GCN5 jouent des rôles opposés en favorisant le phénotype ALT ou en l'inhibant respectivement. Nous avons proposé que leurs participations consistent à réguler le turnover de la protéine télomérique TRF1, dont sa stabilité et sa présence pour contrôler les recombinaisons télomériques dépend de l'activité d'USP22, une déubiquitinase identifiée pour la première fois comme un constituant constitutif des APB. Ainsi, PCAF qui est surexprimée dans nos cellules ALT favoriserait les recombinaisons homologues d'une part avec son partenaire p300 en stimulant la formation des APB et, d'autre part grâce à sa compétition avec GCN5 pour interagir avec le complexe SAGA, inhibant ainsi la déubiquitination de TRF1 induite par USP22 au niveau des APB. Toutefois, des travaux supplémentaires seront indispensables pour valider nos hypothèses et découvrir les modes d'action de ces deux protéines.

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde, ses causes biologiques ont longtemps été concentrées sur l'identification des modifications génétiques. Au cours de ces dernières années, il est devenu évident que le développement du cancer peut également dépendre d'altérations épigénétiques qui modifient l'expression des gènes sans changer leur séquences nucléotidiques. Parmi ces modifications, l'acétylation des histones semble probablement le mécanisme le plus étudié à ce jour. Par conséquent, nous avons montré l'importance de cibler les activités lysines acetyl transferases, principalement de PCAF, par le traitement avec l'AA pour empêcher la formation des APB et des T-SCE, donc altérer la voie ALT utilisée par certains glioblastomes et ostéosarcomes pour maintenir leurs télomères et proliférer indéfiniment et surtout pour résister aux radiations ionisantes. Cependant, nous sommes bien conscients que des pistes supplémentaires sont nécessaires pour confirmer l'inhibition spécifique de l'activité de PCAF dans l'altération de la voie ALT et surtout dans la radiosensibilité des cellules ALT et pour y explorer les voies de signalisation impliquées.

A l'issu de nos travaux, comprendre les bases moléculaires des mécanismes ALT régulées par les lysines acétyl transférases devrait permettre d'améliorer le développement et la mise en place des approches thérapeutiques spécifiques.

- Tout d'abord, les activités probablement de PCAF et de p300 sont impliquées dans la formation des APB. Il conviendrait désormais de déterminer s'ils agissent ensemble en tant que co-activateurs transcriptionnels régulant l'expression de gènes impliqués dans la formation des APB tels que le gène de BRCA1 ou bien les gènes du complexe shelterin. Ceci pourrait être réalisé par RT-qPCR dans des cellules traitées avec l'AA en absence de PCAF et/ou p300 et de GCN5. Comme ils peuvent acétyler directement des cibles communes tels que la protéine PML, un constituant constitutif des APB ou bien la protéine télomérique TRF2. Pour répondre à ces suggestions, des mutants de PML invalidés pour des sites spécifiques d'acétylation et de sumoylation ainsi que des mutants de TRF2 pour des sites spécifiques d'acétylation peuvent être synthétisés en absence de PCAF et/ou p300 dans des cellules traitées avec l'AA, le nombre d'APB dans chaque condition serait évalué.



- Une fois que les APBs sont formés, notre hypothèse est que PCAF s'associe au complexe SAGA pour favoriser la dégradation de TRF1 par le protéasome, ce qui limiterait le pool de TRF1 disponible pour réguler le dépôt de POT1 au niveau des télomères, et favoriserait la persistance de RPA au niveau des télomères activant ainsi la recombinaison médiée par ATR. Il serait donc intéressant d'explorer le rôle de la balance de PCAF et GCN5 qui participerait à ce switch entre RPA et POT1 *via* la régulation de TRF1. Il serait intéressant de comparer les effets d'extraits protéiques de cellules ALT traitées par des siPCAF ou des siGCN5 sur la présence de RPA aux télomères par la technique publiée par l'équipe de Dr Zou (Flynn et al., 2015), afin d'identifier un rôle de PCAF ou de GCN5 dans le switch RPA/POT1.
- Une stratégie intéressante pour mesurer l'opposition entre PCAF et GCN5 pour s'associer au complexe SAGA serait de mesurer par les techniques de PLA ou de Co-Immunoprécipitation les interactions entre GCN5-USP22, GCN5-TRF1 et GCN5-TRRAP (un composant constitutif du complexe SAGA) suite à l'inhibition de PCAF dans nos cellules ALT. D'autre part, nous n'avons pas pu évaluer l'effet de l'inhibition de PCAF ou GCN5 sur le turn-over protéique de TRF1 dans nos cellules ALT, cela par manque d'anticorps commercialisés pouvant détecter en Western Blot cet effet. Dans ce contexte, la technique de PLA, pourrait être proposée pour mesurer le niveau d'ubiquitination de TRF1 dans les cellules transfectées avec siPCAF ou siGCN5, grâce à des anticorps disponibles tels que l'anti-Ubiquitine et un autre reconnaissant TRF1. Il serait aussi important de détecter les quantités de TRF1 dans les cellules transfectées traitées ou non avec le MG132-inhibiteur du protéasome, les différences en présence ou absence de cet inhibiteur dans les différentes conditions permettront d'estimer le rôle de PCAF et GCN5 dans la régulation de la dégradation de TRF1. En outre, on ne sait toujours pas si le complexe SAGA contenant PCAF est réellement capable d'interagir avec USP22, la réponse à cette question ouvrira sans doute de nombreuses pistes de recherches complémentaires.

Les étapes d'une telle démonstration, qui débutent par la formation des APB pour arriver à la recombinaison, permettent de proposer un modèle complet de régulation du mécanisme ALT par les lysines acétyl transférases mises en évidence dans nos études (Figure 27).

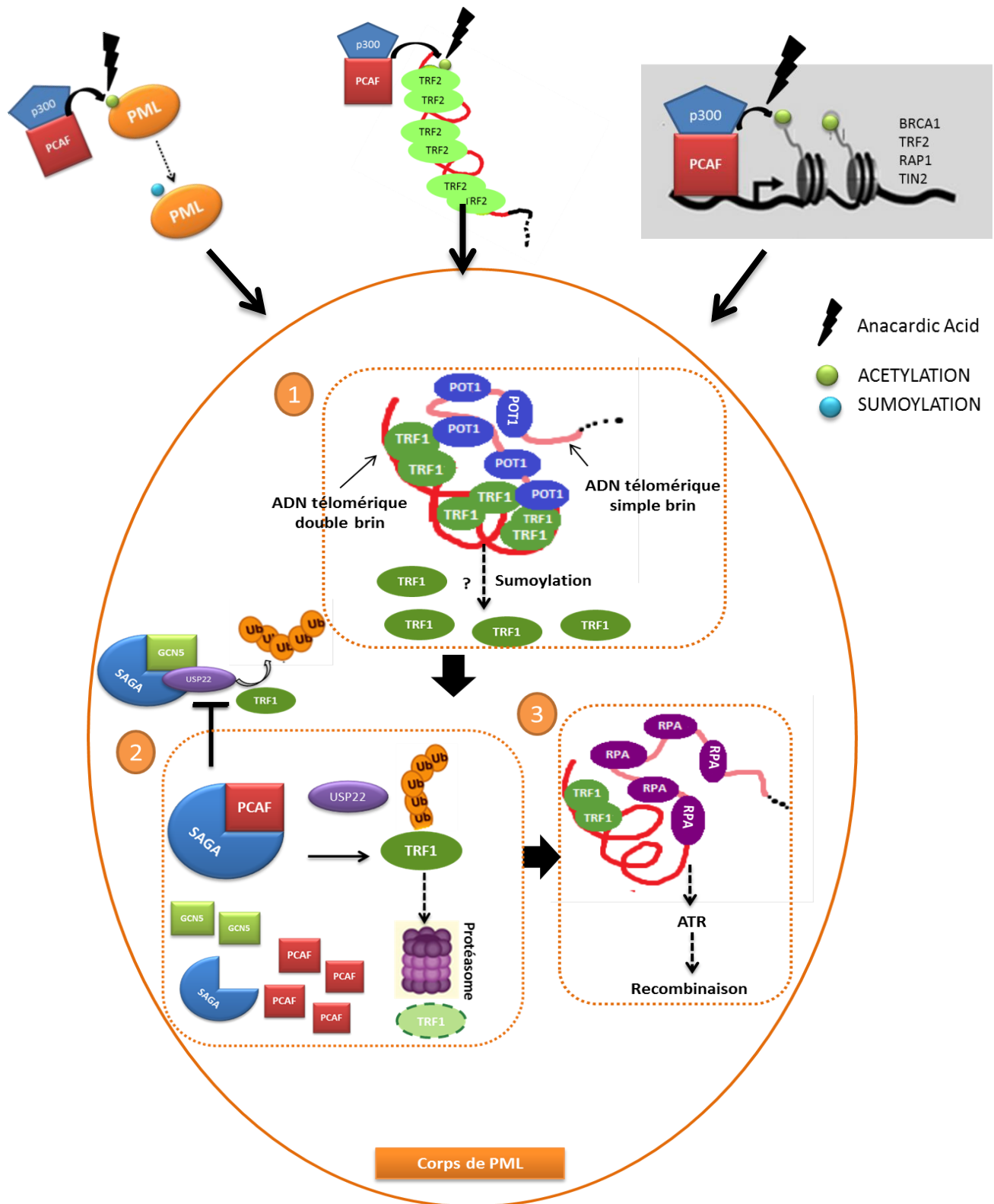


Figure 27 : Modèle complet de régulation du mécanisme ALT par les lysines acétyl transférase

Il est important aussi de rappeler des lignées stables de SAOS-2 surexprimant GCN5 qui ont montré une diminution du nombre d'APB, confirmant notre hypothèse basée sur la balance d'expression de PCAF et de GCN5 pour la régulation de la voie ALT. Ces lignées stables seront utilisées pour évaluer les effets d'une surexpression de GCN5, sur la longueur des télomères par la technique de flow-FISH ainsi que sur les autres aspects du phénotype ALT, y compris la production des c-cycles. D'autre part, elles seront utilisées comme modèles pour valider nos hypothèses et surtout pour effectuer une analyse transcriptomique des cellules SAOS-2 surexprimant GCN5 par rapport à leurs contrôles. Cela devrait nous permettre de déterminer de nouveaux candidats de gènes, nous sélectionnerions surtout ceux qui sont déjà impliqués dans la signalisation des dommages à l'ADN, la formation des APBs et la maintenance des télomères et nous testerions les effets à court terme sur le mécanisme ALT à l'aide de siRNA dirigés contre les gènes cibles.

Toutes les expériences menées dans notre étude ont été réalisées dans deux lignées ALT, TG20 et SAOS-2. Il convient à présent d'évaluer la pertinence de nos différentes hypothèses en utilisant d'autres lignées ALT susceptibles d'étayer l'importance de cette balance d'expression entre PCAF et GCN5 pour la régulation de la voie ALT. il serait intéressant aussi d'explorer l'impact de la balance PCAF/GCN5 sur la maintenance des télomères dans les cellules cancéreuses qui utilisent la télomerase, aussi bien que dans des cellules normales non cancéreuses.

D'autre part, dans le cadre des essais *in vitro* évaluant l'intérêt de l'AA combinée à l'irradiation, il est indispensable de confirmer que l'effet de telles combinaisons sur le phénotype ALT, ainsi que sur la survie des cellules, soit la somme de la toxicité habituelle de la radiothérapie plus l'effet de l'inhibition spécifique de l'activité de PCAF par l'AA. Ainsi, une stratégie alternative au ciblage non spécifique de l'AA consisterait à l'utilisation soit d'autres inhibiteurs disponibles et plus spécifiques dirigés contre l'activité de PCAF, soit des constructions de formes tronquées de cette protéine. Bien que le maintien de l'intégrité des télomères par la voie ALT soit important pour la prolifération des cellules ALT, il s'avère qu'il est aussi indispensable pour leur résistance à l'irradiation. D'autres études complémentaires sont nécessaires pour contester ces hypothèses de radiosensibilité des cellules cancéreuses de type ALT par l'AA.

Enfin, il faut rappeler que les expériences *in vitro* ne prennent pas en considération l'impact des molécules sur l'environnement tumoral. Une évaluation *in vivo* de l'effet de ces traitements semblerait essentielle pour développer des axes précliniques. L'AA a déjà été étudié dans cette optique, il a montré tant au laboratoire des résultats prometteurs *in vitro* ainsi qu'*in vivo*. Il nous reste maintenant à évaluer le potentiel thérapeutique de cette drogue sur des tumeurs ALT déjà établies dans des souris immunodéprimées. Par conséquent, nous utiliserons le modèle de greffes intracérébrales de cellules TG20 dans les souris nude, déjà disponible et validé par notre équipe (Jeitany et al., 2015), pour effectuer le traitement par injection intranasale de l'AA, seul en premier lieu puis combiné à l'irradiation, ce résultat sera confirmé par des lignées cellulaires d'ostéosarcome ALT qui ont montré aussi une capacité de générer des tumeurs *in vivo* une fois injectées d'une manière sous-cutanée ou orthotopique (SAOS-2 (Du et al. 2012), U2OS (Al-Romaih et al. 2007)).

# Bibliographie

Abreu, E., Aritonovska, E., Reichenbach, P., Cristofari, G., Culp, B., Terns, R.M., Lingner, J., and Terns, M.P. (2010). TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 2971–2982.

Acharya, S., Kaul, Z., Gocha, A.S., Martinez, A.R., Harris, J., Parvin, J.D., and Groden, J. (2014). Association of BLM and BRCA1 during Telomere Maintenance in ALT Cells. *PLoS ONE* *9*.

Allshire, R.C., Gosden, J.R., Cross, S.H., Cranston, G., Rout, D., Sugawara, N., Szostak, J.W., Fantes, P.A., and Hastie, N.D. (1988). Telomeric repeat from *T. thermophila* cross hybridizes with human telomeres. *Nature* *332*, 656–659.

Allshire, R.C., Dempster, M., and Hastie, N.D. (1989). Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res.* *17*, 4611–4627.

Ancelin, K., Brunori, M., Bauwens, S., Koering, C.-E., Brun, C., Ricoul, M., Pommier, J.-P., Sabatier, L., and Gilson, E. (2002). Targeting assay to study the cis functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 3474–3487.

Atanassov, B.S., Evrard, Y.A., Multani, A.S., Zhang, Z., Tora, L., Devys, D., Chang, S., and Dent, S.Y.R. (2009). Gcn5 and SAGA regulate shelterin protein turnover and telomere maintenance. *Mol. Cell* *35*, 352–364.

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.

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

Bailey, S.M., Cornforth, M.N., Kurimasa, A., Chen, D.J., and Goodwin, E.H. (2001). Strand-specific postreplicative processing of mammalian telomeres. *Science* *293*, 2462–2465.

Bailey, S.M., Brenneman, M.A., and Goodwin, E.H. (2004). Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase-negative cells. *Nucleic Acids Res.* *32*, 3743–3751.

- Bailey, S.M., Williams, E.S., Cornforth, M.N., and Goodwin, E.H. (2010). Chromosome Orientation fluorescence in situ hybridization or strand-specific FISH. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 659, 173–183.
- Balasubramanyam, K., Swaminathan, V., Ranganathan, A., and Kundu, T.K. (2003). Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *J. Biol. Chem.* 278, 19134–19140.
- Balk, B., Maicher, A., Dees, M., Klermund, J., Luke-Glaser, S., Bender, K., and Luke, B. (2013). Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1199–1205.
- Bandaria, J.N., Qin, P., Berk, V., Chu, S., and Yildiz, A. (2016). Shelterin Protects Chromosome Ends by Compacting Telomeric Chromatin. *Cell* 164, 735–746.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* 444, 756–760.
- Baumann, P., and Cech, T.R. (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* 292, 1171–1175.
- Bechter, O.E., Zou, Y., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2003). Homologous recombination in human telomerase-positive and ALT cells occurs with the same frequency. *EMBO Rep.* 4, 1138–1143.
- Bechter, O.E., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2004). The frequency of homologous recombination in human ALT cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 3, 547–549.
- Bechter, O.E., Zou, Y., Walker, W., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2004). Telomeric Recombination in Mismatch Repair Deficient Human Colon Cancer Cells after Telomerase Inhibition. *Cancer Res.* 64, 3444–3451.
- Benarroch-Popivker, D., Pisano, S., Mendez-Bermudez, A., Lototska, L., Kaur, P., Bauwens, S., Djerbi, N., Latrick, C.M., Fraiser, V., Pei, B., et al. (2016). TRF2-Mediated Control of Telomere DNA Topology as a Mechanism for Chromosome-End Protection. *Mol. Cell* 61, 274–286.
- Bender, J. (1998). Cytosine methylation of repeated sequences in eukaryotes: the role of DNA pairing. *Trends Biochem. Sci.* 23, 252–256.
- Benetti, R., García-Cao, M., and Blasco, M.A. (2007). 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. (2007). Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. *J. Cell Biol.* 178, 925–936.
- Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J., and Balasubramanian, S. (2013). Quantitative Visualization of DNA G-quadruplex Structures in Human Cells. *Nat. Chem.* 5, 182–186.

- 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. (2001). Switching and Signaling at the Telomere. *Cell* *106*, 661–673.
- Blackburn, E.H., and Collins, K. (2011). Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*.
- Blackburn, E.H., and Gall, J.G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J. Mol. Biol.* *120*, 33–53.
- Blackburn, E.H., Greider, C.W., and Szostak, J.W. (2006). Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging. *Nat. Med.* *12*, 1133–1138.
- Bonetti, D., Martina, M., Clerici, M., Lucchini, G., and Longhese, M.P. (2009). Multiple pathways regulate 3' overhang generation at *S. cerevisiae* telomeres. *Mol. Cell* *35*, 70–81.
- Brandes, A.A., Tosoni, A., Franceschi, E., Reni, M., Gatta, G., and Vecht, C. (2008). Glioblastoma in adults. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *67*, 139–152.
- Broccoli, D., Young, J.W., and de Lange, T. (1995). Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 9082–9086.
- 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.
- Brock, G.J., Charlton, J., and Bird, A. (1999). Densely methylated sequences that are preferentially localized at telomere-proximal regions of human chromosomes. *Gene* *240*, 269–277.
- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1996). *Tetrahymena* histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* *84*, 843–851.
- Bryan, T.M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., and Reddel, R.R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J.* *14*, 4240–4248.
- 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. *Nat. Med.* *3*, 1271–1274.
- Bryan, T.M., Marusic, L., Bacchetti, S., Namba, M., and Reddel, R.R. (1997). The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 921–926.
- Cambruzzi, E., and Cambruzzi, E. (2017). The role of IDH1/2 mutations in the pathogenesis of secondary glioblastomas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* *53*, 338–344.

- Candau, R., Scolnick, D.M., Darpino, P., Ying, C.Y., Halazonetis, T.D., and Berger, S.L. (1997). Two tandem and independent sub-activation domains in the amino terminus of p53 require the adaptor complex for activity. *Oncogene* *15*, 807–816.
- Carlson, M., and Botstein, D. (1983). Organization of the SUC gene family in *Saccharomyces*. *Mol. Cell. Biol.* *3*, 351–359.
- Carlson, M., Celenza, J.L., and Eng, F.J. (1985). Evolution of the dispersed SUC gene family of *Saccharomyces* by rearrangements of chromosome telomeres. *Mol. Cell. Biol.* *5*, 2894–2902.
- CATE, R.T., KRAWCZYK, P., STAP, J., ATEN, J.A., and FRANKEN, N.A.P. (2010). Radiosensitizing effect of the histone acetyltransferase inhibitor anacardic acid on various mammalian cell lines. *Oncol. Lett.* *1*, 765–769.
- 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., and Griffith, J.D. (2004). Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 9948–9957.
- Cesare, A.J., Kaul, Z., Cohen, S.B., Napier, C.E., Pickett, H.A., Neumann, A.A., and Reddel, R.R. (2009). Spontaneous occurrence of telomeric DNA damage response in the absence of chromosome fusions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 1244.
- Cesare, A.J., and Reddel, R.R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 319–330.
- Chai, W., Du, Q., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2006). Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands. *Mol. Cell* *21*, 427–435.
- Chan, H., Wang, Y., and Feigon, J. (2017). Progress in Human and Tetrahymena Telomerase Structure Determination. *Annu. Rev. Biophys.* *46*, 199–225.
- Chang, W., Dynek, J.N., and Smith, S. (2003). TRF1 is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after release from telomeres. *Genes Dev.* *17*, 1328–1333.
- Charron, M.J., and Michels, C.A. (1988). The naturally occurring alleles of MAL1 in *Saccharomyces* species evolved by various mutagenic processes including chromosomal rearrangement. *Genetics* *120*, 83–93.
- Chen, C., Gu, P., Wu, J., Chen, X., Niu, S., Sun, H., Wu, L., Li, N., Peng, J., Shi, S., et al. (2017). Structural insights into POT1-TPP1 interaction and POT1 C-terminal mutations in human cancer. *Nat. Commun.* *8*.
- Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G., and Parada, L.F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth following chemotherapy. *Nature* *488*, 522–526.



- Chen, J.L., Blasco, M.A., and Greider, C.W. (2000). Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* 100, 503–514.
- Chen, L.-Y., Liu, D., and Songyang, Z. (2007). Telomere maintenance through spatial control of telomeric proteins. *Mol. Cell. Biol.* 27, 5898–5909.
- Chen, Y., Rai, R., Zhou, Z.-R., Kanoh, J., Ribeyre, C., Yang, Y., Zheng, H., Damay, P., Wang, F., Tsujii, H., et al. (2011). A conserved motif within RAP1 has diversified roles in telomere protection and regulation in different organisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 213–221.
- Cho, N.W., Dilley, R.L., Lampson, M.A., and Greenberg, R.A. (2014). Interchromosomal Homology Searches Drive Directional ALT Telomere Movement and Synapsis. *Cell* 159, 108–121.
- Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P., and de Lange, T. (1995). A human telomeric protein. *Science* 270, 1663–1667.
- Chung, I., Osterwald, S., Deeg, K.I., and Rippe, K. (2012). PML body meets telomere. *Nucleus* 3, 263–275.
- Cimprich, K.A., and Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 616–627.
- Claussin, C., and Chang, M. (2015). The many facets of homologous recombination at telomeres. *Microbial Cell* 2, 308–321.
- Clynes, D., Jelinska, C., Xella, B., Ayyub, H., Taylor, S., Mitson, M., Bachrati, C.Z., Higgs, D.R., and Gibbons, R.J. (2014). ATRX dysfunction induces replication defects in primary mouse cells. *PLoS One* 9, e92915.
- Clynes, D., Jelinska, C., Xella, B., Ayyub, H., Scott, C., Mitson, M., Taylor, S., Higgs, D.R., and Gibbons, R.J. (2015). Suppression of the alternative lengthening of telomere pathway by the chromatin remodelling factor ATRX. *Nat. Commun.* 6, 7538.
- Cohen, H.Y., Lavu, S., Bitterman, K.J., Hekking, B., Imahiyerobo, T.A., Miller, C., Frye, R., Ploegh, H., Kessler, B.M., and Sinclair, D.A. (2004). Acetylation of the C Terminus of Ku70 by CBP and PCAF Controls Bax-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell* 13, 627–638.
- Colgin, L.M., Wilkinson, C., Englezou, A., Kilian, A., Robinson, M.O., and Reddel, R.R. (2000). The hTERT $\alpha$  splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia* N. Y. N 2, 426–432.
- Collins, K. (2006). The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 484–494.
- Cong, Y.-S., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2002). Human Telomerase and Its Regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 407–425.

- Conomos, D., Stutz, M.D., Hills, M., Neumann, A.A., Bryan, T.M., Reddel, R.R., and Pickett, H.A. (2012). Variant repeats are interspersed throughout the telomeres and recruit nuclear receptors in ALT cells. *J Cell Biol* 199, 893–906.
- Conomos, D., Reddel, R.R., and Pickett, H.A. (2014). NuRD-ZNF827 recruitment to telomeres creates a molecular scaffold for homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 760–770.
- Cook, B.D., Dynek, J.N., Chang, W., Shostak, G., and Smith, S. (2002). Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol. Cell. Biol.* 22, 332–342.
- Costantino, L., Sotiriou, S.K., Rantala, J.K., Magin, S., Mladenov, E., Helleday, T., Haber, J.E., Iliakis, G., Kallioniemi, O., and Halazonetis, T.D. (2014). Break-induced replication repair of damaged forks induces genomic duplications in human cells. *Science* 343, 88–91.
- Cox, K.E., Maréchal, A., and Flynn, R.L. (2016). SMARCAL1 Resolves Replication Stress at ALT Telomeres. *Cell Rep.* 14, 1032–1040.
- Cui, L., Miao, J., Furuya, T., Fan, Q., Li, X., Rathod, P.K., Su, X.-Z., and Cui, L. (2008). Histone acetyltransferase inhibitor anacardic acid causes changes in global gene expression during in vitro *Plasmodium falciparum* development. *Eukaryot. Cell* 7, 1200–1210.
- Dahse, R., Fiedler, W., and Ernst, G. (1997). Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. *Clin. Chem.* 43, 708–714.
- Dai, X., Huang, C., Bhusari, A., Sampathi, S., Schubert, K., and Chai, W. (2010). Molecular steps of G-overhang generation at human telomeres and its function in chromosome end protection. *EMBO J.* 29, 2788–2801.
- D’Alcontres, M.S., Mendez-Bermudez, A., Foxon, J.L., Royle, N.J., and Salomoni, P. (2007). Lack of TRF2 in ALT cells causes PML-dependent p53 activation and loss of telomeric DNA. *J. Cell Biol.* 179, 855–867.
- Darefsky, A.S., King, J.T., and Dubrow, R. (2012). Adult glioblastoma multiforme survival in the temozolomide era: a population-based analysis of Surveillance, Epidemiology, and End Results registries. *Cancer* 118, 2163–2172.
- Davis, M.E. (2016). Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin. J. Oncol. Nurs.* 20, S2–S8.
- Déjardin, J., and Kingston, R.E. (2009). Purification of proteins associated with specific genomic Loci. *Cell* 136, 175–186.
- Denchi, E.L., and Lange, T. de (2007). Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* 448, nature06065.

- Deng, Z., Dheekollu, J., Broccoli, D., Dutta, A., and Lieberman, P.M. (2007). The origin recognition complex localizes to telomere repeats and prevents telomere-circle formation. *Curr. Biol. CB* 17, 1989–1995.
- Deng, Z., Norseen, J., Wiedmer, A., Riethman, H., and Lieberman, P.M. (2009). TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Mol. Cell* 35, 403–413.
- Dessain, S.K., Yu, H., Reddel, R.R., Beijersbergen, R.L., and Weinberg, R.A. (2000). Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Res.* 60, 537–541.
- Devereux, T.R., Horikawa, I., Anna, C.H., Annab, L.A., Afshari, C.A., and Barrett, J.C. (1999). DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Res.* 59, 6087–6090.
- Dilley, R.L., Verma, P., Cho, N.W., Winters, H.D., Wondisford, A.R., and Greenberg, R.A. (2016). Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance. *Nature* 539, 54–58.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9363–9367.
- Dionne, I., and Wellinger, R.J. (1998). Processing of telomeric DNA ends requires the passage of a replication fork. *Nucleic Acids Res.* 26, 5365–5371.
- Diotti, R., and Loayza, D. (2011). Shelterin complex and associated factors at human telomeres. *Nucleus* 2, 119–135.
- Doksani, Y., Wu, J.Y., de Lange, T., and Zhuang, X. (2013). Super-resolution fluorescence imaging of telomeres reveals TRF2-dependent T-loop formation. *Cell* 155, 345–356.
- Donate, L.E., and Blasco, M.A. (2011). Telomeres in cancer and ageing. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 366, 76–84.
- Draskovic, I., Arnoult, N., Steiner, V., Bacchetti, S., Lomonte, P., and Londoño-Vallejo, A. (2009). Probing PML body function in ALT cells reveals spatiotemporal requirements for telomere recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 15726–15731.
- Dregalla, R.C., Zhou, J., Idate, R.R., Battaglia, C.L.R., Liber, H.L., and Bailey, S.M. (2010). Regulatory roles of tankyrase 1 at telomeres and in DNA repair: suppression of T-SCE and stabilization of DNA-PKcs. *Aging* 2, 691–708.
- Ducoux, M., Urbach, S., Baldacci, G., Hübscher, U., Koundrioukoff, S., Christensen, J., and Hughes, P. (2001). Mediation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-dependent DNA replication through a conserved p21(Cip1)-like PCNA-binding motif present in the third subunit of human DNA polymerase delta. *J. Biol. Chem.* 276, 49258–49266.

- Dueva, R., and Iliakis, G. (2013). Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Transl. Cancer Res.* 2, 163–177.
- Dunham, M.A., Neumann, A.A., Fasching, C.L., and Reddel, R.R. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat. Genet.* 26, 447–450.
- Eguía-Aguilar, P., Solís-Paredes, M., Reyes-Cid, P., Perezpeña-Diazconti, M., León, F.C.-P. de, Sadowinski-Pine, S., and Arenas-Huertero, F. (2013). Expression of histone acetylases p300 and PCAF in pediatric astrocytomas. *Childs Nerv. Syst.* 29, 1089–1096.
- Episkopou, H., Draskovic, I., Van Beneden, A., Tilman, G., Mattiussi, M., Gobin, M., Arnoult, N., Londoño-Vallejo, A., and Decottignies, A. (2014). Alternative Lengthening of Telomeres is characterized by reduced compaction of telomeric chromatin. *Nucleic Acids Res.* 42, 4391–4405.
- Everett, R.D., Meredith, M., Orr, A., Cross, A., Katoria, M., and Parkinson, J. (1997). A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *EMBO J.* 16, 1519–1530.
- Fairall, L., Chapman, L., Moss, H., de Lange, T., and Rhodes, D. (2001). Structure of the TRFH dimerization domain of the human telomeric proteins TRF1 and TRF2. *Mol. Cell* 8, 351–361.
- Fasching, C.L., Neumann, A.A., Muntoni, A., Yeager, T.R., and Reddel, R.R. (2007). DNA damage induces alternative lengthening of telomeres (ALT) associated promyelocytic leukemia bodies that preferentially associate with linear telomeric DNA. *Cancer Res.* 67, 7072–7077.
- Flint, J., Bates, G.P., Clark, K., Dorman, A., Willingham, D., Roe, B.A., Micklem, G., Higgs, D.R., and Louis, E.J. (1997). Sequence comparison of human and yeast telomeres identifies structurally distinct subtelomeric domains. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1305–1313.
- 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.
- Flynn, R.L., Cox, K.E., Jeitany, M., Wakimoto, H., Bryll, A.R., Ganem, N.J., Bersani, F., Pineda, J.R., Suvà, M.L., Benes, C.H., et al. (2015). Alternative lengthening of telomeres renders cancer cells hypersensitive to ATR inhibitors. *Science* 347, 273–277.
- Fogli, A., Demattei, M.-V., Corset, L., Vauris-Barrière, C., Chautard, E., Biau, J., Kémény, J.-L., Godfraind, C., Pereira, B., Khalil, T., et al. (2017). Detection of the alternative lengthening of telomeres pathway in malignant gliomas for improved molecular diagnosis. *J Neurooncol* 135, 381–390.
- Frank, S.R., Schroeder, M., Fernandez, P., Taubert, S., and Amati, B. (2001). Binding of c-Myc to chromatin mediates mitogen-induced acetylation of histone H4 and gene activation. *Genes Dev.* 15, 2069–2082.

- Frescas, D., and de Lange, T. (2014). TRF2-tethered TIN2 can mediate telomere protection by TPP1/POT1. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 1349–1362.
- Frescas, D., and de Lange, T. (2014). Binding of TPP1 protein to TIN2 protein is required for POT1a,b protein-mediated telomere protection. *J. Biol. Chem.* *289*, 24180–24187.
- Fuks, F., Milner, J., and Kouzarides, T. (1998). BRCA2 associates with acetyltransferase activity when bound to P/CAF. *Oncogene* *17*, 2531–2534.
- Gaillard, H., García-Muse, T., and Aguilera, A. (2015). Replication stress and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 276.
- Garcea, R.L., and Alberts, B.M. (1980). Comparative studies of histone acetylation in nucleosomes, nuclei, and intact cells. Evidence for special factors which modify acetylase action. *J. Biol. Chem.* *255*, 11454–11463.
- Garcia-Exposito, L., Bournique, E., Bergoglio, V., Bose, A., Barroso-Gonzalez, J., Zhang, S., Roncaioli, J.L., Lee, M., Wallace, C.T., Watkins, S.C., et al. (2016). Proteomic Profiling Reveals a Specific Role for Translesion DNA Polymerase  $\eta$  in the Alternative Lengthening of Telomeres. *Cell Rep.* *17*, 1858–1871.
- Ghosal, G., and Muniyappa, K. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Mre11 is a high-affinity G4 DNA-binding protein and a G-rich DNA-specific endonuclease: implications for replication of telomeric DNA. *Nucleic Acids Res.* *33*, 4692–4703.
- Goldberg, A.D., Banaszynski, L.A., Noh, K.-M., Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X., et al. (2010). Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell* *140*, 678–691.
- Gonzalo, S., García-Cao, M., Fraga, M.F., Schotta, G., Peters, A.H.F.M., Cotter, S.E., Eguía, R., Dean, D.C., Esteller, M., Jenuwein, T., et al. (2005). Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin. *Nat. Cell Biol.* *7*, 420–428.
- 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.
- Graf, M., Bonetti, D., Lockhart, A., Serhal, K., Kellner, V., Maicher, A., Jolivet, P., Teixeira, M.T., and Luke, B. (2017). Telomere Length Determines TERRA and R-Loop Regulation through the Cell Cycle. *Cell* *170*, 72–85.e14.
- 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.

- Grobelny, J.V., Godwin, A.K., and Broccoli, D. (2000). ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/M phase of the cell cycle. *J. Cell Sci.* *113*, 4577–4585.
- Hakin-Smith, V., Jellinek, D.A., Levy, D., Carroll, T., Teo, M., Timperley, W.R., McKay, M.J., Reddel, R.R., and Royds, J.A. (2003). Alternative lengthening of telomeres and survival in patients with glioblastoma multiforme. *Lancet Lond. Engl.* *361*, 836–838.
- Hanaoka, S., Nagadoi, A., Yoshimura, S., Aimoto, S., Li, B., de Lange, T., and Nishimura, Y. (2001). NMR structure of the hRap1 Myb motif reveals a canonical three-helix bundle lacking the positive surface charge typical of Myb DNA-binding domains. *J. Mol. Biol.* *312*, 167–175.
- Hanaoka, S., Nagadoi, A., and Nishimura, Y. (2005). Comparison between TRF2 and TRF1 of their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *14*, 119–130.
- Harley, C.B. (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat. Res.* *256*, 271–282.
- Harrington, L., Zhou, W., McPhail, T., Oulton, R., Yeung, D.S., Mar, V., Bass, M.B., and Robinson, M.O. (1997). Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits. *Genes Dev.* *11*, 3109–3115.
- Hayakawa, F., Abe, A., Kitabayashi, I., Pandolfi, P.P., and Naoe, T. (2008). Acetylation of PML Is Involved in Histone Deacetylase Inhibitor-mediated Apoptosis. *J. Biol. Chem.* *283*, 24420–24425.
- Hayflick, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp. Cell Res.* *37*, 614–636.
- Heaphy, C.M., de Wilde, R.F., Jiao, Y., Klein, A.P., Edil, B.H., Shi, C., Bettgowda, C., Rodriguez, F.J., Eberhart, C.G., Hebbar, S., et al. (2011). Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science* *333*, 425.
- Heaphy, C.M., Schreck, K.C., Raabe, E., Mao, X.-G., An, P., Chu, Q., Poh, W., Jiao, Y., Rodriguez, F.J., Oda, Y., et al. (2013). A glioblastoma neurosphere line with alternative lengthening of telomeres. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *126*.
- Henderson, E.R., and Blackburn, E.H. (1989). An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 345.
- Henderson, E., Hardin, C.C., Walk, S.K., Tinoco, I., and Blackburn, E.H. (1987). Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs. *Cell* *51*, 899–908.
- Henriques, C.M., Carneiro, M.C., Tenente, I.M., Jacinto, A., and Ferreira, M.G. (2013). Telomerase is required for zebrafish lifespan. *PLoS Genet.* *9*, e1003214.

- Henson, J.D., and Reddel, R.R. (2010). Assaying and investigating Alternative Lengthening of Telomeres activity in human cells and cancers. *FEBS Lett.* *584*, 3800–3811.
- Henson, J.D., Hannay, J.A., McCarthy, S.W., Royds, J.A., Yeager, T.R., Robinson, R.A., Wharton, S.B., Jellinek, D.A., Arbuckle, S.M., Yoo, J., et al. (2005). A Robust Assay for Alternative Lengthening of Telomeres in Tumors Shows the Significance of Alternative Lengthening of Telomeres in Sarcomas and Astrocytomas. *Clin. Cancer Res.* *11*, 217–225.
- Henson, J.D., Cao, Y., Huschtscha, L.I., Chang, A.C., Au, A.Y.M., Pickett, H.A., and Reddel, R.R. (2009). DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nat. Biotechnol.* *27*, 1181–1185.
- Henson, J.D., Lau, L.M., Koch, S., Martin La Rotta, N., Dagg, R.A., and Reddel, R.R. (2017). The C-Circle Assay for alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Methods San Diego Calif* *114*, 74–84.
- Her, Y.R., and Chung, I.K. (2009). Ubiquitin Ligase RLIM Modulates Telomere Length Homeostasis through a Proteolysis of TRF1. *J. Biol. Chem.* *284*, 8557–8566.
- Her, Y.R., and Chung, I.K. (2013). p300-mediated acetylation of TRF2 is required for maintaining functional telomeres. *Nucleic Acids Res.* *41*, 2267–2283.
- Ho, A., Wilson, F.R., Peragine, S.L., Jeyanthan, K., Mitchell, T.R.H., and Zhu, X.-D. (2016). TRF1 phosphorylation on T271 modulates telomerase-dependent telomere length maintenance as well as the formation of ALT-associated PML bodies. *Sci. Rep.* *6*.
- Hoare, S.F., Bryce, L.A., Wisman, G.B.A., Burns, S., Going, J.J., van der Zee, A.G.J., and Keith, W.N. (2001). Lack of Telomerase RNA Gene hTERC Expression in Alternative Lengthening of Telomeres Cells Is Associated with Methylation of the hTERC Promoter. *Cancer Res.* *61*, 27–32.
- Hockemeyer, D., and Collins, K. (2015). Control of telomerase action at human telomeres. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 848–852.
- Hockemeyer, D., Sfeir, A.J., Shay, J.W., Wright, W.E., and de Lange, T. (2005). POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end. *EMBO J.* *24*, 2667–2678.
- Hockemeyer, D., Palm, W., Else, T., Daniels, J.-P., Takai, K.K., Ye, J.Z.-S., Keegan, C.E., de Lange, T., and Hammer, G.D. (2007). Telomere protection by mammalian Pot1 requires interaction with Tpp1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 754–761.
- Hong, L., Schroth, G.P., Matthews, H.R., Yau, P., and Bradbury, E.M. (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 “tail” to DNA. *J. Biol. Chem.* *268*, 305–314.

- 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. CB* 14, 1621–1631.
- Hrdličková, R., Nehyba, J., and Bose, H.R. (2012). Alternatively Spliced Telomerase Reverse Transcriptase Variants Lacking Telomerase Activity Stimulate Cell Proliferation. *Mol. Cell Biol.* 32, 4283–4296.
- Hu, C., Rai, R., Huang, C., Broton, C., Long, J., Xu, Y., Xue, J., Lei, M., Chang, S., and Chen, Y. (2017). Structural and functional analyses of the mammalian TIN2-TPP1-TRF2 telomeric complex. *Cell Res.*
- 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.
- Hug, N., and Lingner, J. (2006). Telomere length homeostasis. *Chromosoma* 115, 413–425.
- Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D., and Steindler, D.A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39, 193–206.
- Ijdo, J.W., Lindsay, E.A., Wells, R.A., and Baldini, A. (1992). Multiple variants in subtelomeric regions of normal karyotypes. *Genomics* 14, 1019–1025.
- Imamura, S., Uchiyama, J., Koshimizu, E., Hanai, J.-I., Raftopoulou, C., Murphey, R.D., Bayliss, P.E., Imai, Y., Burns, C.E., Masutomi, K., et al. (2008). A non-canonical function of zebrafish telomerase reverse transcriptase is required for developmental hematopoiesis. *PLoS One* 3, e3364.
- Imhof, A., Yang, X.-J., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., Wolffe, A.P., and Ge, H. (1997). Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Curr. Biol.* 7, 689–692.
- Ira, G., and Haber, J.E. (2002). Characterization of RAD51-Independent Break-Induced Replication That Acts Preferentially with Short Homologous Sequences. *Mol. Cell Biol.* 22, 6384–6392.
- Iwano, T., Tachibana, M., Reth, M., and Shinkai, Y. (2004). Importance of TRF1 for functional telomere structure. *J. Biol. Chem.* 279, 1442–1448.



- Jády, B.E., Richard, P., Bertrand, E., and Kiss, T. (2006). Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol. Biol. Cell* 17, 944–954.
- Janer, A., Werner, A., Takahashi-Fujigasaki, J., Daret, A., Fujigasaki, H., Takada, K., Duyckaerts, C., Brice, A., Dejean, A., and Sittler, A. (2010). SUMOylation attenuates the aggregation propensity and cellular toxicity of the polyglutamine expanded ataxin-7. *Hum. Mol. Genet.* 19, 181–195.
- Jegou, T., Chung, I., Heuvelman, G., Wachsmuth, M., Görisch, S.M., Greulich-Bode, K.M., Boukamp, P., Lichter, P., and Rippe, K. (2009). Dynamics of Telomeres and Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies in a Telomerase-negative Human Cell Line. *Mol. Biol. Cell* 20, 2070–2082.
- Jeitany, M., Pineda, J.R., Liu, Q., Porreca, R.M., Hoffschir, F., Desmaze, C., Silvestre, D.C., Mailliet, P., Junier, M.-P., Londoño-Vallejo, A., et al. (2015). A preclinical mouse model of glioma with an alternative mechanism of telomere maintenance (ALT). *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 136, 1546–1558.
- Jeitany, M., Bakhos-Douaihy, D., Silvestre, D.C., Pineda, J.R., Ugolin, N., Moussa, A., Gauthier, L.R., Busso, D., Junier, M.-P., Chneiweiss, H., et al. (2017). Opposite effects of GCN5 and PCAF knockdowns on the alternative mechanism of telomere maintenance. *Oncotarget* 8, 26269–26280.
- Jiang, W.-Q., Zhong, Z.-H., Henson, J.D., Neumann, A.A., Chang, A.C.-M., and Reddel, R.R. (2005). Suppression of Alternative Lengthening of Telomeres by Sp100-Mediated Sequestration of the MRE11/RAD50/NBS1 Complex. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2708–2721.
- Jiang, W.-Q., Zhong, Z.-H., Henson, J.D., and Reddel, R.R. (2007). Identification of candidate alternative lengthening of telomeres genes by methionine restriction and RNA interference. *Oncogene* 26, 4635–4647.
- Jiang, W.-Q., Zhong, Z.-H., Nguyen, A., Henson, J.D., Toouli, C.D., Braithwaite, A.W., and Reddel, R.R. (2009). Induction of alternative lengthening of telomeres-associated PML bodies by p53/p21 requires HP1 proteins. *J. Cell Biol.* 185, 797–810.
- Jiao, Y., Killela, P.J., Reitman, Z.J., Rasheed, B.A., Heaphy, C.M., de Wilde, R.F., Rodriguez, F.J., Rosenberg, S., Oba-Shinjo, S.M., Marie, S.K.N., et al. (2012). Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* 3, 709–722.
- Jiao, Y., Shi, C., Edil, B.H., de Wilde, R.F., Klimstra, D.S., Maitra, A., Schulick, R.D., Tang, L.H., Wolfgang, C.L., Choti, M.A., et al. (2011). DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science* 331, 1199–1203.
- Jin, W., Liu, Y., Chen, L., Zhu, H., Di, G.-H., Ling, H., Wu, J., and Shao, Z.-M. (2011). Involvement of MyoD and c-myb in regulation of basal and estrogen-induced transcription activity of the BRCA1 gene. *Breast Cancer Res. Treat.* 125, 699–713.

- Jr, P., M, J., A, A., Mp3, J., H3, C., and Boussin, F.D. (2017). Intranasal Administration of Temozolomide Delayed the Development of Brain Tumors Initiated by Human Glioma Stem-Like Cell in Nude Mice. *J. Cancer Sci. Ther.* *9*, 374–378.
- Jung, A.R., Yoo, J.E., Shim, Y.-H., Choi, Y.-N., Jeung, H.-C., Chung, H.C., Rha, S.Y., and Oh, B.-K. (2013). Increased alternative lengthening of telomere phenotypes of telomerase-negative immortal cells upon trichostatin--a treatment. *Anticancer Res.* *33*, 821–829.
- Kabir, S., Hockemeyer, D., and de Lange, T. (2014). TALEN gene knockouts reveal no requirement for the conserved human shelterin protein Rap1 in telomere protection and length regulation. *Cell Rep.* *9*, 1273–1280.
- Kargbo, R.B. (2018). Histone Deacetylase Inhibitors as Treatment for Targeting Multiple Components in Cancer Therapy. *ACS Med. Chem. Lett.* *9*, 167–168.
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and Lange, T. de (1999). p53- and ATM-Dependent Apoptosis Induced by Telomeres Lacking TRF2. *Science* *283*, 1321–1325.
- Karlseder, J., Kachatrian, L., Takai, H., Mercer, K., Hingorani, S., Jacks, T., and de Lange, T. (2003). Targeted deletion reveals an essential function for the telomere length regulator Trf1. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 6533–6541.
- Kibe, T., Osawa, G.A., Keegan, C.E., and de Lange, T. (2010). Telomere protection by TPP1 is mediated by POT1a and POT1b. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 1059–1066.
- Kilian, A., Bowtell, D.D., Abud, H.E., Hime, G.R., Venter, D.J., Keese, P.K., Duncan, E.L., Reddel, R.R., and Jefferson, R.A. (1997). Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum. Mol. Genet.* *6*, 2011–2019.
- Killela, P.J., Reitman, Z.J., Jiao, Y., Bettegowda, C., Agrawal, N., Diaz, L.A., Friedman, A.H., Friedman, H., Gallia, G.L., Giovannella, 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, K.-B., Kim, D.-W., Park, J.W., Jeon, Y.-J., Kim, D., Rhee, S., Chae, J.-I., and Seo, S.-B. (2014). Inhibition of Ku70 acetylation by INHAT subunit SET/TAF-I $\beta$  regulates Ku70-mediated DNA damage response. *Cell. Mol. Life Sci.* *71*, 2731–2745.
- 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., Parrinello, S., Kim, J., and Campisi, J. (2003). *Mus musculus* and *Mus spretus* homologues of the human telomere-associated protein TIN2. *Genomics* *81*, 422–432.
- Kipling, D., and Cooke, H.J. (1990). Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* *347*, 347400a0.

- Kirk, K.E., and Blackburn, E.H. (1995). An unusual sequence arrangement in the telomeres of the germ-line micronucleus in *Tetrahymena thermophila*. *Genes Dev.* 9, 59–71.
- Kiss, T., Fayet-Lebaron, E., and Jády, B.E. (2010). Box H/ACA small ribonucleoproteins. *Mol. Cell* 37, 597–606.
- Kocak, H., Ballew, B.J., Bisht, K., Eggebeen, R., Hicks, B.D., Suman, S., O’Neil, A., Giri, N., Maillard, I., Alter, B.P., et al. (2014). Hoyeraal-Hreidarsson syndrome caused by a germline mutation in the TEL patch of the telomere protein TPP1. *Genes Dev.* 28, 2090–2102.
- Kornberg, R.D., and Lorch, Y. (1999). Twenty-Five Years of the Nucleosome, Fundamental Particle of the Eukaryote Chromosome. *Cell* 98, 285–294.
- Koschmann, C., Calinescu, A.-A., Nunez, F.J., Mackay, A., Fazal-Salom, J., Thomas, D., Mendez, F., Kamran, N., Dzaman, M., Mulpuri, L., et al. (2016). ATRX Loss Promotes Tumor Growth and Impairs Non-Homologous End Joining DNA Repair in Glioma. *Sci. Transl. Med.* 8, 328ra28.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128, 693–705.
- Krebs, A.R., Karmodiya, K., Lindahl-Allen, M., Struhl, K., and Tora, L. (2011). SAGA and ATAC Histone Acetyl Transferase Complexes Regulate Distinct Sets of Genes and ATAC Defines a Class of p300-Independent Enhancers. *Mol. Cell* 44, 410–423.
- Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., and Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Res.* 40, 5795–5818.
- Kumata, M., Shimizu, M., Oshimura, M., Uchida, M., and Tsutsui, T. (2002). Induction of cellular senescence in a telomerase negative human immortal fibroblast cell line, LCS-AF.1-3, by human chromosome 6. *Int. J. Oncol.* 21, 851–856.
- Kuo, M.-H., and Allis, C.D. (1998). Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *BioEssays* 20, 615–626.
- Kuo, Y.-M., and Andrews, A.J. (2013). Quantitating the specificity and selectivity of Gcn5-mediated acetylation of histone H3. *PLoS One* 8, e54896.
- Kuo, M.-H., Brownell, J.E., Sobel, R.E., Ranalli, T.A., Cook, R.G., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1996). Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature* 383, 269–272.
- Lafferty-Whyte, K., Cairney, C.J., Will, M.B., Serakinci, N., Daidone, M.-G., Zaffaroni, N., Bilslund, A., and Keith, W.N. (2009). A gene expression signature classifying telomerase and ALT immortalization reveals an hTERT regulatory network and suggests a mesenchymal stem cell origin for ALT. *Oncogene* 28, 3765–3774.
- Lallemant-Breitenbach, V., Zhu, J., Puvion, F., Koken, M., Honoré, N., Doubeikovsky, A., Duprez, E., Pandolfi, P.P., Puvion, E., Freemont, P., et al. (2001). Role of Promyelocytic

- Leukemia (Pml) Sumolation in Nuclear Body Formation, 11s Proteasome Recruitment, and as2O3-Induced Pml or Pml/Retinoic Acid Receptor  $\alpha$  Degradation. *J. Exp. Med.* *193*, 1361–1372.
- 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.
- de Lange, T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 323–329.
- de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev.* *19*, 2100–2110.
- Larson, D.D., Spangler, E.A., and Blackburn, E.H. (1987). Dynamics of telomere length variation in *tetrahymena thermophila*. *Cell* *50*, 477–483.
- Laud, P.R., Multani, A.S., Bailey, S.M., Wu, L., Ma, J., Kingsley, C., Lebel, M., Pathak, S., DePinho, R.A., and Chang, S. (2005). Elevated telomere-telomere recombination in WRN-deficient, telomere dysfunctional cells promotes escape from senescence and engagement of the ALT pathway. *Genes Dev.* *19*, 2560–2570.
- Law, M.J., Lower, K.M., Voon, H.P.J., Hughes, J.R., Garrick, D., Viprakasit, V., Mitson, M., De Gobbi, M., Marra, M., Morris, A., et al. (2010). ATR-X syndrome protein targets tandem repeats and influences allele-specific expression in a size-dependent manner. *Cell* *143*, 367–378.
- Lee, T.H., Perrem, K., Harper, J.W., Lu, K.P., and Zhou, X.Z. (2006). The F-box protein FBX4 targets PIN2/TRF1 for ubiquitin-mediated degradation and regulates telomere maintenance. *J. Biol. Chem.* *281*, 759–768.
- Lei, M., Zaug, A.J., Podell, E.R., and Cech, T.R. (2005). Switching human telomerase on and off with hPOT1 protein in vitro. *J. Biol. Chem.* *280*, 20449–20456.
- 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.
- Lewis, P.W., Elsaesser, S.J., Noh, K.-M., Stadler, S.C., and Allis, C.D. (2010). Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 14075–14080.
- Li, B., and de Lange, T. (2003). Rap1 Affects the Length and Heterogeneity of Human Telomeres. *Mol. Biol. Cell* *14*, 5060–5068.
- Li, Y., and Tergaonkar, V. (2014). Noncanonical functions of telomerase: implications in telomerase-targeted cancer therapies. *Cancer Res.* *74*, 1639–1644.
- Linardopoulou, E.V., Williams, E.M., Fan, Y., Friedman, C., Young, J.M., and Trask, B.J. (2005). Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. *Nature* *437*, 94–100.

- Linares, L.K., Kiernan, R., Triboulet, R., Chable-Bessia, C., Latreille, D., Cuvier, O., Lacroix, M., Le Cam, L., Coux, O., and Benkirane, M. (2007). Intrinsic ubiquitination activity of PCAF controls the stability of the oncoprotein Hdm2. *Nat. Cell Biol.* *9*, 331–338.
- Liu, D., Safari, A., O'Connor, M.S., Chan, D.W., Laegeler, A., Qin, J., and Songyang, Z. (2004). PTPN22 interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nat. Cell Biol.* *6*, 673–680.
- Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D., and Berger, S.L. (1999). p53 Sites Acetylated In Vitro by PCAF and p300 Are Acetylated In Vivo in Response to DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1202–1209.
- Liu, T., Liang, X., Björkholm, M., Jia, J., and Xu, D. (2014). The absence of TERT promoter mutations in primary gastric cancer. *Gene* *540*, 266–267.
- Liu, T., Wang, N., Cao, J., Sofiadis, A., Dinets, A., Zedenius, J., Larsson, C., and Xu, D. (2014). The age- and shorter telomere-dependent TERT promoter mutation in follicular thyroid cell-derived carcinomas. *Oncogene* *33*, 4978–4984.
- Liu, X., Wu, G., Shan, Y., Hartmann, C., von Deimling, A., and Xing, M. (2013). Highly prevalent TERT promoter mutations in bladder cancer and glioblastoma. *Cell Cycle Georget. Tex* *12*, 1637–1638.
- Liu, X.-Y., Gerges, N., Korshunov, A., Sabha, N., Khuong-Quang, D.-A., Fontebasso, A.M., Fleming, A., Hadjadj, D., Schwartzentruber, J., Majewski, J., et al. (2012). Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol.* *124*, 615–625.
- Liu, Y., Snow, B.E., Hande, M.P., Yeung, D., Erdmann, N.J., Wakeham, A., Itie, A., Siderovski, D.P., Lansdorp, P.M., Robinson, M.O., et al. (2000). The telomerase reverse transcriptase is limiting and necessary for telomerase function in vivo. *Curr. Biol. CB* *10*, 1459–1462.
- Loayza, D., and de Lange, T. (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* *423*, 1013–1018.
- Loidl, P. (1994). Histone acetylation: facts and questions. *Chromosoma* *103*, 441–449.
- Londoño-Vallejo, J.A., Der-Sarkissian, H., Cazes, L., Bacchetti, S., and Reddel, R.R. (2004). Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange. *Cancer Res.* *64*, 2324–2327.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *114*, 97–109.
- Love, I.M., Sekaric, P., Shi, D., Grossman, S.R., and Androphy, E.J. (2012). The histone acetyltransferase PCAF regulates p21 transcription through stress-induced acetylation of histone H3. *Cell Cycle* *11*, 2458–2466.

- Lovejoy, C.A., Li, W., Reisenweber, S., Thongthip, S., Bruno, J., de Lange, T., De, S., Petrini, J.H.J., Sung, P.A., Jasin, M., et al. (2012). Loss of ATRX, genome instability, and an altered DNA damage response are hallmarks of the alternative lengthening of telomeres pathway. *PLoS Genet.* *8*, e1002772.
- Lundblad, V., and Blackburn, E.H. (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* *73*, 347–360.
- Luo, Y., Hermetz, K.E., Jackson, J.M., Mulle, J.G., Dodd, A., Tsuchiya, K.D., Ballif, B.C., Shaffer, L.G., Cody, J.D., Ledbetter, D.H., et al. (2011). Diverse mutational mechanisms cause pathogenic subtelomeric rearrangements. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 3769–3778.
- Lynn, A., Kashuk, C., Petersen, M.B., Bailey, J.A., Cox, D.R., Antonarakis, S.E., and Chakravarti, A. (2000). Patterns of meiotic recombination on the long arm of human chromosome 21. *Genome Res.* *10*, 1319–1332.
- M. Fletcher, T., and Hansen, J. (1996). *The Nucleosomal Array: Structure/Function Relationships*.
- Majaz, S., Tong, Z., Peng, K., Wang, W., Ren, W., Li, M., Liu, K., Mo, P., Li, W., and Yu, C. (2016). Histone acetyl transferase GCN5 promotes human hepatocellular carcinoma progression by enhancing AIB1 expression. *Cell Biosci.* *6*.
- 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.
- Malatesta, M., Steinhauer, C., Mohammad, F., Pandey, D.P., Squatrito, M., and Helin, K. (2013). Histone Acetyltransferase PCAF Is Required for Hedgehog–Gli-Dependent Transcription and Cancer Cell Proliferation. *Cancer Res.* *73*, 6323–6333.
- Martadinata, H., and Phan, A.T. (2009). Structure of propeller-type parallel-stranded RNA G-quadruplexes, formed by human telomeric RNA sequences in K<sup>+</sup> solution. *J. Am. Chem. Soc.* *131*, 2570–2578.
- Martínez, P., and Blasco, M.A. (2015). Replicating through telomeres: a means to an end. *Trends Biochem. Sci.* *40*, 504–515.
- Martínez, P., Thanasoula, M., Muñoz, P., Liao, C., Tejera, A., McNees, C., Flores, J.M., Fernández-Capetillo, O., Tarsounas, M., and Blasco, M.A. (2009). Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. *Genes Dev.* *23*, 2060–2075.
- Marzec, P., Armenise, C., Pérot, G., Roumelioti, F.-M., Basyuk, E., Gagos, S., Chibon, F., and Déjardin, J. (2015). Nuclear-Receptor-Mediated Telomere Insertion Leads to Genome Instability in ALT Cancers. *Cell* *160*, 913–927.

- Mattsson, K., Pokrovskaja, K., Kiss, C., Klein, G., and Szekely, L. (2001). Proteins associated with the promyelocytic leukemia gene product (PML)-containing nuclear body move to the nucleolus upon inhibition of proteasome-dependent protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 1012–1017.
- McClintock, B. (1939). The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *25*, 405–416.
- McDonald, K.L., McDonnell, J., Muntoni, A., Henson, J.D., Hegi, M.E., von Deimling, A., Wheeler, H.R., Cook, R.J., Biggs, M.T., Little, N.S., et al. (2010). Presence of alternative lengthening of telomeres mechanism in patients with glioblastoma identifies a less aggressive tumor type with longer survival. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *69*, 729–736.
- McEachern, M.J., and Blackburn, E.H. (1996). Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in *Kluyveromyces lactis* lacking telomerase. *Genes Dev.* *10*, 1822–1834.
- McEachern, M.J., and Haber, J.E. (2006). Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 111–135.
- McElligott, R., and Wellinger, R.J. (1997). The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J.* *16*, 3705–3714.
- McKerlie, M., and Zhu, X.-D. (2011). Cyclin B-dependent kinase 1 regulates human TRF1 to modulate the resolution of sister telomeres. *Nat. Commun.* *2*, 371.
- Mefford, H.C., and Trask, B.J. (2002). The complex structure and dynamic evolution of human subtelomeres. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 91–102.
- Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, Q., et al. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* *90*, 785–795.
- Meyne, J., Ratliff, R.L., and Moyzis, R.K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 7049–7053.
- Min, J., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2017). Alternative Lengthening of Telomeres Mediated by Mitotic DNA Synthesis Engages Break-Induced Replication Processes. *Mol. Cell. Biol.* *37*.
- Mitchell, T.R.H., Glenfield, K., Jeyanthan, K., and Zhu, X.-D. (2009). Arginine methylation regulates telomere length and stability. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 4918–4934.
- Morin, G.B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* *59*, 521–529.
- Morton Bradbury, E. (1992). Reversible histone modification and the chromosome cell cycle. *BioEssays* *14*, 9–16.

- Moye, A.L., Porter, K.C., Cohen, S.B., Phan, T., Zyner, K.G., Sasaki, N., Lovrecz, G.O., Beck, J.L., and Bryan, T.M. (2015). Telomeric G-quadruplexes are a substrate and site of localization for human telomerase. *Nat. Commun.* 6, 7643.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne, J., Ratliff, R.L., and Wu, J.R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 6622–6626.
- Muller, H. J. (1938). "The remaking of chromosomes." *Collecting Net* XIII(8): 181-198
- Muntoni, A., and Reddel, R.R. (2005). The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum. Mol. Genet.* 14 *Spec No.* 2, R191-196.
- Mur, P., Mollejo, M., Hernández-Iglesias, T., de Lope, Á.R., Castresana, J.S., García, J.F., Fiaño, C., Ribalta, T., Rey, J.A., and Meléndez, B. (2015). Molecular classification defines 4 prognostically distinct glioma groups irrespective of diagnosis and grade. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 74, 241–249.
- Nabetani, A., and Ishikawa, F. (2009). Unusual Telomeric DNAs in Human Telomerase-Negative Immortalized Cells. *Mol. Cell. Biol.* 29, 703–713.
- Nabetani, A., Yokoyama, O., and Ishikawa, F. (2004). Localization of hRad9, hHus1, hRad1, and hRad17 and Caffeine-sensitive DNA Replication at the Alternative Lengthening of Telomeres-associated Promyelocytic Leukemia Body. *J. Biol. Chem.* 279, 25849–25857.
- Nagy, Z., and Tora, L. (2007). Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene* 26, 5341–5357.
- Nakabayashi, K., Ogata, T., Fujii, M., Tahara, H., Ide, T., Wadhwa, R., Kaul, S.C., Mitsui, Y., and Ayusawa, D. (1997). Decrease in amplified telomeric sequences and induction of senescence markers by introduction of human chromosome 7 or its segments in SUSM-1. *Exp. Cell Res.* 235, 345–353.
- Nakamura, T.M., Cooper, J.P., and Cech, T.R. (1998). Two modes of survival of fission yeast without telomerase. *Science* 282, 493–496.
- 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
- Nakane, T., Kousuke, N., Sonoko, H., Yuko, K., Sato, H., Kubota, T., and Sugita, K. (2013). 6p subtelomere deletion with congenital glaucoma, severe mental retardation, and growth impairment. *Pediatr. Int. Off. J. Jpn. Pediatr. Soc.* 55, 376–381.



- Nan, X., Hou, J., Maclean, A., Nasir, J., Lafuente, M.J., Shu, X., Kriaucionis, S., and Bird, A. (2007). Interaction between chromatin proteins MECP2 and ATRX is disrupted by mutations that cause inherited mental retardation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 2709–2714.
- Nandakumar, J., and Cech, T.R. (2013). Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 69–82.
- Nandakumar, J., Bell, C.F., Weidenfeld, I., Zaug, A.J., Leinwand, L.A., and Cech, T.R. (2012). The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature* *492*, 285–289.
- Napier, C.E., Huschtscha, L.I., Harvey, A., Bower, K., Noble, J.R., Hendrickson, E.A., and Reddel, R.R. (2015). ATRX represses alternative lengthening of telomeres. *Oncotarget* *6*, 16543–16558.
- Negorev, D., and Maul, G.G. (2001). Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene* *20*, 7234–7242.
- Neidle, S. (2010). Human telomeric G-quadruplex: the current status of telomeric G-quadruplexes as therapeutic targets in human cancer. *FEBS J.* *277*, 1118–1125.
- Neuwald, A.F., and Landsman, D. (1997). GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. *Trends Biochem. Sci.* *22*, 154–155.
- O'Connor, M.S., Safari, A., Liu, D., Qin, J., and Songyang, Z. (2004). The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. *J. Biol. Chem.* *279*, 28585–28591.
- Oganesian, L., Moon, I.K., Bryan, T.M., and Jarstfer, M.B. (2006). Extension of G-quadruplex DNA by ciliate telomerase. *EMBO J.* *25*, 1148–1159.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996). The Transcriptional Coactivators p300 and CBP Are Histone Acetyltransferases. *Cell* *87*, 953–959.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2013). The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin Cancer Res* *19*, 764–772.
- Oishi, H., Kitagawa, H., Wada, O., Takezawa, S., Tora, L., Kouzu-Fujita, M., Takada, I., Yano, T., Yanagisawa, J., and Kato, S. (2006). An hGCN5/TRRAP Histone Acetyltransferase Complex Co-activates BRCA1 Transactivation Function through Histone Modification. *J. Biol. Chem.* *281*, 20–26.
- Olovnikov, A.M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* *41*, 181–190.

- 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.
- Osterhage, J.L., and Friedman, K.L. (2009). Chromosome end maintenance by telomerase. *J. Biol. Chem.* *284*, 16061–16065.
- O’Sullivan, R.J., Arnoult, N., Lackner, D.H., Oganessian, L., Haggblom, C., Corpet, A., Almouzni, G., and Karlseder, J. (2014). Rapid induction of alternative lengthening of telomeres by depletion of the histone chaperone ASF1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *21*, 167–174.
- Palm, W., and Lange, T. de (2008). How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. *Annu. Rev. Genet.* *42*, 301–334.
- Pan, X., Drosopoulos, W.C., Sethi, L., Madireddy, A., Schildkraut, C.L., and Zhang, D. (2017). FANCM, BRCA1, and BLM cooperatively resolve the replication stress at the ALT telomeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E5940–E5949.
- Pandita, T.K., Hunt, C.R., Sharma, G.G., and Yang, Q. (2007). Regulation of telomere movement by telomere chromatin structure. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *64*, 131–138.
- Pennarun, G., Granotier, C., Hoffschir, F., Mandine, E., Biard, D., Gauthier, L.R., and Boussin, F.D. (2008). Role of ATM in the telomere response to the G-quadruplex ligand 360A. *Nucleic Acids Res.* *36*, 1741–1754.
- Pennarun, G., Hoffschir, F., Revaud, D., Granotier, C., Gauthier, L.R., Mailliet, P., Biard, D.S., and Boussin, F.D. (2010). ATR contributes to telomere maintenance in human cells. *Nucleic Acids Res.* *38*, 2955–2963.
- Perrem, K., Bryan, T.M., Englezou, A., Hackl, T., Moy, E.L., and Reddel, R.R. (1999). Repression of an alternative mechanism for lengthening of telomeres in somatic cell hybrids. *Oncogene* *18*, 3383–3390.
- Peuscher, M.H., and Jacobs, J.J.L. (2012). Posttranslational control of telomere maintenance and the telomere damage response. *Cell Cycle Georget. Tex* *11*, 1524–1534.
- Phan, A.T., and Patel, D.J. (2003). Two-repeat human telomeric d(TAGGGTTAGGGT) sequence forms interconverting parallel and antiparallel G-quadruplexes in solution: distinct topologies, thermodynamic properties, and folding/unfolding kinetics. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 15021–15027.
- Pickett, H.A., Cesare, A.J., Johnston, R.L., Neumann, A.A., and Reddel, R.R. (2009). Control of telomere length by a trimming mechanism that involves generation of t-circles. *EMBO J.* *28*, 799–809.
- 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.

- Potts, P.R., and Yu, H. (2007). The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 581–590.
- 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.
- Poux, A.N., and Marmorstein, R. (2003). Molecular basis for Gcn5/PCAF histone acetyltransferase selectivity for histone and nonhistone substrates. *Biochemistry (Mosc.)* *42*, 14366–14374.
- Pryde, F.E., and Louis, E.J. (1997). *Saccharomyces cerevisiae* telomeres. A review. *Biochem. Biokhimiia* *62*, 1232–1241.
- Qiang, W., Wu, Q., Zhou, F., Xie, C., Wu, C., and Zhou, Y. (2014). Suppression of telomere-binding protein TPP1 resulted in telomere dysfunction and enhanced radiation sensitivity in telomerase-negative osteosarcoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *445*, 363–368.
- Qin, H., Zhao, C., Sun, Y., Ren, J., and Qu, X. (2017). Metallo-supramolecular Complexes Enantioselectively Eradicate Cancer Stem Cells in Vivo. *J. Am. Chem. Soc.* *139*, 16201–16209.
- Rai, R., Chen, Y., Lei, M., and Chang, S. (2016). TRF2-RAP1 is required to protect telomeres from engaging in homologous recombination-mediated deletions and fusions. *Nat. Commun.* *7*, 10881.
- Ramamoorthy, M., and Smith, S. (2015). Loss of ATRX Suppresses Resolution of Telomere Cohesion to Control Recombination in ALT Cancer Cells. *Cancer Cell* *28*, 357–369.
- Randall, A., and Griffith, J.D. (2009). Structure of long telomeric RNA transcripts: the G-rich RNA forms a compact repeating structure containing G-quartets. *J. Biol. Chem.* *284*, 13980–13986.
- Razak, Z.R.A., Varkonyi, R.J., Kulp-McEliece, M., Caslini, C., Testa, J.R., Murphy, M.E., and Broccoli, D. (2004). p53 differentially inhibits cell growth depending on the mechanism of telomere maintenance. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 5967–5977.
- 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.
- Rezler, E.M., Seenisamy, J., Bashyam, S., Kim, M.-Y., White, E., Wilson, W.D., and Hurley, L.H. (2005). Telomestatin and diseleno saphyrin bind selectively to two different forms of the human telomeric G-quadruplex structure. *J. Am. Chem. Soc.* *127*, 9439–9447.
- Ribes-Zamora, A., Indiviglio, S.M., Mihalek, I., Williams, C.L., and Bertuch, A.A. (2013). TRF2 interaction with Ku heterotetramerization interface gives insight into c-NHEJ prevention at human telomeres. *Cell Rep.* *5*, 194–206.

- Richards, E.J., Chao, S., Vongs, A., and Yang, J. (1992). Characterization of Arabidopsis thaliana telomeres isolated in yeast. *Nucleic Acids Res.* *20*, 4039–4046.
- Rogan, E.M., Bryan, T.M., Hukku, B., Maclean, K., Chang, A.C., Moy, E.L., Englezou, A., Warneford, S.G., Dalla-Pozza, L., and Reddel, R.R. (1995). Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 4745–4753.
- Roumelioti, F., Sotiriou, S.K., Katsini, V., Chiourea, M., Halazonetis, T.D., and Gagos, S. (2016). Alternative lengthening of human telomeres is a conservative DNA replication process with features of break-induced replication. *EMBO Rep.* *17*, 1731–1737.
- Rudd, M.K., Friedman, C., Parghi, S.S., Linardopoulou, E.V., Hsu, L., and Trask, B.J. (2007). Elevated rates of sister chromatid exchange at chromosome ends. *PLoS Genet.* *3*, e32.
- Sakellariou, D., Chiourea, M., Raftopoulou, C., and Gagos, S. (2013). Alternative Lengthening of Telomeres: Recurrent Cytogenetic Aberrations and Chromosome Stability under Extreme Telomere Dysfunction. *Neoplasia N. Y. N* *15*, 1301–1313.
- Sale, J.E. (2013). Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a012708.
- Sampathi, S., and Chai, W. (2011). Telomere replication: poised but puzzling. *J. Cell. Mol. Med.* *15*, 3–13.
- Sapountzi, V., and Côté, J. (2011). MYST-family histone acetyltransferases: beyond chromatin. *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 1147–1156.
- Sarbajna, S., Davies, D., and West, S.C. (2014). Roles of SLX1-SLX4, MUS81-EME1, and GEN1 in avoiding genome instability and mitotic catastrophe. *Genes Dev.* *28*, 1124–1136.
- Saretzki, G. (2014). Extra-telomeric functions of human telomerase: cancer, mitochondria and oxidative stress. *Curr. Pharm. Des.* *20*, 6386–6403.
- Sarkar, J., Wan, B., Yin, J., Vallabhaneni, H., Horvath, K., Kulikowicz, T., Bohr, V.A., Zhang, Y., Lei, M., and Liu, Y. (2015). SLX4 contributes to telomere preservation and regulated processing of telomeric joint molecule intermediates. *Nucleic Acids Res.* *43*, 5912–5923.
- Scheibe, M., Arnoult, N., Kappei, D., Buchholz, F., Decottignies, A., Butter, F., and Mann, M. (2013). Quantitative interaction screen of telomeric repeat-containing RNA reveals novel TERRA regulators. *Genome Res.* *23*, 2149–2157.
- Schiltz, R.L., Mizzen, C.A., Vassilev, A., Cook, R.G., Allis, C.D., and Nakatani, Y. (1999). Overlapping but Distinct Patterns of Histone Acetylation by the Human Coactivators p300 and PCAF within Nucleosomal Substrates. *J. Biol. Chem.* *274*, 1189–1192.
- Schmidt, J.C., and Cech, T.R. (2015). Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes Dev.* *29*, 1095–1105.

- Schmidt, J.C., Dalby, A.B., and Cech, T.R. (2014). Identification of human TERT elements necessary for telomerase recruitment to telomeres. *ELife* 3.
- Schmidt, J.C., Zaug, A.J., and Cech, T.R. (2016). Live Cell Imaging Reveals the Dynamics of Telomerase Recruitment to Telomeres. *Cell* 166, 1188–1197.e9.
- Schmidt, J.C., Zaug, A.J., Kufer, R., and Cech, T.R. (2017). Dynamics of human telomerase recruitment depend on template-telomere base-pairing. *BioRxiv* 217885.
- Schoeftner, S., and Blasco, M.A. (2008). Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat. Cell Biol.* 10, 228.
- Schoeftner, S., and Blasco, M.A. (2009). A “higher order” of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *EMBO J.* 28, 2323–2336.
- Schultz, D.J., Wickramasinghe, N.S., Ivanova, M.M., Isaacs, S.M., Dougherty, S.M., Imbert-Fernandez, Y., Cunningham, A.R., Chen, C., and Klinge, C.M. (2010). Anacardic acid inhibits estrogen receptor alpha-DNA binding and reduces target gene transcription and breast cancer cell proliferation. *Mol. Cancer Ther.* 9, 594–605.
- Schwartzentruber, J., Korshunov, A., Liu, X.-Y., Jones, D.T.W., Pfaff, E., Jacob, K., Sturm, D., Fontebasso, A.M., Quang, D.-A.K., Tönjes, M., et al. (2012). Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482, 226–231.
- Scolnick, D.M., Chehab, N.H., Stavridi, E.S., Lien, M.C., Caruso, L., Moran, E., Berger, S.L., and Halazonetis, T.D. (1997). CREB-binding Protein and p300/CBP-associated Factor Are Transcriptional Coactivators of the p53 Tumor Suppressor Protein. *Cancer Res.* 57, 3693–3696.
- Secci, D., Carradori, S., Bizzarri, B., Bolasco, A., Ballario, P., Patramani, Z., Fracapane, P., Vernarecci, S., Canzonetta, C., and Filetici, P. (2014). Synthesis of a novel series of thiazole-based histone acetyltransferase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 1680–1689.
- Sen, D., and Gilbert, W. (1988). Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* 334, 364–366.
- 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 absence of NHEJ or a DNA damage signal. *Science* 327, 1657–1661.
- Shakirov, E.V., and Shippen, D.E. (2004). Length Regulation and Dynamics of Individual Telomere Tracts in Wild-Type Arabidopsis. *Plant Cell* 16, 1959–1967.
- Shampay, J., Szostak, J.W., and Blackburn, E.H. (1984). DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 310, 310154a0.

- Shao, L., Shaw, C.A., Lu, X.-Y., Sahoo, T., Bacino, C.A., Lalani, S.R., Stankiewicz, P., Yatsenko, S.A., Li, Y., Neill, S., et al. (2008). Identification of Chromosome Abnormalities in Subtelomeric Regions by Microarray Analysis: A Study of 5,380 Cases. *Am. J. Med. Genet. A. 146A*, 2242–2251.
- Shay, J.W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 33*, 787–791.
- Shay, J.W., Pereira-Smith, O.M., and Wright, W.E. (1991). A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp. Cell Res. 196*, 33–39.
- Shen, T.H., Lin, H.-K., Scaglioni, P.P., Yung, T.M., and Pandolfi, P.P. (2006). The mechanisms of PML-nuclear body formation. *Mol. Cell 24*, 331–339.
- Shigeeda, N., Uchida, M., Barrett, J.C., and Tsutsui, T. (2003). Candidate chromosomal regions for genes involved in activation of alternative lengthening of telomeres in human immortal cell lines. *Exp. Gerontol. 38*, 641–651.
- Silanes, I.L. de, d'Alcontres, M.S., and Blasco, M.A. (2010). TERRA transcripts are bound by a complex array of RNA-binding proteins. *Nat. Commun. 1*, 33.
- Silvestre, D.C., Pineda, J.R., Hoffschir, F., Studler, J.-M., Mouthon, M.-A., Pflumio, F., Junier, M.-P., Chneiweiss, H., and Boussin, F.D. (2011). Alternative lengthening of telomeres in human glioma stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio 29*, 440–451.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature 432*, 396–401.
- Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2004). Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem. 73*, 177–208.
- 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.
- Smogorzewska, A., Karlseder, J., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., and de Lange, T. (2002). DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr. Biol. CB 12*, 1635–1644.
- Sobinoff, A.P., Allen, J.A., Neumann, A.A., Yang, S.F., Walsh, M.E., Henson, J.D., Reddel, R.R., and Pickett, H.A. (2017). BLM and SLX4 play opposing roles in recombination-dependent replication at human telomeres. *EMBO J. 36*, 2907–2919.
- Sobinoff, A.P., and Pickett, H.A. (2017). Alternative Lengthening of Telomeres: DNA Repair Pathways Converge. *Trends Genet. 33*, 921–932.

- Spedale, G., Timmers, H.T.M., and Pijnappel, W.W.M.P. (2012). ATAC-king the complexity of SAGA during evolution. *Genes Dev.* 26, 527–541.
- 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.
- 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.
- Stopschinski, B.E., Beier, C.P., and Beier, D. (2013). Glioblastoma cancer stem cells – From concept to clinical application. *Cancer Lett.* 338, 32–40.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987–996.
- Sukumari-Ramesh, S., Singh, N., Jensen, M.A., Dhandapani, K.M., and Vender, J.R. (2011). Anacardic acid induces caspase-independent apoptosis and radiosensitizes pituitary adenoma cells. *J. Neurosurg.* 114, 1681–1690.
- Sun, L., Nakajima, S., Teng, Y., Chen, H., Yang, L., Chen, X., Gao, B., Levine, A.S., and Lan, L. (2017). WRN is recruited to damaged telomeres via its RQC domain and tankyrase1-mediated poly-ADP-ribosylation of TRF1. *Nucleic Acids Res.* 45, 3844–3859.
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., and Price, B.D. (2006). Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation. *FEBS Lett.* 580, 4353–4356.
- Sundquist, W.I., and Klug, A. (1989). Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* 342, 825–829.
- 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.
- Szostak, J.W., and Blackburn, E.H. (1982). Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29, 245–255.
- Takai, K.K., Hooper, S., Blackwood, S., Gandhi, R., and de Lange, T. (2010). In vivo stoichiometry of shelterin components. *J. Biol. Chem.* 285, 1457–1467.
- Takai, K.K., Kibe, T., Donigian, J.R., Frescas, D., and de Lange, T. (2011a). Telomere protection by TPP1/POT1 requires tethering to TIN2. *Mol. Cell* 44, 647–659.

- Takakura, M., Kyo, S., Kanaya, T., Tanaka, M., and Inoue, M. (1998). Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in cervical cancer. *Cancer Res.* *58*, 1558–1561.
- Tarsounas, M., and Tijsterman, M. (2013). Genomes and G-quadruplexes: for better or for worse. *J. Mol. Biol.* *425*, 4782–4789.
- Taylor, B.S., Barretina, J., Maki, R.G., Antonescu, C.R., Singer, S., and Ladanyi, M. (2011). Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 541.
- Theimer, C.A., and Feigon, J. (2006). Structure and function of telomerase RNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *16*, 307–318.
- Tilman, G., Lorient, A., Beneden, A.V., Arnoult, N., Londoño-Vallejo, J.A., Smet, C.D., and Decottignies, A. (2009). Subtelomeric DNA hypomethylation is not required for telomeric sister chromatid exchanges in ALT cells. *Oncogene* *28*, 1682.
- Timashev, L.A., Babcock, H., Zhuang, X., and de Lange, T. (2017). The DDR at telomeres lacking intact shelterin does not require substantial chromatin decompaction. *Genes Dev.* *31*, 578–589.
- Tokutake, Y., Matsumoto, T., Watanabe, T., Maeda, S., Tahara, H., Sakamoto, S., Niida, H., Sugimoto, M., Ide, T., and Furuichi, Y. (1998). Extra-chromosomal telomere repeat DNA in telomerase-negative immortalized cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *247*, 765–772.
- 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.
- Tos, T., Vurucu, S., Karkucak, M., Kozan, S., Gul, D., and Akin, R. (2013). Subtelomeric fish findings in Turkish patients with idiopathic mental retardation. *Genet. Couns. Geneva Switz.* *24*, 259–264.
- Trask, B.J., Friedman, C., Martin-Gallardo, A., Rowen, L., Akinbami, C., Blankenship, J., Collins, C., Giorgi, D., Iadonato, S., Johnson, F., et al. (1998). Members of the olfactory receptor gene family are contained in large blocks of DNA duplicated polymorphically near the ends of human chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* *7*, 13–26.
- Turakainen, H., Naumov, G., Naumova, E., and Korhola, M. (1993). Physical mapping of the MEL gene family in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* *24*, 461–464.
- Van Damme, E., Laukens, K., Dang, T.H., and Van Ostade, X. (2010). A manually curated network of the PML nuclear body interactome reveals an important role for PML-NBs in SUMOylation dynamics. *Int. J. Biol. Sci.* *6*, 51–67.
- van den Bosch, T., Leus, N.G.J., Timmerman, T., and Dekker, F.J. (2016). Chapter 8 - Small Molecule Inhibitors of Histone Deacetylases and Acetyltransferases as Potential Therapeutics in Oncology. In *Drug Discovery in Cancer Epigenetics*, (Boston: Academic Press), pp. 191–208.



- Vancevska, A., Douglass, K.M., Pfeiffer, V., Manley, S., and Lingner, J. (2017). The telomeric DNA damage response occurs in the absence of chromatin decompaction. *Genes Dev.* *31*, 567–577.
- 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.
- 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.
- Vera, E., Canela, A., Fraga, M.F., Esteller, M., and Blasco, M.A. (2008). Epigenetic regulation of telomeres in human cancer. *Oncogene* *27*, 6817–6833.
- Vetting, M.W., S. de Carvalho, L.P., Yu, M., Hegde, S.S., Magnet, S., Roderick, S.L., and Blanchard, J.S. (2005). Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* *433*, 212–226.
- Víglaský, V., Bauer, L., and Tluczková, K. (2010). Structural features of intra- and intermolecular G-quadruplexes derived from telomeric repeats. *Biochemistry (Mosc.)* *49*, 2110–2120.
- Vilotti, S., Biagioli, M., Foti, R., Dal Ferro, M., Lavina, Z.S., Collavin, L., Del Sal, G., Zucchelli, S., and Gustincich, S. (2012). The PML nuclear bodies-associated protein TTRAP regulates ribosome biogenesis in nucleolar cavities upon proteasome inhibition. *Cell Death Differ.* *19*, 488–500.
- Walker, J.R., and Zhu, X.-D. (2012). Post-translational modifications of TRF1 and TRF2 and their roles in telomere maintenance. *Mech. Ageing Dev.* *133*, 421–434.
- Walmsley, R.M., Szostak, J.W., and Petes, T.D. (1983). Is there left-handed DNA at the ends of yeast chromosomes? *Nature* *302*, 84–86.
- Wan, J., Zhan, J., Li, S., Ma, J., Xu, W., Liu, C., Xue, X., Xie, Y., Fang, W., Chin, Y.E., et al. (2015). PCAF-primed EZH2 acetylation regulates its stability and promotes lung adenocarcinoma progression. *Nucleic Acids Res.* *43*, 3591–3604.
- Wang, F., and Lei, M. (2011). Human telomere POT1-TPP1 complex and its role in telomerase activity regulation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *735*, 173–187.
- Wang, L., and Dent, S.Y. (2014). Functions of SAGA in development and disease. *Epigenomics* *6*, 329–339.
- Wang, C., Xiao, H., Ma, J., Zhu, Y., Yu, J., Sun, L., Sun, H., Liu, Y., Jin, C., and Huang, H. (2013). The F-box protein  $\beta$ -TrCP promotes ubiquitination of TRF1 and regulates the ALT-associated PML bodies formation in U2OS cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *434*, 728–734.

- Wang, F., Stewart, J.A., Kasbek, C., Zhao, Y., Wright, W.E., and Price, C.M. (2012). Human CST has independent functions during telomere duplex replication and C-strand fill-in. *Cell Rep.* 2, 1096–1103.
- Wang, N., Xu, D., Sofiadis, A., Höög, A., Vukojević, V., Bäckdahl, M., Zedenius, J., and Larsson, C. (2014). Telomerase-dependent and independent telomere maintenance and its clinical implications in medullary thyroid carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E1571–1579.
- 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, Y.-L., Faiola, F., Xu, M., Pan, S., and Martinez, E. (2008). Human ATAC Is a GCN5/PCAF-containing Acetylase Complex with a Novel NC2-like Histone Fold Module That Interacts with the TATA-binding Protein. *J. Biol. Chem.* 283, 33808–33815.
- Watson, J.D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature. New Biol.* 239, 197–201.
- Watson, L.A., Solomon, L.A., Li, J.R., Jiang, Y., Edwards, M., Shin-ya, K., Beier, F., and Bérubé, N.G. (2013). Atrx deficiency induces telomere dysfunction, endocrine defects, and reduced life span. *J. Clin. Invest.* 123, 2049–2063.
- Wellinger, R.J., and Zakian, V.A. (2012). Everything You Ever Wanted to Know About *Saccharomyces cerevisiae* Telomeres: Beginning to End. *Genetics* 191, 1073–1105.
- Wellinger, R.J., Wolf, A.J., and Zakian, V.A. (1993). *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* 72, 51–60.
- Wicky, C., Villeneuve, A.M., Lauper, N., Codourey, L., Tobler, H., and Müller, F. (1996). Telomeric repeats (TTAGGC)<sub>n</sub> are sufficient for chromosome capping function in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8983–8988.
- Wilson, D.M., and Thompson, L.H. (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.* 616, 11–23.
- Wilson, F.R., Ho, A., Walker, J.R., and Zhu, X.-D. (2016). Cdk-dependent phosphorylation regulates TRF1 recruitment to PML bodies and promotes C-circle production in ALT cells. *J. Cell Sci.* 129, 2559–2572.
- Wong, K.-K., Chang, S., Weiler, S.R., Ganesan, S., Chaudhuri, J., Zhu, C., Artandi, S.E., Rudolph, K.L., Gottlieb, G.J., Chin, L., et al. (2000). Telomere dysfunction impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. *Nat. Genet.* 26, 85–88.
- Wright, J.H., Gottschling, D.E., and Zakian, V.A. (1992). *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev.* 6, 197–210.
- Wright, W.E., Piatyszek, M.A., Rainey, W.E., Byrd, W., and Shay, J.W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev. Genet.* 18, 173–179.

- 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, L., and Hickson, I.D. (2003). The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* *426*, 870–874.
- Wu, G., Lee, W.H., and Chen, P.L. (2000). NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres. *J. Biol. Chem.* *275*, 30618–30622.
- Wu, G., Jiang, X., Lee, W.-H., and Chen, P.-L. (2003). Assembly of functional ALT-associated promyelocytic leukemia bodies requires Nijmegen Breakage Syndrome 1. *Cancer Res.* *63*, 2589–2595.
- Wu, L., Bachrati, C.Z., Ou, J., Xu, C., Yin, J., Chang, M., Wang, W., Li, L., Brown, G.W., and Hickson, I.D. (2006). BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 4068–4073.
- Wu, P., Takai, H., and de Lange, T. (2012). Telomeric 3' overhangs derive from resection by Exo1 and Apollo and fill-in by POT1b-associated CST. *Cell* *150*, 39–52.
- Wu, R.A., Tam, J., and Collins, K. (2017). DNA-binding determinants and cellular thresholds for human telomerase repeat addition processivity. *EMBO J.* *36*, 1908–1927.
- Wu, Y., Ji, T., Wang, J., Xiao, J., Wang, H., Li, J., Gao, Z., Yang, Y., Cai, B., Wang, L., et al. (2010). Submicroscopic subtelomeric aberrations in Chinese patients with unexplained developmental delay/mental retardation. *BMC Med. Genet.* *11*, 72.
- Xi, L., Schmidt, J.C., Zaug, A.J., Ascarrunz, D.R., and Cech, T.R. (2015). A novel two-step genome editing strategy with CRISPR-Cas9 provides new insights into telomerase action and TERT gene expression. *Genome Biol.* *16*, 231.
- Xu, G.-L., Pan, Y.-K., Wang, B.-Y., Huang, L., Tian, L., Xue, J.-L., Chen, J.-Z., and Jia, W. (2008a). TTRAP is a novel PML nuclear bodies-associated protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *375*, 395–398.
- Xu, W., Edmondson, D.G., Evrard, Y.A., Wakamiya, M., Behringer, R.R., and Roth, S.Y. (2000). Loss of *Gcn5l2* leads to increased apoptosis and mesodermal defects during mouse development. *Nat. Genet.* *26*, 229–232.
- Xu, Y., Sato, H., Shinohara, K.-I., Komiyama, M., and Sugiyama, H. (2007). T-loop formation by human telomeric G-quadruplex. *Nucleic Acids Symp. Ser.* *2004* 243–244.
- Xu, Y., Kaminaga, K., and Komiyama, M. (2008). G-quadruplex formation by human telomeric repeats-containing RNA in Na<sup>+</sup> solution. *J. Am. Chem. Soc.* *130*, 11179–11184.

- Xue, Y., Gibbons, R., Yan, Z., Yang, D., McDowell, T.L., Sechi, S., Qin, J., Zhou, S., Higgs, D., and Wang, W. (2003). The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 10635–10640.
- Yadav, K., Meka, P.N.R., Sadhu, S., Guggilapu, S.D., Kovvuri, J., Kamal, A., Srinivas, R., Devayani, P., Babu, B.N., and Nagesh, N. (2017). Telomerase Inhibition and Human Telomeric G-Quadruplex DNA Stabilization by a  $\beta$ -Carboline-Benzimidazole Derivative at Low Concentrations. *Biochemistry (Mosc.)* *56*, 4392–4404.
- Yang, L., Sun, L., Teng, Y., Chen, H., Gao, Y., Levine, A.S., Nakajima, S., and Lan, L. (2017). Tankyrase1-mediated poly(ADP-ribosylation) of TRF1 maintains cell survival after telomeric DNA damage. *Nucleic Acids Res.* *45*, 3906–3921.
- Yang, X.-J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996). A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature* *382*, 319–324.
- Yao, K., Jiang, X., He, L., Tang, Y., Yin, G., Zeng, Q., Jiang, Z., and Tan, J. (2015). Anacardic acid sensitizes prostate cancer cells to radiation therapy by regulating H2AX expression. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *8*, 15926–15932.
- Yao, M.C., Blackburn, E., and Gall, J. (1981). Tandemly repeated C-C-C-C-A-A hexanucleotide of Tetrahymena rDNA is present elsewhere in the genome and may be related to the alteration of the somatic genome. *J. Cell Biol.* *90*, 515–520.
- Yasumoto, S., Kunimura, C., Kikuchi, K., Tahara, H., Ohji, H., Yamamoto, H., Ide, T., and Utakoji, T. (1996). Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* *13*, 433–439.
- Ye, J.Z.-S., 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.-S., Hockemeyer, D., Krutchinsky, A.N., Loayza, D., Hooper, S.M., Chait, B.T., and de Lange, T. (2004). POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev.* *18*, 1649–1654.
- Yeager, T.R., Neumann, A.A., Englezou, A., Huschtscha, L.I., Noble, J.R., and Reddel, R.R. (1999). Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res.* *59*, 4175–4179.
- Zaffaroni, N., Della Porta, C., Villa, R., Botti, C., Buglioni, S., Mottolèse, M., and Grazia Daidone, M. (2002). Transcription and alternative splicing of telomerase reverse transcriptase in benign and malignant breast tumours and in adjacent mammary glandular tissues: implications for telomerase activity. *J. Pathol.* *198*, 37–46.
- 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.
- Zaug, A.J., Podell, E.R., and Cech, T.R. (2005). Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10864–10869.
- Zeng, S., Xiang, T., Pandita, T.K., Gonzalez-Suarez, I., Gonzalo, S., Harris, C.C., and Yang, Q. (2009). Telomere recombination requires the MUS81 endonuclease. *Nat. Cell Biol.* 11, 616–623.
- Zhang, S., Sun, G., Wang, Z., Wan, Y., Guo, J., and Shi, L. (2015). PCAF-mediated Akt1 acetylation enhances the proliferation of human glioblastoma cells. *Tumor Biol.* 36, 1455–1462.
- Zhang, X., Pfeiffer, H.K., Thorne, A.W., and McMahon, S.B. (2008a). USP22, an hSAGA subunit and potential cancer stem cell marker, reverses the polycomb-catalyzed ubiquitylation of histone H2A. *Cell Cycle Georget. Tex* 7, 1522–1524.
- Zhang, X.-Y., Varthi, M., Sykes, S.M., Phillips, C., Warzecha, C., Zhu, W., Wyce, A., Thorne, A.W., Berger, S.L., and McMahon, S.B. (2008b). The putative cancer stem cell marker USP22 is a subunit of the human SAGA complex required for activated transcription and cell-cycle progression. *Mol. Cell* 29, 102–111.
- Zhao, M., Geng, R., Guo, X., Yuan, R., Zhou, X., Zhong, Y., Huo, Y., Zhou, M., Shen, Q., Li, Y., et al. (2017). PCAF/GCN5-Mediated Acetylation of RPA1 Promotes Nucleotide Excision Repair. *Cell Rep.* 20, 1997–2009.
- Zhong, F.L., Batista, L.F.Z., Freund, A., Pech, M.F., Venteicher, A.S., and Artandi, S.E. (2012). TPP1 OB-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. *Cell* 150, 481–494.
- 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.
- Zhu, S., Rousseau, P., Lauzon, C., Gandin, V., Topisirovic, I., and Autexier, C. (2014). Inactive C-terminal telomerase reverse transcriptase insertion splicing variants are dominant-negative inhibitors of telomerase. *Biochimie* 101, 93–103.
- Zhu, X.D., Küster, 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.J., 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., Kibe, T., Kabir, S., and de Lange, T. (2014). TRF1 negotiates TTAGGG repeat-associated replication problems by recruiting the BLM helicase and the TPP1/POT1 repressor of ATR signaling. *Genes Dev.* 28, 2477–2491.