



HAL
open science

Caractérisation du rôle de la voie de réponse aux dommages à l'ADN et des lysosomes dans la mort cellulaire et la sénescence induites par un ligand G-quadruplexe

Jennifer Beauvarlet

► **To cite this version:**

Jennifer Beauvarlet. Caractérisation du rôle de la voie de réponse aux dommages à l'ADN et des lysosomes dans la mort cellulaire et la sénescence induites par un ligand G-quadruplexe. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0318 . tel-03045403

HAL Id: tel-03045403

<https://theses.hal.science/tel-03045403>

Submitted on 8 Dec 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.

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement par :

Jennifer BEAUVARLET

Le 7 Décembre 2018

**Caractérisation du rôle de la voie de réponse aux dommages
à l'ADN et des lysosomes dans la mort cellulaire et la
sénescence induites par un ligand G-quadruplexe**

Thèse dirigée par le Dr. Mojgan DJAVAHERI-MERGNY

au sein de l'équipe INSERM U1218

Membres du Jury

Président : Pr. Martin TEICHMANN (Université de Bordeaux)

Rapporteur : Dr. Baharia MOGRABI (Université Nice-Sophia-Antipolis)

Rapporteur : Pr. Jean-François RIOU (Muséum National d'Histoire Naturelle)

Examineur : Dr. Ahmed HAMAÏ (Université Necker Paris Descartes)

Remerciements

Ainsi s'achèvent huit années de formation universitaire, ma vie Bordelaise mais certainement pas ma volonté à travailler en recherche. En effet, la recherche m'a toujours captivée et si j'en suis arrivée là aujourd'hui c'est grâce à mes rencontres avec de nombreuses personnes et leur très grand soutien dans ce projet.

Ces remerciements commenceront évidemment par ceux destinés à ma directrice de thèse, le Dr. **Mojgan DJAVAHERI-MERGNY** qui m'a encadrée pendant ces trois ans. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée sur ce projet de recherche, pour votre esprit critique sur de nombreuses questions scientifiques. L'encadrement que vous avez réalisé a permis d'orienter les axes de recherche, m'a évité la dispersion sur des questions trop diverses et de seconde importance, a nourri ma curiosité et m'a aidé à aller plus loin dans mes réflexions. Je vous en suis donc très reconnaissante.

Je remercie également les membres du Jury pour le temps qu'ils consacreront à évaluer ce travail : le Pr. **Martin TEICHMANN** pour avoir accepté de le présider, ainsi que le Dr. **Baharia MOGRABI** et le Pr. **Jean-François RIOU** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Enfin je remercie le Dr. **Ahmed HAMAÏ** d'avoir accepté d'être examinateur dans ce jury. J'attends avec impatience de pouvoir en discuter avec vous.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer et qui ont participé à ce projet.

Un énorme merci à l'équipe du Dr. **Jean-Louis MERGNY**, en particulier **Aurore GUEDIN** et **Marion PETITET** qui ont mis beaucoup d'énergie dans les expériences relatives à ce projet et ont permis de faire avancer nos recherches de façon non négligeable. Mais également au Dr. Jean-Louis MERGNY lui-même, pour les échanges toujours très intéressants et constructifs sur ce projet au cours des réunions que nous avons pu avoir.

Je remercie également **Elodie RICHARD** pour le travail important qu'elle a fourni, pour sa patience lors de mon apprentissage à la manipulation des souris (même en week-end), pour son enthousiasme à toutes épreuves, pour son analyse critique, sa bonne humeur, sa gentillesse, et en particulier son rire reconnaissable entre mille.

Elodie DARBO a aussi contribué de façon importante à ce travail, toujours motivée et à l'origine de nombreuses discussions très intéressantes. Un grand merci pour ton aide précieuse sur ces questions de bioinfo et pour les quelques conseils pour la suite de mon parcours.

Je remercie aussi le département d'anatomopathologie pour leur aide sur ce projet avec **Sabrina CROCE** à l'analyse et **Valérie VELASCO** à la coupe (à qui je souhaite de continuer à faire de grands voyages formidables qui font rêver).

Je remercie également l'équipe du Dr. **Anne ROYOU**, avec **Damien GOUTTE-GATTAT**, **Cédric LANDMANN** et **Emilie MONTEBAULT** pour leur aide sur certains aspects de ce projet.

Je tiens à remercier les personnes qui constituent la base de la vie de ce laboratoire, celles présentes actuellement ou qui ont été présentes au cours des années précédentes.

Merci à **Isa** pour toutes ces petites discussions, souvent très intéressantes pour mes éventuels projets d'avenir.

Egalement un grand merci au petit groupe du midi de ces derniers temps, animé, bonne ambiance et de bonne humeur. Je parle évidemment de **Christelle, Vanessa, Steph, Jess**. Merci à toutes pour votre dynamisme, votre joie de vivre, votre grand sens de l'humour et toutes les petites anecdotes « bébé/enfant » qui m'ont fait prendre conscience de ce que c'est que d'être parent...

Je remercie du fond du cœur notre superbe petit duo « **Ben et Simon** » j'ai vraiment apprécié ces trois années passées avec vous, vous avez mis une ambiance du tonnerre dans ce laboratoire.

Bien qu'ils nous aient délaissés pour Toulouse, je remercie **Tom, Lulu et Candice**. En particulier, merci à Lulu, ma camarade de nuit et de week-end, que j'entends encore crier « Rentre chez toi ! », et une grosse pensée pour toi qui est aussi en rédaction en ce moment. Tom et Candice préparez-vous c'est bientôt votre tour !

Un grand merci à **Olivier et Vanessa** (« Ayo cousine des îles »), un couple extraordinaire, toujours de bonne humeur. Bon même si vous avez failli tuer Thibaud avec ce Tacos de 1,2kg, je vous apprécie quand même. J'ai été très heureuse de vous avoir côtoyé pendant ces deux années.

Je remercie particulièrement deux personnes de qui j'ai été très proche au cours de ma thèse.

Kelly, tu m'as accompagnée au tout début de ma thèse et m'a vraiment aidée à trouver mes repères dans ce laboratoire, dans la mise en place de mes manips et leur analyse. Toujours un œil sur moi, comme une petite « Maman de labo » qui prend soin de moi et me conseille de ne pas rester trop tard. J'ai beaucoup apprécié ta présence à mes côtés pour ces débuts, et nos discussions, si bien sur le plan professionnel que personnel, m'ont beaucoup manquées après ton départ. Merci également pour votre petite connivence avec Thibaud, ça m'a beaucoup touchée, encore une preuve que tu joues ton rôle de « Maman de labo » jusqu'au bout ^^.

Egalement un grand merci à **Silvia**, ma petite « bimbo » brésilienne qui n'est pas du Brésil... Ta présence au laboratoire pour cette dernière année de thèse a vraiment été essentielle à ma survie. Non j'exagère un peu mais tu as vraiment été mon rayon de soleil avec ta joie de vivre, ta bonne humeur, ta dévotion et tes petites habitudes gastronomiques.

De nombreuses phrases, dont le français était parfois écorché, qui me font typiquement penser à toi : « J'ai faim !!! », « Je vais aller m'acheter quelque chose à manger à la boulangerie, tu en veux quelque chose ? », « la moelleuse osseuse »... Merci mille fois pour cette année très enrichissante, tu es une personne formidable. Bon courage pour ta thèse !

Merci également aux nombreux stagiaires de passage au laboratoire.

Bien sûr que j'ai une pensée pour **Camille**, merci de m'avoir fait découvrir Soulac-sur-Mer et les merveilleuses glaces de « Jus d'Ici », merci pour ta bonne humeur, ta joie de vivre.

Merci aussi à **Félicy** et **Coriolan** pour votre participation au groupe du midi des derniers mois et votre bonne humeur, bon courage à vous pour vos thèses respectives.

Je remercie également les personnes qui ont fait partie de notre petite équipe et qui ont toujours véhiculé de la gaieté : **Morgane, Théo, Corentin, Astride, Sofia, Vanessa**. Ça a été très agréable de travailler avec vous.

Je remercie aussi ceux qui de près ou de loin ont contribué à ma réussite jusqu'ici et ont maintenu ma motivation pour la recherche.

Je tenais à remercier particulièrement certains de mes professeurs de l'université qui m'ont vraiment captivés dans leurs cours, m'ont transmis leur passion de la recherche et ont eu beaucoup d'influence sur moi, je pense notamment au Pr. **Jérôme GUERLOTTE** et au Pr. **Martin TEICHMANN**.

Un grand merci à ceux qui m'ont encadré au cours de mes stages en laboratoire de recherche et m'ont motivé à poursuivre dans cette voie :

Mirna, la première thésarde que j'ai rencontrée qui m'a beaucoup appris sur le monde de la recherche, j'ai beaucoup apprécié le temps qu'on a passé ensemble.

Ian, petit Hollandais de Grenoble né en Angleterre, qui ne sait pas très bien parler le Français selon certains. Qui aurait cru que malgré nos caractères peu compatibles, faut l'avouer, on aurait tissé des liens d'amitiés si forts. Au passage une petite pensée aux physiciens qui n'aiment pas qu'on les appelle ainsi (**Flopinou** qui aime bien manger des cordes, et **Jonathan** le Corse !).

Yann PERCHERANCIER et **Pierre VACHER**, qui m'ont également encadrée pendant mon Master 2 et m'ont beaucoup soutenue pour le concours de l'école doctorale. Sans eux, peut-être que je n'aurais pas eu les financements pour réaliser cette thèse.

Enfin, de nombreux remerciements adressés à la famille et les amis.

Un grand merci à tous les membres de ma famille, dont une partie est loin mais je sais qu'ils me soutiennent par la pensée. Je remercie très chaleureusement mes parents, mon frère et ma sœur. Votre soutien (financier et moral) dans mes choix d'orientations professionnelles et votre confiance ont vraiment été des moteurs essentiels à ma réussite.

J'ai également une pensée très grande pour la **famille LEVRAUD**. Je n'en dirai pas plus..., vous savez ce que j'en pense... Mais du fond du cœur, merci pour votre soutien chaleureux.

Merci aussi aux amis que j'ai rencontré sur Bordeaux : **Eva, Sandra, Lisanne** et **Gianni**. Vous êtes vraiment des personnes formidables, de suis heureuse de vous avoir rencontré.

Enfin, *last but not least*, je tiens à remercier tout particulièrement **Thibaud** (alias Ti Boyo, ou simplement Boyo). Tu as joué un rôle essentiel dans le maintien de mon homéostasie physiologique, psychologique et culturelle. En effet, je ne compte plus les fois où je suis rentrée à la maison avec un très bon repas qui mijotait sur le feu, ou qu'un pot de pâte à tartiner au chocolat d'une marque très bien connue me tendais les bras. Tu as partagé avec moi ton désir de découverte et de voyage, même si je les associais souvent à des destinations potentielles pour la recherche de post-doc. J'apprécie énormément nos discussions, souvent riches en bêtises je te l'accorde, mais aussi souvent riches intellectuellement. Merci mille fois d'avoir joué ce rôle clé, de m'avoir soutenue avec mes hauts et mes bas, sans toi tout aurait vraiment été beaucoup plus difficile. J'espère que je réussirai à jouer aussi bien ce rôle lorsque ce sera ton tour de réaliser ta thèse.

Caractérisation du rôle de la voie de réponse aux dommages à l'ADN et des lysosomes dans la mort cellulaire et la sénescence induites par un ligand G-quadruplexe

Résumé

Les G-quadruplexes (G4) sont des structures non canoniques des acides nucléiques qui peuvent être formés dans des régions d'ADN ou d'ARN riches en guanines. Les ligands G4 (LG4), sont des molécules capables d'interagir et de stabiliser les structures G4, qui présentent de nombreuses propriétés anti-cancéreuses. Nous avons travaillé avec le LG4 20A, appartenant à la famille des triarylpyridines, qui stabilise efficacement les structures G4 *in vitro*. Les objectifs de ce travail ont été de déterminer les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables des effets anti-prolifératifs du 20A dans des cellules cancéreuses.

Dans cette étude, nous avons montré que le 20A induit un arrêt de la croissance cellulaire de cellules en culture et dans un modèle de xéno greffe tumorale, grâce à l'induction de la sénescence et de la mort cellulaire par apoptose. Ces réponses sont associées à l'activation de la voie des réponses aux dommages à l'ADN (DDR) *via* la kinase ATM, qui favorise l'autophagie (un processus catabolique) et la sénescence, tout en protégeant les cellules de l'apoptose.

De plus, nous avons observé que le 20A induit un échec de la cytokinèse, conduisant à l'accumulation de cellules binucléées qui présentent une résistance à la mort cellulaire. De façon inattendue, nous avons trouvé que le 20A s'accumule dans les lysosomes, induisant une augmentation de la taille de ces derniers. La combinaison du 20A et de l'agent lysomotropique chloroquine, potentialise de façon importante la perméabilisation de la membrane lysosomale (LMP) et la mort cellulaire. En particulier, cette combinaison sensibilise de façon notable ces cellules binucléées à la mort cellulaire.

L'ensemble de ces résultats révèle une relation entre les processus de mort cellulaire et de sénescence induits par le LG4 20A, et les voies de DDR et lysosomales. Ces régulations devraient être prises en considération lors de l'utilisation d'agents antiprolifératifs susceptibles d'interférer avec les fonctions lysosomales.

Mots clés : ligand G-quadruplexe, réponse aux dommages à l'ADN, lysosome, mort cellulaire, sénescence, cancer

Deciphering the role of DNA Damage Response and lysosomal pathways in cell death and senescence induced by a G-quadruplex ligand

Abstract

G-quadruplexes (G4) are unusual nucleic acid structures that can be formed by guanine-rich DNA and RNA. Through their ability to stabilize G4 structures, G4 ligands (G4L) have been described to display potent anticancer properties. Here, we studied the G4L 20A belonging to the triarylpyridine family of compounds that have the ability to efficiently bind to and stabilize G4 structures *in vitro*. The objectives of this work were to determine the molecular and cellular mechanisms responsible for the anti-proliferative effects of 20A in cancer cells.

In this study, we showed that 20A causes cancer cell growth arrest in cell culture and a mice tumour xenograft model, through induction of senescence and apoptotic cell death. These cellular responses are associated with the induction of the DNA damage response pathway (DDR), in particular ATM activation, which promotes the induction of both autophagy (a lysosomal catabolic pathway) and senescence, while protecting cells against apoptosis.

Furthermore, we found that 20A induces failure of cytokinesis which results in the accumulation of binucleated cells that display marked resistance to 20A-induced cell death. Unexpectedly, we found that 20A accumulates in the lysosomal compartment and causes lysosome enlargement. The combination of a lysosomotropic agent, chloroquine, and 20A promotes a significant induction of lysosomal membrane permeabilization (LMP) and a robust cell death. In particular, this combination significantly sensitizes binucleated cells to cell death.

Altogether, our results uncover the relationship of the DDR and lysosomal pathways to cell death and senescence induced by the G4L 20A. Such regulation should also be taken into account when using antiproliferative drugs susceptible to interfere with the lysosomal functions.

Keywords: G-quadruplex ligand, DNA damage response, lysosome, cell death, senescence, cancer

Sommaire

Liste des figures.....	1
Liste des abréviations	2
INTRODUCTION	5
I) La voie de réponse aux dommages à l'ADN dans la thérapie anti-cancéreuse	6
A. Généralités sur les traitements anti-cancéreux et positionnement du projet	6
B. La voie de réponse aux dommages à l'ADN	9
1. Les différentes lésions de l'ADN et les mécanismes de réparation	10
2. Activation de la voie des DDR : ATM/CHK2 et ATR/CHK1	12
a. Signaux d'activation de la voie des DDR.....	12
b. Activation d'ATR en réponse à l'arrêt d'une fourche de réplication.....	13
c. Activation d'ATM en réponse à des cassures double brin	14
d. Interconnexion entre l'activation d'ATR/CHK1 et ATM/CHK2	16
3. Paradoxe de la voie des DDR dans les cancers.....	17
C. Activation de la voie des DDR au cours du cycle cellulaire	18
1. Les points de contrôle du cycle cellulaire.....	18
a. Le cycle cellulaire.....	18
b. Les points de contrôle « obligatoires »	19
c. Les points de contrôle des dommages à l'ADN	20
2. Rappels sur la machinerie du cycle cellulaire.....	21
3. Les points de contrôle des dommages à l'ADN au cours de l'interphase	23
a. Le point de contrôle des dommages à l'ADN en phase G1	23
i. Le point de restriction (sans dommages à l'ADN)	23
ii. Le point de contrôle des dommages à l'ADN	24
b. Le point de contrôle des dommages à l'ADN en phase S.....	25
c. Le point de contrôle des dommages à l'ADN en phase G2	26
d. Arrêt de la signalisation de la voie de réparation des dommages à l'ADN	27
4. Point de contrôle des dommages à l'ADN relatifs à la mitose	28
a. Mécanismes moléculaires de la cytokinèse et point de contrôle de l'abscission	29
i. Généralités sur la cytokinèse.....	29
ii. Assemblage du fuseau central.....	30
iii. Formation de l'anneau contractile d'actine	30
iv. Formation du midbody et abscission	32
b. Le point de contrôle de la tétraploïdie.....	33
5. Dérégulation des points de contrôle dans les cancers.....	34
a. Dérégulation du point de restriction.....	34

b.	Les protéines de la famille de p53.....	35
II)	Devenir cellulaire après des dommages à l'ADN	37
A.	Les différents destins cellulaires suite à des dommages à l'ADN.....	37
B.	La sénescence.....	38
1.	Généralités sur la sénescence	38
2.	Mécanismes moléculaires de la sénescence.....	39
a.	La sénescence répllicative	40
b.	La sénescence prématurée.....	40
c.	Les voies de signalisation responsables de l'induction de la sénescence	41
3.	Sénescence et cancer	43
a.	La sénescence comme barrière à la tumorigenèse.....	43
b.	La sénescence dans la réponse aux traitements anti-cancéreux.....	44
C.	L'apoptose en réponse à des dommages à l'ADN.....	46
1.	Généralités sur l'apoptose	46
2.	Apoptose intrinsèque.....	46
3.	Apoptose extrinsèque	49
4.	La mort cellulaire indépendante des caspases (CICD).....	50
5.	Choix de l'apoptose ou la sénescence suite à des dommages à l'ADN.....	51
a.	La protéine p53 dans le choix de la sénescence ou de l'apoptose.....	52
b.	Le choix de la sénescence ou de l'apoptose dans les cancers	53
III)	Les mécanismes de résistance en réponse à des agents anti-cancéreux.....	54
A.	Généralités sur les mécanismes de résistance.....	54
1.	Introduction sur les mécanismes de résistance aux traitements.....	54
2.	Les pompes à efflux de drogue	55
3.	Mutations de la voie de réparation des dommages à l'ADN.....	56
4.	Rôle des voies du NF- κ B et d'AKT dans la résistance à l'apoptose	57
5.	Le rôle des lysosomes dans la résistance aux chimiothérapies	59
B.	La séquestration lysosomale et la LMP dans la thérapie anti-cancéreuse.....	60
1.	Composition des lysosomes	60
2.	La séquestration lysosomale des agents anti-cancéreux.....	61
a.	Mécanisme de la séquestration lysosomale	61
b.	Rôle dans la résistance aux chimiothérapies	63
3.	Intérêt du ciblage des lysosomes en thérapie anti-cancéreuse.....	64
a.	Altération des lysosomes pendant la progression tumorale	64
b.	La LMP et la mort cellulaire lysosomale comme stratégie anti-cancéreuse.....	65
i.	Induction de la LMP par des agents anti-cancéreux	65
ii.	Intérêt de la composition en lipide de la membrane lysosomale	66
iii.	Un rôle de BAX dans la LMP	67

c.	Implication de la LMP dans les mécanismes de la mort régulée	67
i.	Les cathepsines au service de la mort par LMP.....	67
ii.	La LMP dans l'apoptose.....	67
iii.	La LMP dans d'autres types de mort cellulaire régulée	68
d.	Choix de la survie ou de la mort en réponse à la LMP	69
C.	L'autophagie en réponse à des dommages à l'ADN.....	71
1.	Généralités sur l'autophagie	71
2.	Mécanismes moléculaires de l'autophagie.....	74
a.	L'initiation de l'autophagie.....	74
b.	L'élongation et la fermeture de la membrane autophagosomale.....	75
c.	La fusion de l'autophagosome et du lysosome.....	76
d.	Le recyclage des constituants dégradés.....	76
3.	Voies de signalisation en amont de l'activation de l'autophagie.....	77
4.	Rôle de l'autophagie dans les cancers.....	80
a.	Rôle de l'autophagie dans la progression tumorale.....	80
i.	Rôle anti-tumoral	80
ii.	Rôle pro-tumoral	81
b.	Implication de l'autophagie dans la voie de réparation des dommages à l'ADN	82
c.	Rôle de l'autophagie dans la sénescence.....	83
d.	Rôle de l'autophagie dans la mort cellulaire.....	84
i.	L'autophagie protège de la mort cellulaire	84
ii.	L'autophagie participe à la mort cellulaire.....	85
IV)	Les structures G-quadruplexes (G4) comme cibles pour des agents anti-cancéreux	87
A.	Généralités sur les structures G4	87
1.	La formation des structures G4 <i>in vitro</i>	87
2.	Identification des structures G4 <i>in vivo</i>	88
B.	Inhibition de la télomérase par stabilisation des structures G4 télomériques.....	91
1.	Structure et fonction des télomères	91
a.	Structure des télomères : le complexe <i>shelterin</i>	91
b.	Protection des extrémités chromosomiques de l'activation de la voie des DDR	93
2.	Ciblage de la télomérase par les LG4 en thérapie anti-cancéreuse	94
C.	Mécanismes d'action anti-cancéreux des LG4	96
1.	Activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN	96
2.	Inhibition de l'expression d'oncogènes.....	98
3.	Autres effets anti-cancéreux potentiels.....	100
	Objectifs de la Thèse.....	102
	MATÉRIELS ET MÉTHODES	104

I)	Matériels et méthodes supplémentaires (article n°1)	105
A.	Immunohistochemistry for apoptosis and senescence assesement on paraffin embedded tumor bloc	105
B.	Meta-TIF assay.....	105
C.	Supplemental reagent (P-Chk2 and Chk2 antibodies)	106
II)	Matériels et méthodes complémentaires (partie n°3)	106
A.	Culture cellulaire	106
B.	Réactifs	107
C.	Marquage et comptage des cellules à doubles noyaux	108
D.	Analyse du contenu en ADN.....	108
E.	Analyses d'immunofluorescence.....	109
F.	Expérience de transfection avec le plasmide EGFP-AuroraB	110
G.	Expériences de vidéomicroscopie	110
1.	Etude du succès de la mitose et de la localisation d'AuroraB.....	110
2.	Analyse du cycle cellulaire avec les cellules A549 FUCCI	111
H.	Evaluation de la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial.....	112
I.	Evaluation de la production de ROS.....	113
J.	Western blot.....	114
K.	Etude de la sénescence (évaluation de l'activité de la SA-β-gal)	114
L.	Analyses statistiques	115
	RÉSULTATS	116
I)	Evaluation de l'implication de la voie de réponse des dommages à l'ADN et de l'autophagie dans la sénescence et la mort cellulaire en réponse au 20A	117
	Article 1: Modulation of the ATM/autophagy pathway by a G-quadruplex ligand tips the balance between senescence and apoptosis in cancer cells.....	117
1.	Contexte	117
2.	Article n°1	119
3.	Récapitulatif des résultats principaux et résultats supplémentaires.....	159
4.	Conclusion	165
II)	Implication de la localisation lysosomale du 20A dans la réponse anti-cancéreuse	167
	Article 2: The combination of triarylpyridine compounds and chloroquine induces LMP and triggers cell death in cancer cells.....	167
1.	Contexte	167
2.	Article n°2.....	169
3.	Récapitulatif des résultats principaux	197
4.	Conclusion	199
III)	Etude des mécanismes de formation des cellules à doubles noyaux par le 20A et de leur rôle dans la réponse au 20A	200
	Résultats complémentaires.....	200

1. Contexte	200
2. Résultats	202
3. Conclusion	220
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	222
I) Activation des voies de survie par ATM en réponse à un ligand G-quadruplexe.....	223
A. ATM contrôle le destin cellulaire en réponse au LG4 20A	223
B. Activation de l'autophagie par ATM comme voie de survie en réponse à des dommages à l'ADN.....	224
1. Cibler les mécanismes moléculaires de l'activation de l'autophagie.....	225
2. Cibler la stabilisation de CHK1 par l'autophagie	227
C. D'autres mécanismes de survie activés par ATM.....	228
1. Activation de la voie de signalisation de p53	228
2. D'autres voies de signalisation	230
D. Complexité de la balance entre la sénescence et la mort cellulaire en réponse au 20A.....	231
1. Rôle de p21.....	231
2. Rôle d'ATM	232
II) La séquestration lysosomale des LG4 : quels avantages peut-on en tirer ?	234
A. Implication de la séquestration lysosomale pour d'autres LG4	234
B. Effets de l'accumulation des LG4 sur les fonctions lysosomales	235
1. Identification des cibles moléculaires du 20A.....	235
2. Activation de l'autophagie par la séquestration lysosomale du 20A ?	237
C. Conséquences de la LMP sur la mort cellulaire.....	238
D. Origine de la LMP	240
1. Les interactions directes avec les lipides de la membrane lysosomale	241
2. Modifications de la structure de la membrane lysosomale.....	241
E. Un ciblage plus spécifique des cellules cancéreuses ?.....	243
III) Améliorer l'efficacité thérapeutique du 20A en ciblant les cellules binucléées.....	245
A. Empêcher la formation de cellules binucléées.....	245
1. Mécanismes du défaut de recrutement de RhoA	245
2. Mécanismes de l'implication des ROS dans la cytokinèse	247
B. Sensibiliser les cellules binucléées à la mort.....	249
IV) Quels rôles de la stabilisation des structures G4 par le 20A dans ses effets cellulaires ?....	251
A. Quel rôle dans la régulation de l'expression des gènes ?	251
B. Quel rôle dans la localisation lysosomale du 20A ?	252
C. Quel rôle dans la régulation de RhoA par le 20A ?.....	254
V) Conclusion générale	255
Bibliographie	257

Annexes	302
I) Annexes 1: Figures supplémentaires de l'article n°1	302
II) Annexes 2: Figures supplémentaires de l'article n°2	313
III) Annexes 3: Liste des publications et communications	318

Liste des figures

Figure 1 : Les "Hallmarks" du cancer et leur ciblage thérapeutique.....	8
Figure 2 : Les lésions de l'ADN et leur système de réparation	11
Figure 3 : Recrutement d'ATR au niveau d'une fourche de réplication arrêtée	14
Figure 4 : Activation d'ATM au site d'un DSB ou par les ROS.....	15
Figure 5 : Machinerie du cycle cellulaire et points de contrôle	20
Figure 6 : Contrôle de l'entrée en cycle cellulaire par le point de restriction	24
Figure 7 : Les points de contrôle des dommages à l'ADN	27
Figure 8 : Formation de l'anneau contractile d'actine au cours de la cytokinèse	32
Figure 9 : Voies de signalisation impliquées dans l'établissement de la sénescence	43
Figure 10 : Mécanismes moléculaires de l'apoptose	51
Figure 11 : NF- κ B et AKT dans l'activation de voies de survie suite à des dommages à l'ADN	59
Figure 12 : Contrôle de la biogenèse lysosomale et implication de la séquestration lysosomale	63
Figure 13: Causes et conséquences de la perméabilisation de la membrane lysosomale.....	71
Figure 14 : Les différents types d'autophagie	73
Figure 15 : Mécanismes moléculaires de l'autophagie	77
Figure 16 : Mécanisme d'activation de l'autophagie en réponse à des dommages à l'ADN	79
Figure 17 : Structure d'un G-quadruplexe.....	88
Figure 18 : Structure des télomères (le complexe <i>shelterin</i>)	92
Figure 19 : Activation de la voie de DDR par un traitement aux LG4.....	98
Figure 20 : Régulation de l'activité du promoteur de c-Myc par des structures G4	99
Figure 21: Immunohistochemistry for assessment of senescence and apoptosis <i>in vivo</i>	160
Figure 22 : Analysis of Chk2 activation and Meta-TIF formation	163
Figure 23 : Implication d'ATM et de l'autophagie dans la balance entre la sénescence et l'apoptose en réponse au 20A	166
Figure 24: Effet de la combinaison chloroquine/20A sur les lysosomes et la mort cellulaire	199
Figure 25: 20A treatment induces binucleation due to mitosis failure.....	203
Figure 26: Most of the binucleated cells are arrested in G1 phase and manifest reduced sensitivity to 20A-induced cell death than mononucleated ones.....	206
Figure 27: 20A treatment disrupts microtubule organization during cytokinesis.....	209
Figure 28: 20A treatment leads to failure in recruitment of RhoA at the invaginating membrane.....	212
Figure 29: 20A treatment induces ROS production which contributes to cytokinesis failure.	215
Figure 30: Effect of antioxidants and chloroquine on the outcome of 20A-treated cells.....	219
Figure 31: Schéma récapitulatif des mécanismes responsables de la formation des cellules binucléées induites par le 20A et de potentielles combinaisons thérapeutiques	221

Liste des abréviations

9-1-1 : Rad9-Hus1-Rad1
AIF : Apoptosis-Inducing Factor
ALT : Alternative Lengthening of Telomere
APAF-1 : Apoptosis Protease Activating Factor-1
APC/C : Anaphase Promoting Complex / cyclosome
ATCC : American Type Culture Collection
ATG : autophagy related gene
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR : ATM- and Rad3-related
ATRIP : ATR Interacting Protein
BER : Base Excision Repair
BHA : Butylated Hydroxyanisole
BRCA1/2 : breast cancer gene 1/2
CAK : Cyclin Activating Kinase
CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain
CDC25 A/B/C : Cell Division Cycle 25 A/B/C
CDK : Cyclin-Dependent Kinase
CHK1/2 : checkpoint kinase 1/2
CHMP4C : Charged Multivesicular body Protein 4C
CICD : Caspase-Independent Cell Death
CKI : Cyclin-dependent Kinase Inhibitor
CLEAR : Coordinated Lysosomal Expression and Regulation
CMA : Chaperone mediated Autophagy
CPC : Chromosomal Passenger Complex
CQ : Chloroquine diphosphate
CRISPR-Cas9 : Clustered Regularly Interspersed Palindromic Repeats – CRISPR associated protein 9
DD : Death Domain
DDR : DNA Damage Response pathway
DED : Death Effector Domain
DISC : Death Inducing Signaling Complex
DSB : Double Strand Breaks
FUCCI : Fluorescence Ubiquitination based Cell Cycle Indicator
GABARAP : Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
GAP : GTPases Activating Protein
GDI : Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor
GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor
H2DCFDA : diacétate de dichlorodihydrofluorescéine 2',7'
HR : Homologous Recombination
HRP : Horse Radish Peroxidase
hTERT : human Telomerase Reverse Transcriptase
hTR : human telomerase RNA

IAP : Inhibitor of Apoptosis
ICAD : Inhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease
Id-1 : Inhibitor of DNA binding
INCENP : inner centromere protein
INK4 : Inhibitor of CDK4
LAMP-1/2 : Lysosomal-Associated Membrane Protein 1/2
LC3 : microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LDCD : Lysosomal Dependent Cell Death
LG4 : Ligand G-quadruplexe
LMP : Lysosomal Membrane Permeabilization
MAM : mitochondria-associated ER-membrane
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MDC1 : Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1
MDR1 : Multi Drug Resistance 1 (ou encore P-glycoprotéine, Pgp)
MKLP1 : Mitotic Kinesin-Like Protein 1
MMR : Mismatch Repair
MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
MRN : MRE11-RAD50-NBS1 complex
mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
NAC : N-Acétyle-L-Cystéine
NEMO : NF- κ B Essential Modulator
NER : Nucleotide Excision Repair
NF- κ B : Nuclear Factor-KappaB
NHEJ : Non-Homologous End Joining
OGG1 : 8-Oxoguanine DNA Glycosylase
PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase
PCNA : Proliferation Cell Nuclear Antigen
PDX : Patient-Derived tumor Xenograft
PG4 : Putative G-quadruplex forming sequence
PI : Propidium Iodide
PIDD : p53-induced protein with death domain
PIKK : PI3K-related Kinase
PIP2 : Phosphatidyl Inositol-2-Phosphate
PIP3 : Phosphatidyl Inositol-3-Phosphate
PLK1 : Polo-like kinase 1
PP2A, PP4, PP6 : protéines phosphatases 2A, 4, 6
pRb : protéine du rétinoblastome
PRC1 : Protein Required for Cytokinesis 1
RE : réticulum endoplasmique
RFP-Ctd1 : chromatin licensing and DNA replication factor 1
ROS : Reactive Oxygen Species
RPA : Replication Protein A
SA- β -gal : Senescence-Associated β -galactosidase
SAC : Spindle Assembly Checkpoint
SASP : Senescence Associated Secretory Phenotype

SCF : Skip/Cullin/F-box
Smac/DIABLO : second mitochondrial derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis proteins binding protein
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attaches protein receptor
SSB : Single Strand Breaks
SBB : Sudan-Black-B
TCA : trichloro acetic acid
TFEB : Transcription Factor EB
TMRM : Tetramethylrhodamine methylester
TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor
TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand
TSS : Transcription Start Site
ULK1 : uncoordinated-51 like kinase 1
UV : Ultra-Violets
WIPI : WD repeat protein interacting with phosphoinositides
XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis
XPC : Xeroderma Pigmentosum complementation group C
XRCC1 : X-ray repair cross-complementing protein 1

INTRODUCTION

I) La voie de réponse aux dommages à l'ADN dans la thérapie anti-cancéreuse

A. Généralités sur les traitements anti-cancéreux et positionnement du projet

Le cancer est considéré comme la deuxième cause de mortalité dans le monde en 2018 selon l'organisation mondiale de la santé. Malgré des progrès importants réalisés au cours de ces dernières décennies dans la prise en charge de cette maladie, de nombreux efforts restent encore à fournir pour la soigner efficacement.

Les thérapies anti-cancéreuses traditionnelles sont apparues à une époque où la biologie des cancers était encore mal connue, mais restent encore largement utilisées. Ces traitements sont notamment la chirurgie, la radiothérapie (aux rayons X) et la chimiothérapie (DeVita and Chu, 2008). Le principe de la chimiothérapie est d'administrer des agents pharmacologiques qui permettent de maintenir la croissance tumorale sous contrôle (notamment en inhibant la prolifération des cellules cancéreuses), et/ou au mieux d'éliminer la tumeur établie (en favorisant la mort de ces cellules). La majorité des agents chimiothérapeutiques fonctionnent comme anti-cancéreux grâce à leur capacité à induire des dommages à l'ADN, en ciblant essentiellement des cellules qui se divisent rapidement (Bouwman and Jonkers, 2012). Ces thérapies, en ciblant toutes les cellules en division, produisent de nombreux effets secondaires indésirables au niveau des tissus à renouvellement rapide (en particulier le tissu hématopoïétique et intestinal).

L'identification de cibles moléculaires spécifiques des cellules cancéreuses permet ainsi l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques avec la promesse d'une réduction de l'impact vis-à-vis des cellules saines. Les cibles moléculaires de choix sont celles qui fonctionnent différemment dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales, et dont les cellules cancéreuses dépendent pour leur survie. En particulier, les recherches se

focalisent sur les mécanismes moléculaires qui ont permis l'acquisition des propriétés tumorigéniques au cours de la progression tumorale (Hanahan and Weinberg, 2011).

De nombreuses études ont permis d'identifier les différentes étapes du processus de la progression tumorale et de définir ainsi les caractéristiques (ou « *Hallmarks* ») du cancer (Figure 1). Ces *Hallmarks* correspondent notamment à l'acquisition de propriétés :

- de prolifération incontrôlée grâce à une suractivation d'oncogènes, une inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs, et une adaptation du métabolisme énergétique pour soutenir cette prolifération intensive
- de résistance à la mort cellulaire pour survivre aux conditions défavorables de l'environnement tumoral (hypoxie, manque de nutriments, accumulation de dommages à l'ADN qui menacent la vie de la cellule)
- d'immortalité notamment grâce à la réactivation de la télomérase (enzyme responsable de l'allongement des télomères), ou d'un mécanisme alternatif de maintenance de la taille des télomères (ALT pour *Alternative Lengthening of Telomeres*)
- de vascularisation intra-tumorale pour un meilleur apport en oxygènes et nutriments
- d'échappement à la reconnaissance par le système immunitaire
- de dissémination métastatique

Ainsi, une cible thérapeutique potentielle qui avait été jugée particulièrement prometteuse dans les années 90 est la télomérase (Figure 1). Il avait été décrit que son inhibition permettait de contrecarrer l'immortalité et conduisait même à la mort des cellules cancéreuses (Hahn et al., 1999; Herbert et al., 1999; Zhang et al., 1999).

Parmi les nombreuses classes de composés qui ont été développées dans le but d'inhiber l'activité de la télomérase, on retrouve notamment la classe des ligands G-quadruplexe (LG4). Ce sont de petites molécules capables de stabiliser des structures non canoniques de l'ADN appelées structures G-quadruplexes (G4). Ces LG4, en plus de l'inhibition de l'activité de la télomérase, ont également montré de nombreux autres effets anti-cancéreux, en particulier en induisant une activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN responsable de l'induction de la sénescence et de la mort cellulaire (Rhodes and Lipps, 2015).

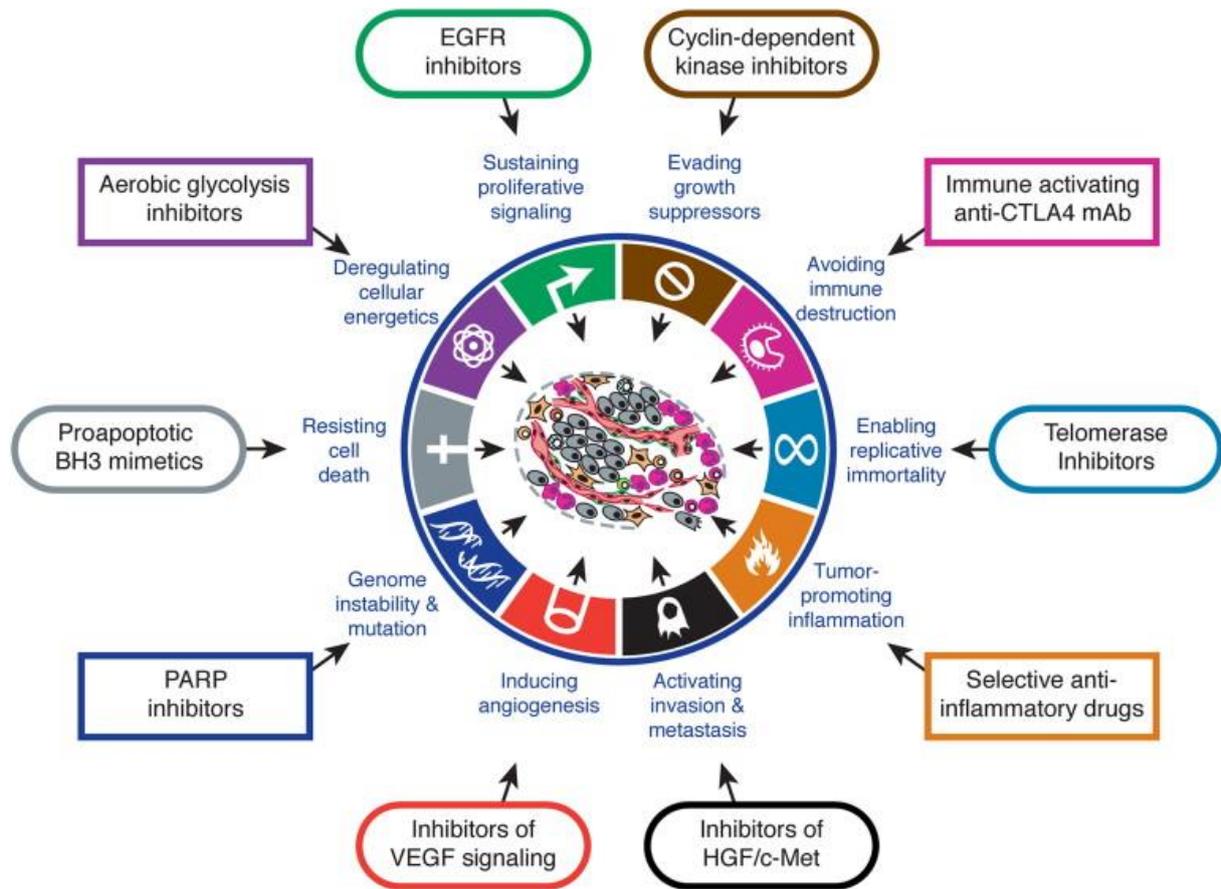


Figure 1 : Les "Hallmarks" du cancer et leur ciblage thérapeutique

Ici sont présentées les 10 caractéristiques acquises par la cellule cancéreuse au cours de la progression tumorale ainsi que les différentes stratégies thérapeutiques ciblées qui sont envisagées pour empêcher la croissance et la progression tumorale (Hanahan and Weinberg, 2011).

Mon travail de thèse a consisté à caractériser les effets anti-cancéreux potentiels d'un LG4 qui a été synthétisé récemment dans un travail en collaboration avec l'unité U1212 dirigée par le Dr. Jean-Louis Mergny (Smith et al., 2011). Ainsi, dans cette introduction nous présenterons les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire par la voie de réponse aux dommages à l'ADN, en précisant les particularités liées aux cellules cancéreuses pour la réponse aux traitements. Puis nous aborderons les mécanismes impliqués dans le choix du devenir cellulaire en réponse à des agents anti-cancéreux qui induisent des dommages à l'ADN, ainsi que certains mécanismes de résistance. Et enfin nous finirons par voir l'intérêt des LG4 en thérapie anti-cancéreuse en détaillant certains de leurs mécanismes d'action.

B. La voie de réponse aux dommages à l'ADN

De nombreuses causes sont responsables des dommages qui surviennent dans le génome d'une cellule. Ces lésions de l'ADN, si elles ne sont pas réparées, peuvent conduire à une instabilité génomique par modification de la structure de l'ADN (substitution de base, insertion ou délétion) ou à une instabilité chromosomique (modification du nombre ou de la structure des chromosomes). Les instabilités génomiques et chromosomiques présentent un fort potentiel tumorigène, ainsi la cellule a mis en place de nombreux mécanismes pour maintenir l'intégrité du génome et prévenir de la tumorigenèse en réparant ces lésions. L'ensemble des mécanismes de réparation constitue la « voie de réponse aux dommages à l'ADN » (DDR pour *DNA Damage Response pathway*) (Lord and Ashworth, 2012).

Le processus de réparation se déroule en trois étapes : une étape de reconnaissance des dommages à l'ADN par des senseurs ; une étape de recrutement des facteurs de réparation au site du dommage grâce à l'intervention de médiateurs ; et enfin un arrêt du cycle cellulaire permet à la mise en place d'une étape de réparation physique de la lésion par les effecteurs (Lord and Ashworth, 2012; Maréchal and Zou, 2013). Après réparation de la lésion, le cycle cellulaire reprend. En revanche, en cas de lésion non réparable, la cellule peut activer une voie de signalisation conduisant à la mort cellulaire, permettant d'éliminer les cellules ayant un potentiel tumorigène important (Roos and Kaina, 2013).

Au cours du processus de progression tumorale, de nombreuses déficiences apparaissent dans les mécanismes de DDR, permettant aux cellules tumorales d'accumuler de nombreuses mutations qui favorisent l'acquisition de nouvelles caractéristiques malignes, sans déclencher la mort cellulaire. Mais ces déficiences dans les mécanismes de DDR confèrent également une susceptibilité plus grande des cellules cancéreuses aux agents inducteurs de dommages à l'ADN. Cette différence de sensibilité est alors utilisée comme un avantage thérapeutique (Bouwman and Jonkers, 2012).

1. Les différentes lésions de l'ADN et les mécanismes de réparation

L'ADN cellulaire peut être endommagé de plusieurs façons, par des causes endogènes ou exogènes. Chaque type de lésion est reconnu et réparé par des systèmes de réparation spécifiques à chaque type de lésion, conduisant à une grande variété de mécanismes de réparation (Figure 2) (pour revue Lord and Ashworth, 2012).

On peut nommer ainsi des lésions de type :

- dimère de pyrimidine causé par les Ultra-Violets (UV),
- des alkylations de base, avec des agents anticancéreux tels que le témolozomide et la mitomycine C
- un « *crosslinking* » de base suite à l'action de certains agents anti-cancéreux comme le cisplatine, l'oxaliplatine, ou le carboplatine
- des mésappariements de base à la suite d'erreurs de la réplication de l'ADN
- des cassures simples brins (SSB, *Single Strand Breaks*) causées par des agents anticancéreux agissant comme poison de la topoisomérase I (comme la camptothécine) ou inducteurs d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*)
- des cassures doubles brins (DSB, *Double Strand Breaks*) produites directement par des radiations ionisantes (comme les rayons X), des agents anticancéreux poisons de la topoisomérase II (tel que l'étoposide); ou indirectement par réplication d'une portion d'ADN contenant un SSB qui n'aurait pas été réparé

La réparation des lésions de l'ADN qui concernent une ou quelques bases (tels que les SSB et les crosslinks) est prise en charge par des systèmes de réparation par excision de base (BER, *Base Excision Repair*), ou par excision de nucléotide (NER, *Nucleotide Excision Repair*).

Pour ce qui concerne la réponse aux mésappariements, c'est notamment le système de la réparation des mésappariements de base (MMR, *Mismatch Repair*). Ce mécanisme intervient en particulier au moment de la réplication de l'ADN afin de s'assurer de l'incorporation du nucléotide complémentaire correcte.

Les DSB sont des lésions rares, mais ce sont les plus dangereuses du point de vue de l'intégrité génomique et chromosomique (Roos and Kaina, 2013). En effet, une mauvaise

réparation peut conduire à des délétions ou des translocations. Leur réparation est complexe et fait intervenir deux mécanismes de réparation : la recombinaison homologue (HR, *Homologous Recombination*) qui nécessite l'utilisation d'un modèle d'homologie (en général la chromatide sœur) pour la synthèse d'un nouveau brin d'ADN ; et la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*) qui consiste à lier les deux extrémités d'ADN situés de part et d'autre de la cassure (Lord and Ashworth, 2012).

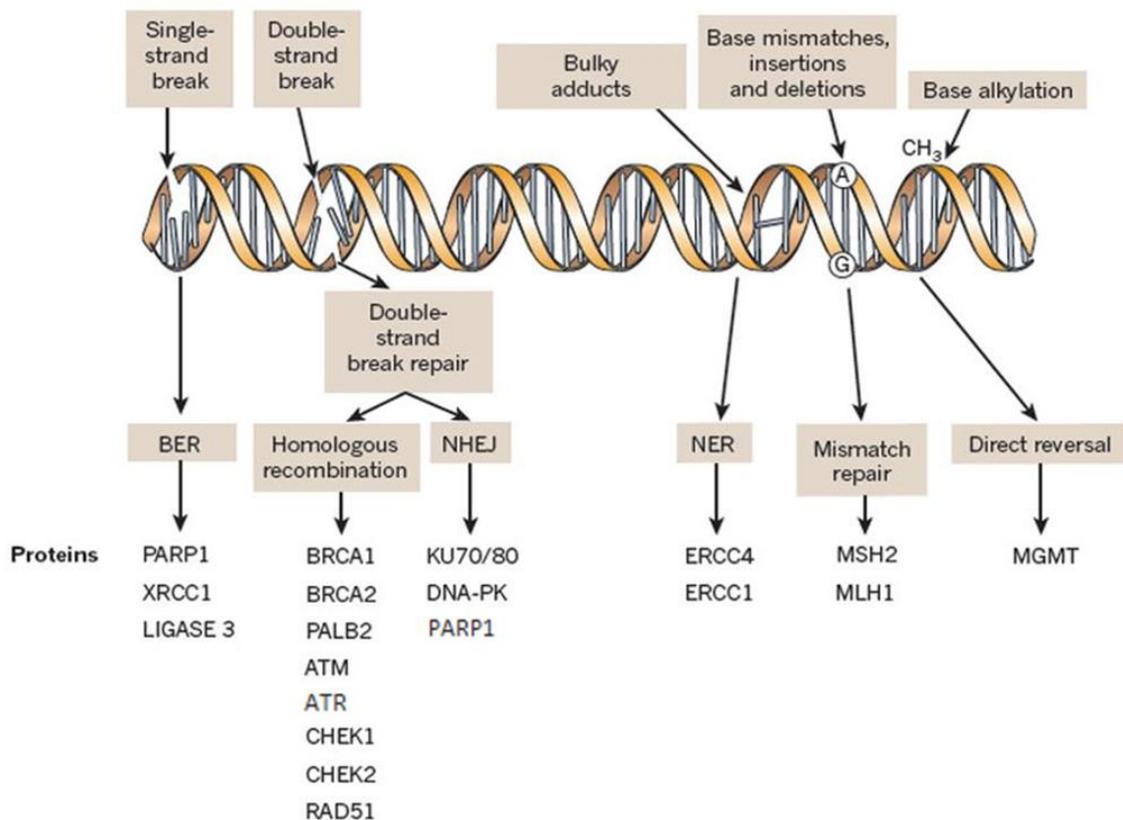


Figure 2 : Les lésions de l'ADN et leur système de réparation

Il existe différents types de lésions de l'ADN (ou dommages de l'ADN) qui sont pris en charge par différents systèmes de réparation (DDR) qui permettent de réparer la lésion considérée. Les protéines indiquées dans chaque catégorie de DDR sont les principales, mais la liste n'est pas exhaustive. Les protéines ici appelées CHEK1 et CHEK2 sont référencées par CHK1 et CHK2 dans la suite de ce manuscrit (Lord and Ashworth, 2012).

2. Activation de la voie des DDR : ATM/CHK2 et ATR/CHK1

a. Signaux d'activation de la voie des DDR

L'intégrité du génome cellulaire est contrôlée en permanence au cours de toutes les phases du cycle cellulaire par les différents senseurs qui appartiennent à la voie de DDR.

De nombreux types de dommages à l'ADN sont réparés rapidement et ne nécessitent pas, en soit, d'arrêter le cycle cellulaire. En revanche, lorsqu'ils se trouvent sur le chemin d'une fourche de réplication ils constituent un obstacle à la progression de cette fourche. L'arrêt de la fourche de réplication constitue ainsi un signal de dommage à l'ADN, et permet d'activer la voie de DDR (Byun et al., 2005). Il y aura alors un ralentissement de la progression des fourches de réplication, une inhibition de l'initiation de nouvelles fourches de réplication et l'activation des processus de réparation (Seiler et al., 2007). Une fois la lésion réparée, la réplication pourra alors se poursuivre.

La stabilisation de la fourche de réplication arrêtée est très importante dans ce processus. En effet, un effondrement de la fourche de réplication peut conduire à la création d'un site de cassure et la génération d'un DSB (Zachos et al., 2003, 2005).

Les DSB étant les dommages les plus dangereux, ils induisent donc rapidement l'activation des voies de DDR responsables de l'arrêt de la progression du cycle cellulaire afin de donner le temps aux mécanismes de réparation de se mettre en place.

Sur le plan moléculaire, les médiateurs de la voie de DDR sont représentés par différentes kinases. Les deux kinases les plus en amont de la cascade de signalisation, impliquées dans la coordination des réponses cellulaires aux dommages à l'ADN, appartiennent à la famille des PIKK (*PI3K-related Kinase*) : ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) pour la réponse aux DSB, et ATR (*ATM- and Rad3-related*) pour la réponse à un arrêt de la fourche de réplication. Ainsi, bien qu'ATM et ATR ne fassent pas partie intégrante des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, leur rôle en amont de la signalisation activée en réponse aux dommages à l'ADN conduit à les désigner comme des régulateurs clés de la voie des DDR (pour revues Alexander and Orr-Weaver, 2016; Blackford and Jackson, 2017; Maréchal and Zou, 2013; Smith et al., 2010).

b. Activation d'ATR en réponse à l'arrêt d'une fourche de réplication

Dans les cellules, ATR est présent sous la forme d'un complexe avec son partenaire ATRIP (*ATR Interacting Protein*). La rencontre d'une fourche de réplication et d'un site de dommage de l'ADN entraîne un découplage de l'ADN polymérase, générant alors une portion d'ADN simple brin qui est rapidement recouverte par le complexe des protéines de la réplication A (RPA, *Replication Protein A*). Il a été montré que c'est le signal soutenu généré par le simple brin d'ADN recouvert de RPA qui conduit au recrutement du complexe ATR-ATRIP au niveau de la fourche de réplication arrêtée (Figure 3) (Zou and Elledge, 2003).

Une fois recruté au niveau des simples brins d'ADN, l'activation d'ATR nécessite la présence de facteurs activateurs (tel que TopBP1) qui interagit avec le complexe Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1). Il s'agit d'un complexe hétérotrimérique en forme d'anneau qui est chargé sur les jonctions simple brin d'ADN /double brin d'ADN, et permet ainsi de marquer les sites d'une fourche de réplication arrêtée (Delacroix et al., 2007; Kumagai et al., 2006; Lee et al., 2007). Une fois recruté et activé au niveau du simple brin d'ADN, ATR phosphoryle la Claspin, qui recrute alors la kinase CHK1 et se retrouve ainsi phosphorylée par ATR sur son résidu Ser345 (Jeong et al., 2003; Liu et al., 2000). Ce site de phosphorylation est alors utilisé comme marqueur de l'activation de la voie ATR/CHK1.

Après son activation, CHK1 se dissocie de la Claspin pour phosphoryler de nombreuses cibles impliquées dans l'inhibition des complexes CDK/cycline ce qui cause un arrêt du cycle cellulaire (en particulier CDC25A et p53) (Lukas et al., 2003). De plus CHK1 empêche l'initiation des origines de réplication à proximité des fourches de réplication en pause afin d'éviter de répliquer un ADN endommagé (Ge and Blow, 2010).

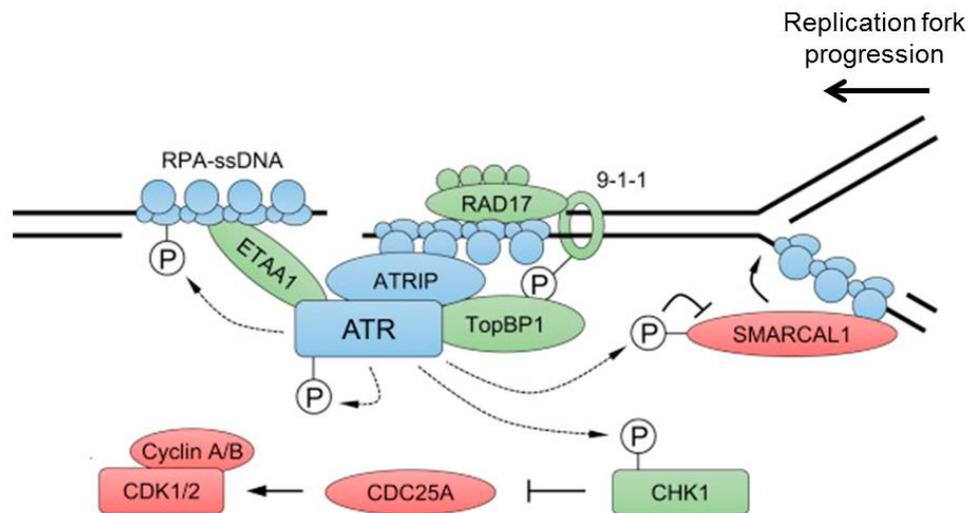


Figure 3 : Recrutement d'ATR au niveau d'une fourche de répliation arrêtée

Cette figure représente le mécanisme de recrutement du complexe ATR-ATRIP sur un simple brin d'ADN recouvert de RPA au niveau d'un site de cassure double brin, et l'activation de la cascade de signalisation de l'arrêt du cycle cellulaire. Les mécanismes de recrutement et d'activation d'ATR au niveau d'une fourche de répliation arrêtée suite à la rencontre d'un obstacle se fait de façon similaire *via* les protéines RPA (adapté de Blackford and Jackson, 2017).

c. Activation d'ATM en réponse à des cassures double brin

L'activation d'ATM en réponse à des dommages à l'ADN passe par son recrutement au niveau des sites de DSB par l'intermédiaire de la machinerie de la réparation par la recombinaison homologue. En effet, ATM inactif se retrouve sous forme d'un homodimère. En présence de DSB au niveau de l'ADN, le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) reconnaît la lésion, puis recrute la kinase ATM (Figure 4A) (Carson et al., 2003; Lee and Paull, 2005). Ce complexe MRN a d'autres rôles ensuite dans la réparation des DSB par la recombinaison homologue, que nous ne détaillerons pas dans ce manuscrit.

Le recrutement d'ATM *via* le complexe MRN conduit à une autophosphorylation d'ATM sur son résidu Ser1981 et une dissociation sous forme monomérique (Bakkenist and Kastan, 2003). Sous cette forme, l'activité kinase d'ATM est active et permettra la phosphorylation de plusieurs cibles dont la kinase CHK2, sur son résidu Thr68, une fois qu'elle est recrutée au niveau du site de DSB. Cette phosphorylation conduit alors à une dissociation rapide de CHK2 au site du DSB et sera ainsi responsable de la phosphorylation de nombreuses protéines impliquées à la fois dans la réparation des DSB (telles que BRCA1, BRCA2, XRCC1...)

et dans l'arrêt du cycle cellulaire (comme CDC25A ou p53) (Ahn et al., 2000; Bakkenist and Kastan, 2003; Lukas et al., 2003; Matsuoka et al., 2000).

De plus, ATM recruté au niveau du site de DSB se retrouve à proximité d'une de ces cibles, l'histone H2AX. Cette histone sera alors phosphorylée sur son résidu Ser139, cette forme phosphorylée étant appelée γ H2AX (Burma et al., 2001). La formation de γ H2AX au site de DSB permettra la mise en place d'une cascade de signalisation basée sur la chromatine via le recrutement de MDC1 (*Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1*) directement sur γ H2AX (Stucki et al., 2005). MDC1 est alors stabilisé par une phosphorylation médiée par ATM, et est capable de recruter une autre molécule d'ATM sur l'histone adjacente au site de DSB (Liu et al., 2012). ATM pourra ainsi phosphoryler l'histone voisine, qui recrutera MDC1 et ATM, et ainsi de suite conduisant à la formation d'un long brin de γ H2AX et de MDC1. C'est ainsi que des foci de γ H2AX sont facilement visibles en immunofluorescence et constituent des marqueurs de DSB.

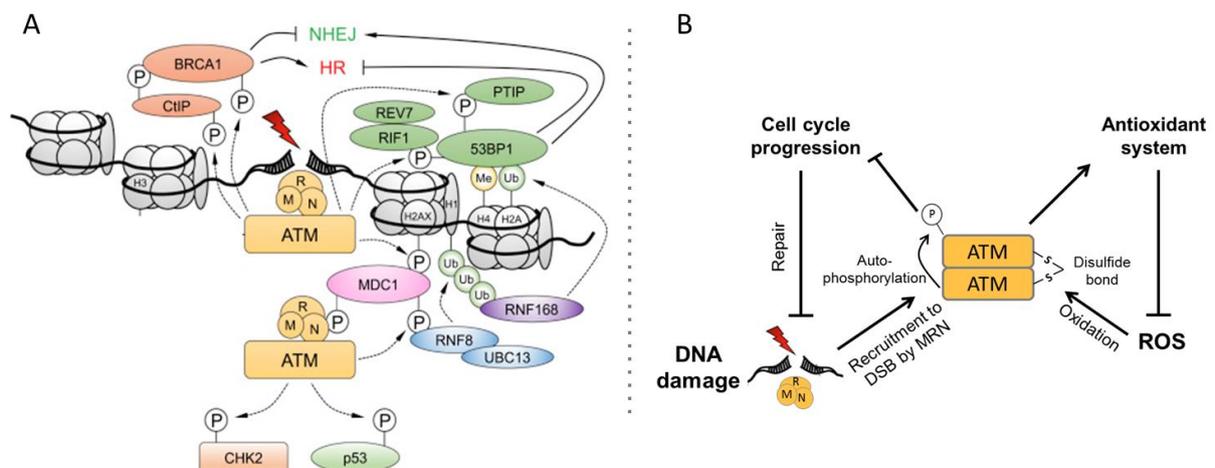


Figure 4 : Activation d'ATM au site d'un DSB ou par les ROS

A. Mécanisme de recrutement d'ATM par le complexe MRN au niveau d'une cassure double brin (DSB) et activation de la cascade de signalisation impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire (médiée par CHK2 et p53) et dans la réparation des dommages à l'ADN par HR ou NHEJ (via les protéines MDC1, RNF8, RNF168, 53BP1, BRCA1...) (adapté de Blackford and Jackson, 2017). **B.** Mécanisme d'activation d'ATM par les ROS de façon indépendante d'un DSB et du complexe MRN, via la formation d'un dimère d'ATM reliés par un pont disulfure (adapté de Guo et al., 2010b).

Il est intéressant de noter qu'ATM peut également être activé par un stress oxydant, indépendamment de la présence de DSB et du complexe MRN. Un stress oxydant désigne une situation dans laquelle le niveau de ROS intracellulaire est supérieur au niveau

physiologique. Il est causé par un déséquilibre de la balance entre la production de ROS et l'élimination de ces derniers par le système anti-oxydant cellulaire (constitué d'enzymes anti-oxydantes et de petites molécules qui séquestrent les ROS). Dans un contexte de stress oxydant, ATM serait oxydé et activé *via* la formation d'un dimère d'ATM liés par un pont disulfure. L'activation d'ATM jouerait alors un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire en réponse à une élévation de la production de ROS et dans la réponse antioxydante (Guo et al., 2010b) (Figure 4B). Etant donné qu'un stress oxydant peut également conduire à la formation de DSB, cette activation directe d'ATM par les ROS permettrait de renforcer l'activation d'ATM par les DSB et de favoriser leur réparation (Guo et al., 2010a).

d. Interconnexion entre l'activation d'ATR/CHK1 et ATM/CHK2

Historiquement, il était admis que les deux voies de signalisation en amont de la réponse aux dommages à l'ADN ATM/CHK2 et ATR/CHK1 fonctionnaient en parallèle et de manière indépendante. Cependant de nombreuses études suggèrent une relation entre ces deux voies. En effet, il a été montré que dans certains cas, les kinases ATR et ATM peuvent être activées au niveau des mêmes sites de lésion de l'ADN.

En particulier, il a été montré qu'ATM peut être phosphorylé de façon dépendante d'ATR en réponse aux UV, en absence de DSB (Stiff et al., 2006).

D'autre part, ATR peut également être activé en réponse à des DSB (Figure 3). En effet, un des modes de réparation des DSB (la recombinaison homologue) requiert la formation de simples brins d'ADN recouverts du complexe RPA capable d'induire le recrutement d'ATR (Cuadrado et al., 2006; Jazayeri et al., 2006; Myers and Cortez, 2006).

De plus, il a été montré qu'ATM, en réponse à des radiations ionisantes, est capable d'induire directement la phosphorylation de CHK1 (Gatei et al., 2003; Sørensen et al., 2003).

L'activation d'ATM et d'ATR au niveau des mêmes sites de dommages à l'ADN permet ainsi de coordonner la réponse cellulaire en termes d'arrêt du cycle cellulaire et de réparation des dommages.

3. Paradoxe de la voie des DDR dans les cancers

La plupart des cancers présentent des altérations d'un ou plusieurs mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. Des mutations d'ATM et de CHK2 et de leur signalisation en aval (notamment BRCA1, BRCA2...) sont souvent retrouvées dans les cancers. De plus des individus porteurs de mutations dans ces gènes présentent une prédisposition à certains cancers (Bartkova et al., 2005; Bouwman and Jonkers, 2012; Macheret and Halazonetis, 2015; Wooster et al., 1995). Ce résultat est le fruit de l'évolution de la tumeur. En effet au cours de la progression tumorale, la dérégulation de la voie de DDR permet une plus grande instabilité génomique, et donc une acquisition plus rapide de propriétés de prolifération accrue, d'inhibition de l'apoptose et de capacité métastatique.

Cependant, l'acquisition de mutations dans la voie des DDR peut favoriser l'efficacité des chimiothérapies. En effet, de nombreux agents anti-cancéreux fonctionnent en induisant des dommages à l'ADN. Or, les déficiences dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN réduisent la capacité des cellules cancéreuses à réparer leur ADN. Ces déficiences rendent alors les cellules cancéreuses plus sensibles à la mort cellulaire vis-à-vis de dommages supplémentaires de l'ADN, tels que ceux causés par des agents anti-cancéreux. (Smith et al., 2010).

De façon intéressante, il existe une forme de redondance entre les mécanismes de réparation. Ainsi pour compenser la perte d'activité d'un système de réparation déficient, la cellule cancéreuse sur-utilise les autres systèmes de réparation disponibles afin d'éviter la mort cellulaire qui serait induite en cas de lésion non réparée. Ceci conduit à une dépendance plus grande vis-à-vis des systèmes de réparation fonctionnels qui peut être utilisé comme avantage thérapeutique. Un des exemples phare est la sensibilisation importante de la mort de cellules cancéreuses qui présentent des mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 (impliqués dans la réparation des DSB par recombinaison homologue) qui sont traitées avec des inhibiteurs de la Poly(ADP-ribose) polymérase (PARP), impliquée dans la réparation des DSB par NHEJ. C'est dans ce contexte que le principe de létalité synthétique a été exprimé pour la première fois. C'est-à-dire que ni la déficience en recombinaison homologue seule, ni l'inhibiteur de NHEJ seul n'induisent la mort. En revanche, lorsqu'ils sont combinés, ils induisent une mort massive (Bryant et al., 2005;

Farmer et al., 2005). Ces études ont mené à l'établissement de nombreux essais cliniques pour des cancers du sein et des ovaires présentant des déficiences en BRCA1/2 (Konecny and Kristeleit, 2016; Tutt et al., 2010). D'ailleurs, depuis Janvier 2018, l'utilisation de l'inhibiteur de PARP (Olaparib) est autorisé par la « Food and Drug Administration » pour le traitement de patients atteints de cancer du sein métastatique et présentant des mutations germinales de BRCA.

C. Activation de la voie des DDR au cours du cycle cellulaire

1. Les points de contrôle du cycle cellulaire

a. Le cycle cellulaire

La division cellulaire est le processus par lequel une cellule mère donne naissance à deux cellules filles identiques sur le plan génétique. Ce processus est cyclique et divisé en deux périodes successives, l'interphase (subdivisée en phase G1, S et G2) et la mitose (subdivisée en prophase, métaphase, anaphase et télophase).

L'interphase assure une duplication du génome sans mutations. Les phases G1 et G2 correspondent à des phases de croissance, alors que la phase S correspond à la phase de répllication de l'ADN (Diaz-Moralli et al., 2013; Otto and Sicinski, 2017).

La mitose est la phase du cycle cellulaire qui permet au matériel génétique, répliqué pendant la phase S, de se distribuer équitablement entre deux cellules filles (Walczak et al., 2010). Elle se déroule en 4 étapes distinctes :

La prophase, pendant laquelle les centrosomes (dupliqués pendant l'interphase) se séparent et migrent à chaque pôle de la cellule pour former le fuseau mitotique bipolaire. En parallèle, l'enveloppe nucléaire se rompt et les chromosomes se condensent.

La métaphase, où s'opère l'alignement des chromosomes sur le plan équatorial de la cellule grâce à l'attachement aux microtubules *via* leur kinétochore.

L'anaphase, pendant laquelle les chromatides sœurs de chaque chromosome se séparent. C'est au cours de l'anaphase que le processus de cytokinèse, qui est responsable de la séparation physique des deux cellules filles, commence à se mettre en place grâce à la formation d'un fuseau central de microtubules et l'invagination de la membrane plasmique dans un sillon de clivage.

La télophase, au cours de laquelle la chromatine se décondense et l'enveloppe nucléaire se reforme. Les dernières étapes de la cytokinèse se déroulent en parallèle avec la formation d'une structure très dense en protéines appelée midbody. Cette structure est alors impliquée dans l'abscission finale qui génère deux cellules filles.

b. Les points de contrôle « obligatoires »

La division cellulaire est un processus hautement régulé par l'activation de signaux de croissance et par le contrôle de l'intégrité génétique pour éviter la transmission d'un génome endommagé. Les systèmes de surveillance et de régulation du cycle cellulaire constituent des « points de contrôle » du cycle cellulaire.

Au cours d'un cycle cellulaire normal (sans dommages à l'ADN), la cellule doit passer obligatoirement par deux points de contrôle. Le premier point de contrôle est appelé point de restriction (R) (Figure 5). Il se situe en fin de phase G1 et s'assure que les conditions environnementales et cellulaires soient correctes pour permettre le bon déroulement du cycle cellulaire. Il constitue le point d'entrée irrémédiable dans le cycle cellulaire, en effet une fois ce point de restriction passé, à moins d'une catastrophe, la cellule terminera nécessairement son cycle cellulaire (Diaz-Moralli et al., 2013; Pardee, 1974).

Le deuxième point de contrôle d'un cycle cellulaire sans dommage à l'ADN est celui qui surveille l'assemblage du fuseau mitotique au cours de la transition Métaphase/Anaphase (le SAC, *Spindle Assembly Checkpoint*) (Figure 5). Il s'assure de l'attachement correct des chromosomes au niveau du fuseau de microtubule et empêche ainsi le déclenchement de l'anaphase avant que les chromosomes ne soient séparés correctement (Carmena et al., 2012; Hoyt et al., 1991; Musacchio, 2015).

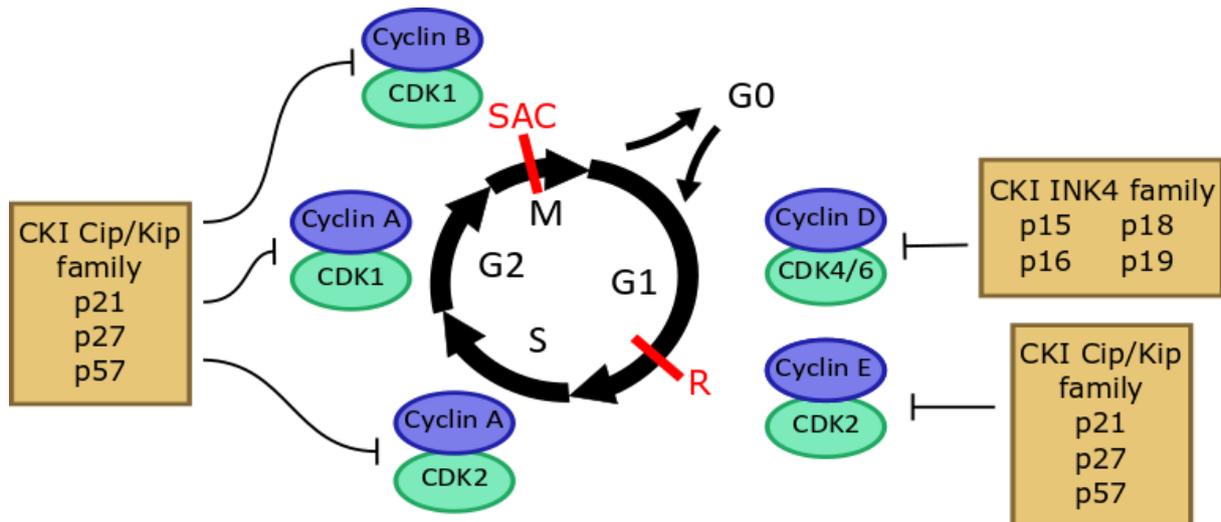


Figure 5 : Machinerie du cycle cellulaire et points de contrôle

La machinerie du cycle cellulaire est constituée de différents couples de complexes CDK/Cycline qui se forment successivement au cours des phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire. Les points de contrôles « obligatoires » sont indiqués par R (pour restriction) et SAC (pour *Spindle Assembly Checkpoint*). Les points de contrôle des dommages à l'ADN s'effectuent tout au long du cycle cellulaire et ne sont pas représentés sur cette figure (voir Figure 7 pour plus de détails sur ces points de contrôle des dommages à l'ADN). Sont représentées également les deux familles d'inhibiteurs de CDK (CKI pour *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor*) les complexes CDK/Cycline qu'ils inhibent.

c. Les points de contrôle des dommages à l'ADN

En plus de ces points de contrôle « obligatoires », des dommages à l'ADN, qu'ils soient causés par des agents chimiothérapeutiques ou non, peuvent survenir au cours de chaque étape du cycle cellulaire. Ainsi, afin de protéger les cellules des mutations qui menacent l'intégrité du génome qui sera transmis à la descendance, de nombreux points de contrôle des dommages à l'ADN peuvent être activés au cours des phases G1, S ou G2 de l'interphase (Elledge, 1996; Shaltiel et al., 2015; Smith et al., 2010). Ces points de contrôle sont activés par les senseurs de dommages à l'ADN ATM et ATR que nous avons présenté précédemment.

Le principe de fonctionnement de ces points de contrôle est que la détection d'un dommage à l'ADN (directement ou indirectement) conduit à l'activation d'une voie de signalisation qui impose un arrêt du cycle cellulaire et à l'activation des mécanismes de réparation. Les réponses moléculaires qui sont activées sont alors différentes selon la phase dans laquelle la cellule se retrouve. De nombreuses études sur des souris ou cellules déficientes pour ATR,

ATM, CHK1 et CHK2 ont conduit à identifier leur importance dans chacun des points de contrôle (Brown and Baltimore, 2003; Takai et al., 2000; Xu et al., 2002; Zachos et al., 2003).

A la fin de la mitose, le processus de cytokinèse se déclenche afin de conduire à la séparation physique des cellules filles. Or, des dommages à l'ADN peuvent générer la formation de ponts de chromatine entre les deux noyaux des futures cellules filles (Acilan et al., 2007; Cho et al., 2017). Ces structures conduisent à l'activation du point de contrôle de l'abscission, représenté sur le plan moléculaire par la kinase Aurora B. Le rôle de ce point de contrôle est d'empêcher une régression du sillon de clivage et de donner le temps à la cellule de résoudre le problème du pont de chromatine. Ce point de contrôle est essentiel pour empêcher la formation d'une cellule tétraploïde (Steigemann et al., 2009).

En cas d'échec de la cytokinèse, un point de contrôle de la tétraploïdie se met alors en place afin d'empêcher la prolifération de ces cellules dont le génome n'est pas intègre et de limiter les risques de tumorigenèse (Margolis et al., 2003).

Dans la suite, nous ferons un bref rappel sur la machinerie du cycle cellulaire, nous présenterons les mécanismes moléculaires impliqués dans la progression du cycle cellulaire normale (sans dommages à l'ADN), puis nous aborderons le fonctionnement des différents points de contrôle activés en réponse à des dommages à l'ADN. Pour des raisons de clarté, nous aborderons dans des parties séparées les mécanismes qui interviennent soit en interphase, soit en mitose.

2. Rappels sur la machinerie du cycle cellulaire

La machinerie du cycle cellulaire est formée de complexes protéiques hétérodimériques de cyclines (cycline D, E, A et B) et des sérine/thréonine kinases dépendantes des cyclines (CDK4, CDK6, CDK2, et CDK1). Au cours du cycle cellulaire, c'est la formation et l'activité successive de couples particuliers de CDK/cycline qui permettent la progression d'une phase à l'autre (Figure 5) (Malumbres and Barbacid, 2009).

La formation et l'activité des complexes CDK/cycline est régulée en partie par la variation du niveau des cyclines au cours du cycle cellulaire. En effet, alors que le niveau de CDK est constant, le niveau des cyclines varie fortement et de façon similaire au profil de formation des complexes CDK/cycline dans les différentes phases du cycle cellulaire. Ces variations cycliques sont le fruit d'une régulation de leur synthèse, et de leur dégradation par le protéasome. L'adressage des cyclines au protéasome se fait par l'intermédiaire des complexes d'ubiquitine ligase. Il s'agit du complexe Skip/Cullin/F-box (SCF) et du complexe promoteur d'anaphase/cyclosome (APC/C) (Vodermaier, 2004).

D'autre part, la régulation des complexes CDK/cycline dépend également de la phosphorylation des CDKs. Ces phosphorylations peuvent être activatrices grâce à l'intervention de la kinases activatrice des CDK (CAK pour *Cyclin Activating Kinase*, constituée de la cycline H, CDK7 et de MAT1) (Lolli and Johnson, 2005). En revanche, les kinases Wee1 et Myt1 induisent des phosphorylations inhibitrices de CDK1 (respectivement sur ses résidus Thr14 et Tyr15) (Baldin and Ducommun, 1995), qui peuvent être levées par l'intervention des phosphatases CDC25 (CDC25A, CDC25B et CDC25C) (Malumbres and Barbacid, 2005).

En plus de la régulation des complexes CDK/cycline par le niveau de cyclines disponibles et leur phosphorylation, les inhibiteurs de CDK (ou CKI, *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor*) sont capables d'interagir avec les complexes CDK/cycline et d'inhiber leur activité. Il y aurait 7 CKI décrits jusqu'alors, chacune n'étant pas capable d'inhiber tous les complexes CDK/cycline comme indiqué sur la Figure 5 (Vermeulen et al., 2003).

Ces CKI sont regroupés en deux familles distinctes, la famille INK4 (*Inhibitor of CDK4*) et la famille Cip/Kip. Les CKI de la famille INK4 ciblent spécifiquement les complexes CDK4 et CDK6 (CDK de la phase G1). Il s'agit des protéines p16, p15, p18 et p19.

Les CKI de la famille Cip/Kip sont les protéines p21, p27 et p57. Elles sont capables d'inhiber tous les autres complexes CDK/cycline qui se forment à des étapes plus tardives. Les CKI de la famille Cip/Kip ont aussi été décrits pour être impliqués dans d'autres processus cellulaires tels que la régulation transcriptionnelle de gènes, l'apoptose, l'autophagie, l'organisation du cytosquelette et la migration (Besson et al., 2008; Mathiassen et al., 2017).

3. Les points de contrôle des dommages à l'ADN au cours de l'interphase

a. Le point de contrôle des dommages à l'ADN en phase G1

i. Le point de restriction (sans dommages à l'ADN)

Dans les tissus, les cellules normales sont majoritairement dans un état réversible de quiescence (G0) et sont donc en dehors du cycle cellulaire. Leur entrée dans le cycle cellulaire est régulée très finement par la présence de nutriments, facteurs mitogènes (tels que des facteurs de croissance) ou anti-mitogènes, mais également de ROS dans l'environnement cellulaire. En effet, les signaux mitogènes conduisent notamment à l'expression de la cycline D qui permet l'activation des CDK4 et CDK6 et le dépassement du point de restriction (Pardee, 1974).

Un niveau de ROS élevé semble également important la transition G0/G1 en réponse aux facteurs de croissance pour induire l'expression des cyclines (Felty et al., 2005). Cependant, ce niveau de ROS doit ensuite être diminué pour la progression dans le cycle. En effet, un niveau de ROS élevé inhibe la synthèse d'ADN et ce indépendamment de leur capacité à induire des dommages à l'ADN (Girard et al., 2008; Havens et al., 2006).

Le point de restriction est représenté sur le plan moléculaire par la protéine produite par le gène suppresseur de tumeur *retinoblastoma* (pRb). En effet pRb inhibe l'activité du facteur de transcription hétérodimérique E2F-1/DP-1 (appelé E2F pour la suite) (Brehm et al., 1998). Or, l'activité de E2F permet l'expression de nombreux gènes impliqués dans la synthèse de l'ADN, et est donc nécessaires à l'entrée en phase S.

L'augmentation de l'expression de la cycline D au cours de la phase G1 conduit à activer les complexes CDK4/cycline D et CDK6/cycline D. Ces complexes réalisent une phosphorylation « légère » de pRb (alors sous une forme hypophosphorylée) et partiellement inactivé (Figure 6). Cette inactivation de pRb conduit à la libération du facteur de transcription E2F, permettant ainsi l'expression de la cycline E (Kato et al., 1993).

L'augmentation de l'expression de la cycline E en fin de phase G1 va conduire à l'activation du complexe CDK2/cycline E. Ce dernier est responsable d'une phosphorylation totale de pRb (forme hyperphosphorylée), rendant pRb totalement inactif. Il y a alors une

amplification de l'activité du facteur de transcription E2F pour induire la transcription de gènes de protéines impliquées dans la synthèse de précurseurs nucléotidiques de l'ADN et dans la réplication de l'ADN. Une fois ce point de restriction dépassé, les couples de CDK/cycline vont s'enchaîner jusqu'à la fin du cycle cellulaire et l'étape finale de la mitose (Diaz-Moralli et al., 2013).

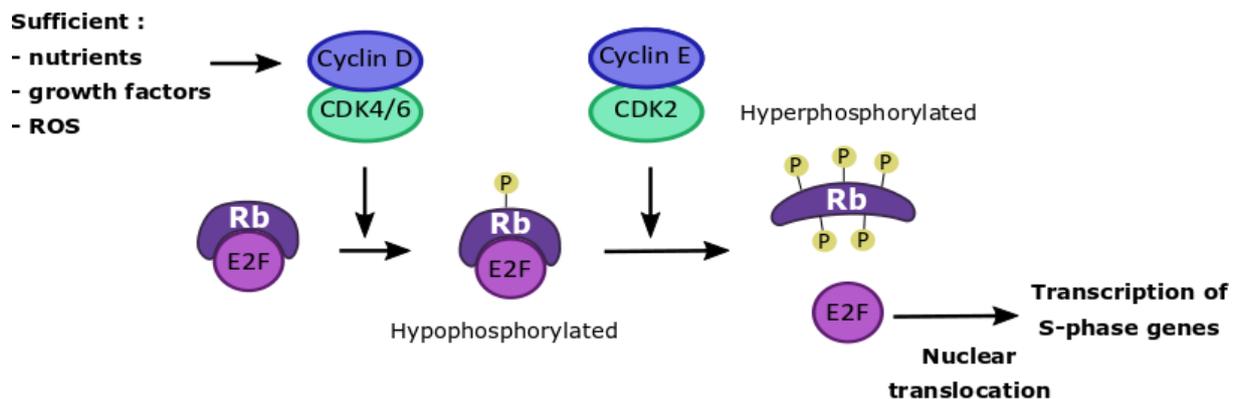


Figure 6 : Contrôle de l'entrée en cycle cellulaire par le point de restriction

La protéine Rb est au cœur du contrôle du point de restriction par la séquestration du facteur de transcription E2F dans le cytoplasme. Les complexes CDK/Cycline sont responsables de phosphorylations inactivatrices de Rb pour permettre la progression en phase S du cycle cellulaire.

ii. Le point de contrôle des dommages à l'ADN

En phase G1, la présence de DSB va conduire à l'activation de la voie de signalisation ATM/CHK2. Ces kinases seront responsables de la stabilisation du facteur de transcription p53 (suppresseur de tumeur) et de l'induction de son gène cible p21 (Figure 7A). En effet, dans des conditions normales, p53 est ciblé par le complexe hétérodimérique MDM2-MDMX qui favorise son ubiquitinylation et le dirige vers une dégradation par le protéasome. En réponse à des DSB, l'activation d'ATM/CHK2 conduit à une inhibition de la dégradation de p53. La stabilisation de p53 se fait grâce à une phosphorylation de p53 sur plusieurs sites (par ATM ou CHK2), qui empêche son interaction avec MDM2 (Chehab et al., 2000; Hirao et al., 2000; Saito et al., 2002). De plus, ATM et CHK2 sont également impliquées dans la phosphorylation du complexe MDM2 participant à la libération de p53 (Chen et al., 2005a; Khosravi et al., 1999).

L'expression de p21 (inhibiteur de CDK) conduira ainsi à l'inhibition du complexe CDK2/cycline E, empêchant la progression de la phase G1 à la phase S en présence de lésions de l'ADN. De plus, une des particularités de p21, c'est qu'il est aussi capable d'inhiber un des composants de l'appareil de réplication de l'ADN (PCNA, *proliferation cell nuclear antigen*) afin d'induire une pause dans la réplication de l'ADN qui aurait éventuellement commencé (Cayrol et al., 1998).

La stabilisation de p53 conduit également à l'induction de l'expression de nombreux gènes impliqués dans les mécanismes de réparation (tels que XPC, OGG1, RAD51...) (pour revue Williams and Schumacher, 2016).

Ce système permet donc de donner le temps aux mécanismes de réparation des DSB, qui sont activés en parallèle, de réparer efficacement les DSB, évitant la réplication d'un ADN endommagé. Notons qu'en phase G1, la réparation des DSB s'opère majoritairement par la voie de réparation par NHEJ (pour revue Shrivastav et al., 2008). Ainsi la voie ATR/CHK1 n'est pas activée au point de contrôle G1, et ce point de contrôle est donc sous la responsabilité de la voie ATM/CHK2 uniquement.

b. Le point de contrôle des dommages à l'ADN en phase S

En phase S, l'activation des voies de signalisation ATM/CHK2 et ATR/CHK1 se fait en réponse à des DSB et/ou en réponse à un arrêt de la fourche de réplication. Ils sont alors responsables d'une phosphorylation inactivatrice des phosphatases de la famille CDC25 (Figure 7B). En effet, la phosphorylation de CDC25A conduit à sa dégradation par le protéasome, et la phosphorylation de CDC25C conduit à son association avec le complexe inhibiteur 14-3-3 (Blasina et al., 1999; Peng et al., 1997). Ces phosphatases sont importantes pour l'activation des complexes CDK2/cycline E et CDK2/cycline A, et donc pour la progression de la phase S.

En parallèle, la phosphorylation de nombreuses cibles impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN, notamment par ATR conduira à une stimulation de la réparation des dommages à l'ADN.

c. Le point de contrôle des dommages à l'ADN en phase G2

Alors que le point de contrôle en G1 est totalement dépendant de la stabilisation de p53, l'activation du point de contrôle en G2 (Figure 7C) peut être le résultat de plusieurs voies de signalisations dépendantes ou non de p53.

En phase G2, la réparation des DSB se fait majoritairement par recombinaison homologue, ainsi à ce point de contrôle les deux voies de signalisation ATM/CHK2 et ATR/CHK1 peuvent être activées.

Un arrêt en phase G2 passe par l'inhibition de l'activité du complexe CDK1/cycline B. Au cours d'un cycle cellulaire normal, l'activation du complexe CDK1/cycline B en fin de phase G2 est nécessaire pour l'entrée en mitose. Cette activation nécessite une phosphorylation activatrice de CDK1 sur son résidu Thr161 par la CAK (Tassan et al., 1994), et une déphosphorylation de ses résidus Thr14 et Tyr15 par l'action de la phosphatase CDC25C (Hoffmann et al., 1993). De plus, CDC25C étant complexée à la protéine 14-3-3 est séquestrée dans le cytoplasme, sa translocation nucléaire est donc nécessaire pour déphosphoryler le complexe CDK1/cycline B et le rendre entièrement actif. Cet événement est permis grâce à la phosphorylation de CDC25C par PLK1 (*Polo-like kinase 1*) qui entraîne sa dissociation de la protéine 14-3-3 (Toyoshima-Morimoto et al., 2002).

En revanche, en présence de dommages à l'ADN, l'activation de CHK1 va permettre une phosphorylation de CDC25C responsable de son association avec le complexe 14-3-3 (Krämer et al., 2004). Cette interaction conduit alors à la séquestration de CDC25C dans le cytoplasme, alors que ses cibles sont dans le noyau. De plus, il a été montré qu'en réponse à des dommages à l'ADN, PLK1 est phosphorylée et inhibée de façon dépendante d'ATM et d'ATR. Cette phosphorylation de PLK1 la rend ainsi incapable d'inhiber l'interaction de CDC25C avec le complexe 14-3-3 (van Vugt et al., 2001). Cette signalisation est responsable d'une inhibition de l'activité des complexes CDK/cycline de la mitose, empêchant ainsi l'entrée en mitose.

En plus de l'inhibition de l'entrée en mitose, la stabilisation de p53 (par ATM/CHK2 et ATR/CHK1) peut contribuer à la maintenance de ce point de contrôle. En effet, p53 est

responsable de la répression transcriptionnelle de CDC25C et de la cycline B, ainsi que de l'induction de l'expression de p21 (qui est capable d'inhiber les complexes CDK/cycline mitotiques), ainsi que de l'expression de 14-3-3 (Bunz et al., 1998; Chan et al., 1999; Taylor et al., 1999).

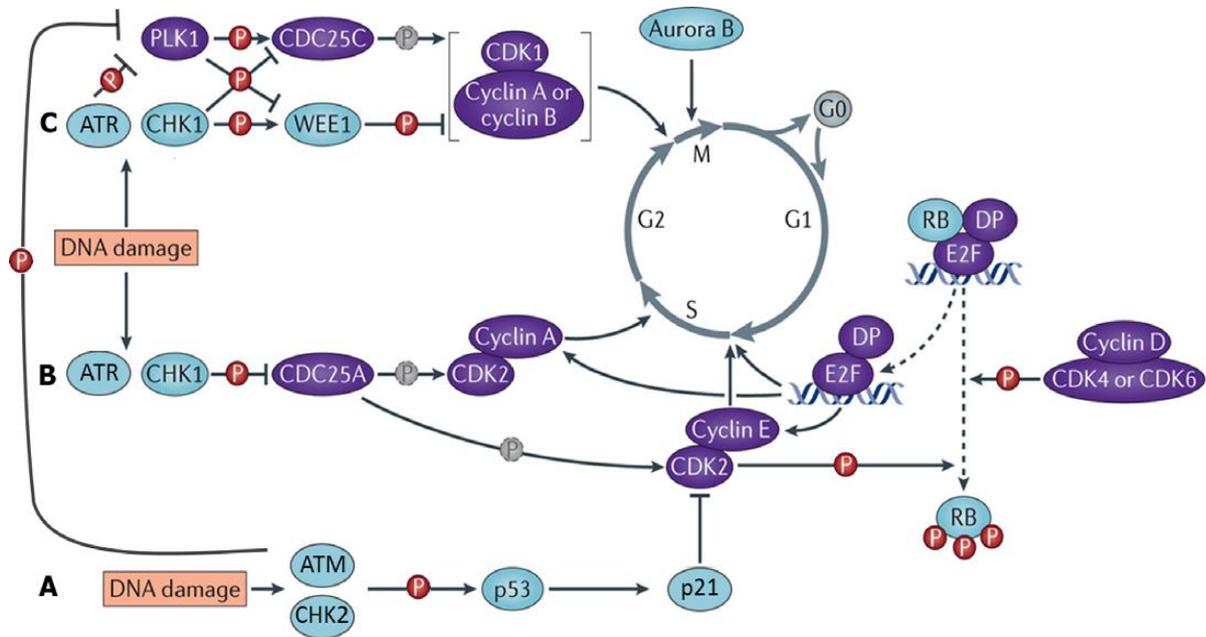


Figure 7 : Les points de contrôle des dommages à l'ADN

Point de contrôle des dommages à l'ADN en phase G1 (A), phase S (B) ou phase G2 (C) du cycle cellulaire. Les protéines violettes sont des régulateurs positifs de la progression du cycle cellulaire, celles en bleu constituent des régulateurs négatifs de la progression du cycle cellulaire. Les « P » dans un cercle rouge indiquent des réactions de phosphorylation, alors que ceux en gris indiquent des réactions de déphosphorylation (adapté d'Otto and Sicinski, 2017).

d. Arrêt de la signalisation de la voie de réparation des dommages à l'ADN

Après l'activation des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, la cascade de phosphorylation initiée par ATM et ATR est inhibée *via* notamment l'intervention de protéines phosphatases (PP2A, PP4, PP6 et Wip1). Elles sont capables de déphosphoryler les nombreuses protéines activées par la voie des DDR (γH2AX, ATM, CHK2, CHK1, p53, MDM2...) (Shaltiel et al., 2015). En phase G1 l'arrêt est surtout dépendant de l'action de la phosphatase PP4, alors qu'en phase S et G2 l'arrêt de la voie de signalisation est surtout dépendante de la phosphatase Wip1 (Shaltiel et al., 2014).

En phase G2, en plus de l'activité de la phosphatase Wip1, la PLK1 est essentielle pour la reprise du cycle cellulaire après l'activation des voies de DDR. En effet, elle permet d'une part la réactivation du complexe CDK1/cycline B. Mais elle est également responsable de la phosphorylation de la Claspin, qui devient alors la cible pour une dégradation par le protéasome. Cette dégradation est responsable de l'inhibition de l'activité de CHK1 (Bassermann et al., 2008; Macůrek et al., 2008; Mamely et al., 2006). PLK1 peut également conduire à l'inactivation de CHK2 (van Vugt et al., 2010).

L'ensemble de ces processus permettent ainsi, après réparation des dommages à l'ADN, la reprise du cycle cellulaire.

4. Point de contrôle des dommages à l'ADN relatifs à la mitose

Pendant la mitose, les voies de réparation des dommages à l'ADN sont largement inhibées (Shaltiel et al., 2015). Bien qu'il était admis que des cellules ne peuvent pas poursuivre leur cycle cellulaire si les dommages ne sont pas réparés, il a été montré que dans certains cas les cellules arrêtées en G2 peuvent s'adapter et entrer en mitose même en présence de dommages à l'ADN (Syljuåsen et al., 2006).

La présence de dommages à l'ADN non réparés pendant la mitose, peut générer la formation de ponts de chromatine qui apparaissent au moment de la cytokinèse entre les noyaux des deux futures cellules filles (Cho et al., 2017). Ces ponts de chromatine, qui se forment dans le sillon de clivage, constituent un obstacle à l'abscission et conduisent ainsi à l'activation du point de contrôle de l'abscission. Sur le plan moléculaire, ce point de contrôle est représenté par la kinase Aurora B qui a pour rôle de stabiliser le sillon d'invagination et d'empêcher ainsi sa régression (Steigemann et al., 2009).

En cas de régression du sillon de clivage, il y a formation de cellules tétraploïdes à deux noyaux qui se retrouvent en phase G1. La formation de cellules tétraploïdes binucléées peut constituer un danger majeur pour l'intégrité du génome. En effet, à la division suivante, la ségrégation des chromosomes ne se déroulera pas correctement et peut favoriser l'instabilité chromosomique. Une étude a montré de grandes différences dans le potentiel

tumorigénique entre les cellules diploïde et tétraploïde issues d'une même population cellulaire (déficiente pour p53) à la suite d'un défaut de cytokinèse. En effet, ils ont remarqué que les cellules tétraploïdes étaient les seules cellules à avoir un caractère de cellules transformées in vitro, et à pouvoir générer un cancer après implantation chez la souris (Fujiwara et al., 2005).

De plus, il a été montré dans de nombreux cas de cancers (en particulier colorectaux et du sein) que la tétraploïdie constitue un évènement précoce dans la progression tumorale, en favorisant l'instabilité génétique. En plus, les cancers qui ont subi un doublement de leur génome au cours de la progression tumorale sont associés à un pronostic vital faible (Bielski et al., 2018; Coward and Harding, 2014; Dewhurst et al., 2014). Ainsi, un point de contrôle de la tétraploïdie existe également afin d'empêcher à la cellule tétraploïde de poursuivre son cycle cellulaire (Ganem et al., 2014), qu'il s'agisse d'une cellule tétraploïde mononucléée (issue d'un doublement du génome) ou binucléée (issue d'un échec de la cytokinèse). Pour la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement à la formation de cellules tétraploïdes binucléées.

a. Mécanismes moléculaires de la cytokinèse et point de contrôle de l'abscission

i. Généralités sur la cytokinèse

La cytokinèse est l'étape finale de la division cellulaire, elle aboutit à la séparation physique entre deux cellules filles. En fin d'anaphase lorsque les chromosomes se retrouvent à proximité des pôles de la cellule, la zone centrale de la cellule (appelée *spindle midzone*) est le siège du chevauchement antiparallèle des microtubules qui émanent des pôles opposés du fuseau mitotique. Ces microtubules chevauchants vont s'assembler en un faisceau serré (appelé fuseau central) qui sera le siège du recrutement très localisé de nombreux complexes protéiques importants pour la suite de la cytokinèse. En particulier, ils permettront la formation d'un anneau contractile d'actine et de myosine conduisant à l'invagination de la membrane dans un sillon de clivage.

A cette étape les deux cellules filles sont encore liées par un pont intercytoplasmique qui contient une structure dense en protéines appelé le midbody. La formation du midbody est une étape très importante pour l'abscission finale qui permet la séparation des deux cellules filles (Sagona and Stenmark, 2010).

ii. Assemblage du fuseau central

L'assemblage du fuseau central nécessite l'intervention de plusieurs facteurs (Figure 8a). Les trois facteurs majoritaires sont :

- la protéine PRC1 (*Protein Required for Cytokinesis 1*) qui favorise le rapprochement serré des microtubules (Mollinari et al., 2002),
- le complexe *centralspindlin*, constitué d'un hétérotétramère de 2 sous unités de MKLP1 (*Mitotic Kinesin-Like Protein 1*) et de 2 sous-unités de la protéine activatrice de l'activité GTPasique de Rho (MgcRacGAP) stabilisant le fuseau central (Mishima et al., 2002)
- le CPC (*Chromosomal Passenger Complex*), constitué des protéines INCENP (*inner centromere protein*), survivine, boréaline et de la kinase Aurora B. C'est l'activité kinase d'Aurora B qui permet d'activer le complexe *centralspindlin* via une phosphorylation de MKLP1 (Douglas et al., 2010).

Le recrutement de ces facteurs d'assemblage et de stabilisation du fuseau central au niveau de l'extrémité positive des microtubules chevauchants se fait *via* l'interaction avec des protéines de la famille des kinésines. Il s'agit notamment de KIF4 pour PRC1 (Kurasawa et al., 2004), de MKLP1 pour le complexe *centralspindlin* (en tant que constituant de ce complexe), et de MKLP2 pour le CPC (Hümmer and Mayer, 2009) (Figure 8a).

Un évènement important pour l'initiation de la formation du fuseau central à l'anaphase est la translocation du CPC des centromères vers la *spindle midzone*. Cette translocation n'est pas permise avant l'anaphase à cause d'une phosphorylation inhibitrice sur la sous-unité INCENP médiée par le complexe CDK1/cycline B (Hümmer and Mayer, 2009).

iii. Formation de l'anneau contractile d'actine

La formation du fuseau central dans la *spindle midzone* constitue un signal qui spécifie le plan de clivage. En effet le fuseau central va permettre l'activation de la Rho GTPase RhoA au niveau du cortex de façon très localisée dans la *spindle midzone* afin de former l'anneau contractile d'actine (Figure 8b). Un défaut de localisation de RhoA, par exemple à cause d'une zone d'activation plus large de RhoA peut conduire à un défaut de formation de l'anneau contractile et compromettre la cytokinèse (Manukyan et al., 2015). De même, une

inhibition de l'activité de RhoA empêche également la formation de l'anneau contractile et conduit à un défaut de cytokinèse (Lordier et al., 2008).

En tant que Rho GTPase, RhoA est activée par des GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factor*). Un des GEFs de RhoA, Ect2, va interagir avec la sous unité MgcRacGAP du complexe *centraspindlin* (Yüce et al., 2005) (Figure 8a). Cette interaction dépend de la phosphorylation par PLK1 de MgcRacGAP et de la levée de la phosphorylation inhibitrice de Ect2 qui avait été réalisée par le complexe CDK1/cycline B (Wolfe et al., 2009; Su et al., 2011). Ainsi le recrutement très localisé à la *spindle midzone* de Ect2, conduit à l'activation très localisée de RhoA.

A ce stade, RhoA activée va favoriser l'assemblage de l'anneau contractile d'actomyosine en stimulant la nucléation des filaments d'actine non ramifiés, grâce à l'activation de la formine mDia (Watanabe et al., 2008). RhoA contribue également à l'activation de la protéine motrice myosine II, notamment *via* l'activation de la kinase ROCK qui induit une phosphorylation activatrice des chaînes légères de la myosine (Kosako et al., 2000).

En parallèle le CPC, en phosphorylant les filaments intermédiaires, favorise leur désassemblage pour permettre le bon déroulement de l'invagination et de la séparation des cellules filles (Goto et al., 2003).

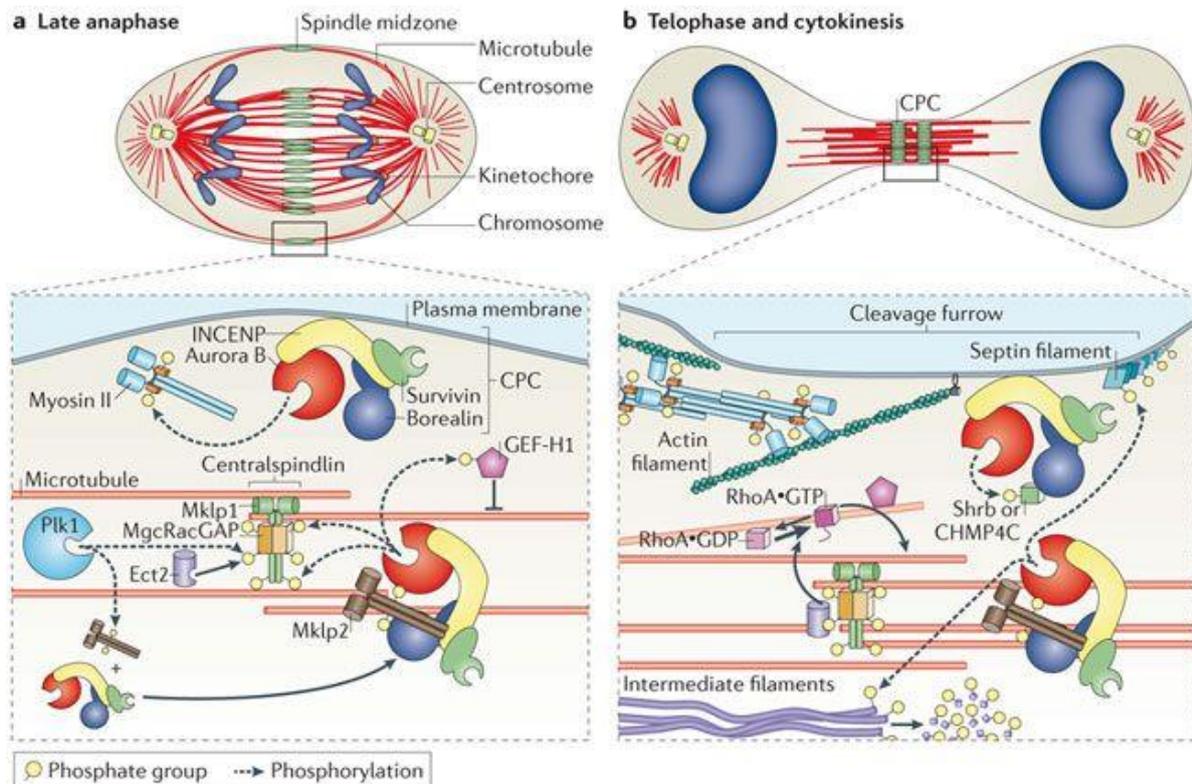


Figure 8 : Formation de l'anneau contractile d'actine au cours de la cytokinèse

a. Le CPC (pour *Chromosomal Passenger Complex*) est recruté au niveau des microtubules de la *spindle midzone* à la suite de la phosphorylation de MKLP2 par PLK1. Il contribue alors au recrutement de Ect2 via le complexe *centralspindlin*.

b. RhoA est activé de façon très localisée au niveau de la *spindle midzone* grâce à Ect2 qui permet l'échange de GDP en GTP. L'action combinée de RhoA et du CPC conduit respectivement à la polymérisation de l'actine en anneau contractile d'actine-myosine et le désassemblage des filaments intermédiaire afin que la membrane plasmique s'invagine dans un sillon de clivage (Carmena et al., 2012).

iv. Formation du midbody et abscission

La contraction de l'anneau contractile va engendrer l'invagination de la membrane dans un sillon de clivage, conduisant à la formation d'un pont intercytoplasmique d'un diamètre de 1 à 2µm. De nombreuses protéines constituantes du fuseau central (tels que le CPC et les protéines de la famille des kinésines, PRC1, le *centralspindlin complex*...) vont se retrouver compactées en une structure très dense appelée le midbody (Mierzwa and Gerlich, 2014).

L'abscission est l'étape finale de la cytokinèse qui conduit à la séparation des deux cellules filles. Le complexe protéique ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport III) permet la déformation des membranes et est nécessaire à l'abscission (Carlton and

Martin-Serrano, 2007). A cette étape, le midbody se désassemble, et RhoA est inhibé pour que les filaments d'actomyosine de l'anneau contractile se désassemblent. Cette inactivation fait intervenir le complexe PKC ϵ -14-3-3 (Saurin et al., 2008), mais également des changements dans la composition des lipides de la membrane plasmique (Emoto et al., 2005).

En cas de présence de chromatine dans le pont intercytoplasmique entre les futures cellules filles (alors appelé pont de chromatine), le point de contrôle de l'abscission est activé. En condition normale, l'activité du CPC (évaluée par la phosphorylation d'Aurora B) est inhibée au moment du désassemblage du midbody et de l'abscission par la PKC ϵ (Pike et al., 2016). En revanche, la présence de ces ponts de chromatine conduit à un maintien de l'activité d'Aurora B et à la formation d'un canal intracellulaire stable grâce à la formation de patch d'actine des deux côtés du canal intercytoplasmique (Steigemann et al., 2009). De plus Aurora B phosphoryle un des composants du complexe ESCRT-III (CHMP4C, pour *Charged Multivesicular body Protein 4C*), conduisant à l'inhibition de l'activité du complexe et au retard de l'abscission (Carlton et al., 2012). Ainsi l'activité d'Aurora B permet de stabiliser le sillon d'invagination et de retarder l'abscission en présence de chromatine dans le sillon de clivage afin de donner le temps pour la résolution de ces ponts de chromatine.

b. Le point de contrôle de la tétraploïdie

Le point de contrôle de la tétraploïdie a été suggéré par de nombreux travaux, et notamment ceux du groupe d'Andreassen (Margolis et al., 2003). Leurs études ont mis en évidence que des fibroblastes normaux, traités par la cytochalasine D (un déstabilisateur de la polymérisation de l'actine), peuvent former des cellules tétraploïdes. De plus ces cellules tétraploïdes subissent un arrêt en phase G1 alors que les cellules diploïdes au sein de la même population cellulaire continuent de proliférer (Andreassen et al., 2001).

Cette hypothèse a été controversée par deux groupes indépendants qui ont montré que l'utilisation de doses plus faibles de cytochalasine D, ou d'autres agents inducteurs de défaut de cytokinèse (tels qu'un inhibiteur de myosine II) ne permettent pas d'avoir un arrêt en phase G1 des cellules tétraploïdes (Uetake and Sluder, 2004; Wong and Stearns, 2005).

Ces deux observations contradictoires ont finalement été réconciliées récemment, car il a été montré que la tétraploïdisation n'impose pas nécessairement un arrêt en phase G1, mais qu'elle induit une accumulation graduelle de l'expression de p53 et donc de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21. Ce serait alors le niveau d'expression de p21 qui, lorsqu'il est suffisant, empêche l'entrée en phase S par inhibition du couple de cycline CDK2/cyclineE qui ne peut pas phosphoryler pRb et induit l'arrêt en phase G1. Ces résultats suggèrent ainsi que le contexte cellulaire initiale (en particulier le niveau de stress initiale) pourrait expliquer que toutes les cellules ne soient pas arrêtées en phase G1 (Ganem et al., 2014).

5. Dérégulation des points de contrôle dans les cancers

a. **Dérégulation du point de restriction**

Dans les tumeurs, les cellules cancéreuses prolifèrent constamment et ce même lorsqu'elles sont dans des conditions non favorables à la prolifération (manque de nutriments, hypoxie, absence de facteurs mitogènes). Cette prolifération incontrôlée est le résultat de déficiences du point de restriction. En particulier, des mutations inhibitrices ou méthylation du promoteur de pRb sont souvent retrouvées dans les cancers (Goodrich, 2006). Une surexpression de la cycline D (par amplification du gène, ou par activation constitutive des voies de signalisation mitogénique), ou encore une surexpression du facteur de transcription E2F permettent aussi de court-circuiter le point de restriction (Malumbres and Barbacid, 2009).

Pour toutes ces raisons, le point de contrôle des dommages à l'ADN mais également le point de contrôle de la tétraploïdie sont déficients dans les cancers. Ces déficiences sont la cause d'une grande instabilité génomique et chromosomique, et accélèrent le processus de progression tumorale. Ces déficiences posent également un problème dans la réponse aux traitements anti-cancéreux. En particulier, de nombreux agents anti-cancéreux dont ceux qui interagissent avec les microtubules (tels que les taxoïdes) et ceux qui induisent des dommages à l'ADN (tels que les rayons X, l'étoposide ou le cisplatine) peuvent induire la formation de cellules tétraploïdes dans des lignées de cellules cancéreuses. Ces cellules

tétraploïdes, en échappant au point de contrôle de la tétraploïdie peuvent alors continuer leur cycle cellulaire et devenir polyploïdes (Erenpreisa et al., 2008; Ivanov et al., 2003; Panvichian et al., 1998; Shen et al., 2013).

Initialement, ces cellules polyploïdes étaient considérées comme incapables de proliférer et donc considérées comme un avantage thérapeutique. Cependant, de plus en plus d'études suggèrent que ces cellules polyploïdes peuvent donner naissance à des clones de cellules presque diploïdes qui sont capable de prolifération importante *in vitro*, mais aussi de croissance tumorale *in vivo* (Puig et al.; Vitale et al., 2010). Des études ont même montré qu'une seule cellule polyploïde est capable de générer des sphéroïdes *in vitro* et de générer des tumeurs métastatiques *in vivo*. De plus les cellules presque diploïdes générées à partir des cellules polyploïdes présentent des propriétés de résistance vis-à-vis de la chimiothérapie (Weihua et al., 2011).

L'ensemble de ces résultats suggère donc que les cellules presque diploïdes, issues de la régénération des cellules polyploïdes, peuvent être la causes des rechutes des traitements anti-cancéreux et constituent des cibles thérapeutiques importantes (Coward and Harding, 2014; Erenpreisa and Cragg, 2013).

b. Les protéines de la famille de p53

Parmi les mutations de la voie des DDR dans les cancers, le gène codant pour la protéine p53 est très fréquemment muté (dans deux tiers des cancers humains), et sa perte est associée à une grande instabilité génomique (Olivier et al., 2010). En effet, la protéine p53 est un acteur majeur dans l'activation du point de contrôle en phase G1, et peut également être activé au point de contrôle en phase G2. Elle participe alors, *via* son activité de facteur de transcription, à l'établissement de l'arrêt du cycle cellulaire (en induisant l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21) et à l'activation des mécanismes de réparation.

Mais elle peut également induire l'expression de très nombreux gènes impliqués dans la mort cellulaire (tels que BAX, NOXA, PUMA...) (pour revue Nicolai et al., 2015). Il existe donc un système de régulation très complexe qui se met en place lorsque p53 est stabilisé afin que les dommages de l'ADN réparables ne conduisent pas à la mort cellulaire, alors qu'un

niveau de dommage à l'ADN plus élevé ne pouvant pas être réparé mène à la mort cellulaire. Ainsi, des cellules cancéreuses déficientes pour p53 présentent des défauts d'induction de la mort cellulaire en réponse à des dommages à l'ADN, et favorisant l'instabilité génomique. De plus ces cellules cancéreuses présentent souvent des résistances à la mort cellulaire induite par de nombreux agents anti-cancéreux (tels que le cisplatine, le témolozomide, la doxorubicine...) (Hientz et al., 2016).

En revanche, p53 fait partie de la famille des protéines p53, qui comprend deux autres homologues, p63 et p73. A la différence de p53, p63 et p73 sont rarement mutés dans les cancers. En réponse à des dommages à l'ADN, les protéines p63 et p73 sont aussi stabilisées et peuvent également induire l'expression de gènes dont les protéines sont impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de la mort cellulaire (Dohn et al., 2001; Guo et al., 2009; Vayssade et al., 2005; Zhu et al., 1998). Ces protéines constituent donc des acteurs essentiels dans la réponse des cellules cancéreuses déficientes pour p53 aux dommages à l'ADN induits par les chimiothérapies, en effet leur activité permet d'expliquer les réponses partielles aux chimiothérapies en absence de p53.

II) Devenir cellulaire après des dommages à l'ADN

A. Les différents destins cellulaires suite à des dommages à l'ADN

Nous venons de voir qu'en présence de dommages de l'ADN, les points de contrôle des dommages de l'ADN sont activés pour induire un arrêt du cycle cellulaire et donner le temps à la cellule de réparer son ADN. Une fois l'ADN réparé, les mécanismes activés par la voie de DDR sont inhibés et la cellule peut reprendre son cycle cellulaire normalement (Shaltiel et al., 2015). En revanche, lorsque les dommages sont graves, l'ADN n'est pas suffisamment réparé, l'arrêt du cycle cellulaire se prolonge et la cellule devra alors choisir entre s'adapter aux dommages et survivre, entrer dans une phase de sénescence (arrêt définitif du cycle cellulaire) ou alors mourir (Roos et al., 2016).

Il existe différents types de mort cellulaire dont les caractéristiques sont définies et régulièrement mises à jour par le comité de nomenclature de la mort cellulaire (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD) (Galluzzi et al., 2018). Ce comité définit en particulier des morts cellulaires dites programmées qui dépendent de l'activation de voies de signalisation dans la cellule. La mort cellulaire programmée est un processus physiologique, indispensable au développement embryonnaire et au maintien de l'homéostasie tissulaire. Mais elle peut également survenir en réponse à un stress cellulaire tel que les dommages irréparables de l'ADN.

Les trois types de mort cellulaire régulés qui ont été les plus étudiés sont l'apoptose, la mort cellulaire autophagique et la nécrose.

L'apoptose, (anciennement dénommée mort cellulaire de type I). Elle peut être intrinsèque ou extrinsèque selon l'origine du signal de mort. Le processus apoptotique est défini par un maintien de l'intégrité de la membrane plasmique et de l'activité métabolique jusqu'à la mort de la cellule. Elle a été décrite pour la première fois par Kerr et al. et présente des caractéristiques morphologiques particulières telles que la contraction du cytoplasme, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN, la fragmentation du cytoplasme dans des corps apoptotiques, ainsi qu'une externalisation de la phosphatidylsérine (un phospholipide) sur le feuillet externe de la membrane plasmique.

L'ensemble de ces changements morphologiques sont initiés par l'activation de caspases (Kerr et al., 1972).

La mort cellulaire dépendante de l'autophagie (historiquement désignée comme mort cellulaire de type II). Comme nous le verrons plus loin dans ce manuscrit, l'autophagie est un processus permettant la dégradation de constituants intracellulaires par la voie lysosomale. Au cours de ce processus de mort cellulaire dépendante de l'autophagie, le cytoplasme subit une vacuolisation importante, et les mécanismes impliqués dans la mort cellulaire reposent sur la machinerie autophagique. Ce type de mort cellulaire n'a été observé que dans très peu de contextes spécifiques (Fulda, 2017).

La nécrose (ou encore mort cellulaire de type III) qui ne présente aucune des caractéristiques des types I et II de la mort cellulaire. Elle est caractérisée en particulier par une augmentation du volume cellulaire, un gonflement des organites, une dilatation de l'enveloppe nucléaire, ainsi qu'une rupture précoce de la membrane plasmique associée à une libération du contenu intracellulaire dans l'environnement cellulaire. Ce type de mort cellulaire a longtemps été considéré comme un phénomène passif, cependant de nombreux types de mort nécrotiques sont aujourd'hui reconnus pour être régulés. C'est le cas notamment de la nécroptose, la ferroptose, la parthanatose...

Le choix de la cellule de survivre ou de mourir, mais également le choix du type de mort cellulaire en réponse à des dommages à l'ADN sont dépendants de nombreux facteurs. Dans cette partie, nous présenterons les mécanismes de la sénescence, de la mort cellulaire apoptotique qui sont les deux destins cellulaires les plus décrits en réponse à des traitements anticancéreux.

B. La sénescence

1. Généralités sur la sénescence

La sénescence cellulaire est un état d'arrêt du cycle cellulaire permanent, qui s'accompagne de changements métaboliques et morphologiques importants. La sénescence est associée à

une morphologie large et aplatie, une absence de prolifération, ainsi qu'une polynucléation de certaines cellules qui est assez fréquemment observée (pour revue Kuilman et al., 2010). La sénescence est également caractérisée sur le plan moléculaire par l'expression de marqueurs témoins d'un arrêt du cycle cellulaire (tels que p21, p16 et p27) et de l'activation de la voie de réponse aux dommages à l'ADN (phosphorylation d'ATM, CHK2, de γ H2AX...). Il a également été mis en évidence qu'une des caractéristiques des cellules sénescents est l'augmentation de l'activité de l'enzyme lysosomale β -galactosidase associée à la sénescence (SA- β -gal) à un pH sub-optimal (pH 6) (Dimri et al., 1995). L'augmentation de l'activité de cette enzyme est liée à une augmentation de la masse lysosomale et donc une expression plus importante de l'enzyme au cours de la sénescence (Kurz et al., 2000). Cette caractéristique est largement utilisée pour mettre en évidence la sénescence cellulaire suite à l'ajout d'un substrat de l'enzyme (le X-gal) qui lorsqu'il sera clivé par la SA- β -gal conduira à la formation d'un précipité bleu.

Les cellules sénescents sont arrêtées dans le cycle cellulaire mais, à la différence des cellules quiescentes, elles restent métaboliquement actives. Elles subissent des changements importants de l'organisation de la chromatine et de l'expression des gènes, et développent ainsi un phénotype sécrétoire appelé SASP (*Senescence Associated Secretory Phenotype*). Ce phénotype permet alors la sécrétion de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, des facteurs de croissances et des métalloprotéases (Young and Narita, 2009).

Il est important de noter qu'il est nécessaire d'observer plusieurs de ces caractéristiques pour établir le phénotype sénescents des cellules, car pris individuellement ces marqueurs ne sont pas suffisants.

2. Mécanismes moléculaires de la sénescence

Selon le signal initial responsable de l'induction de la sénescence, elle peut être caractérisée de sénescence réplivative ou prématurée. La sénescence réplivative est liée au raccourcissement des télomères à la suite de plusieurs cycles de division cellulaire. La sénescence prématurée est induite par des signaux de stress, dont en particulier des signaux

de stress oncogénique, de stress oxydant, et aussi de stress induit par des agents thérapeutiques (dont des agents inducteurs de dommages à l'ADN ou de dysfonction télomérique).

L'activation de la sénescence, qu'elle soit répllicative ou prématurée passe en générale par l'induction de dommages à l'ADN et donc à l'activation des mécanismes de DDR.

a. La sénescence répllicative

La sénescence répllicative correspond à l'arrêt permanent du cycle cellulaire, pour des cellules primaires, après un certain nombre de divisions. Elle a été décrite pour la première fois par Hayflick et Moorhead et a été assez rapidement associée au processus de vieillissement et de carcinogénèse (Hayflick, 1965; Hayflick and Moorhead, 1961).

Cette sénescence traduit une capacité limitée de prolifération pour des cellules primaires en culture, et « l'horloge moléculaire » déterminant le nombre de divisions qu'une cellule peut réaliser est représentée par la taille des télomères. En effet, à chaque cycle de division cellulaire, l'ADN polymérase ne parvient pas à répliquer totalement l'extrémité télomérique du brin retardé, causant ainsi une érosion des télomères (Bodnar et al., 1998).

Or, la fonction du télomère est de protéger l'extrémité des chromosomes grâce à l'association d'un complexe de protéines avec l'ADN télomérique, appelé complexe *shelterin*. Ce complexe empêche la reconnaissance de l'extrémité chromosomique comme un signal de DSB (puisque cette extrémité est repliée dans un capuchon télomérique), et les protéines de ce complexe jouent un rôle inhibiteur vis-à-vis de la voie des DDR (voir partie VI-B.1 de ce manuscrit pour plus de détails sur ces processus).

Ainsi, des télomères trop courts empêchent la formation du complexe *shelterin*, laissant libre les extrémités chromosomiques, conduisant à l'activation de la voie des DDR, l'augmentation de l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 et l'entrée en sénescence (Figure 9) (d'Adda di Fagagna et al., 2003).

b. La sénescence prématurée

La dysfonction télomérique qui survient alors que la taille des télomères n'est pas limitante peut également induire la sénescence, qui est alors prématurée. Elle est le résultat d'une

perturbation de la structure du complexe *shelterin* qui ne peut donc plus protéger l'extrémité des chromosomes. Ce phénomène peut être causé notamment par certains agents anti-prolifératifs qui induisent alors l'activation de la voie des DDR et la sénescence. Nous aborderons plus en détail les causes de la dysfonction télomérique dans la partie IV-B.

Un stress oncogénique peut également être à l'origine de l'induction de la sénescence prématurée. En particulier, il a été montré qu'une surexpression de Ras, Raf ou MEK, ou l'inactivation par exemple du gène suppresseur de tumeur PTEN conduisent à une induction de la sénescence (Chen et al., 2005b; Lin et al., 1998; Michaloglou et al., 2005; Serrano et al., 1997). Dans ce contexte, c'est la prolifération intensive des cellules qui génère un stress réplicatif, conduisant à un arrêt des fourches de réplication, l'activation de la voie des DDR qui induit un arrêt du cycle cellulaire et la sénescence (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006).

De plus, la suractivation de ces oncogènes a été liée à une augmentation du stress oxydant qui est à l'origine de l'induction de la sénescence. En effet une production trop élevée de ROS peut être responsable de dommages à l'ADN et donc potentiellement inducteurs de la sénescence (Kodama et al., 2013).

c. Les voies de signalisation responsables de l'induction de la sénescence

L'entrée en sénescence est classiquement associée à un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire, mais des travaux récents suggèrent que la sénescence peut aussi se mettre en place à partir d'un arrêt en phase G2 (Gire and Dulic, 2015). La sénescence induite en réponse à divers stimuli est conduite par l'activation d'une des deux voies de signalisation qui conduisent à l'expression d'inhibiteurs de CDK pour arrêter le cycle cellulaire. Ces deux voies de signalisation sont la voie p53/p21 et la voie p38MAPK/p16/pRb (Figure 9).

L'activation de la voie p53/p21 dans l'établissement de la sénescence est généralement le résultat de l'induction de la sénescence en réponse à des dommages à l'ADN. C'est cette voie de signalisation qui est activée au cours de la sénescence répllicative, d'un dysfonctionnement des télomères, d'un stress réplicatif, ou bien en réponse à des agents génotoxiques (tels que certains agents anti-cancéreux) (Cosme-Blanco et al., 2007; Herbig et

al., 2004; Krenning et al., 2014). Comme nous l'avons vu précédemment, en réponse à des dommages à l'ADN, p53 est rapidement stabilisé par phosphorylation (par ATM/CHK2 ou ATR/CHK1) et peut alors induire l'expression de p21. L'expression de p21 conduit ainsi à un arrêt du cycle cellulaire par inhibition de multiples complexes CDK/cycline, qui fournit normalement le temps nécessaire pour la réparation des dommages à l'ADN. Cependant, un prolongement de cet arrêt (à causes de dommages trop nombreux ou non réparables) conduit à l'établissement de la sénescence.

L'induction de la sénescence par la voie p38MAPK/p16/pRb fait intervenir une augmentation de l'expression de p16 qui inhibe l'activité des complexes CDK4/cycline D et CDK6/cycline D de la phase G1, empêchant ainsi la phosphorylation initiale de pRb et maintenant l'inhibition du facteur de transcription E2F. Un des mécanismes responsables de l'augmentation de l'expression de p16 pour l'établissement de la sénescence est l'activation de la voie Ras/Raf/MEK (Ohtani et al., 2001). Cette activation conduit à l'induction de l'expression du facteur ATF3 qui est alors responsable de l'inhibition de l'expression d'Id-1 (*Inhibitor of DNA binding*). Il s'agit d'un inhibiteur des facteurs de transcription tels que Ets1 et Ets2. Ainsi l'activité de ces facteurs de transcription est stimulée par l'activation de la voie MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), et ils sont alors responsables de l'induction de l'expression de p16.

Il a été décrit que l'activation prolongée de la voie de la p38MAPK est impliquée dans l'établissement du phénotype de SASP de façon indépendante d'ATM, *via* l'activation du facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear Factor-Kappa B*) (Freund et al., 2011).

Il est intéressant de noter qu'il existe un lien entre l'activation de la voie des DDR et la voie p38MAPK/p16/pRb. En effet, il a été décrit qu'ATM et ATR sont capables d'activer la p38MAPK (Reinhardt et al., 2007). De plus l'activation de la p38MAPK est aussi responsable d'une stabilisation de l'ARNm de p21 conduisant à une augmentation de son expression (Lafarga et al., 2009).

Une autre voie de signalisation impliquée dans l'établissement du phénotype SASP a récemment été décrite et dépendrait de l'activité du facteur de transcription GATA4 qui est régulé par la voie des DDR et active aussi en aval le NF- κ B (Kang et al., 2015).

Ainsi, l'activation prolongée de l'ensemble de ces voies en réponse à des agents génotoxiques (comme des anti-cancéreux) conduit à l'établissement du phénotype de sénescence et à un arrêt de la prolifération des cellules.

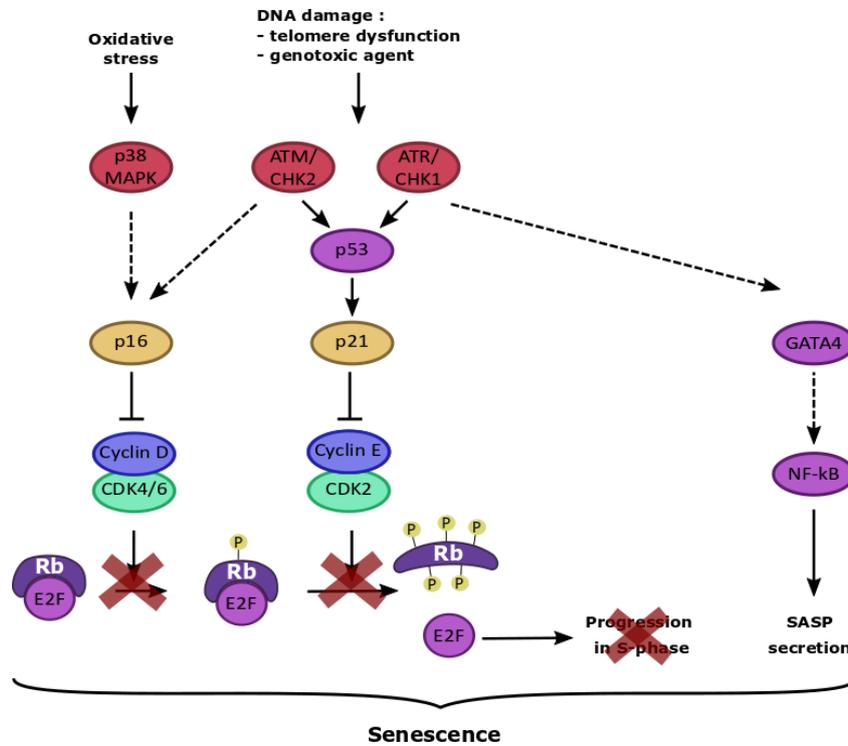


Figure 9 : Voies de signalisation impliquées dans l'établissement de la sénescence

La convergence des signaux conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire et à la sécrétion des SASP mène à l'établissement de la sénescence en réponse à des signaux de stress. Les protéines en rouge représentent les kinases en amont des voies de signalisation impliquées dans la sénescence, en violet les facteurs de transcription, en jaune les inhibiteurs des complexes CDK/Cycline. Les flèches en pointillées indiquent un lien indirecte.

3. Sénescence et cancer

a. La sénescence comme barrière à la tumorigénèse

La sénescence joue un rôle de barrière à la progression tumorale. En effet, la sénescence répliquative et celle induite par un stress oncogénique empêchent respectivement une prolifération indéfinie des cellules et une prolifération intensive (Braig et al., 2005). C'est également le mécanisme qui permet l'arrêt définitif de la prolifération des cellules tétraploïdes et qui permet de limiter l'instabilité chromosomique qui surviendrait si ces cellules réalisaient de nouveaux cycles de division (Erenpreisa and Cragg, 2013).

C'est ainsi qu'au cours de la progression tumorale, la cellule cancéreuse parvient à surmonter la sénescence répliquative, notamment en activant des mécanismes qui permettent d'allonger les télomères. Très souvent les cellules cancéreuses réexpriment ainsi la sous-unité catalytique hTERT de la télomérase. Dans les rares cas où la télomérase n'est pas réactivée, l'allongement des télomères dépend d'un mécanisme alternatif (ALT, pour *Alternative Lengthening of Telomere*) (pour revue Jafri et al., 2016).

La progression tumorale conduit également à l'inhibition des voies de signalisation impliquées dans la sénescence, en particulier par des mutations inactivatrices des protéines p53 et pRb, ou encore par une sous-expression des inhibiteurs du cycle cellulaire.

De plus, comme nous l'avons dit précédemment, les cellules sénescents sont métaboliquement actives et produisent notamment des cytokines pro-inflammatoires du SASP qui seront relâchées dans l'environnement tumoral. Des études ont montré que ces cytokines jouent un rôle anti-tumoral, en maintenant le phénotype sénescents des cellules tumorales elles même (Acosta et al., 2008), et en favorisant l'enlèvement des cellules tumorales sénescents par le système immunitaire inné ou adaptatif (Kang et al., 2011; Xue et al., 2007).

Cependant, dans certains contextes, il a été décrit que la réponse inflammatoire liée à la sénescence favorise la croissance tumorale (Pribluda et al., 2013).

Ces données suggèrent donc bien que le rôle des cytokines du SASP et de la sénescence dans la tumorigenèse est très complexe, et peut dépendre de nombreux facteurs (pour revue Ruhland et al., 2016).

b. La sénescence dans la réponse aux traitements anti-cancéreux

Bien que les cellules tumorales semblent s'être affranchies des mécanismes qui permettent l'induction de la sénescence, la présence de cellules sénescents a été observée assez tôt dans des tumeurs non déficientes pour p53, issues de patients traités par de la chimiothérapie (Poele et al., 2002). Par la suite, de nombreuses autres études ont confirmé que les cellules cancéreuses peuvent effectivement entrer en sénescence (pour revue Gewirtz et al., 2008).

Le rôle de p53 dans l'induction de la sénescence en réponse aux traitements anti-cancéreux est assez controversé. En effet, p53 est souvent muté dans les cancers, et de nombreuses études ont montré que des cellules déficientes pour p53, traitées avec des agents qui induisent la sénescence dans des cellules non mutées pour p53, ne parviennent pas à induire la sénescence et s'orientent vers la mort cellulaire (Chang et al., 1999a; Elmore et al., 2002; Jones et al., 2005).

Pourtant d'autres études ont pu mettre en évidence une induction de la sénescence même lorsque p53 n'est pas fonctionnel (Chang et al., 1999b, 2002; Roberson et al., 2005). Cette induction de la sénescence indépendante de p53, en réponse à des dommages à l'ADN, peut notamment s'expliquer par l'augmentation de l'expression de p21 *via* la p38MAPK en aval de l'activation d'ATM et d'ATR (Lafarga et al., 2009; Reinhardt et al., 2007).

Il semblerait donc que l'induction de la sénescence dans les cellules déficientes pour p53 soit très dépendante du contexte, potentiellement dépendante du type cellulaire ou du type de traitement.

Du fait de la caractéristique des cellules sénescents d'induire un arrêt définitif de la prolifération cellulaire, il était initialement admis que l'induction de la sénescence par les thérapies anti-cancéreuses soit une bonne stratégie thérapeutique. Cependant il est important de noter que la sénescence peut constituer un mécanisme de résistance de la tumeur à la chimiothérapie, potentiellement responsable des rechutes des patients. En effet, en plus de jouer un rôle sur la progression tumorale, les cytokines du SASP peuvent aussi influencer la réponse aux agents anti-cancéreux, en particulier *via* la génération d'un microenvironnement immunosuppresseur (Toso et al., 2014).

De plus, une des caractéristiques des cellules sénescents est l'accumulation de plusieurs noyaux, et donc d'une polyploidie qui a la capacité de régénérer des cellules presque diploïdes à caractère très tumorigène (Weihua et al., 2011). Et de plus en plus de données montrent que l'induction de la sénescence par les thérapies anticancéreuses, peut en fait être réversible et régénérer des cellules souches cancéreuses (Erenpreisa and Cragg, 2013; Puig et al.; Sabisz and Skladanowski, 2009; Sliwinska et al., 2009).

Ainsi la sénescence associée aux tumeurs possède un double rôle, à la fois anti- et pro-tumoral, et participerait à la résistance aux traitements anti-cancéreux. Il semblerait que la

détermination de ces rôles soit très dépendante du contexte tumorale, de la nature des cytokines du SASP qui sont produites et du microenvironnement tumoral (Lecot et al., 2016; Schosserer et al., 2017).

C. L'apoptose en réponse à des dommages à l'ADN

1. Généralités sur l'apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire physiologique qui se déroule au cours du développement embryonnaire, mais également chez l'adulte où il participe à l'homéostasie tissulaire en maintenant le nombre de cellules approprié. L'apoptose joue aussi un rôle anti-tumoral très important en éliminant les cellules endommagées pré-néoplasiques (Galluzzi et al., 2018).

Les caspases (cysteine-aspartic protease) sont les protéines clés de la machinerie apoptotique intrinsèque et extrinsèque. Les caspases impliquées dans l'apoptose sont classés en deux sous-types : les caspases initiatrices (caspase 2, 8, 9 et 10), et les caspases effectrices (caspases 3, 6 et 7). Les deux types d'apoptose, intrinsèque ou extrinsèque, sont activés par des signaux distincts, mais convergent vers une voie de signalisation commune d'activation des caspases effectrices et l'activation des protéines impliquées dans les changements morphologiques observés au cours de l'apoptose (pour revue Taylor et al., 2008).

2. Apoptose intrinsèque

La voie intrinsèque (Figure 10b) fait intervenir la mitochondrie comme centre intégrateur de signaux pro- et anti-apoptotiques. Les régulateurs de l'apoptose intrinsèque sont les membres de la famille BCL-2 (Czabotar et al., 2014). Les protéines de cette famille peuvent être classées selon deux catégories, les pro-apoptotiques (BAX, BAK, BOK, BID, BIM, PUMA, NOXA...) et les anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-XL et MCL-1).

L'apoptose intrinsèque est sous le contrôle de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP, pour *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*).

Le mode de fonctionnement des protéines de la famille BCL-2 dans l'induction ou l'inhibition de l'apoptose se fait par différentes stratégies :

- Les membres pro-apoptotiques BAX et BAK, qui se trouvent sur la membrane mitochondriale externe et favorisent la MOMP. Bien que le rôle de BAX et BAK dans l'activation de la MOMP est largement admis, les mécanismes qui sont responsables de l'activation de la MOMP par BAX et BAK ne sont pas connus, en particulier la composition moléculaire de la structure de perméabilisation ne fait pas consensus dans la communauté scientifique. Les preuves manquent afin de savoir s'il s'agit d'un pore lipidique ou protéique qui se forme dans la membrane mitochondriale (pour revue Borner and Andrews, 2014).
- Les membres anti-apoptotiques se lient et inactivent BAX et BAK pour empêcher la MOMP
- Les membres pro-apoptotiques (autres que BAX et BAK) ont alors deux stratégies. La première est d'interagir directement avec BAX et BAK pour les activer. La deuxième est d'interagir avec les anti-apoptotiques pour empêcher leur action inhibitrice sur BAX et BAK.

Ce sont donc les nombreuses interactions entre les membres de cette famille BCL-2 qui vont réguler la MOMP. Ainsi, la balance de l'activité entre les membres anti- ou pro-apoptotique (par régulation de leur niveau d'expression ou par modification post-traductionnelle) va être un facteur déterminant dans le choix de la cellule d'entrer en apoptose ou pas.

Cette voie de l'apoptose peut être activée en réponse à de nombreux stimuli tels qu'une augmentation du calcium ou des ROS intracellulaires, et en réponse à de nombreux agents induisant des dommages à l'ADN. En particulier, en réponse à des dommages à l'ADN, la stabilisation de p53 joue un rôle très important dans l'activation de l'apoptose en induisant l'expression de nombreux gènes pro-apoptotique (dont les membres de la famille BCL-2 PUMA, BAX, NOXA, BAD) et réprime l'expression de l'anti-apoptotique BCL-2 (pour revue Ho and Benchimol, 2003; Yu and Zhang, 2005). Ainsi, la stabilisation de p53 va conduire à

déséquilibrer la balance entre les pro- et les anti-apoptotiques en faveur d'une activation de l'apoptose.

Une fois que le choix de la mort cellulaire est fait, la MOMP va conduire à une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) ainsi qu'à une sortie du cytochrome C et des protéines Smac/DIABLO (*second mitochondrial derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis proteins binding protein*).

Le cytochrome C a une fonction physiologique dans la chaîne de transport des électrons mitochondriale lors de la production d'ATP. Son relargage dans le cytoplasme va conduire à son association avec APAF1 (*apoptosis protease activating factor-1*) induisant un changement de conformation qui permet alors le recrutement des pro-caspases 9 via leur domaine CARD (*Caspase Activation and Recruitment Domain*) sous forme d'un héptamère. Cette structure est alors appelée apoptosome et favorise l'auto clivage des caspases 9 qui vont alors initier la cascade d'activation des caspases effectrices (Li et al., 1997). Les clivages de nombreuses cibles des caspases (telles que l'actine, les lamines nucléaires, PARP, l'inhibiteur de nucléases activé par les caspases ICAD) est responsable de l'exécution du programme apoptotique, permettant les changements morphologiques observés pendant l'apoptose.

La libération de Smac/DIABLO en parallèle va conduire à son interaction inhibitrice avec des IAP (*inhibitor of apoptosis*), dont le rôle est d'inhiber l'activité protéolytique des caspases (Chai et al., 2000). Ainsi, l'inhibition des IAP par Smac/DIABLO conduit à une amplification de la signalisation apoptotique.

Il est intéressant de noter que dans certaines circonstances de dommages à l'ADN, la mort cellulaire peut survenir au cours de la mitose à la suite d'un processus de catastrophe mitotique. La catastrophe mitotique est un mécanisme qui empêche la prolifération ou la survie de cellules qui ne réussissent pas à terminer leur mitose. Cette catastrophe mitotique peut être causée par des dommages à l'ADN trop importants, ou une machinerie mitotique déficiente (Galluzzi et al., 2018). Cette mort cellulaire est en particulier observée pour de nombreuses cellules tétraploïdes qui entrent en mitose (Gascoigne and Taylor, 2009; Puig et al., 2008).

La mort cellulaire associée à la catastrophe mitotique conduit très souvent à une forme de mort apoptotique intrinsèque, médiée par la caspase 2, les membres de la famille BCL-2 qui conduisent à la MOMP et la libération du cytochrome C dans le cytoplasme (Castedo et al., 2004; Dawar et al., 2017). Mais dans certains contextes la mort cellulaire mitotique peut présenter des caractéristiques de mort de type nécrotique (Mansilla et al., 2006).

3. Apoptose extrinsèque

La voie extrinsèque (Figure 10a) est activée en réponse à la fixation de ligands sur des récepteurs transmembranaires à domaine de mort, dont le CD95, le TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*), les récepteurs du ligand TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). L'interaction avec leur ligand va conduire à une modification conformationnelle et un regroupement des récepteurs, permettant alors l'interaction homotypique entre les domaines d'interaction de mort (DD pour *Death Domain*) de ces récepteurs et de plusieurs protéines adaptatrices FADD (Chinnaiyan et al., 1995; Kischkel et al., 2000). Ces protéines FADD pourront à leur tour recruter de nombreuses caspases 8 et 10 via leur domaine DED (*Death Effector Domain*).

L'ensemble de ces facteurs recrutés au niveau du récepteur constitue ainsi le DISC (*Death Inducing Signaling Complex*) et favorise alors une concentration importante de caspases 8 et 10 qui procèdent à un auto-clivage activateur (Dickens et al., 2012; Schleich et al., 2012). Les caspases initiateuses ainsi activées activeront à leur tour par clivage des caspases effectrices, conduisant à l'activation du programme apoptotique comme au cours de l'apoptose intrinsèque.

Une coopération entre la voie apoptotique extrinsèque et la voie apoptotique intrinsèque a été mise en évidence. En effet, la caspase 8 active est capable de cliver la protéine BID, ce qui favorise sa localisation au niveau de la mitochondrie, et pourra activer BAX et BAK et favoriser l'apoptose (Gross et al., 1999; Huang et al., 2016). Ainsi, au cours de l'apoptose extrinsèque, la balance entre les niveaux d'anti- et de pro-apoptotiques, ainsi que le niveau d'activation des récepteurs par leurs ligands va conduire au déclenchement de l'apoptose ou non.

4. La mort cellulaire indépendante des caspases (CICD)

Alors que les caspases sont les protéines clés de l'exécution de l'apoptose, il a tout de même été décrit dans de nombreux contextes qu'en absence de caspases fonctionnelles, les cellules meurent tout de même en réponse à des stimuli connus pour induire l'apoptose (Borner and Monney, 1999; Déas et al., 1998; Jäättelä and Tschopp, 2003). Ce type de mort a alors été défini comme une mort indépendante des caspases (CICD pour *caspase-independent cell death*). Ce mécanisme ne fait pas intervenir d'externalisation de la phosphatidylsérine, ni de condensation globale de la chromatine. Les cellules subissant la CICD présentent souvent une vacuolisation importante de leur cytoplasme, avec de nombreux autophagosomes, et une condensation nucléaire périphérique (Giampazolias et al., 2017; Tait and Green, 2008; Tait et al., 2014).

La CICD a notamment été décrite en réponse à l'activation de récepteurs à domaine de mort par les ligands TNF ou FasL (Cauwels et al., 2003; Holler et al., 2000). Cette forme de CICD est alors appelée nécroptose, elle fait intervenir les kinases RIPK1, RIPK3 et MLKL qui conduisent à la perméabilisation de la membrane plasmique (Sun et al., 2012).

Mais elle a aussi été décrite à la suite de l'activation de la voie de l'apoptose intrinsèque. En effet, il est admis que le point de non retour est constitué par la MOMP car, en plus de conduire à la libération du cytochrome c et de Smac/DIABLO, la protéine AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) est également relâchée dans le cytoplasme. AIF est alors transloquée dans le noyau et conduit à la condensation de la chromatine et la perte d'ADN de façon indépendante des caspases (Delettre et al., 2006; Sevrioukova, 2011).

La mort cellulaire par CICD peut également dépendre de la perte progressive de la capacité de la mitochondrie à assurer ses fonctions respiratoires à la suite de la MOMP dans un contexte d'inhibition des caspases (Lartigue et al., 2009).

Il faut noter cependant qu'il existe bien d'autres types de mort cellulaires indépendantes des caspases (comme la LMP, la mort cellulaire autophagique, la ferroptose...) mais ne sont pas regroupées sous le terme de CICD. En effet ce terme est spécifiquement lié à une mort

induite à la suite de la perméabilisation de la membrane mitochondriale et à l'inactivation des caspases (Tait et al., 2014).

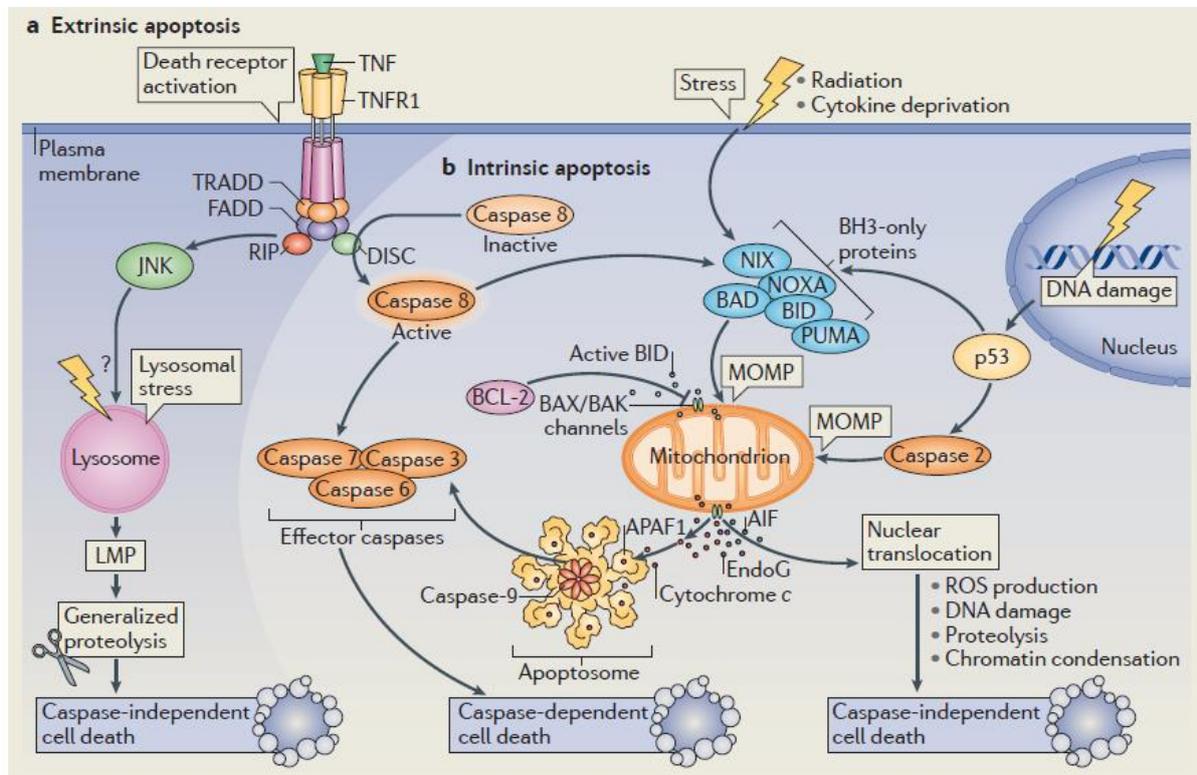


Figure 10 : Mécanismes moléculaires de l'apoptose

L'apoptose peut être activée par voie extrinsèque (a) *via* l'activation de récepteurs à domaine de mort ; ou par voie intrinsèque (b) sous le contrôle de la perméabilisation de la membrane mitochondriale (MOMP, pour *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization*). L'activation des caspases est le point de convergence entre les signaux de ces deux voies et mène à la mort cellulaire. En absence de caspases fonctionnelles les signaux inducteurs de mort conduisent à l'activation de voies de mort cellulaire indépendantes des caspases (CICD pour *caspase-independent cell death*) (Mariño et al., 2014).

5. Choix de l'apoptose ou la sénescence suite à des dommages à l'ADN

Comme nous l'avons déjà évoqué, l'activation des points de contrôle des dommages à l'ADN conduit à des signaux contradictoires à la fois de survie (activation de voies de réparation des dommages de l'ADN, arrêt du cycle cellulaire et induction de la sénescence) et de mort (induction de l'expression de nombreux facteurs pro-apoptotiques). Le choix de la cellule d'entrer en sénescence ou de mourir semble dépendant de la balance entre l'induction des

facteurs pro-survie et pro-mort par les voies de réponse des dommages à l'ADN (pour revue Roos et al., 2016).

a. La protéine p53 dans le choix de la sénescence ou de l'apoptose

La protéine p53 est impliquée dans l'expression de nombreux facteurs pro-survie et pro-mort. Le choix de l'expression de l'un ou l'autre de ces facteurs dépend notamment du profil d'expression de p53, des modifications post-traductionnelles et de de l'intervention d'autres protéines.

En effet, il a été montré qu'en réponse à des dommages à l'ADN, des profils d'expression différents de p53 (oscillatoire ou augmentation stable) sont associés soit à la sénescence, soit à l'apoptose (Chen et al., 2013; Purvis et al., 2012). Ces profils différents peuvent être expliqués par une dynamique d'activation des voies ATM/CHK2 et ATR/CHK1 différente selon l'intensité du dommage, couplée au rétrocontrôle négatif exercé par MDM2 (dont l'expression est induite par p53 une fois qu'il est stabilisé) (Batchelor et al., 2008).

Par ailleurs, p53 présente une affinité différente entre les promoteurs des gènes associés à l'arrêt du cycle cellulaire (et donc pro-survie) et des gènes pro-apoptotiques (Inga et al., 2002). Ceci permettrait d'expliquer qu'un niveau de dommage différent conduit à une dynamique d'expression de p53 particulière, responsable d'une expression différente des facteurs pro-survie/pro-mort et participe ainsi au choix de la sénescence ou de l'apoptose.

De plus, des modifications post-traductionnelles de p53, et en particulier la phosphorylation sur son résidu Ser46, peut conduire spécifiquement à l'induction de gènes pro-apoptotiques tels que NOXA, PTEN, TP53AIP1 (Ichwan et al., 2006; Mayo et al., 2005).

Enfin, p53 interagit avec ses homologues puisqu'il a été montré que les protéines p63 et p73 sont nécessaires pour l'induction de l'apoptose dépendante de p53 en réponse à des dommages à l'ADN (Flores et al., 2002).

b. Le choix de la sénescence ou de l'apoptose dans les cancers

Les cellules cancéreuses, afin de survivre à de nombreuses conditions de stress au cours de la progression tumorale, ont inactivé de nombreux composants de leur machinerie apoptotique, ou bien présentent une balance entre les facteurs pro- et anti-apoptotiques déséquilibrée qui penche en faveur de la survie (pour revue Fernald and Kurokawa, 2013). Ces cellules ont un seuil d'induction de l'apoptose plus élevé que des cellules normales, ce qui pourrait expliquer que les cellules tumorales sont assez résistantes à l'apoptose et ont plus tendance à entrer en sénescence en réponse à des agents chimiothérapeutiques. En effet, il a été montré qu'une sur-expression de BCL-2, de BCL-XL, ou l'inhibition des caspases conduit préférentiellement à l'établissement d'un phénotype sénescence par rapport à l'apoptose (Crescenzi et al., 2003; Rebbaa et al., 2003).

De plus comme nous l'avons déjà évoqué, p53 est souvent muté dans les cancers, ainsi d'autres mécanismes peuvent entrer en jeu dans ces cellules pour moduler le choix de la survie ou de la mort en réponse à des dommages à l'ADN. En particulier, de nombreuses études ont montré qu'en absence de p53, p73 est capable de compenser la fonction de p53 dans l'apoptose (Furuya et al., 2007; Gong et al., 1999; Irwin et al., 2000, 2003; Lissy et al., 2000).

D'autres voies de signalisation comme la voie des MAPK (en particulier JNK et p38MAPK) peuvent être activées en réponse à des dommages à l'ADN. En effet il a été décrit que l'activation de JNK en réponse à une exposition aux UV peut phosphoryler BAX et favoriser l'apoptose intrinsèque (Tournier et al., 2000). Il a également été décrit que JNK et la p38MAPK peuvent conduire à une activation de la voie extrinsèque de l'apoptose en réponse au cisplatine grâce à l'augmentation de l'expression d'un ligand des récepteurs à domaine de mort (le FasL) (Mansouri et al., 2003).

III) Les mécanismes de résistance en réponse à des agents anti-cancéreux

A. Généralités sur les mécanismes de résistance

1. Introduction sur les mécanismes de résistance aux traitements

La chimiothérapie représente un des modes principal de traitement des cancers, mais l'efficacité des chimiothérapies est limitée par la résistance aux agents anti-cancéreux (Bouwman and Jonkers, 2012). Selon le processus de résistance auquel les agents anti-cancéreux font face, l'établissement de la résistance peut être rapide (s'il s'agit de mécanismes généraux de résistance), ou bien un peu plus lent (s'il s'agit de la sélection d'un clone cellulaire qui présente cette propriété de résistance). En effet, les tumeurs présentent un certain degré d'hétérogénéité, ce type de résistance peut donc survenir à la suite de la sélection de sous-clones résistants qui étaient présent initialement (Swanton, 2012).

Les résistances aux chimiothérapies peuvent être divisées en deux catégories, les résistances intrinsèques et acquises. Les résistances intrinsèques pré-existent au traitement chimiothérapeutique. Les résistances acquises se développent à la suite du traitement. Ainsi, des cellules cancéreuses initialement sensibles au traitement peuvent mettre en place des réponses adaptatives qui rendent les traitements inefficaces.

Les mécanismes moléculaires responsables de la résistance aux chimiothérapies dépendent de facteurs génétiques (ou épigénétiques) et du micro-environnement tumoral (Cree and Charlton, 2017; Holohan et al., 2013). Ils peuvent intervenir de façon très variées (modification du transport des agents dans les cellules cancéreuses, mutations des cibles thérapeutiques, activation de voies de signalisation de survie...).

Dans cette partie du manuscrit, nous présenterons quelques-uns des mécanismes de résistance développés par les cellules cancéreuses, en se focalisant essentiellement sur les réponses qui peuvent survenir en réponse à des agents génotoxiques.

2. Les pompes à efflux de drogue

Dans les membranes plasmiques cellulaires, il existe des protéines transmembranaires qui fonctionnent comme des pompes à efflux, capables d'exporter des agents de structure très variées. Il s'agit de protéines de la famille des transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*), ou encore appelées transporteurs de multiples drogues (MDR pour *Multi Drug Resistance*). Ils jouent un rôle important dans l'export de nombreux métabolites cellulaire (acides aminés, peptides, sucres, lipides...) à l'extérieur des cellules. Ils ont également un rôle protecteur vis-à-vis d'une grande variété de toxines, comme par exemple certains agents anti-cancéreux (Vasiliou et al., 2009).

Le premier transporteur MDR, impliqué dans les résistances à de multiples drogues, a été identifié comme la P-glycoprotéine (Pgp, ou encore appelée MDR1) (Gros et al., 1986; Ueda et al., 1986). De nombreux autres transporteurs MDR, impliqués dans les résistances aux thérapies anti-cancéreuses, ont ensuite été identifiés (ABCC1, ABCG2, ABCB5...) (Gottesman and Pastan, 2015; Vasiliou et al., 2009).

Ces transporteurs MDR sont exprimés dans des cellules non tumorales telles que les cellules intestinales, les hépatocytes biliaires ou les cellules épithéliales des tubules proximaux rénaux, où elles participent respectivement à une mauvaise absorption intestinale, une excrétion importante par la bile, ou une excrétion par les urines de ces agents anticancéreux (Gottesman and Pastan, 2015). De plus, il a été montré dans de multiples études que ces transporteurs sont surexprimés dans de nombreux cancers (ovaires, seins, leucémies...) qui deviennent résistants à la chimiothérapie (Gillet et al., 2011; Huff et al., 2006; Pajic et al., 2009).

Malgré le rôle important de ces transporteurs MDR dans les résistances aux chimiothérapies, de nombreux essais cliniques avec différentes classes d'inhibiteurs de ces pompes ont révélé d'importantes toxicités, suggérant que le ciblage de ces transporteur peut s'avérer difficile en thérapeutique (Gottesman and Pastan, 2015).

3. Mutations de la voie de réparation des dommages à l'ADN

De nombreux agents chimiothérapeutiques induisent des dommages à l'ADN soit directement (tels que les agents de platine), ou indirectement (tels que des poisons de topoisomérase). Ainsi la capacité de réparation des cellules cancéreuses joue un rôle majeur dans l'efficacité des agents induisant des dommages à l'ADN.

En particulier, il a été montré dans certains cas que le statut mutationnel de certaines protéines appartenant à la voie de DDR peut moduler la réponse cellulaire aux agents anti-cancéreux. C'est notamment le cas pour la protéine p53 pour laquelle il a été montré que selon son statut d'expression, l'inhibition d'ATM associée à des agents génotoxiques peut conduire à des réponses cellulaires différentes. En effet, dans cette étude, l'inhibition d'ATM conduit à une résistance des cellules proficientes pour p53 en réponse à des agents génotoxiques en raison d'une réduction de l'apoptose dépendante de p53. A l'inverse, des cellules déficientes pour p53 sont sensibilisées par l'inhibition d'ATM à la mort induite par les agents anti-cancéreux en favorisant la catastrophe mitotique (Jiang et al., 2009).

Il a souvent été décrit que les mutations de p53 constituent des mutations faux-sens et altèrent son activité biologique (Levine and Oren, 2009). Et certaines de ces mutations peuvent même avoir un effet dominant négatif sur les protéines p63 et p73, pouvant ainsi réduire ou inhiber la réponse au traitement (Bergamaschi et al., 2003; Lang et al., 2004). Il a également été montré que certains variants de p53 peuvent interagir avec MRE11 (protéine de la réparation des DSB), empêchant ainsi le recrutement du complexe MRN au niveau des DSB et l'activation d'ATM (Song et al., 2007).

Ces résultats montrent qu'il est donc important de prendre en considération à la fois la présence de p53 ainsi que son statut mutationnel afin de pouvoir utiliser la meilleure stratégie thérapeutique.

Nous avons déjà décrit précédemment que dans le cas de déficience dans les voies de réparation des dommages à l'ADN, les cellules tumorales sont plus dépendantes vis-à-vis d'autres voies de réparation, que l'on peut alors inhiber pour tuer spécifiquement les cellules cancéreuses. Dans ce contexte, de nombreuses études ont mis en évidence l'apparition de résistances secondaires suite à des mutations permettant la restauration de

la fonctionnalité de la protéine initialement dysfonctionnelle. En particulier, il a été montré que des tumeurs déficientes pour la réparation par HR (mutés et non fonctionnels pour BRCA2) et résistantes à la thérapie, présentent des mutations qui restaurent partiellement ou complètement la fonction initiale de la protéine. Ces mutations peuvent par exemple conduire à un épissage alternatif qui supprime l'exon muté, ou à une restauration du cadre de lecture initial (Edwards et al., 2008; Sakai et al., 2008).

4. Rôle des voies du NF- κ B et d'AKT dans la résistance à l'apoptose

La résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis de l'apoptose induite par des agents anti-cancéreux est un mécanisme bien connu (Hanahan and Weinberg, 2011). Cette propriété de résistance repose d'une part sur une surexpression des protéines anti-apoptotiques et/ou une sous-expression des protéines pro-apoptotiques. Et d'autre part cette résistance à l'apoptose repose sur l'activation de nombreux mécanismes de survie dont les principaux régulateurs, en réponse à des dommages à l'ADN, sont le facteur de transcription NF- κ B et la kinase AKT (Roos et al., 2016).

En effet, de nombreuses études ont montré un rôle de l'activation du NF- κ B dans la résistance aux anti-cancéreux inducteurs de dommages à l'ADN tels que le cisplatine, l'étoposide, la camptothécine, ou encore le témozolomide (Campbell et al., 2006; Piret and Piette, 1996; Schmitt et al., 2011). Cette activation est dépendante de modifications post-traductionnelles du régulateur de la voie du NF- κ B NEMO (*NF- κ B Essential Modulator*) (Figure 11).

En effet, en réponse à des dommages à l'ADN, NEMO subit d'une part une sumoylation dans le noyau (Mabb et al., 2006), qui peut être dépendante de la poly(ADP-ribose)-polymerase-1 (PARP-1) ou de p53 *via* l'intervention de la protéine PIDD (*p53-induced protein with death domain*) (Janssens et al., 2005; Stilmann et al., 2009). D'autre part, NEMO subit une phosphorylation dépendante d'ATM suivie d'une ubiquitinylation, alors responsable de son export du noyau vers le cytoplasme où il pourra activer le NF- κ B (Wu et al., 2006). L'activation du NF- κ B est ensuite responsable de l'activation de mécanismes pro-survie, notamment grâce à l'expression de gènes pro-survie tels que la cycline D, la survivine (qui

est un membre des IAP), XIAP, BCL-2 ou BCL-XL (McCool and Miyamoto, 2012; Wang et al., 2017).

Bien que le NF- κ B soit souvent associé à des réponses de survie à la suite de stress génotoxiques, il a été décrit qu'il peut aussi conduire à l'activation d'une voie de signalisation pro-apoptotique dans un contexte de stress génotoxique important. En effet, l'exposition prolongée à de fortes doses d'étoposide conduit à deux vagues d'activation du NF- κ B, indépendamment de p53. La première est dépendante d'ATM et de NEMO, responsable de l'activation d'une voie de survie. En parallèle de l'activation des voies de survie, il y a induction de l'expression et de la sécrétion du TNF α . Cette sécrétion va activer de façon autocrine le récepteur à domaine de mort du TNF α (TNFR) qui sera alors responsable d'une seconde vague d'activation du NF- κ B. Il y aura alors une boucle d'amplification de la signalisation du TNFR qui conduit ainsi à l'activation de l'apoptose (Biton and Ashkenazi, 2011).

De nombreuses études ont également montré un rôle d'AKT dans l'activation de voie de signalisation inhibitrices de l'apoptose en réponse à des dommages à l'ADN (Gottlieb et al., 2002; Wendel et al., 2004). Les mécanismes d'activation d'AKT en réponse à des dommages à l'ADN semblent dépendants du contexte. En effet, il a été montré que la DNA-PK, ATM, ATR ou le complexe MRE11 peuvent participer à son activation (Boehme et al., 2008; Caporali et al., 2008; Fraser et al., 2011). Une fois AKT activé, il peut moduler la survie par différents mécanismes. En particulier, la phosphorylation de BAD conduit à sa séquestration par le complexe 14-3-3, libérant ainsi les protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-XL (Datta et al., 1997; Zha et al., 1996). AKT est également responsable de la phosphorylation inhibitrice de la caspase 9 (Figure 11), conduisant à l'inhibition des étapes précoces de l'apoptose intrinsèque (Cardone et al., 1998). Il a également été décrit qu'AKT peut phosphoryler MDM2 conduisant à une augmentation de son activité ubiquitin ligase et à une dégradation accrue de p53 (Gottlieb et al., 2002). Enfin, plus récemment AKT a également été impliqué dans la réparation des DSB induit par irradiations en favorisant notamment les mécanismes de NHEJ (Toulany et al., 2012).

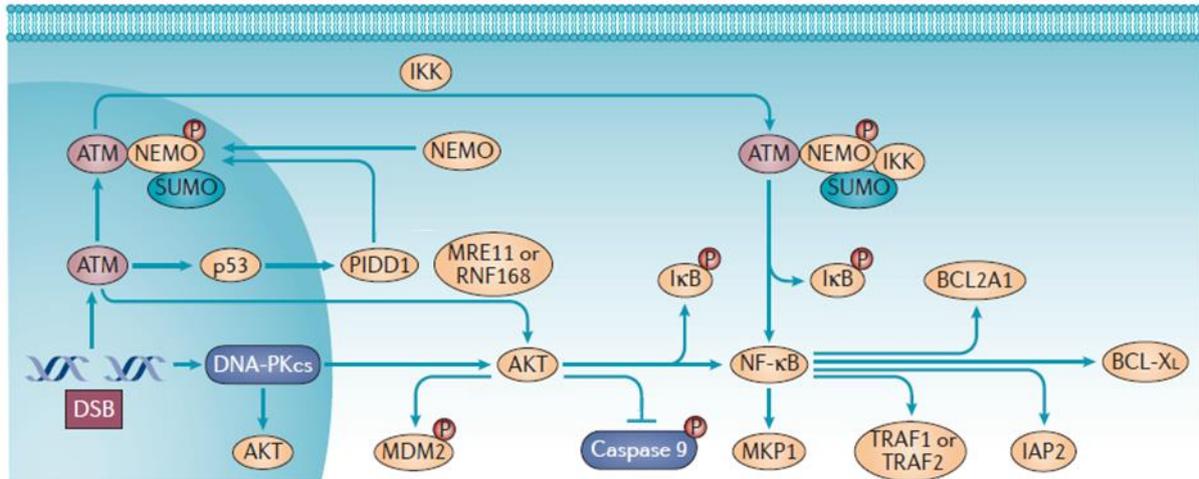


Figure 11 : NF-κB et AKT dans l'activation de voies de survie suite à des dommages à l'ADN
 En réponse à des dommages à l'ADN, plusieurs voies de survie peuvent être activées par la voie des DDR, en particulier le facteur de transcription NF-κB *via* le régulateur NEMO, mais aussi la kinase AKT (Roos et al., 2016).

5. Le rôle des lysosomes dans la résistance aux chimiothérapies

Les lysosomes sont des organites intracellulaires, décrits pour la première fois par Christian de Duve en 1959, qui contiennent un pH acide (compris entre 4,5 et 5) et de nombreuses hydrolases acides. Les lysosomes constituent le compartiment digestif majeur de la cellule grâce à leur propriété de pouvoir dégrader n'importe quel type de macromolécules (acides nucléiques, sucres, lipides et protéines). Ils sont responsables de la dégradation de composants intracellulaires (organites, protéines), de pathogènes (bactéries, virus), ou encore de la réparation de la membrane plasmique. Les constituants intracellulaires sont acheminés aux lysosomes par la voie de l'autophagie, alors que les composés extracellulaires peuvent provenir soit de l'endocytose, soit de la phagocytose (Turk and Turk, 2009).

Les lysosomes ont d'abord été décrits comme des « sacs de suicide » du fait de leur potentiel à pouvoir dégrader l'ensemble du contenu cellulaire. Cependant, de nombreuses études ont suggéré un rôle des lysosomes et de leur fonction dans la résistance aux chimiothérapies (Appelqvist et al., 2013; Sui et al., 2013; Zhitomirsky and Assaraf, 2016). En effet, il a été

décrit que ces organites sont capables de séquestrer de nombreux agents anti-cancéreux (sunitinib, doxorubicine, daunorubicine, cisplatine...), les rendant moins disponibles pour atteindre leur cibles cellulaires (cytoplasmiques ou nucléaires) (Zhitomirsky and Assaraf, 2016).

De plus, bien que nous ayons introduit l'autophagie comme un des processus de mort régulé, le rôle de l'autophagie dans la résistance aux traitements anti-cancéreux a été largement mis en évidence ces dernières années (Li et al., 2017b; Sui et al., 2013).

Ainsi, nous verrons un peu plus en détail dans la suite de ce manuscrit ces deux processus. Nous aborderons à la fois leur rôle protecteur vis-à-vis des agents anti-cancéreux, nous discuterons également des moyens qui permettent de surmonter ces résistances, mais aussi de certains aspects de ces mécanismes qui peuvent s'avérer avantageux pour la thérapie.

B. La séquestration lysosomale et la LMP dans la thérapie anti-cancéreuse

1. Composition des lysosomes

Les lysosomes sont délimités par une simple bicouche lipidique (de 7 à 10nm d'épaisseur) et de nombreuses protéines membranaires hautement glycosylées du côté luminal afin de protéger la composition membranaire des enzymes lytiques contenues dans le lysosome (Kundra and Kornfeld, 1999). Il y aurait plus de 25 protéines de la membrane lysosomale identifiés, les plus abondantes étant LAMP-1 (*Lysosomal-Associated Membrane Protein 1*), LAMP-2, LIMP-2 (*Lysosomal Integral Membrane Protein 2*) et CD63 (Lübke et al., 2009; Saftig et al., 2010).

Plus de 60 hydrolases acides ont également été identifiées, appartenant aux familles des protéases, peptidases, phosphatases, nucléases, glycosidases, sulfatases et lipases. Les enzymes les plus connues sont des protéases de la famille des cathepsines. Selon l'acide aminé qui est retrouvé dans leur site actif, on distingue les cathepsines à : sérine (cathepsine

A et G), à cystéine (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W et X), et à acide aspartique (D et E). Les cathepsine D, B, C, H et L sont ubiquitaire et font partie des protéases lysosomales les plus abondantes (Rossi et al., 2004).

Le pH acide des lysosomes permet ainsi le fonctionnement optimal de ces hydrolases acides. Il est le résultat de l'activité de la pompe à protons v-ATPase transmembranaire, de canaux chlore et des transporteurs d'ions qui font partie des protéines de la membrane lysosomale (Mindell, 2012; Ohkuma et al., 1982).

La biogenèse des lysosomes est sous le contrôle d'un réseau de gènes appelé CLEAR (*Coordinated Lysosomal Expression and Regulation*). De nombreux gènes codants pour les protéines lysosomales présentent une séquence CLEAR à proximité du site d'initiation de la transcription. L'expression de ces gènes est sous le contrôle du facteur de transcription EB (TFEB pour *Transcription Factor EB*) qui se lie aux éléments CLEAR pour induire la transcription de ces gènes et favoriser ainsi la biogenèse des lysosomes (Palmieri et al., 2011; Sardiello et al., 2009). De plus, TFEB est capable de moduler l'expression de gènes impliqués dans les processus associés aux lysosomes tels que l'autophagie, l'endocytose ou la phagocytose (Palmieri et al., 2011; Settembre et al., 2011). TFEB est alors considéré comme le régulateur majeur des fonctions lysosomales afin de coordonner les capacités de dégradation avec les besoins cellulaires.

L'activité de TFEB est régulée négativement par mTOR et positivement par le calcium lysosomal et la calcineurine (Figure 12). En effet, l'activité de mTOR conduit à une phosphorylation de TFEB permettant l'association de TFEB avec le complexe 14-3-3 et une séquestration cytoplasmique (Martina et al., 2012). Cette phosphorylation inhibitrice peut être levée par l'activité phosphatasique de la calcineurine (Medina et al., 2015).

2. La séquestration lysosomale des agents anti-cancéreux

a. Mécanisme de la séquestration lysosomale

La séquestration lysosomale est un processus par lequel des bases faibles hydrophobes se retrouvent hautement accumulées dans les lysosomes acides (MacIntyre and Cutler, 1988). De nombreux agents anti-cancéreux, dont des agents inducteurs de dommage à l'ADN, constituent des bases faibles hydrophobes, et peuvent donc se retrouver séquestrée dans les lysosomes (Zhitomirsky and Assaraf, 2016).

Ce mécanisme a notamment été décrit pour la doxorubicine, la daunorubicine, ou le mitoxantrone. Il s'agit des agents anti-cancéreux inducteurs de dommages à l'ADN, qui possèdent la propriété d'être fluorescents et dont la localisation subcellulaire est facilement observable (Gong et al., 2006; Herlevsen et al., 2007; Smith et al., 1992; Zhitomirsky and Assaraf, 2015a). Dans ces études, ces agents anti-cancéreux ont été décrits pour se localiser dans les lysosomes des cellules résistantes aux traitements, alors qu'ils sont bien observés dans le noyau des cellules sensibles, suggérant qu'il existe un lien entre séquestration lysosomale et résistance au traitement.

L'entrée de ces agents anti-cancéreux dans le lysosome peut se faire par diffusion passive (grâce à leur propriété hydrophobe) ou par transport actif *via* des pompes à efflux telles que MDR1 (Zhitomirsky and Assaraf, 2016). En effet, une partie de la membrane des lysosomes provient de la membrane plasmique *via* la voie endosomale. Au cours de ce processus, la pompe MDR1 se retrouve au niveau de la membrane lysosomale où son activité peut alors être responsable d'un influx de composés vers la lumière du lysosome (Ferrao et al., 2001; Yamagishi et al., 2013). Puis, ces agents anti-cancéreux étant des bases faibles, vont se retrouver protonnés dans le milieu acide de la lumière du lysosome (Figure 12). En effet, il a été montré que le pH lysosomal joue un rôle important dans la séquestration de ces agents puisqu'une élévation du pH lysosomal par la bafilomycine A1 (un inhibiteur de la pompe à proton v-ATPase) ou par la chloroquine (un composé lysomotropique qui agit comme un tampon à protons) inhibe cette séquestration lysosomale (Hrabeta et al., 2015; Zhitomirsky and Assaraf, 2015b).

Une fois protonnés ces agents ne peuvent plus diffuser librement à travers la membrane des lysosomes et restent ainsi piégés, incapables d'atteindre leur cible moléculaire, en particulier l'ADN lorsqu'on considère des agents inducteurs de dommages à l'ADN.

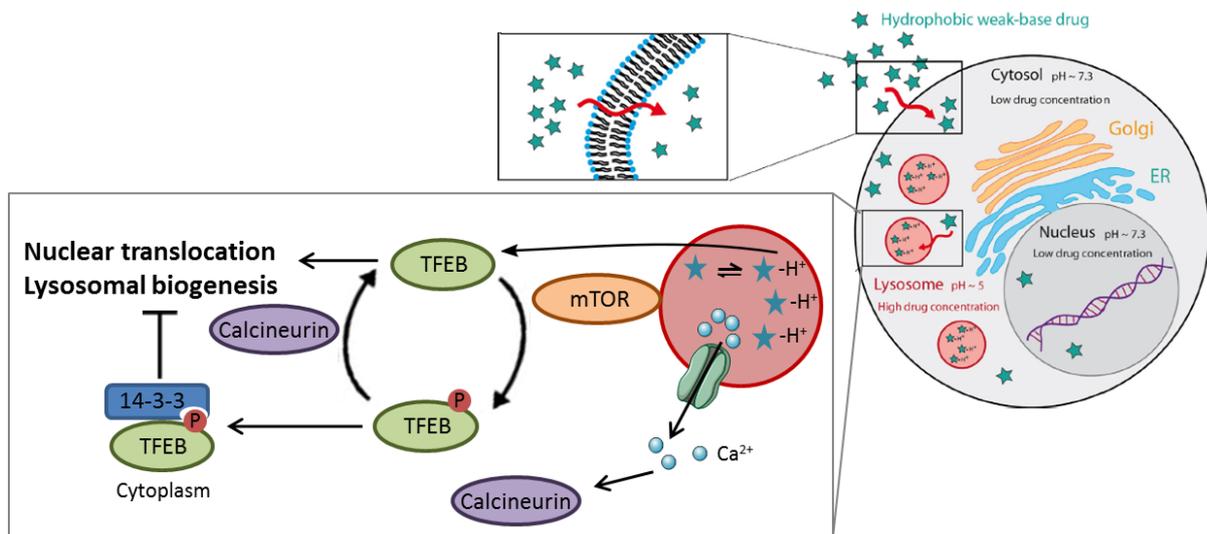


Figure 12 : Contrôle de la biogenèse lysosomale et implication de la séquestration lysosomale

La phosphorylation du facteur de transcription TFEB par mTOR conduit à son interaction avec le complexe 14-3-3 et sa séquestration lysosomale. Un efflux de calcium lysosomal favorise l'activation de TFEB par déphosphorylation *via* la calcineurine. La séquestration lysosomale d'agents anti-cancéreux favorise l'activité de TFEB (l'implication de mTOR et de la calcineurine n'ont pas été étudiés) (adapté de Martina et al., 2012 ; Zhitomirsky and Assaraf, 2016).

b. Rôle dans la résistance aux chimiothérapies

De nombreuses études viennent en support de l'hypothèse du rôle de la séquestration lysosomale des agents anti-cancéreux dans la résistance des cellules cancéreuses.

D'une part, il a été observé que le pH lysosomal des cellules résistantes aux agents anti-cancéreux est inférieur à celui des cellules sensibles, suggérant que la séquestration lysosomale des agents anti-cancéreux sera plus importante (Altan et al., 1998; Gong et al., 2003; Hrabeta et al., 2015; Schindler et al., 1996).

Cette hypothèse est également renforcée par une étude qui a montré que la synthèse d'un dérivé de la daunorubicine, ayant des propriétés acido-basique différentes (en particulier étant une base plus forte), ne se retrouve pas séquestré dans les lysosomes des cellules résistantes à la daunorubicine, et sensibilise de façon importante les cellules résistantes à la mort cellulaire (Duvvuri et al., 2005).

De plus, il a été montré que l'accumulation d'agents anti-cancéreux dans les lysosomes conduit à une activation de la biogenèse des lysosomes par une stimulation du facteur de transcription TFEB (Zhitomirsky and Assaraf, 2015a). Ces résultats suggèrent donc qu'il y aurait une boucle de rétrocontrôle positif qui serait mis en place pour renforcer la séquestration lysosomale et donc la résistance aux chimiothérapies.

Il a également été décrit que les agents anti-cancéreux accumulés dans ces lysosomes peuvent être exocytés, renforçant ainsi la capacité de la séquestration lysosomale à empêcher l'adressage des agents anti-cancéreux à leurs cibles moléculaires (Zhitomirsky et al., 2017).

D'autre part, de nombreuses études ont montré qu'une inhibition de la séquestration lysosomale (par inhibition du transporteur MDR1, par augmentation du pH lysosomal ou d'autres mécanismes) conduit à une inhibition de la localisation lysosomale des agents chimiothérapeutiques et à une resensibilisation des cellules résistantes à la mort induite par ces anti-cancéreux (Ferraro et al., 2001; Gong et al., 2006; Herlevsen et al., 2007; Hrabeta et al., 2015; Yamagishi et al., 2013; Zhitomirsky and Assaraf, 2015b).

3. Intérêt du ciblage des lysosomes en thérapie anti-cancéreuse

a. Altération des lysosomes pendant la progression tumorale

Du fait du rôle des lysosomes dans la séquestration des agents-anti-cancéreux et dans la résistance à ces agents, les lysosomes constituent des cibles d'intérêt pour la thérapie anti-cancéreuse. En particulier, l'idée est de pouvoir empêcher la séquestration lysosomale de ces agents anti-cancéreux.

Mais ce n'est pas le seul aspect des lysosomes qui peut être une cible de la thérapie anti-cancéreuse. En effet, de plus en plus d'études suggèrent que les lysosomes subissent de nombreuses altérations au cours du processus de transformation tumoral (altération de volume, de composition, de distribution des lysosomes). Ces changements semblent être importants pour la progression tumorale (en particulier pour l'invasion, l'angiogenèse, ou la résistance aux drogues) (Kallunki et al., 2013). Mais paradoxalement, ces modifications

semblent sensibiliser les cellules cancéreuses à la perméabilisation de leur membrane (LMP pour *Lysosomal Membrane Permeabilization*) (Fehrenbacher et al., 2004; Petersen et al., 2013).

b. La LMP et la mort cellulaire lysosomale comme stratégie anti-cancéreuse

i. Induction de la LMP par des agents anti-cancéreux

Dans de nombreuses études, la LMP a été associée à des processus de mort cellulaire (Aits and Jäättelä, 2013; Boya and Kroemer, 2008; Repnik et al., 2014; Wang et al., 2018). Ainsi, du fait de la sensibilité plus grande des cellules transformées à la LMP et du potentiel de la LMP à moduler la mort cellulaire, de nombreuses stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses cherchent à sensibiliser les lysosomes à la LMP et à la mort dépendante des lysosomes (LDCD pour *Lysosomal Dependent Cell Death*) (Appelqvist et al., 2013; Dielschneider et al., 2017; Groth-Pedersen and Jäättelä, 2013; Kirkegaard and Jäättelä, 2009; Piao and Amaravadi, 2016).

Beaucoup d'agents utilisés en chimiothérapie ont été décrits pour induire la mort par LDCD (Groth-Pedersen and Jäättelä, 2013). En particulier, il a été montré que les cellules transformées sont plus sensibles que les cellules non transformées à la mort cellulaire par LDCD (Fehrenbacher et al., 2004, 2008). Parmi ces agents, on peut citer en particulier certains agents inducteurs de dommages à l'ADN tels que le cisplatine, l'étoposide, la doxorubicine ou la camptothécine (Emert-Sedlak et al., 2005; Fehrenbacher et al., 2008; Paquet et al., 2005).

De plus, il a été décrit qu'une association des agents anti-cancéreux avec d'autres inducteurs de LMP (comme par exemple le di-2-pyridylketone thiosemicarbazone, ou l'agent antipaludéen chloroquine) sensibilise des cellules cancéreuses, et en particulier des cellules résistantes à la mort induite par le traitement (Circu et al., 2017; Li et al., 2017a; Seebacher et al., 2016).

La LMP peut également être impliquée dans la mort spécifique des cellules souches cancéreuses qui sont connues pour être résistantes aux traitements anti-cancéreux et être la source des rechutes chez les patients (Mai et al., 2017).

L'induction de la mort par LMP semble aussi être un moyen efficace pour cibler des cellules déficientes pour p53. En effet, un criblage de molécules anti-cancéreuses a montré que la majorité des composés qui sont capables d'induire une mort indépendante de p53 conduisent à la mort par LDCD (Erdal et al., 2005).

ii. Intérêt de la composition en lipide de la membrane lysosomale

Au vu des propriétés intéressantes de la mort cellulaire par LDCD pour le ciblage de cancer résistants aux chimiothérapies et de façon indépendante de p53, la recherche des mécanismes responsables de la LMP et de leur application dans la thérapie anti-cancéreuse se multiplie de façon considérable.

La LMP est caractérisée par n'importe quel dommage de la membrane lysosomale qui conduit au relargage du contenu lysosomal dans le cytoplasme. Elle peut avoir de nombreuses origines telles qu'une production importante de ROS qui déstabilisent la membrane lysosomale, une modification de la composition de la membrane lysosomale en lipides, la déstabilisation de la structure de la membrane lysosomale par l'action de détergents lysomotropiques, et bien d'autres (Figure 13A) (Aits and Jäättelä, 2013).

Parmi ces différentes causes de la LMP, la composition en lipides de la membrane lysosomale semble jouer un rôle important. En effet, un niveau élevé de lipides de type acide arachidonique (Windelborn and Lipton, 2008; Zhang et al., 2006), sphingomyéline (Heinrich et al., 2004; Ullio et al., 2012), ou encore l'absence de cholestérol (Appelqvist et al., 2011; Hao et al., 2008) peuvent contribuer à une déstabilisation de la membrane lysosomale, induisant ainsi la mort cellulaire à la suite de la LMP.

Parmi ces lipides, la sphingomyéline a été beaucoup étudiée dans le contexte de la recherche de la thérapie anti-cancéreuse. En effet, il a été montré que l'utilisation d'agents cationiques amphiphiles (tel que la simarésine), grâce à leur propriété inhibitrice de l'enzyme ASM (acid sphingomyelinase) qui catalyse la dégradation de la sphingomyéline, favorise la mort cellulaire par LDCD des cellules transformées (Petersen et al., 2013). Dans cette étude, ils ont également montré qu'une surexpression de la protéine Hsp70 protège de la LMP et de la mort induite par ces agents. En effet, il avait déjà été décrit que la protéine

Hsp70 est responsable du recrutement de l'enzyme ASM au niveau de la membrane lysosomale, favorise son activité et favorise ainsi la stabilité de la membrane lysosomale (Kirkegaard et al., 2010).

iii. Un rôle de BAX dans la LMP

Dans certains contextes, il a été montré que la translocation de BAX et BAK au niveau des lysosomes peut conduire à la LMP et la mort cellulaire (Bové et al., 2014; Kågedal et al., 2005). Cependant, cet événement ne semble pas être universel puisque la translocation de BAX au niveau des lysosomes n'est pas observée dans d'autres contextes d'induction de la LMP (Oberle et al., 2010).

Cette translocation serait dépendante du recrutement de BAX par DRAM1 sur la membrane lysosomale (DRAM1 étant une protéine dont l'expression est induite par p53 et qui est intégrée dans la membrane lysosomale) (Guan et al., 2015). Ces résultats suggèrent donc que comme au niveau de la mitochondrie, BAX pourrait jouer un rôle dans la perméabilisation de la membrane des lysosomes.

c. Implication de la LMP dans les mécanismes de la mort régulée

i. Les cathepsines au service de la mort par LMP

Parmi les nombreuses enzymes de dégradation lysosomale, il semblerait que les effecteurs principaux de la mort par LCD soient les protéases lysosomales, en particulier la cathepsine D (protéase aspartique) et les cathepsines B ou L (protéases à cystéine). En effet, il a été décrit qu'une microinjection de cathepsine B ou D est capable d'induire la mort cellulaire par apoptose (Bivik et al., 2006; Roberg et al., 2002). De plus l'inhibition de ces cathepsines (D, B ou L) a également été décrite pour inhiber la mort cellulaire par LCD (Caruso et al., 2006; Droga-Mazovec et al., 2008; Oberle et al., 2010).

Selon le contexte, les cathepsines libérées par LMP peuvent induire différents types de mort cellulaires régulées.

ii. La LMP dans l'apoptose

La LMP a été décrite pour être induite en réponse à de nombreux stimuli apoptotiques. Dans de nombreux contextes, la LMP serait plutôt en amont de l'induction de la MOMP, du

relargage du cytochrome C et de l'activation des caspases. En particulier, il a été décrit que les cathepsines peuvent contribuer au clivage de BID, à l'activation directe de BAX et BAK, ou à l'inactivation de BCL-2 et de l'inhibiteur d'apoptose XIAP (Boya et al., 2003; Droga-Mazovec et al., 2008; Heinrich et al., 2004; Taniguchi et al., 2015).

Mais dans de nombreux autres contextes, la LMP serait plutôt une conséquence de la MOMP et de l'activation des caspases (Huai et al., 2013; Oberle et al., 2010; Paquet et al., 2005). Dans les deux cas, la LMP induite agit de concert avec les mécanismes de l'apoptose pour accélérer la mort cellulaire.

iii. La LMP dans d'autres types de mort cellulaire régulée

Des études ont également mis en évidence que l'induction de la LMP peut conduire à la mort cellulaire indépendante de l'activation des caspases.

D'une part, il a été mis en évidence que la cathepsine B est capable d'induire la condensation de la chromatine, l'externalisation de la phosphatidylsérine, ainsi que la fragmentation cytoplasmique (Foghsgaard et al., 2001). Ces propriétés de la cathepsine B conduisent à une mort cellulaire par LMP qui est indépendante des caspases, mais tout de même avec un phénotype apoptotique (Bröker et al., 2004; Michallet et al., 2004; Nylandsted et al., 2004).

D'autre part, il a également été mis en évidence que la localisation de BAX et BAK au niveau du lysosome contribue à l'induction de la LMP, et que cette LMP constitue une étape importante dans la mort cellulaire autophagique (Karch et al., 2017).

La LMP peut aussi être impliquée dans un processus de mort par ferroptose. La ferroptose est un processus de mort régulé, de type nécrotique, lié à une accumulation de fer et une production de ROS dans les cellules, qui conduit à une importante peroxydation des lipides (Dixon et al., 2012). La production de ROS en présence de l'ion ferreux (Fe^{2+}) résulte de la réaction de Fenton. Cette réaction catalyse la production d'un radical hydroxyle (HO^\bullet , une espèce de ROS très réactive et causant de nombreux dommages), à partir de peroxyde

d'hydrogène (H_2O_2 , une espèce réactive mais moins dangereuse) en présence de de l'ion Ferreux selon la réaction : $\text{Fe}^{2+}_{(\text{aq})} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+}_{(\text{aq})} + \text{OH}^{-}_{(\text{aq})} + \text{HO}^{\bullet}$.

Or, en participant à la dégradation de nombreuses macro-molécules contenant du Fer, les lysosomes se retrouvent enrichis en Fer. De plus, les lysosomes ne sont pas dotés d'enzymes antioxydantes et sont donc très sensibles au stress oxydant (Kurz et al., 2008). C'est ainsi que la salinomycine, en induisant une accumulation de fer dans les lysosomes des cellules souches cancéreuses, conduit à une production de ROS importante dans ces lysosomes. La production des ROS lysosomaux conduit ensuite à la LMP et participe au processus de mort cellulaire sélectif des cellules souches cancéreuses (Mai et al., 2017).

d. Choix de la survie ou de la mort en réponse à la LMP

La mort cellulaire par LDCD est la conséquence du déversement des enzymes lysosomales dans le cytoplasme suite à la LMP. Le choix de la survie ou de la mort à la suite de la LMP dépend des capacités de protection vis-à-vis de l'induction de la LMP, du niveau de dommages de la membrane lysosomale, et de l'état des interactions avec les voies de la mort cellulaire (Wang et al., 2018).

Les mécanismes de protection vis-à-vis de la LMP incluent d'une part la composition lipidique de la membrane lysosomale comme nous l'avons présenté précédemment, et d'autre part la capacité à réparer ou éliminer les lysosomes endommagés.

La réparation des lysosomes endommagés fait intervenir la machinerie ESCRT, et se déroule uniquement lorsque de petites perforations de la membrane lysosomale sont détectées. La réparation permet alors la réacidification des lysosomes et le maintien de lysosomes fonctionnels (Figure 13B) (Skowrya et al., 2018).

En revanche, lorsque les perforations des lysosomes atteignent une plus grande ampleur, c'est le système d'élimination des lysosomes qui est privilégié (Figure 13C). Le système senseur de la rupture de la membrane lysosomale est constitué par les Galectines 1 et 3 (Aits et al., 2015). Ces protéines appartiennent à un groupe de protéines qui présentent une affinité de liaison pour les β -galactosides. Or, la membrane des lysosomes contient des lipides ou protéines glycoconjugués à des β -galactosides qui sont exposés du côté luminal des

lysosomes, et qui deviennent alors accessibles aux galectines à la suite d'une LMP plus importante (de façon dépendante de la taille du pore à la membrane lysosomale). A ce titre, la formation de puncta de Galectines 1 ou 3 au niveau de la membrane lysosomale sert d'indicateur de la LMP.

Ce système senseur des dommages de la membrane lysosomale est ensuite capable d'activer un des processus d'élimination des lysosomes endommagés. En effet, la Galectine 3 servirait à recruter la machinerie autophagique au niveau des lysosomes endommagés afin de faciliter leur dégradation (connu sous le terme de lysophagie) (Chauhan et al., 2016; Maejima et al., 2013).

Au sein d'une même cellule, les lysosomes répondent de façon plutôt hétérogène aux stress lysosomaux. Ainsi, la réponse cellulaire aux agents inducteurs de la LMP peut varier selon l'ampleur de la LMP, à savoir le nombre de lysosomes touchés et le nombre de pores formés dans chaque lysosome. Il est alors admis que les dommages de quelques lysosomes peut facilement être contenue par les mécanismes de réparation et favoriser la survie cellulaire (Wang et al., 2018).

En revanche, un niveau de LMP plus important peut conduire à deux types de mort cellulaires (Figure 13D). Une rupture massive de la membrane lysosomale est associée au relargage du contenu total des lysosomes qui conduit à une cascade d'hydrolyse des constituants cytoplasmiques, à une acidification généralisée du cytoplasme entraînant une mort incontrôlée de type nécrotique. En revanche, une LMP partielle peut conduire à une mort cellulaire régulée médiée par le relargage d'enzymes lysosomales spécifiques dans le cytoplasme (Bidère et al., 2003; Boya et al., 2003; Bröker et al., 2004). Ces enzymes pourront alors interagir avec les différents systèmes de mort cellulaire afin d'orienter la cellule vers un certain type de mort cellulaire.

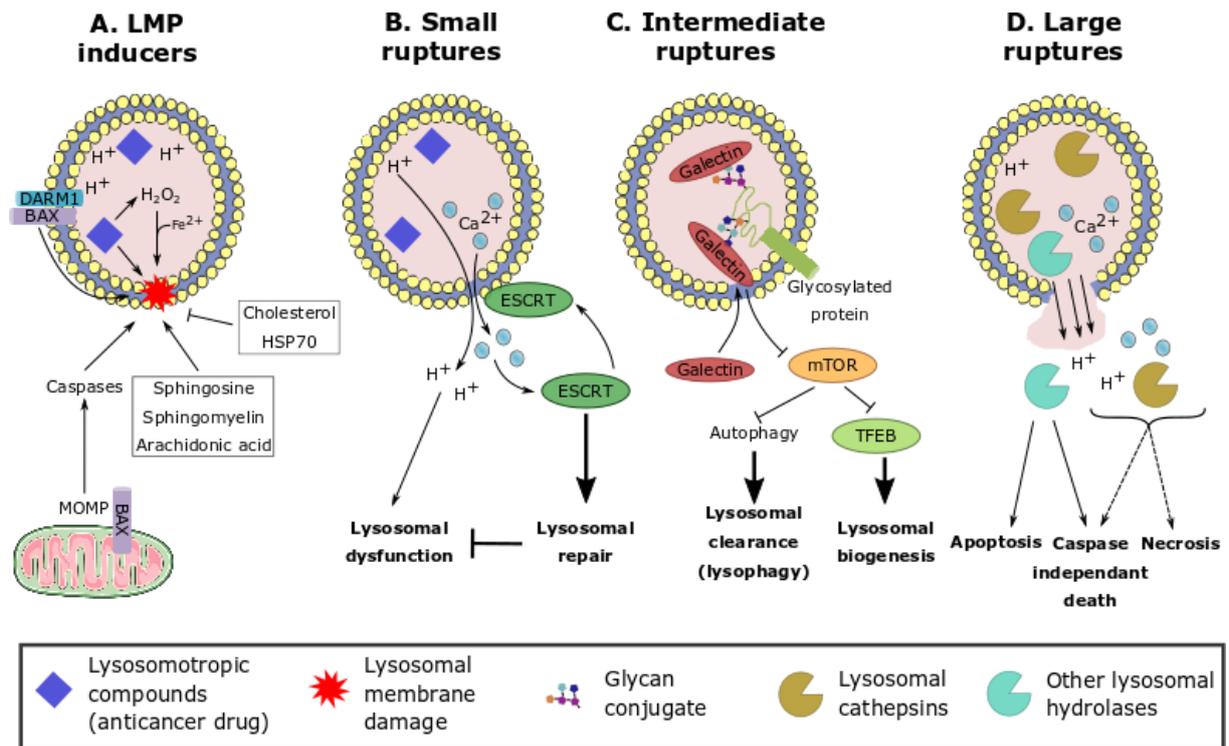


Figure 13: Causes et conséquences de la perméabilisation de la membrane lysosomale

Plusieurs évènements peuvent causer des dommages à la membrane lysosomale (A). Selon l'ampleur de la rupture, la réponse est différente : il y aura réparation de petites ruptures par la machinerie ESCRT (B) ; élimination des lysosomes endommagés par lysophagie et leur renouvellement via l'activation de TFEB lorsque la rupture est de taille intermédiaire (C) ; ou alors induction de la mort cellulaire par apoptose, nécrose ou d'autres types de mort cellulaire programmée indépendante des caspases lorsque la rupture est importante (D) (adapté de Aits and Jäättelä, 2013 ; Skowrya et al., 2018 ; Wang et al., 2018).

C. L'autophagie en réponse à des dommages à l'ADN

1. Généralités sur l'autophagie

L'autophagie est un processus catabolique finement régulé durant lequel les cellules dégradent leurs constituants intracellulaires (appelés cargos) par la voie lysosomale (*via* l'activité d'hydrolases lysosomales fonctionnant à pH acide). Les cargos pris en charge par ce processus sont notamment des protéines ou des organites intracellulaire (telles que les mitochondries, les lysosomes, des gouttelettes lipidiques...)

Selon le mode d'adressage des cargos au lysosome, on distingue trois types d'autophagies, chacun de ces types d'autophagie conduisant à une dégradation par le lysosome (Boya et al., 2013) (Figure 14) :

La macroautophagie, qui nécessite la formation d'une vésicule à double membrane autour des cargos à dégrader, vésicule alors appelée autophagosome, pour permettre ensuite la fusion avec un lysosome (Figure 14a)

La microautophagie, permet la dégradation de composants cytosoliques comme des protéines ou des organites grâce à la prise en charge directe des cargos dans le lysosome suite à l'invagination de la membrane lysosomale (Figure 14c)

L'autophagie dépendante des chaperonnes (CMA pour *Chaperone mediated Autophagy*), au cours de laquelle seules des protéines sont dégradées. Ces protéines sont prises en charge par des chaperonnes (comme la chaperonne Hsc-70, Heat Shock Cognate 70) grâce à la reconnaissance des protéines à dégrader *via* leur motif « KFERQ ». Ce complexe est alors reconnu par le récepteur lysosomal LAMP-2A qui induit le dépliement de la protéine cible ainsi que sa translocation dans le lysosome (Figure 14b)

Nous aborderons plus en détail le processus de la macroautophagie, processus que nous appellerons simplement « autophagie » pour la suite. Cette autophagie peut se distinguer en deux sous-catégories, l'autophagie sélective ou non. L'autophagie non-sélective consiste en une dégradation aléatoire de constituants cellulaires qui se trouvent à proximité de l'autophagosome lorsqu'il se forme. L'autophagie sélective elle consiste à cibler particulièrement des protéines ou des organites cellulaires vers l'autophagosome en formation *via* une interaction avec des récepteurs autophagiques (tels que p62, NDP52, optineurine...).

L'autophagie existe à l'état basal afin d'assurer l'homéostasie cellulaire. En particulier, l'autophagie basale permet la dégradation de protéines à longue durée de vie ou les agrégats protéiques non dégradés par le protéasome, ainsi que le renouvellement des mitochondries âgées ou dysfonctionnelles.

Mais l'autophagie peut également être stimulée en réponse à divers conditions de stress, et constitue ainsi un mécanisme d'adaptation et de survie cellulaire. Les stimuli permettant d'activer l'autophagie sont notamment des stress métaboliques (absence de nutriments,

d'acides aminés, ou facteurs de croissance), l'hypoxie, le stress du réticulum endoplasmique, le stress oxydant, et bien d'autres types de stress (Ryter et al., 2013).

Les produits de dégradation sont ré-utilisés comme source d'énergie pour alimenter les programmes métaboliques intracellulaires et permettre ainsi un maintien de l'homéostasie ou la survie des cellules en condition de stress.

Nous avons vu précédemment que l'autophagie, dans des conditions spécifiques, peut également conduire à la mort cellulaire autophagique. Cette mort autophagique est caractérisée par une dégradation excessive du contenu intracellulaire qui conduit alors à une mort indépendante des caspases. Mais l'autophagie peut aussi contribuer à la mort cellulaire en modulant l'apoptose ou la nécrose (pour revue Mariño et al., 2014).

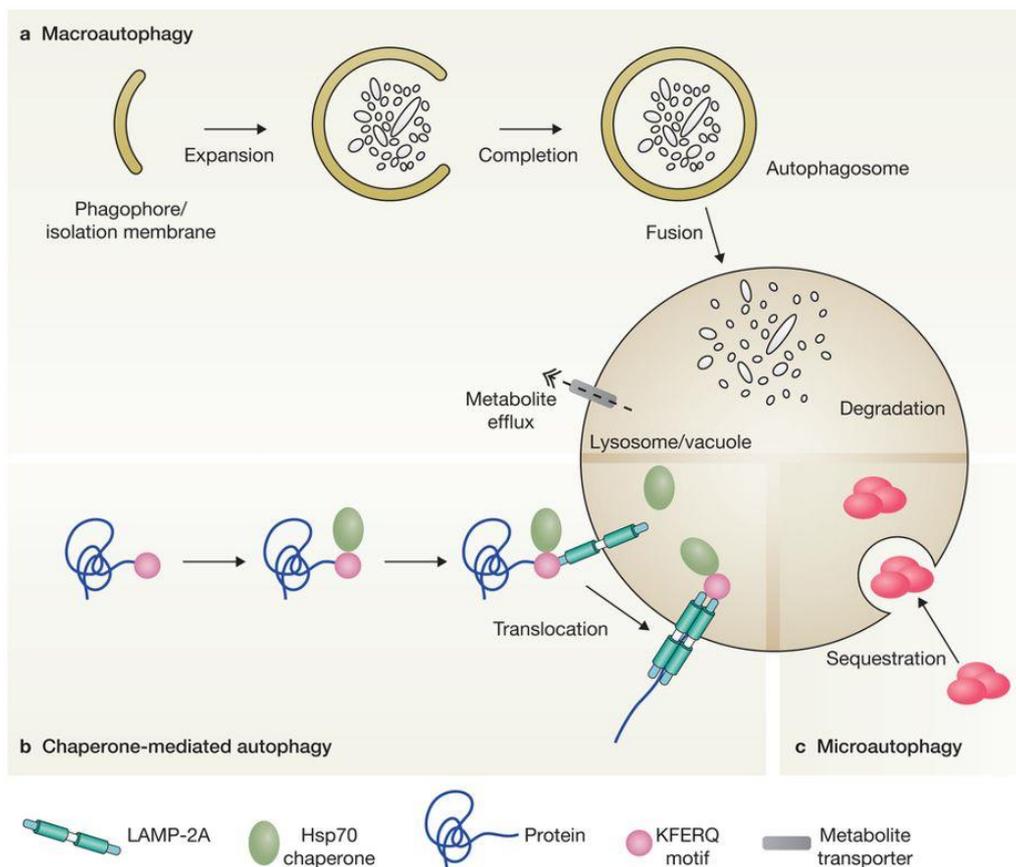


Figure 14 : Les différents types d'autophagie

Au cours de la macroautophagie, les cargos à dégrader sont séquestrés dans une vésicule à double membrane appelée autophagosome (a). La CMA (pour *Chaperone mediated Autophagy*) nécessite la reconnaissance des protéines portant un motif « KFERQ » par la Hsp70 puis LAMP-2A pour leur pénétration dans le lysosome (b). Les cargos dégradés par microautophagie pénètrent dans le lysosome à la suite de l'invagination de la membrane lysosomale (c) (Boya et al., 2013).

2. Mécanismes moléculaires de l'autophagie

L'autophagie est un processus qui se déroule en plusieurs étapes, sous le contrôle de nombreux complexes protéiques et de nombreuses protéines de la famille des ATG (*autophagy related gene*) (Mizushima et al., 2011). Il peut être subdivisé en quatre grandes étapes : l'initiation, l'élongation et la fermeture de la membrane autophagosomale, la fusion avec le lysosome, et le recyclage des constituants cellulaires.

a. L'initiation de l'autophagie

Au cours de cette étape, le site de formation de la membrane autophagosomale est défini grâce à l'activation et l'intervention du complexe ULK1 (*uncoordinated-51 like kinase 1*) constitué de ULK1/FIP200/ATG13, et du complexe Beclin1/Vps34/ATG14 (Figure 15a et 15b). L'origine de la membrane autophagosomale est en débat afin de savoir si elle vient de site de contact entre le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie (appelés MAM pour *mitochondria-associated ER-membrane*), ou entre le RE et la membrane plasmique. En revanche, il est généralement admis que la membrane du RE est un site essentiel pour le recrutement des complexes d'initiation de l'autophagie et la formation d'une membrane d'isolation appelée phagophore (Hamasaki et al., 2013; Tooze, 2013).

En particulier, l'activation du complexe ULK1 va permettre sa translocation au niveau de la membrane du RE (Itakura and Mizushima, 2010) qui sera suivi par le recrutement du complexe Beclin1/Vps34/ATG14 (Koyama-Honda et al., 2013; Matsunaga et al., 2010). La phosphorylation de Beclin1 par ULK1 permet l'activation de l'activité PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 kinase) de Vps34 produisant ainsi le PIP3 (Phosphatidyl Inositol-3-Phosphate) à partir du PIP2 (Phosphatidyl Inositol-2-Phosphate) (Russell et al., 2013). La production de ce lipide PIP3 va participer à la formation du phagophore et servir au recrutement de nombreuses protéines impliquées dans les étapes suivantes.

b. L'élongation et la fermeture de la membrane autophagosomale

Cette étape fait intervenir le complexe WIPI (*WD repeat protein interacting with phosphoinositides*) qui reconnaît les PIP3 et peut alors recruter le complexe ATG5-ATG12-ATG16 (Dooley et al., 2014). Au cours de cette étape, il y a également un apport en composants lipidiques provenant de l'appareil de Golgi et des endosomes tardifs avec l'intervention de la protéine ATG9 (Figure 15c) (Takahashi et al., 2011).

L'élongation est sous la dépendance de la formation d'une forme lipidée des protéines de la famille LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*), composée de LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP (*Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*), GABARAP-L1 et GABARAP-L2. Cette forme lipidée est le résultat d'une conjugaison de LC3 avec une phosphatidyl-éthanolamine (PE), et est alors appelée LC3-II. Cette forme LC3-II s'associera au phagophore en formation et permettra, en coordination avec les autres complexes déjà présents, l'élongation du phagophore ainsi que la fusion des membranes pour la fermeture de l'autophagosome (Kabeya et al., 2000).

Au cours de l'autophagie sélective, c'est à cette étape que l'interaction entre les récepteurs de l'autophagie (p62, NDP52, Optineurine) et les protéines de la famille LC3 permet l'adressage sélectif des protéines à dégrader par la voie de l'autophagie.

La production de la forme LC3-II fait intervenir un processus dit de conjugaison, ressemblant au processus d'ubiquitylation des protéines avec des enzymes d'activation, de conjugaison et de liaison (Figure 15d). La protéine LC3 est synthétisée sous forme de pro-protéine qui est clivée par la protéase ATG4 (alors appelé LC3-I), permettant ainsi une association avec ATG7 (activation), puis LC3-I est transféré sur ATG3 (conjugaison), qui permet alors le transfert de PE (liaison).

L'activité d'ATG3 est dépendante du complexe ATG5-ATG12-ATG16 qui, comme LC3, a subi le processus de conjugaison, avec notamment une activation d'ATG12 par association avec ATG7, puis transfert sur la protéine ATG10 qui permet alors une liaison d'ATG12 avec ATG5. ATG16 est ensuite lié à ce complexe pour former ATG12-ATG5-ATG16 (Ichimura et al., 2000).

Le recrutement des protéines LC3-II au niveau des autophagosomes est utilisé comme marqueur de la formation des autophagosomes. En effet, en microscopie à fluorescence l'augmentation du nombre d'autophagosome est associée à l'apparition d'un profil punctiforme pour la protéine LC3. D'autre part, la lipidation de la protéine LC3-II conduit à une migration par électrophorèse plus rapide que pour la forme LC3-I, ainsi par Western Blot l'accumulation d'autophagosomes est associée à une augmentation de l'intensité de la forme LC3-II (Klionsky et al., 2016) .

c. La fusion de l'autophagosome et du lysosome

Cette étape conduit à la formation d'un autolysosome, permettant ainsi l'acidification du contenu autophagosomal pour que les hydrolases acides soient efficaces et dégradent les cargos. Ce processus de fusion de vésicules fait intervenir la machinerie générale du trafic membranaire intracellulaire, avec l'intervention des protéines de la famille Rab GTPase et les complexe d'ancrage membranaire et de fusion SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachments protein receptor*) (Figure 15e) (Gutierrez et al., 2004; Itakura et al., 2012).

Il est intéressant de noter qu'au cours de l'étape de dégradation des composants lysosomaux, les protéines LC3-II ou les récepteurs impliqués dans l'autophagie sélective sont également dégradés. Ainsi, leur niveau de dégradation permet de caractériser l'activité du flux autophagique. En effet, une inhibition de la dégradation (par inhibition de l'activité des enzymes lysosomales) conduit à une accumulation importante de ces protéines lorsque l'autophagie est activée (Loos et al., 2014).

d. Le recyclage des constituants dégradés

Enfin, les constituants élémentaires issus de la dégradation (tels que les acide aminés et les lipides simples) sont exportés dans le cytoplasme pour être ré-utilisés dans les activités d'anabolisme cellulaire pour soutenir la survie cellulaire et la croissance (synthèse de protéines ou de lipide membranaires). Les mécanismes d'exports ne sont pas encore très bien connus.

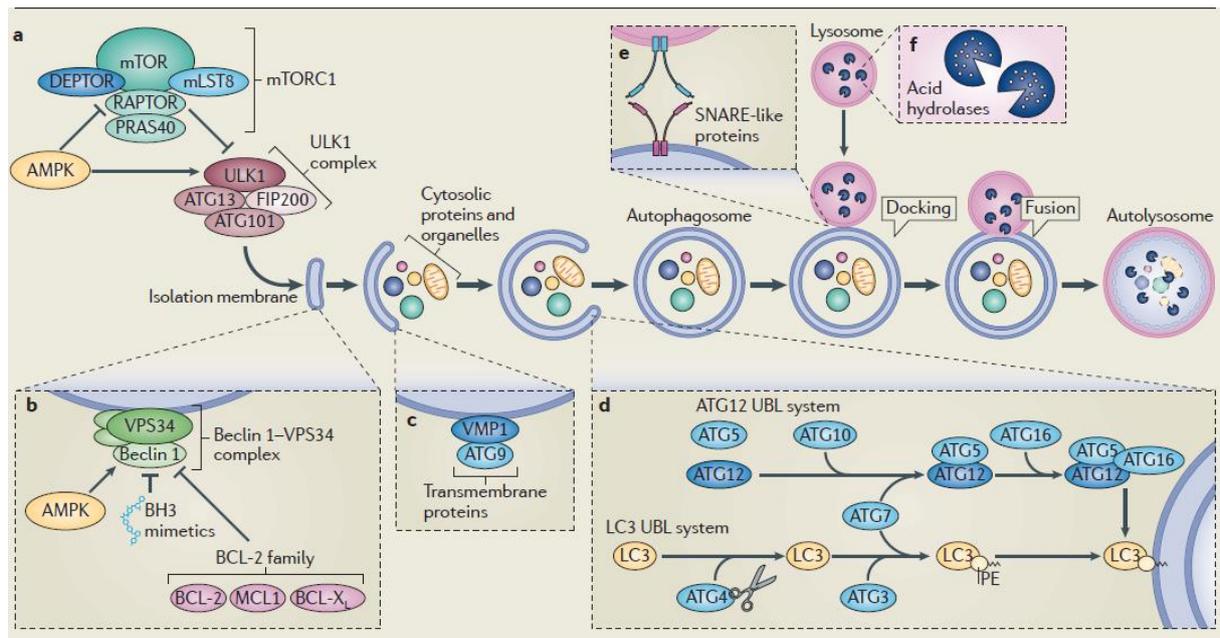


Figure 15 : Mécanismes moléculaires de l'autophagie

La membrane d'isolation définit le site d'initiation de l'autophagie sous la dépendance des complexes ULK1 (a) et Beclin1/Vps34 (b). L'élongation et la fermeture de la membrane autophagosomale autour des cargos à dégrader sont ensuite contrôlées par la protéine ATG9 (c) et la forme lipidée de LC3 (LC3-II, ou LC3-PE). La formation de LC3-II est dépendante de l'activité de deux complexes de conjugaisons (« LC3 UBL system » et « ATG12 UBL system ») (d). La fusion du lysosome et de l'autophagosome est permise grâce à l'activité du complexe SNARE (e) et permettra alors la dégradation des cargos séquestrés dans l'autophagosome (Mariño et al., 2014).

3. Voies de signalisation en amont de l'activation de l'autophagie

L'activation de l'autophagie est régulée en amont par plusieurs voies de signalisation. En dehors des conditions basales, de nombreux stimuli de stress peuvent être responsables de l'activation de l'autophagie. Un grand nombre de ces stimuli convergent vers un des principaux régulateurs de l'autophagie qui est le complexe mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*). Ce complexe est constitué de nombreuses protéines, dont la sérine/thréonine kinase mTOR (Figure 15a). L'activité kinase de mTOR conduit à une phosphorylation inhibitrice du complexe ULK1 (phosphorylation d'ULK1, ainsi que d'ATG13), et est responsable de l'inhibition de l'autophagie (Jung et al., 2009).

Le complexe mTORC1 joue le rôle de centre intégrateur de différents signaux du métabolisme, et son activité favorise les processus de croissance cellulaire lorsque les

conditions métaboliques sont favorables. En condition de stress métabolique (suite à une diminution en acide aminés, d'apport en glucose, en facteurs de croissance, en ATP, en oxygène...), mTOR devient inactif permettant ainsi l'activation de l'activité kinase d'ULK1 et sa translocation au niveau de la membrane du RE pour initier la formation des autophagosomes.

De nombreux mécanismes permettent l'inhibition de mTOR dans des conditions de stress métabolique, une de ces voies fait intervenir la kinase activée par l'AMP (AMPK) (Figure 15a). En réponse à une diminution de l'ATP cellulaire, le niveau d'AMP augmente et active ainsi l'AMPK qui phosphoryle le complexe TSC1/TSC2 (Tuberous Sclerosis 1 et 2) qui sera alors responsable d'une inhibition de l'activité de mTORC1 (Inoki et al., 2003; Shaw et al., 2004). En plus de l'inhibition de mTOR, l'AMPK peut activer directement le complexe ULK1 par phosphorylation d'ULK1, et favorise ainsi l'induction de l'autophagie (Kim et al., 2011).

Cette voie de signalisation, en plus d'être sensible à des stress métaboliques, est également sensible à des stress génotoxiques (Figure 16) (Eliopoulos et al., 2016). En particulier, de nombreux agents induisent des dommages à l'ADN *via* une production de ROS. Le mécanisme de réparation de ce type de dommages (BER) fait intervenir la protéine PARP1. L'activité de PARP1 entraîne une déplétion du pool d'ATP, qui constitue alors un signal d'activation de l'AMPK, et donc de l'autophagie (Muñoz-Gómez et al., 2009). D'autre part, des agents qui induisent des DSB peuvent aussi activer l'AMPK *via* l'activation de la kinase ATM, conduisant ainsi à l'inhibition de mTORC1 et à l'activation de l'autophagie (Alexander et al., 2010a, 2010b; Sanli et al., 2010).

De plus, il a été décrit que p53 joue un rôle important dans la régulation de l'autophagie en réponse à des dommages à l'ADN. En effet, le pool cytoplasmique de p53 inhibe le complexe ULK1 en interagissant avec FIP200, inhibant ainsi la formation des autophagosomes (Morselli et al., 2011). En réponse à des dommages à l'ADN, p53 est transloqué dans le noyau et participe à l'activation de l'autophagie d'une part parce qu'il n'inhibe plus le complexe ULK1, et d'autre part parce qu'il induit l'expression de gènes qui favorisent l'autophagie (Figure 16). En particulier, p53 induit l'expression des sous unités de l'AMPK, de

PTEN (une phosphatase en amont de la signalisation de mTORC1 qui inhibe ce complexe), des Sestrine 1 et 2 (qui sont des senseurs intracellulaires de leucine, impliquées dans l'activation de l'AMPK et l'inhibition de mTOR) et de DRAM1 (une protéine lysosomale qui est nécessaire à l'autophagie induite par p53) (Budanov and Karin, 2008; Crighton et al., 2006; Feng et al., 2007).

Il a également été montré que de nombreux gènes de la famille des ATG sont des cibles directes de p53, p63 et p73 (ATG4, ATG5, ULK1, UVRAG...) (Kenzelmann Broz et al., 2013). De plus, une des protéines anti-apoptotique (BCL-2) a été décrite pour interagir avec Beclin1 et inhiber l'induction de l'autophagie (Figure 16) (Pattingre et al., 2005). Ainsi, l'expression des pro-apoptotiques par p53 qui sont capables d'interagir avec BCL-2 vont conduire au déplacement de cette interaction inhibitrice et activer l'autophagie (Maiuri et al., 2007).

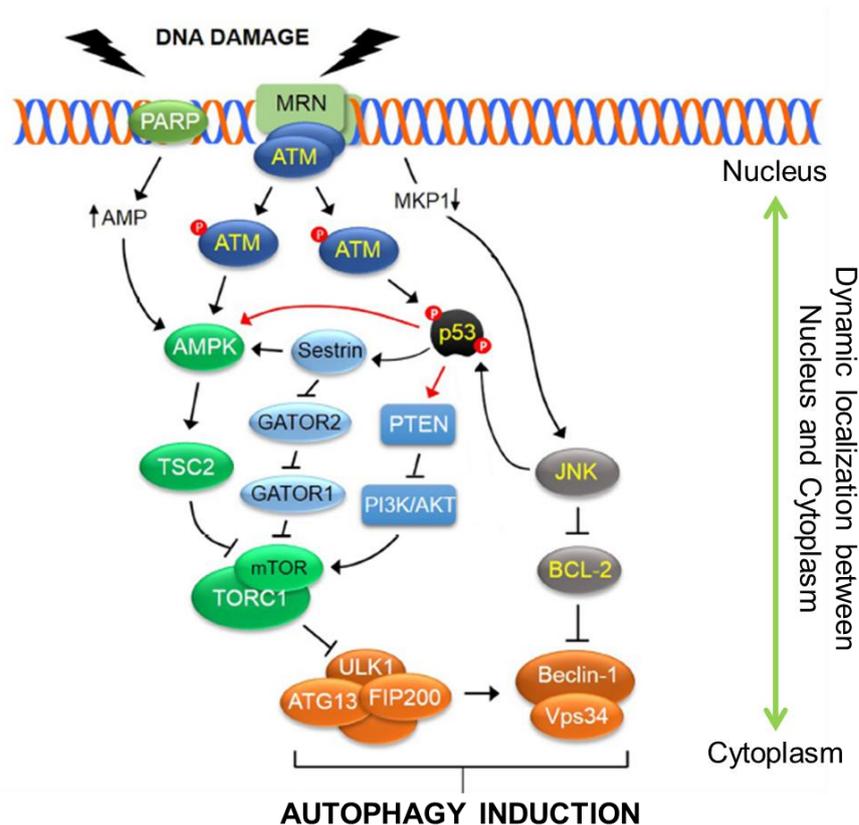


Figure 16 : Mécanisme d'activation de l'autophagie en réponse à des dommages à l'ADN

En réponse à des dommages à l'ADN l'autophagie peut être activée *via* l'inactivation de mTORC1 en aval de l'activation de l'AMPK en fonction du niveau énergétique cellulaire, de l'activité d'ATM, des Sestrines et de p53. mTORC1 peut également être inhibé de façon indépendante de l'AMPK par les Sestrines ou p53. Le complexe Beclin1/Vps34 est régulé négativement par BCL-2. Les flèches en rouge indiquent des régulations transcriptionnelles (Eliopoulos et al., 2016).

4. Rôle de l'autophagie dans les cancers

a. Rôle de l'autophagie dans la progression tumorale

i. Rôle anti-tumoral

Dans le contexte du cancer, au cours des étapes précoces du développement tumoral, l'inhibition de l'autophagie favorise le développement tumoral. En effet, il a été observé que des souris déficientes pour des gènes autophagiques Beclin1, ATG5 ou ATG7 présentent une susceptibilité plus grande de développer des tumeurs du foie (Qu et al., 2003; Takamura et al., 2011). De plus, l'activation de certains oncogènes (PI3K, AKT, BCL-2) ou l'inhibition de suppresseurs de tumeurs (p53, PTEN, LKB1), ont tendance à diminuer l'autophagie (Maiuri et al., 2009). Il a d'ailleurs été décrit dans un modèle de carcinome hépatique qu'une activité autophagique faible corrèle avec une surexpression de la cycline D, et un pronostic de survie faible. Ainsi, l'autophagie semble jouer un rôle important dans le développement tumoral hépatique car en effet, une inhibition de l'autophagie conduit à une accumulation de la cycline D et l'acquisition de caractéristiques tumorigéniques importantes (Wu et al., 2018).

De plus, l'autophagie semble jouer un rôle important dans le processus de cytokinèse. En effet, l'autophagie est impliquée dans la dégradation sélective de RhoA et permet l'activation très restreinte de RhoA au niveau de la membrane d'invagination. Une inhibition de l'autophagie conduit à un recrutement de RhoA sur une zone plus large au niveau de la membrane d'invagination et cause ainsi une régression du sillon de clivage et la formation de cellules tétraploïdes (Belaid et al., 2013). Etant donné le rôle potentiellement tumorigénique de ces cellules tétraploïdes, l'autophagie, par la régulation du recrutement de RhoA, participe au maintien de l'intégrité génomique.

De plus, il a également été décrit que l'autophagie joue un rôle important dans la dégradation du midbody à la fin de la cytokinèse et protège ainsi d'une prolifération intensive. En effet, à la fin de la cytokinèse, l'abscission se réalise d'un seul côté du midbody, ce dernier est alors hérité par une seule des deux cellules filles. A la suite de ce processus, le midbody peut soit être relâché dans le milieu extracellulaire, ou alors retenu par la cellule

filles. Il a été montré que les cellules qui conservent leur midbody sont les cellules qui maintiennent une capacité de prolifération importante (Ettinger et al., 2011). Ce midbody est ensuite en général dégradé par l'autophagie (Pohl and Jentsch, 2009).

Mais, il a été montré que les cellules souches et les cellules souches cancéreuses peuvent accumuler les midbody grâce à un mécanisme d'échappement de l'encapsulation par l'autophagosome et est associé à un potentiel tumorigène accrue (Kuo et al., 2011).

ii. Rôle pro-tumoral

Cependant, certaines études ont également montré un rôle pro-tumoral de l'autophagie au cours de la tumorigenèse. En particulier, les cancers médiés par Ras, Raf semblent être « addict » de l'autophagie pour leur progression (Guo et al., 2011; Yang et al., 2011). En plus du rôle pro-tumoral de l'autophagie dans les cellules tumorales elles-mêmes, il a également été décrit que l'activation de l'autophagie dans les cellules du micro-environnement tumoral peut favoriser la croissance tumorale. Cette étude conforte l'idée que l'autophagie du micro-environnement tumoral participe au recyclage des nutriments afin de favoriser le développement des cellules tumorales en fournissant des substrats pour la croissance dans un environnement pauvre en nutriments (Katheder et al., 2017).

De nombreuses études suggèrent que l'autophagie joue également un rôle dans le processus métastatique (Mowers et al., 2017). En particulier, l'autophagie semble importante dans la modulation de la motilité cellulaire et de l'invasion notamment *via* la production de protéines pro-migratoires (IL-6 et la métalloprotéinase 2) (Lock et al., 2014), pour la viabilité des cellules souches cancéreuses ainsi que pour le maintien de leurs caractéristiques souches (Cufí et al., 2011; Espina et al., 2010).

L'autophagie joue donc un rôle double dans les cancers à la fois anti- et pro-tumoral, mais la modalité d'action de l'autophagie semble être très dépendante du contexte (White, 2012). En particulier, l'autophagie peut moduler de façon importante la réponse aux traitements. En effet, l'autophagie a souvent été décrite pour être un mécanisme de résistance aux thérapies anticancéreuses (Bray et al., 2012; Dörr et al., 2013; Xie et al., 2013). Mais elle peut également favoriser la mort cellulaire (Kanzawa et al., 2004; Knizhnik et al., 2013).

b. Implication de l'autophagie dans la voie de réparation des dommages à l'ADN

En plus du rôle antitumoral de l'autophagie dans la protection contre la tétraploïdisation et le contrôle de la prolifération (par dégradation de RhoA et du midbody respectivement), l'autophagie joue également un rôle important dans le maintien de l'intégrité du génome.

En effet, des souris déficientes pour des gènes impliqués dans les mécanismes de l'autophagie (Beclin1, UVRAG, ATG5 ou ATG7) conduisent à l'accumulation de dommages à l'ADN et favorisent la tumorigenèse (Liang et al., 2006; Takamura et al., 2011; Yue et al., 2003). L'un des mécanismes par lequel l'autophagie participe au maintien de l'intégrité génomique passe par la prévention de la production de ROS qui sont responsables de l'apparition de dommages de l'ADN, grâce à l'élimination de mitochondries dysfonctionnelles et de la protéine p62 (Mathew et al., 2007, 2009).

En plus, l'autophagie est impliquée dans de nombreux processus de réparation.

Elle est notamment impliquée dans la stabilisation de la protéine CHK1 après son activation par des dommages à l'ADN. En effet, il a été montré qu'en absence d'une autophagie fonctionnelle, CHK1 activé est dégradé de façon importante par le protéasome. Cette dégradation est alors associée à une déficience dans les mécanismes de réparation par recombinaison homologue (Liu et al., 2015).

Une autre étude a également montré qu'à la suite de l'induction de dommages à l'ADN, RAD51 (protéine de la réparation par recombinaison homologue) est dégradé par le protéasome grâce à un ciblage par la protéine p62 (Hewitt et al., 2016). En effet, p62 est un des récepteurs de l'autophagie qui est impliqué dans l'autophagie sélective, mais p62 peut également favoriser la dégradation de protéines par la voie protéasomale (Korolchuk et al., 2009). Ainsi, la dégradation de p62 par l'autophagie empêche la dégradation de RAD51 et favorise la réparation des dommages à l'ADN par recombinaison homologue (Hewitt et al., 2016).

Il a également été décrit qu'en réponse à des dommages à l'ADN, CHK1 est dégradé par la voie de l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA). Dans ce contexte également, une inhibition de la CMA conduit à des défauts de la réparation de l'ADN (Park et al., 2015).

D'autres études ont impliqué l'autophagie dans le maintien de l'intégrité génomique, en particulier par sa capacité à favoriser le processus de réparation NER (Qiang et al., 2016), et également de par la propriété générale de l'autophagie à fournir l'énergie suffisante pour favoriser la réparation de l'ADN et retarder la mort cellulaire par apoptose (Yoon et al., 2012).

c. Rôle de l'autophagie dans la sénescence

Le rôle de survie de l'autophagie vient aussi du fait qu'elle favoriserait l'établissement de la sénescence. En effet, l'autophagie et la sénescence semblent très liées puisque de nombreuses situations conduisant à la sénescence cellulaire (en réponse à des agents anticancéreux ou en réponse à d'autres stress), induisent également l'autophagie. Il a été montré que l'autophagie est importante pour la mise en place de la sénescence en réponse à différents stimuli (Goehe et al., 2012; Narita et al., 2011; Young et al., 2009). En particulier, l'autophagie peut être activée par une surexpression des inhibiteurs du cycle cellulaire impliqués dans l'établissement de la sénescence (p16 et p21) (Capparelli et al., 2012).

Pourtant, le rôle de l'autophagie dans la sénescence est controversé. En effet, même si l'autophagie accélère l'apparition du phénotype sénescence, elle n'est pas nécessaire puisqu'en absence d'autophagie la sénescence s'établit, mais simplement avec un peu de retard (Gewirtz, 2013; Goehe et al., 2012). De plus, une étude a montré que la dégradation sélective de GATA4 (un facteur de transcription impliqué dans la production des SASP) par l'autophagie aurait un rôle plutôt anti-sénescence (Kang et al., 2015). Les auteurs proposent dans cette étude que l'autophagie générale serait importante pour la mise en place du phénotype sénescence, mais que l'autophagie sélective induisant la dégradation de GATA4 joue un rôle anti-sénescence. Ils ont d'ailleurs montré que l'activité d'ATM et ATR en réponse à des dommages à l'ADN est responsable de l'inhibition de la dégradation de GATA4 par l'autophagie sélective et permettant ainsi l'établissement de la sénescence.

d. Rôle de l'autophagie dans la mort cellulaire

L'accumulation d'autophagosomes est souvent observée dans les cellules qui subissent l'apoptose en réponse à de nombreux signaux extracellulaires (radiations ionisantes, chimiothérapie, agents anticancéreux...). De plus nous avons vu dans les parties précédentes que des voies de signalisations communes permettaient d'induire l'autophagie et l'apoptose en réponse à des dommages à l'ADN.

De façon générale, l'autophagie est activée pour faire face à un stress et induire un mécanisme d'adaptation. En effet, il est assez souvent observé que l'autophagie bloque l'induction de l'apoptose, et qu'à l'inverse l'activation des caspases au cours de l'apoptose inhibe l'autophagie et empêche son action cytoprotective pour accélérer la disparition de la cellule. L'autophagie et l'apoptose sont donc mutuellement inhibiteurs (Mariño et al., 2014). Cependant, dans certains cas, l'autophagie contribue à la mort cellulaire soit par la mort autophagique, ou en favorisant l'apoptose. Nous verrons donc dans cette partie comment l'autophagie peut jouer un rôle dans la balance entre la survie et la mort cellulaire.

i. L'autophagie protège de la mort cellulaire

L'autophagie inhibe l'apoptose en particulier grâce à la dégradation sélective de composants essentiels à l'induction de l'apoptose. En effet, les mitochondries qui ont subi une perte de leur potentiel transmembranaire et une fragmentation mitochondriale subissent la mitophagie (autophagie sélective des mitochondries) (Kim and Lemasters, 2011; Youle and Narendra, 2011). De plus, il a été décrit que la caspase 8 active peut également être la cible de l'autophagie sélective, et être envoyée vers la dégradation lysosomale (Hou et al., 2010).

A l'inverse, au cours de l'apoptose de nombreuses protéines autophagiques sont clivées. Certains de ces fragments de protéines autophagiques clivés pourraient avoir un rôle dans la potentialisation de l'apoptose, tels que des fragments de Beclin1, ATG4D, ATG5 (Betin and Lane, 2009; Wirawan et al., 2010; Yousefi et al., 2006). Enfin il semblerait qu'une surexpression des protéines pro-apoptotiques telles que BAX, BAK conduit à une inhibition de l'autophagie (Shimizu et al., 2004).

L'inhibition de l'autophagie semble donc une bonne stratégie thérapeutique afin de favoriser le processus de l'apoptose. De nombreux essais cliniques avec des inhibiteurs d'autophagie ont d'ailleurs été lancés avec l'utilisation de l'hydroxychloroquine (un dérivé de la chloroquine, déjà utilisé en clinique dans le traitement contre la malaria, et qui fonctionne par inhibition de la dégradation lysosomale) (Chude and Amaravadi, 2017). Un des mécanismes moléculaire le plus direct qui ait été décrit pour expliquer l'efficacité de l'association d'inhibiteurs de l'autophagie avec des thérapies anti-cancéreuses dans la sensibilisation des tumeurs aux agents anti-cancéreux fait intervenir le facteur de transcription Foxo3a (Codogno and Morel, 2018). En effet, Foxo3a est dégradé au niveau basal par l'autophagie, de ce fait lorsque l'autophagie est inhibée, Foxo3a est stabilisé et induit l'augmentation de l'expression de gènes pro-apoptotiques (comme PUMA). C'est donc l'augmentation de l'expression de PUMA qui est responsable de la sensibilisation à la mort cellulaire induite par l'inhibition de l'autophagie (Fitzwalter et al., 2018).

ii. L'autophagie participe à la mort cellulaire

L'autophagie peut être impliquée dans la mise en place de la mort cellulaire. En effet, il a été observé dans de très rares cas que l'autophagie intensive conduit vraiment à la mort cellulaire (c'est la mort autophagique) (Fulda, 2017; Shen et al., 2012). En particulier, la mort autophagique a été décrite en réponse au témozolomide, un agent anti-cancéreux inducteur de dommages à l'ADN (Kanzawa et al., 2004; Knizhnik et al., 2013). D'autres agents anticancéreux tels que des BH3 mimétiques (qui inhibent les anti-apoptotiques et induisent la mort des cellules cancéreuses qui surexpriment BCL-2) peuvent aussi induire la mort autophagique dans un contexte où les cellules sont déficientes pour l'apoptose (Lian et al., 2011; Voss et al., 2010).

Mais il existe de nombreux exemples où le processus autophagique, ou bien les protéines de la machinerie autophagique favorisent l'activation de la mort apoptotique ou nécrotique. En particulier, il a été montré que la formation des autophagosomes pourrait servir de plateforme d'activation de la caspase 8, en formant un complexe entre FADD, ATG5, LC3, p62 et la caspase 8. Dans ce contexte le processus de dégradation n'est pas nécessaire pour l'activation de la caspase 8 (Young et al., 2012).

D'autre part, la protéine ATG12 a été décrite pour interagir avec les protéines anti-apoptotiques BCL-2 et MCL-1 empêchant ainsi leur interaction avec les protéines pro-apoptotiques, et libérant ces derniers pour faciliter le processus apoptotique (Rubinstein et al., 2011).

Il a également été montré que la machinerie autophagique (en particulier par l'intermédiaire de p62) pouvait servir de plateforme importante pour le choix de la mort par apoptose ou par nécroptose (Goodall et al., 2016). De plus, l'autophagie peut également avoir un rôle promoteur de nécrose, en effet il a été mis en évidence que la dégradation sélective de la catalase (une enzyme antioxydante) conduisait à une augmentation de la production de ROS et favorisait ainsi la mort nécrotique (Yu et al., 2006).

Ainsi, le rôle de l'autophagie dans les cancers est très complexe car l'autophagie peut à la fois favoriser et inhiber la progression tumorale par différents mécanismes. Elle participe également à la survie de la cellule en réponse à des stress génotoxiques grâce à son rôle important dans le contrôle de l'intégrité génomique, et en participant à l'inhibition de l'apoptose dans de nombreux contextes. Mais elle peut également dans certains contextes favoriser la mort cellulaire.

De plus, l'autophagie semble jouer un rôle important dans la mise en place de la sénescence, or nous avons également vu précédemment que la sénescence peut avoir un rôle complexe dans les cancers.

Il est alors très important de comprendre le contexte tumoral et les mécanismes de la réponse à différents traitements anti-cancéreux avant d'envisager un ciblage de l'autophagie dans la thérapie anti-cancéreuse. Les futures recherches permettront de comprendre un peu mieux les mécanismes de régulation de l'autophagie et son implication dans les différentes conditions afin de pouvoir cibler spécifiquement l'autophagie pro-tumorale ou anti-tumorale.

IV) Les structures G-quadruplexes (G4) comme cibles pour des agents anti-cancéreux

A. Généralités sur les structures G4

1. La formation des structures G4 *in vitro*

Depuis 1953, nous connaissons la structure de l'ADN typiquement sous la forme d'une double hélice droite (ADN-B), stabilisée par des liaisons hydrogènes de type Watson et Crick entre des paires de bases. En revanche, il a été mis en évidence que l'ADN peut adopter des conformations alternatives. En particulier, les régions d'ADN riches en guanine peuvent adopter une conformation non canonique en hélice à quatre brins, appelée structure G-quadruplexe (ou G4).

Il a d'abord été observé par Bang, dès les années 1910 qu'une solution d'acide guanylique forme un gel à haute concentration. Puis il fallut attendre 1962 pour que des études de structure par rayon-X permettent d'identifier l'assemblage d'une hélice à quatre brins. Cette hélice est issue de l'interaction coplanaire de 4 guanines entre elles par des liaisons hydrogènes de type Hoogsteen, formant ainsi un G-quartet (Figure 17A) (Gellert et al., 1962). L'empilement d'au moins deux G-quartets, stabilisés par des interactions d'empilement entre les G-quartets et la présence de cations, conduit à la formation d'une structure G4 (Figure 17B).

Les structures G4 sont assez polymorphes, c'est-à-dire qu'elles peuvent adopter des structures assez différentes. Différents paramètres expliquent cette variabilité. Les G4 peuvent d'abord être intra- ou inter-moléculaires, constitués respectivement d'un ou de plusieurs brins d'oligonucléotides. Ils peuvent comporter un nombre variable (au moins deux) de G-quartets, et adopter différentes conformation selon l'orientation parallèle ou anti-parallèle des brins et la nature des boucles qui les relie (Figure 17C) (Davis, 2004; Ma et al., 2015).

La formation des structures G4 *in vitro* est dépendante de la présence de cations monovalents (Na⁺ ou K⁺) (Williamson et al., 1989). Ces cations occupent la cavité centrale entre les piles de G-quartets, neutralisant les répulsions électrostatiques des atomes d'oxygène qui pointent vers le centre. La nature du cation joue un rôle sur la topologie de la structure G4 (Sen and Gilbert, 1990).

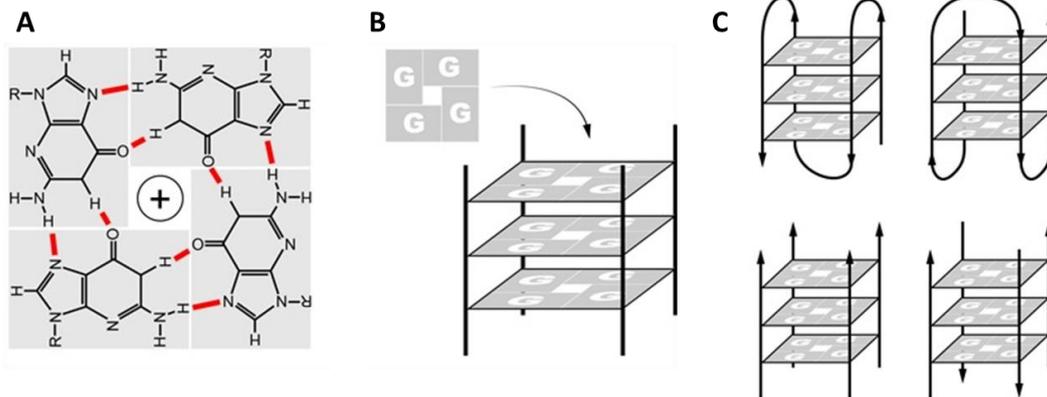


Figure 17 : Structure d'un G-quadruplexe

A. Structure d'un G-quartet. B. L'empilement d'au moins deux G-quartets forme une structure G-quadruplexe (G4). C. Polymorphisme des structures G4 intra- ou inter-moléculaires, parallèles ou anti-parallèles (Rhodes and Lipps, 2015).

2. Identification des structures G4 *in vivo*

L'hypothèse de la formation de structure G4 *in vivo* s'est posée dès la fin des années 1980. En effet, il a été montré que des séquences d'oligonucléotides riches en guanine, correspondant à des séquences d'ADN génomique de différents organismes, sont capables de former des structures G4 *in vitro*, stabilisées par des cations monovalents dans des tampons physiologiques. En particulier, ces études ont été réalisées avec des oligonucléotides correspondant à des séquences télomériques, qui sont constituées de séquences répétées courtes riches en guanine (Henderson et al., 1987; Sundquist and Klug, 1989; Williamson et al., 1989).

Ces structures G4 ont d'abord été considérées comme d'éventuels artéfacts des expériences *in vitro*. Cependant, de nombreux arguments en faveur de leur existence se sont accumulés au fur et à mesure. En particulier, la formation de ces structures a pu être observée *in cellulo* au niveau des télomères de l'organisme cilié *Stylonychia lemnae*

(Schaffitzel et al., 2001) et également chez les mammifères grâce à la production d'anticorps dirigés contre ces structures (Biffi et al., 2013; Henderson et al., 2014), bien que des réactions croisées aient pu être identifiées (Kazemier et al., 2017). Il a également été montré que des molécules radiomarquées ou fluorescentes, qui se lient spécifiquement aux structures G4, se localisent au niveau de l'ADN génomique, dans le noyau des cellules (Granotier et al., 2005; Shivalingam et al., 2015).

De plus, des études bioinformatiques ont permis d'identifier des séquences qui formeraient potentiellement des structures G4 (PG4, pour *putative G-quadruplex sequences*) dans le génome humain. Ces études se sont basées sur de nombreuses données obtenues *in vitro*, qui ont permis de déterminer des caractéristiques de la formation et de la stabilité des structures G4 en fonction de leur séquence primaire. Ces études ont ainsi permis de créer des algorithmes capables de prédire les PG4. Les premiers algorithmes se sont donc basés sur le fait que :

- la concentration faible en ADN dans le noyau favoriserait la formation de structure G4 intramoléculaire,
- le nombre de G-quartet est au moins égal à 3,
- la taille des boucles entre les G-quartets est comprise entre 1 et 7 nucléotides.

Les séquences PG4 identifiées présentent ainsi au moins 4 séries d'au moins 3 guanines à la suite, chaque série de guanine étant séparées par un maximum de 7 nucléotides dont la nature est indifférente ($G_{\geq 3}N_XG_{\geq 3}N_XG_{\geq 3}N_XG_{\geq 3}$). Deux équipes indépendantes ont réalisé cette analyse avec des algorithmes légèrement différents et ont trouvés des résultats similaires. Ces analyses ont ainsi identifié plus de 375 000 PG4 dans le génome humain (Huppert and Balasubramanian, 2005; Todd et al., 2005).

Ces analyses computationnelles ont permis d'identifier un enrichissement des PG4 au niveau des régions télomériques et subtélomériques, mais aussi dans des régions régulatrices du génome telles que les promoteurs de gènes, les régions UTR des ARNm ou encore au niveau des origines de réplication (Hänsel-Hertsch et al., 2017; Rhodes and Lipps, 2015).

En effet, plus de 40% des gènes présentent au moins un PG4 dans les 1000 bases en amont du site d'initiation de la transcription (TSS, pour *Transcription Start Site*). De plus ces PG4 sont proches ou chevauchent des sites de liaisons de facteurs de transcription, suggérant ainsi que les PG4 joueraient un rôle de régulateurs de la transcription et sont plus fréquents dans les promoteurs des oncogènes et des gènes régulateurs que dans ceux des gènes de ménage (Eddy and Maizels, 2008; Huppert and Balasubramanian, 2007).

Au niveau des séquences codantes du gène, il semblerait que les PG4 soient sous-représentés, en revanche ils sont enrichies au niveau des régions 5'- et 3'-UTR des ARNm (Huppert et al., 2008; Kumari et al., 2007). Ces résultats ont également été confirmés par une étude de ChIP-seq en immunoprécipitant les structures G4 grâce à un anticorps anti-G4 et en réalisant un séquençage des régions d'ADN obtenus. Les auteurs ont ainsi montré que les structures G4 se forment effectivement *in cellulo*, et ils ont confirmé l'enrichissement de ces structures au niveau de régions sub-téломériques, dans les gènes et dans leurs régions régulatrices (Lam et al., 2013). L'ensemble de ces données suggèrent donc que les structures G4 pourraient réguler l'expression des gènes au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.

Enfin, il a également été observé que 90% des origines de réplication humaines présentent un PG4, et ces PG4 se retrouveraient en densité plus importante près des origines fréquemment utilisées, suggérant aussi un rôle important dans la régulation de l'initiation de la réplication (Besnard et al., 2012).

Grâce à l'approfondissement des connaissances structurelles des G4, d'autres algorithmes ont été développés. En effet, il avait été montré que des boucles jusqu'à 30 nucléotides permettent de former un G4 stable, suggérant ainsi qu'il y a de nombreuses séquences PG4 qui n'ont pas été identifiées (Guédin et al., 2010). Ces nouveaux algorithmes ont également pris en compte certains faux-positifs, c'est-à-dire des séquences PG4 mais qui ne forment pas de structure G4 *in vitro*. En particulier, l'algorithme G4Hunter a été développé. Cet algorithme est capable par ailleurs de donner un score de prédiction de formation de la structure G4. Selon cet algorithme, le nombre de PG4 identifiés dans le

génomique humaine devrait être revue largement à la hausse, et pourrait ainsi permettre de suggérer de nouvelles fonctions à ces structures G4 (Bedrat et al., 2016).

B. Inhibition de la télomérase par stabilisation des structures G4 télomériques

1. Structure et fonction des télomères

a. Structure des télomères : le complexe *shelterin*

Les télomères constituent un complexe nucléoprotéique à l'extrémité des chromosomes linéaires. Il s'agit d'une structure spécialisée qui permet de protéger les séquences d'ADN plus interne d'une activation inappropriée de la voie de réparation des dommages à l'ADN, mais également de la perte de séquence qui s'opère à chaque cycle de réplication de l'ADN. La séquence d'ADN télomérique des eucaryotes est constituée de répétitions en tandem de séquences télomériques riches en Guanine, ces séquences étant très conservées entre des espèces phylogénétiquement proches. En particulier, chez les vertébrés, l'ADN télomérique est constitué de la séquence hexanucléotidique 5'-TTAGGG-3' (Meyne et al., 1989; Moyzis et al., 1988). Les télomères sont également constitués de six protéines (TRF1, TRF2 et POT1, TIN2, TPP1 et RAP1), l'ensemble de ces protéines et de l'ADN télomérique forment ainsi le complexe *shelterin* (Figure 18a) (pour revue Jafri et al., 2016).

Chez l'homme, la séquence télomérique est répétée en tandem sur environ 10 à 15kb à la naissance, donnant lieu à un brin riche en G et l'autre riche en C. Le brin riche en G est prolongé en 3', constituant un simple brin de 150 à 200 nucléotides de long (Makarov et al., 1997). L'extrémité 3' simple brin peut se replier et envahir la région homologue TTAGG double brin, formant une boucle télomérique (t-loop) (Figure 18b). La t-loop, en séquestrant l'extrémité 3' de l'ADN télomérique fournit une protection contre la reconnaissance de l'extrémité par la machinerie de la réparation des DSB et empêche ainsi l'activation de la

voie de DDR qui conduirait à fusionner deux extrémités de chromosomes différents (Doksani et al., 2013; Griffith et al., 1999).

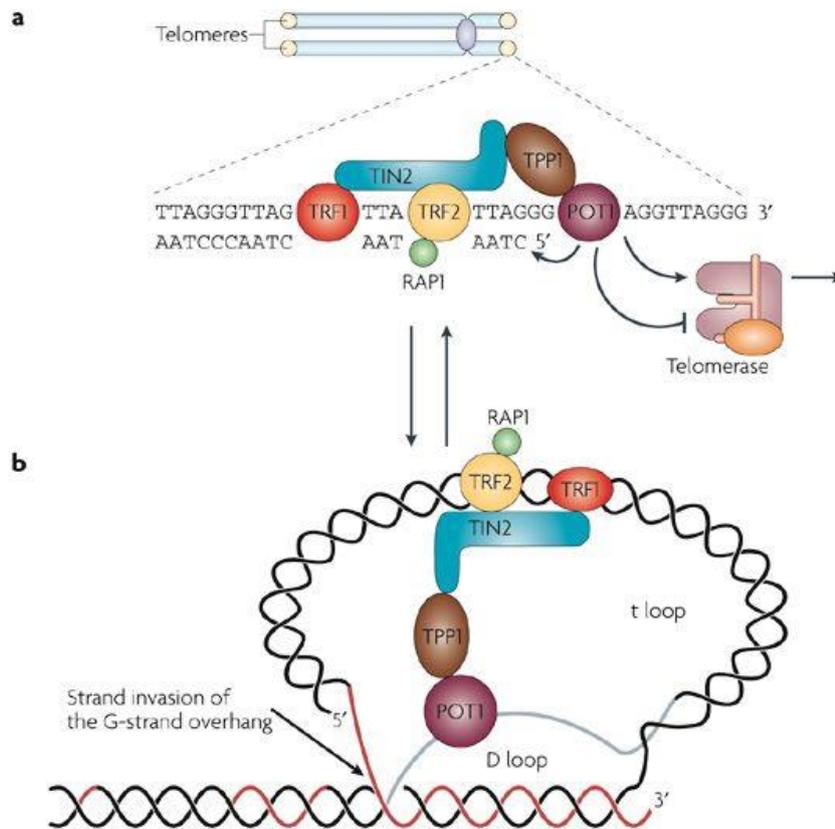


Figure 18 : Structure des télomères (le complexe *shelterin*)

L'ADN télomérique est composé de séquences répétitives TTAGGG se terminant en un simple brin 3'. Les six protéines télomériques s'associent à ces séquences d'ADN pour former le complexe *shelterin* (a). Le simple brin en 3' peut envahir la région double brin télomérique en créant une boucle télomérique (t-loop) et une boucle de déplacement (D-loop) au niveau du site d'invasion (b) (Deng et al., 2008).

Les protéines télomériques TRF1 et TRF2 reconnaissent directement les duplex répétés d'ADN TTAGGG et s'y fixent (Lin et al., 2014). Ils ont des rôles importants dans l'architecture du télomère, régulant la taille de ces derniers (Smogorzewska et al., 2000), et TRF2 est également impliqué dans la formation de la t-loop (Doksani et al., 2013). TIN2 joue un rôle dans la connexion et la stabilisation des protéines TRF1 et TRF2 au niveau des télomères (Ye et al., 2004). RAP1 interagit directement avec TRF2 et ce complexe joue un rôle dans la régulation de la taille des télomères grâce au recrutement de protéines de la réparation des DSB par RPA1 (en particulier les complexes MRN et Ku70/80) (O'Connor et al., 2004).

La protéine POT1 est recrutée au niveau du simple brin TTAGGG grâce à son interaction avec TPP1 et contribue aussi à la régulation de la taille des télomères (Liu et al., 2004).

b. Protection des extrémités chromosomiques de l'activation de la voie des DDR

Les protéines du complexe *shelterin*, en plus de jouer un rôle dans la structure et le contrôle de la taille des télomères, ont également un rôle prépondérant dans l'inhibition des mécanismes de réparation des DSB. En effet, l'extrémité télomérique peut être reconnue comme cassure double-brin et activer la voie des DDR. L'activation de ces mécanismes entraîne la fusion des extrémités des chromosomes, conduisant à une instabilité génomique et favorisant ainsi la tumorigénèse (pour revue Arnoult et al., 2017). Il a ainsi été montré que TRF2 est capable d'empêcher l'activation d'ATM (Karlseder et al., 1999), notamment grâce à la formation de la t-loop qui empêche la reconnaissance d'un DSB. Mais TRF2 est également capable d'inhiber la voie de signalisation en aval d'ATM (Okamoto et al., 2013) et la réparation des DSB par NHEJ (Ribes-Zamora et al., 2013). De plus le complexe TPP1-POT1 est responsable de l'exclusion de RPA au niveau du simple-brin télomérique en 3', empêchant ainsi l'activation d'ATR (Gong and de Lange, 2010).

Une dysfonction télomérique peut se produire lorsque la structure du complexe *shelterin* est perturbée. Elle conduit à l'activation des voies de réparation des dommages à l'ADN, et au recrutement de nombreuses protéines impliquées dans la réparation au niveau des télomères. On note notamment l'apparition de foci de γ H2AX, MDC1, NBS1, RNF8, RNF168, 53BP1 au niveau des télomères appelés alors TIF (*Telomere dysfunction-Induced Foci*) (Takai et al., 2003).

De façon physiologique, la dysfonction télomérique et la formation de TIF ont été observées au cours de la sénescence répliquative lorsque les télomères deviennent trop courts pour que la t-loop se forme (d'Adda di Fagagna et al., 2003). L'absence de formation de la t-loop conduit à un recrutement d'ATM au niveau du télomère qui est capable de phosphoryler ses cibles et notamment γ H2AX, permettant le recrutement des protéines du TIF. En revanche, la présence de TRF2, même en faible quantité est toujours capable d'inhiber la fusion des extrémités des chromosomes par NHEJ, et permettant ainsi l'arrêt des cellules en

sénescence sans que le génome ne soit déstabilisé par des fusions de télomères (Cesare et al., 2013).

La dysfonction télomérique et la formation des TIF peuvent également être provoquées par des délétions des protéines du complexe *shelterin*, alors que les télomères sont toujours longs. En particulier il a été observé que la formation des TIF suite à une délétion de TRF2 est dépendante de l'activation d'ATM, et causant une fusion des extrémités télomériques. Et suite à une délétion de POT1, la formation de TIF est dépendante de l'activation d'ATR (Denchi and de Lange, 2007).

2. Ciblage de la télomérase par les LG4 en thérapie anti-cancéreuse

La télomérase est l'enzyme responsable de l'élongation des télomères et de l'immortalisation des cellules cancéreuses (Bodnar et al., 1998). Elle a premièrement été identifiée chez l'organisme cilié *Tetrahymena* (Greider and Blackburn, 1985). Il s'agit d'un complexe ribonucléoprotéique à activité reverse-transcriptase (Lingner et al., 1997). Chez l'homme, elle est constituée de la sous-unité catalytique hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) et de l'ARN hTR (*human telomerase RNA*) (Feng et al., 1995; Nakamura et al., 1997). L'ARN hTR contient des séquences complémentaires d'une ou plusieurs copies de la région télomérique répétée et agit comme un modèle pour la synthèse de l'ADN télomérique par hTERT. Le recrutement de la télomérase au niveau des télomères se fait notamment grâce à une interaction avec les protéines du complexe *shelterin* TPP1 (interaction directe) et TRF2 (interaction indirecte via la protéine SRSF11) (Lee et al., 2015; Xin et al., 2007).

La télomérase est surexprimée ou réactivée dans 90% des cancers. Un des mécanismes responsable de sa surexpression est l'apparition de mutations dans le promoteur du gène d'hTERT. En effet, des mutations très récurrentes sont souvent observées dans divers types de cancer, dont les cancers de la vessie, les mélanomes, ou encore les gliomes (Allory et al., 2014; Horn et al., 2013; Killela et al., 2013). Ces mutations conduisent au recrutement du facteur de transcription GABP spécifiquement au niveau du promoteur muté d'hTERT responsable de l'activation de son expression (Bell et al., 2015).

Alors qu'elle est surexprimée dans la majorité des cancers, la télomérase est très peu active dans les cellules somatiques normales (Kim et al., 1994; Shay and Bacchetti, 1997). En revanche, les cellules souches hématopoïétiques, de la lignée germinale ou des tissus à renouvellement rapide (comme l'épiderme ou le tissu intestinal) présentent une activation de la télomérase. Mais ces cellules possèdent en général des télomères plus longs que les cellules cancéreuses, et leur taux de prolifération est plus faible (Masutomi et al., 2003; Wright et al., 1996). Ces caractéristiques ont fait de la télomérase une cible très intéressante en thérapie anti-cancéreuse, avec un risque minimum pour le raccourcissement des télomères dans des cellules normales. De plus, il avait été montré que l'inhibition de la télomérase dans les cellules cancéreuses conduit à la mort des cellules tumorales (Hahn et al., 1999; Herbert et al., 1999; Zhang et al., 1999).

Ainsi, de nombreuses stratégies thérapeutiques anti-téломérasique se sont développées. En particulier des oligonucléotides de séquence complémentaire de l'ARN hTR qui joue donc un rôle d'inhibiteur compétitif (Dikmen et al., 2005; Marian et al., 2010), ou encore l'immunothérapie anti-téломérase grâce à la vaccination réalisée à partir de peptides de la télomérase (Kyte, 2009).

Parmi les stratégies d'inhibition de l'activité de la télomérase, il a été envisagé d'exploiter la capacité des télomères à former des structures G4. En effet, il a été montré, *in vitro*, que la formation de ces structures G4 (stabilisés par des cations monovalents) à partir de séquences télomériques conduit à l'inhibition de l'élongation de ces séquences par la télomérase (Zahler et al., 1991). La formation des structures G4 se ferait au niveau du simple brin 3', or c'est ce simple brin qui sert de substrat pour l'élongation par la télomérase. Ainsi la structure G4 inhibe l'activité d'élongation de la télomérase en empêchant l'accès à son substrat. La recherche de molécules capable d'interagir et de stabiliser les structures G4 (appelés ligands G4, LG4) au niveau des télomères et d'inhiber l'activité de la télomérase a été très intense. Il a effectivement été observé que ces LG4 peuvent aussi inhiber l'élongation des séquences télomériques par la télomérase *in vitro* (Fedoroff et al., 1998; Sun et al., 1997). Enfin, il a également été montré *in cellulo* que les LG4 peuvent réduire la taille des télomères dans les cellules cancéreuses (Riou et al., 2002). Ces études suggèrent donc

que les LG4, par leur effet inhibiteur de l'activité de la télomérase, ont un potentiel intéressant dans le cadre d'une thérapeutique anti-cancéreuse.

C. Mécanismes d'action anti-cancéreux des LG4

1. Activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN

Etant donné le rôle des LG4 dans l'inhibition de l'activité de la télomérase observé *in vitro*, les effets cellulaires attendus correspondraient à une réduction progressive de la taille des télomères au fur et à mesure des divisions des cellules cancéreuses. Cette attrition des télomères conduirait ainsi à l'établissement de la sénescence et l'induction de l'apoptose si ces télomères atteignent une taille critique. La sénescence et l'apoptose seraient donc observées approximativement après 40-50 jours de traitements selon les lignées cellulaires et la taille initiale des télomères (Neidle, 2010).

Bien que quelques études ont pu montrer un établissement de la sénescence associé à un raccourcissement progressif des télomères (Burger et al., 2005; Riou et al., 2002), d'autres études ont montré une induction de la sénescence sans raccourcissement des télomères (Gowan et al., 2001; Gunaratnam et al., 2007; Leonetti et al., 2004). De plus, l'induction de la sénescence est observée beaucoup plus tôt qu'attendu car elle se met en place dès 7 à 10 jours de traitement. Ainsi, la taille des télomères ne semble pas être le facteur critique pour l'établissement de la sénescence en réponse à un LG4.

Il a d'ailleurs été observé que des traitements par LG4 conduisent à une augmentation du nombre de ponts d'anaphase caractéristiques de la fusion des extrémités des chromosomes, suggérant une déstructuration des télomères par perte de liaison des protéines du complexe *shelterin*. Certaines études montrent en effet une délocalisation de POT1 ou de TRF2 des télomères suite à un traitement à différents LG4 tels que BRACO-19, RHPS4, Télomestatine, SYUIQ5 (Gomez et al., 2006; Salvati et al., 2007; Tahara et al., 2006; Zhou et al., 2009). Cette délocalisation conduit ainsi à une activation de la voie des DDR, par activation d'ATR/CHK1

et d'ATM/CHK2 respectivement, conduisant à l'apparition de TIF, et qui serait alors responsable des fusions des extrémités chromosomiques observées. De plus, l'activation de ces voies conduit à l'induction de l'expression des protéines p16 et p21 et serait donc responsable de la sénescence (Figure 19A).

Des études de localisation des structures G4 ont montré que ces LG4 se forment majoritairement dans des sites en dehors des télomères (Biffi et al., 2013). Ainsi, la formation de ces structures constitue un obstacle à la progression des polymérase au cours de la réplication ou de la transcription si elles ne sont pas dépliées correctement par les hélicases cellulaires. Il a d'ailleurs été montré qu'en présence du LG4 pyridostatine, de nombreux dommages à l'ADN sont causés de façon dépendante de de la réplication ou de la transcription. Ces dommages à l'ADN sont ainsi responsables de l'activation des points de contrôles des dommages à l'ADN qui conduisent l'arrêt du cycle cellulaire, pouvant mener soit à la sénescence ou à la mort cellulaire (Figure 19B) (Rodriguez et al., 2012).

Cette capacité à induire des dommages à l'ADN de façon dépendante de la réplication est à l'origine d'un stress réplicatif, et peut servir à cibler des cellules déficientes dans leurs mécanismes de réponse au stress réplicatif. En particulier, il a été montré que la pyridostatine conduit à la mort préférentiellement des cellules déficientes pour les mécanismes de réparation par recombinaison homologue (en particulier déficient pour BRCA1 ou BRCA2). Cet effet de la pyridostatine est causé par une augmentation du niveau de stress réplicatif puisque les dommages à l'ADN ne sont pas réparés. De plus la pyridostatine est efficace même lorsque les cellules sont résistantes à l'inhibition de PARP, ces résistances constituant un défi important en clinique (Zimmer et al., 2016).

Au vu du mécanisme d'action de ces LG4 et puisque l'inhibition de la télomérase ne semble pas être le facteur principal responsable de l'effet inhibiteur de la prolifération, la question de la sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales se pose. Ainsi, une étude a montré qu'un élément important dans cette sélectivité est lié à un niveau basal de dommage à l'ADN (et en particulier au niveau des télomères) qui est plus important dans les cellules transformées par rapport aux cellules normales (Salvati et al., 2015).

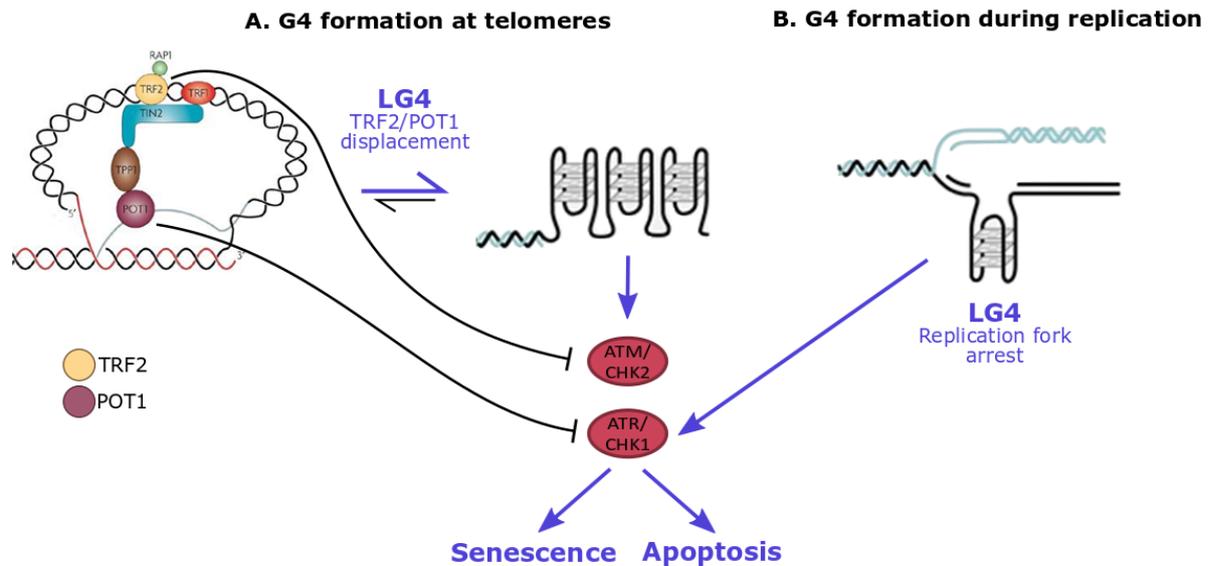


Figure 19 : Activation de la voie de DDR par un traitement aux LG4

A. La stabilisation des structures G4 au niveau des télomères par un LG4 conduit à un déplacement des protéines du complexe *shelterin* TRF2 et/ou POT1 et à l'activation d'ATM et/ou ATR respectivement. B. La stabilisation des structures G4 au niveau des fourches de réplication conduit à un arrêt de la fourche de réplication et l'activation d'ATR. L'activation des DDR (pour DNA Damage Response) est alors responsable de l'induction de la sénescence et/ou de la mort cellulaire par apoptose (inspiré de Balasubramanian and Neidle, 2009 ; Deng et al., 2008 ; Rhodes and Lipps, 2015).

2. Inhibition de l'expression d'oncogènes

Les analyses bioinformatiques ont permis d'identifier un enrichissement des séquences PG4 à cheval ou en amont des promoteurs des gènes, et en particulier de proto-oncogènes. On trouve ainsi des PG4 dans les promoteurs des gènes c-Myc, KRAS, c-Kit, BCL-2 et bien d'autres (pour revue Balasubramanian et al., 2011). Des études de structure ont confirmé la formation des structures G4 *in vitro* à partir de ces PG4 (Cogoi et al., 2008; Dai et al., 2006; Fernando et al., 2006; Simonsson et al., 1998).

Pour certains de ces oncogènes tels que k-Ras ou c-Myc il est difficile de synthétiser des inhibiteurs pharmacologiques, ainsi le ciblage de l'expression des gènes par ciblage des structures G4 de leur promoteur est une stratégie attirante.

La région riche en guanines présente dans le promoteur de c-Myc a été une des premières identifiées et la plus étudiée. En particulier, il a été montré qu'une mutation dans la

séquence du PG4, qui déstabilise la formation de la structure G4 *in vitro*, conduit à une augmentation de l'activité du promoteur de c-Myc *in cellulo*. De plus, l'utilisation du LG4 TMPyP4, qui est capable d'interagir avec le G4 de c-Myc *in vitro*, conduit à une inhibition de l'expression de c-Myc *in cellulo* (Figure 20). Ces résultats sont des arguments forts en faveur de la formation d'une structure G4 dans promoteur de c-Myc, et de sa contribution dans l'inhibition de l'expression de c-Myc (Siddiqui-Jain et al., 2002).

Il a également été montré que certaines protéines sont capables de stabiliser ou au contraire déstabiliser la formation des G4 dans le promoteur de c-Myc. En particulier, la protéine NM23-H2 est capable d'interagir avec la structure G4 de c-Myc (Thakur et al., 2009) et de déplier cette structure, maintenant ainsi le promoteur sous forme linéaire pour le recrutement des facteurs de transcription responsables de l'augmentation de l'expression de c-Myc (Figure 20) (Dexheimer et al., 2009). A l'inverse, la nucléoline est capable d'interagir et de stabiliser la structure G4 du promoteur de c-Myc et conduit à l'inhibition de son expression (Figure 20) (González et al., 2009).

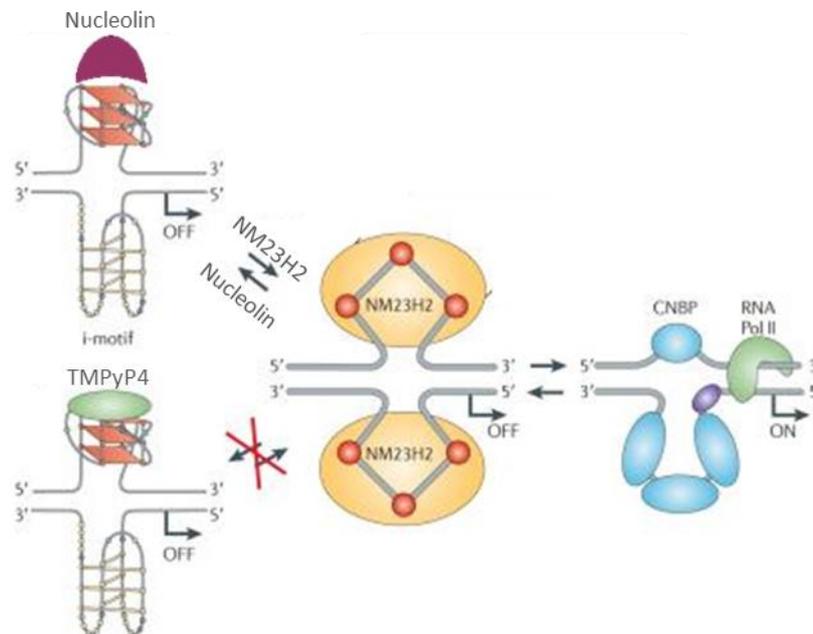


Figure 20 : Régulation de l'activité du promoteur de c-Myc par des structures G4

Les structures G4 formées dans le promoteur de c-Myc peuvent être stabilisées par des protéines (telles que la nucléoline) ou des LG4 (comme le TMPyP4) et sont responsables de l'inhibition de l'expression de c-Myc. La protéine NM23H2 est capable de déstructurer le G4 du promoteur de c-Myc favorisant le recrutement de facteur de transcription et l'expression de c-Myc (adapté de Balasubramanian et al., 2011).

Des études similaires ont été réalisées par rapport à la structure G4 dans le promoteur de KRAS. Une première étude a permis d'identifier plusieurs protéines qui interagissent avec la structure G4 de KRAS, dont la protéine hnRNPA1 (Cogoi et al., 2008). Cette protéine joue un rôle dans la déstabilisation de la structure du G4, et est beaucoup moins efficace en présence du LG4 TMPyP4 (Paramasivam et al., 2009). La déstabilisation de la structure G4 par hnRNPA1 conduit à une stimulation de l'expression de KRAS. Il a d'ailleurs été décrit que cette protéine participe à une boucle de régulation positive de l'expression de KRAS dans un modèle de cancer pancréatique (Chu et al., 2016). De plus, une étude a montré l'efficacité *in vivo* du LG4 MM41 dans un modèle de cancer pancréatique associé à une diminution de l'expression de KRAS ainsi que de BCL-2 (Ohnmacht et al., 2015). Bien que cette étude n'ait pas analysé l'implication de la protéine hnRNPA1 dans l'effet anti-tumoral de MM41, l'ensemble de ces résultats suggèrent que le ciblage de la structure G4 dans le promoteur de KRAS semble aussi être une cible intéressante pour la thérapie anti-cancéreuse.

3. Autres effets anti-cancéreux potentiels

Outre la formation des structures G4 dans les promoteurs des gènes, il a également été décrit que des structures G4 se forment au niveau de l'ADNr (gène codant pour l'ARN ribosomique, constituant essentiel des ribosomes). Il s'agit d'une séquence d'ADN qui contient plus de 400 copies du gène de l'ADNr. Le brin qui ne sert pas de modèle pour la transcription est riche en guanine et capable de former une structure G4.

De plus, la nucléoline, protéine nucléolaire nécessaire pour la transcription de l'ADN ribosomique par l'ARN polymérase I, a été décrite pour interagir avec une très grande affinité pour la structure G4 formée par le brin non transcrit de l'ADNr (Hanakahi et al., 1999). Cette interaction de la nucléoline avec les structures G4 de l'ADNr peut être interrompue par l'action du LG4 Quarfloxine (ou CX-3543), par des effets d'interaction compétitive avec cette structure G4. La nucléoline est alors relocalisée dans le nucléoplasme, conduisant à une inhibition de la transcription de l'ADNr par l'ARN polymérase I et à l'activation d'une réponse apoptotique dans les cellules cancéreuses (Drygin et al., 2009).

Enfin, il a été montré qu'à la suite d'un traitement avec la Quarfloxine, la nucléoline en se retrouvant dans le nucléoplasme interagit et stabilise le G4 dans le promoteur de c-Myc et conduit à une inhibition de l'expression de c-Myc (González et al., 2009). Tous ces mécanismes d'action participent à l'efficacité anti-cancéreuse de la Quarfloxine. Cette molécule est d'ailleurs la première et la seule parmi la classe de molécules qui stabilisent les structures G4 à être entrée en essais clinique. Elle est parvenue jusqu'en phase II pour le traitement de tumeurs neuroendocrine/carcinoïde, mais a été abandonnée à cause de problèmes de biodisponibilité (Balasubramanian et al., 2011).

Les études computationnelles ont révélé l'existence de PG4 en particulier dans les régions 5'-UTR des ARNm. De plus, l'utilisation d'anticorps anti-G4 (Biffi et al., 2014), ou de certains LG4 fluorescents (Cogoi et al., 2013; Hampel et al., 2013) ont montré un marquage nucléaire mais aussi extra-nucléaire, suggérant donc que des structures G4 peuvent effectivement se former dans des acides nucléiques cytoplasmiques tels que les ARNm. Il a notamment été montré que l'ARNm de certains oncogènes tels que KRAS ou BCL-2, présentent un PG4 dans leur 5'-UTR qui est capable de former une structure G4 *in vitro* (Faudale et al., 2012; Shahid et al., 2010). En particulier, la stabilisation de la structure G4 de KRAS par le LG4 TMPyP4-C14 conduit à une inhibition de la traduction de cet ARNm (Faudale et al., 2012).

De plus, de récentes études proposent que les structures G4 pourraient également se former dans les mitochondries. En effet, des études de bioinformatique ont identifié des séquences PG4 dans le génome mitochondrial (Bedrat et al., 2016). La formation de ces structures dans l'ADN mitochondrial pourrait jouer un rôle dans la réplication et la stabilité du génome mitochondrial (Bharti et al., 2014; Wanrooij et al., 2010).

Le ciblage de ces structures G4 de l'ADN mitochondriale semble intéressant en thérapie anti-cancéreuse puisqu'il a été montré qu'un LG4 fluorescent, le BMVC, se localise préférentiellement dans les mitochondries des cellules cancéreuses et induit la mort de ces cellules en supprimant l'expression des gènes mitochondriaux. De plus, les auteurs ont montré que la sélectivité vis-à-vis des cellules normales est basée sur le fait que dans les cellules normales le BMVC se localise plutôt au niveau lysosomal, et constitue un mécanisme de résistance puisque le BMVC ne peut alors pas cibler les G4 mitochondriaux (Huang et al., 2015; Kang et al., 2013).

Objectifs de la Thèse

Le traitement des cancers par la chimiothérapie est en général limité par la toxicité et la mise en place de mécanismes de résistance par les cellules cancéreuses. De nombreuses études soulignent le besoin de nouveaux composés qui agissent *via* des modes d'action différents ou complémentaires de ceux des chimiothérapies actuelles.

L'ensemble des études réalisées sur les LG4 montrent un potentiel intéressant pour atteindre de nombreuses cibles oncogéniques, une capacité à induire la sénescence et la mort cellulaire, et une sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses. Ces données suggèrent donc que les LG4 sont d'un intérêt particulier pour le développement en thérapie anti-cancéreuse. De nombreux LG4 ont déjà été synthétisés et de nombreuses études restent encore à mener sur ces molécules afin de comprendre leurs mécanismes d'action et de pouvoir exploiter au mieux leurs effets anti-cancéreux.

Nous avons travaillé sur le ligand G-quadruplexe 20A, correspondant au composé n°3 de l'article suivant (Smith et al., 2011). Parmi la série de LG4 qui a été synthétisée dans cette étude, le 20A a été sélectionné pour sa capacité importante à stabiliser les structures d'ADN G-quadruplexe *in vitro*. Il présente aussi l'avantage d'avoir une bonne affinité et sélectivité pour ces structures par rapport à des duplexes d'ADN. Le 20A présente également une des IC_{50} les plus faibles sur la lignée de cellules cancéreuses HeLa par rapport aux autres composés, et dans des délais courts (24h de traitement), suggérant que les effets du 20A ne font pas intervenir d'effets au niveau des télomères et de la télomérase.

De plus, des résultats non publiés de travaux réalisés dans le laboratoire du Dr Jean-Louis Mergny ont étudié la sensibilité de cellules transformées par rapport à des cellules non transformées de différents LG4 (dont la pyridostatine, Braco-19 ou le 360A). Cette étude a révélé que le 20A est l'un des LG4 auquel les cellules transformées sont les plus sensibles, avec une IC_{50} 4 fois plus importante que pour les cellules non transformées.

L'ensemble de ces résultats préliminaires suggèraient donc que le 20A serait un LG4 intéressant pour des études plus poussées, qui permettraient de comprendre ses mécanismes d'action et d'évaluer son potentiel thérapeutique anti-cancéreux.

Ainsi, les objectifs généraux de ma thèse ont consisté à :

- Etudier les réponses cellulaires associées à la perte de viabilité rapide des cellules cancéreuses en réponse à 24h de traitement au 20A, à des doses non létales pour les cellules normales (celle-ci étant supérieure à 10 μ M)
- Evaluer les conditions dans lesquelles le 20A serait le plus efficace afin de déterminer les contextes cancéreux qui seraient les plus sensibles au 20A

Nous avons donc évalué la sénescence et l'apoptose, qui sont des réponses cellulaires responsables de la perte de viabilité en réponse à des agents anti-cancéreux. Afin d'orienter nos études moléculaires pour la compréhension des mécanismes impliqués dans ces réponses, nous avons réalisé des études de transcriptomique et de protéomique qui nous ont permis d'identifier qu'en réponse au 20A, les cellules présentent une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans les voies de réponse des dommages à l'ADN, ainsi que des voies de signalisation des fonctions lysosomales (en particulier de l'autophagie).

Au cours des expériences que nous avons réalisées, nous avons également remarqué deux caractéristiques frappantes qui sont d'une part que le 20A est fluorescent et se retrouve localisé au niveau des lysosomes, et que les cellules traitées au 20A présentent une proportion importante de cellules à double noyaux.

Nous avons alors définis trois objectifs spécifiques :

- Vérifier l'activation des voies de DDR et de l'autophagie, et déterminer leur rôle dans et la sénescence et la mort cellulaire induite par le 20A.
- Déterminer les conséquences de la localisation lysosomale du 20A dans les réponses cellulaires au 20A.
- Etudier les mécanismes de formation des cellules binucléées et leur rôle dans la réponse au traitement par le 20A

La partie résultat de ce manuscrit est donc séparée en trois sous-parties afin de présenter chacun de ces objectifs. Ce travail a fait l'objet d'un premier article qui a été soumis au journal *Nucleic Acid Research* et est en cours de révision actuellement. Un second article est en cours de préparation et nécessite quelques expériences supplémentaires avant soumission. Enfin, la troisième partie des résultats est présentée sous forme de résultats complémentaires.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

La partie « Matériels et méthodes » relative aux deux premiers articles est présentée dans chaque article respectif (des pages 148 à 154 pour l'article n°1 ; 188 à 193 pour l'article n°2). Suite à la réponse des referees concernant le premier article, de nombreuses études supplémentaires ont été demandées. Trois de ces expériences seront présentées dans ce manuscrit, et les matériels et méthodes concernant ces expériences sont indiqués en I) de cette partie.

Les « Matériels et méthodes » relatifs aux résultats complémentaires de la partie n°3 sont présentés en II) de cette partie.

I) Matériels et méthodes supplémentaires (article n°1)

A. Immunohistochemistry for apoptosis and senescence assessment on paraffin embedded tumor bloc

At the day of the sacrifice, tumor blocks were fixed in 4% formol and paraffin embedded for hematoxylin-eosin-saffron staining and immunohistochemical labeling of apoptosis marker Cleaved-Caspase3, or the Sudan-Black-B (senescence marker that stain for lipofuscin) as described in (Evangelou and Gorgoulis, 2017). High-quality images were made with slide scanner Nanozoomer (Hamamatsu) in the Bordeaux Imaging Center. Tumor morphology and immunohistochemical staining were analyzed by a pathologist.

B. Meta-TIF assay

The meta-TIF assay for detection of telomere-induced foci (TIF) in metaphase spreads was performed as described (Cesare et al., 2009).

Metaphases were prepared by centrifugation (Cytospin, 1500 rpm, 10 min, medium acceleration) after a 7-minute hypotonic shock in 0.8% sodium citrate solution at room temperature. Slides were immediately fixed with 3.7% formaldehyde in PBS, rinsed twice in double-distilled water, permeabilized in Solution KCM (10 mM Tris pH7.5, 120 mM KCl, 20

mM NaCl, 0.1% triton-X-100) and in PBS at 4°C. For the immunofluorescence (IF), slides were treated with RNase A (0.1 mg/ml) in ABDIL buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 2% BSA, 0.1 % Triton X-100) for 15 min at 37°C, incubated with mouse anti- γ -H2AX antibody (Millipore, 1:500), followed by the goat anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen). All antibody incubation steps were performed in a humid incubator at 37°C for 45 min with antibodies diluted in the ABDIL buffer, followed by 3 x 2 min washes in PBST (0.1 % Tween-20 in PBS). For subsequent FISH experiments, IF slides were fixed with 3.7% formaldehyde in PBS for 10 minutes, rinsed once in PBS and dehydrated in 70%, 80%, 90% and 100% ethanol series. FISH with Cy3-O-O-(CCCTAA)₃ PNA probe (TelC, Panagene) was performed. 80 μ l of a hybridization mix containing 10 nM TelC probe in 70% formamide, 10 mM Tris pH 7.4, and 1% blocking reagent (Roche, 11096176001) was applied to each slide. Slides were co-denatured in the presence of the probe by heating to 80°C for 3 min. Slides were washed 2 x 5 min in Wash A (70% formamide, 10 mM Tris pH7.5) and 2 x 5 min in Wash B (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.8% Tween-20) prior to mounting in Vectashield (Vector, H-1000) supplemented with 0.01 mg/ml of DAPI. Images were acquired using the Nikon MULTIZOOM AZ100M microscope at the Nikon Imaging Center, Institut Curie.

C. Supplemental reagent (P-Chk2 and Chk2 antibodies)

The antibodies P-Chk2 (Thr68) (#2197) and Chk2 (#2662) were purchased from Cell Signaling Technology and used for Western Blot analysis.

II) Matériels et méthodes complémentaires (partie n°3)

A. Culture cellulaire

La lignée cellulaire de cancer du col de l'utérus HeLa a été achetée à l'ATCC (*American Type Culture Collection*). Les lignées de cellules HeLa déficientes pour l'autophagie (sous-exprimant ATG5 et ATG7) ont été générées comme décrit dans la section « Matériels et méthodes » du premier article (page 152). La lignée de cellules HeLa exprimant le marqueur nucléaire fluorescent H2B-mCherry, la lignée d'adénocarcinome de poumon A549, et la

lignée de cellules A549 exprimant le rapporteur FUCCI (*Fluorescence Ubiquitination based Cell Cycle Indicator*) nous ont été gracieusement données par les laboratoires du Dr. Anne Royou (IECB, Pessac, France), du Dr. Jean-François Riou (MNHN, Paris, France) et du Dr. Baharia Mograbi (IRCAN, Nice, France) respectivement.

Les lignées de cellules HeLa se cultivent en milieu RPMI 1640, additionné de 2mM de glutamine (Gibco-Life technologies), alors que les lignées de cellules A549 se cultivent en DMEM. Chaque milieu de culture est supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal, 100unités/ml de pénicilline, et 100µg/ml de streptomycine. Toutes les lignées sont cultivées à 37°C dans un incubateur humide à 5% de CO₂. Les cellules sont passées tous les deux à trois jours afin d'obtenir une croissance exponentielle.

B. Réactifs

Les antioxydants Butylhydroxyanisole (BHA, #B1212000), N-Acétyle-L-Cystéine (NAC, #A8199) ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

Le Hoechst 33258 (#14530), Iodure de propidium (#P4864), Chloroquine diphosphate (#C6628), RNaseA (#R4642), thymidine (#T9250) ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

Les sondes Tetramethylrhodamine methylester, TMRM (T-668) et Dichlorohydrofluorescéine 2',7' (H2DCFDA) ont été achetées chez Molecular Probes.

Les anticorps contre les protéines suivantes ont été utilisés : p21 Waf1/CIP1 (12D1) (#2947), de Cell Signaling Technology, Inc ; β -Actin (#NB600-501) de Novus Biologicals ; RhoA (#sc-418) de santa-cruz ; α -Tubuline (#T9026) de Sigma.

Les anticorps secondaires suivants ont été utilisés : anti-lapin et anti-souris conjugués à la HRP (#111-035-003 ; et #115-035-174 respectivement) de Jackson ImmunoResearch ; et anti-souris conjugué au fluorophore Alexa488 (#A11001) de chez Invitrogen.

Le 20A a été synthétisé comme précédemment décrit (Smith, OBC, 2011).

C. Marquage et comptage des cellules à doubles noyaux

Les cellules HeLa sontensemencées à 40 000 cellules par puits en plaque 12 puits et traitées le lendemain selon les conditions expérimentales.

Après 24h d'incubation avec les agents de traitement, les cellules sont lavées en PBS et fixées avec 4% de paraformaldéhyde (vol/vol) pendant 10min à température ambiante. Puis les noyaux sont marqués avec 2µg/ml de Hoechst 33258 pendant 15min.

L'acquisition des images est ensuite réalisée avec un microscope à épifluorescence Leica DMI8, équipé d'un objectif x20 (NA 0.40), d'une caméra digitale CMOS (Hamamatsu photonics) et de blocs filtre pour la détection de la fluorescence du Hoechst 33258 (exc : 325-375nm / em : 435-485nm) et du contraste de phase. Cinq images sont acquises dans chaque condition, puis un comptage manuel est réalisé grâce au logiciel ImageJ et au module de quantification des cellules afin de déterminer le nombre de cellules à double noyaux et le nombre de cellules totales.

D. Analyse du contenu en ADN

Les cellules HeLa sontensemencées à 80 000 cellules par puits en plaque 6 puits et traitées le lendemain selon les conditions expérimentales.

Après 24h d'incubation avec les agents de traitement, les cellules sont lavées avec du PBS froid, trypsinées et culotées à 1800rpm pendant 5min à 4°C. Le culot est lavé une fois avec du PBS, puis resuspendu dans 1ml d'éthanol 70% glacé et incubés toute la nuit à -20°C. Après centrifugation et lavage en PBS à 850g pendant 5min à 4°C, les culots sont resuspendus dans 200µl de PBS contenant 50µg/ml d'Iodure de propidium (P4864, Sigma-Aldrich), 500µg/ml de RNaseA (R4642, Sigma-Aldrich) et 0.1% de NP40.

Les cellules sont incubées pendant 30min) 37°C et analysées par cytométrie en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson) dans le canal FL2 (exc : 488nm / em : 564-606nm).

E. Analyses d'immunofluorescence

Les cellules HeLa sontensemencées sur lamelle de verre à 40 000 cellules par puits dans des plaques 12 puits. Le lendemain, les cellules sont synchronisées avec 2mM de thymidine pendant 20h, puis lavées trois fois dans du milieu pré-chauffé à 37°C et traitées selon les conditions expérimentales pendant 11h.

Les cellules sont lavées une fois en PBS et fixées pendant 3min dans du méthanol 100% à -20°C ou pendant 15min dans 10% d'acide trichloroacétique (TCA, pour *trichloro acetic acid*) froid dilué en PBS pour les marquages de la tubuline et de RhoA respectivement. La fixation des cellules avec 10% de TCA est une méthode validée pour la préservation des formes de RhoA liées au membranes et actives (Yonemura et al., 2004).

Les cellules sont perméabilisée avec du Triton X-100 à 0.5% ou 0.3% pendant 5min pour les marquages de la tubuline et de RhoA respectivement. Les cellules sont ensuite bloquées pendant 30min avec du PBS contenant 0.2% de gélatine (m/vol).

Puis les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire toute la nuit à 4°C. Après trois lavages, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé au fluorophore Alexa488 pendant 1h à température ambiante dans une pièce noire.

Les cellules sont ensuite marquées avec 2µg/ml de Hoechst 33258 pendant 10min. Après deux lavages en PBS, les lamelles de verre sont montées sur une lame avec le Fluoromount G et laisse à sécher pendant toute la nuit à 4°C.

Les images sont acquises sur un microscope confocal Zeiss LSM510 Meta (Zeiss, Göttingen, Germany) avec un objectif à immersion à huile Apoplan x63 (NA 0.75), ou un microscope à épifluorescence Leica DMI8 avec un objectif sec x63x (NA 0.70) équipé d'une caméra digitale CMOS (Hamamatsu photonics) et de blocs filtre pour la détection du contraste de phase, de la fluorescence du Hoechst 33258 (exc : 325-375nm / em : 435-485nm) et de l'Alex488 (exc : 460-500nm / em : 512-542nm).

Des z-stack sont réalisées avec 0.6µm d'intervalle entre chaque stack, et l'image représentée correspond à une projection en z du maximum d'intensité de fluorescence. Des expositions identiques ont été réalisées entre les différentes conditions d'une même expérience afin que

les intensités de fluorescence soient comparables. Les images sont ensuite traitées *via* le logiciel ImageJ.

F. Expérience de transfection avec le plasmide EGFP-AuroraB

Le vecteur d'expression de la protéine AuroraB couplée à la EGFP (pEGFP-C14 codant pour EGFP-hAurB) a été construit par Damien Goutte-Gattat (numéro d'accèsion ROY_000003) et généreusement donné par le laboratoire du Dr. Anne Royou (IECB, Pessac, France).

Les cellules HeLa H2B-mCherry sontensemencée à 40 000 cellules par puits en plaque 12 puits et transfectées avec 0.5µg de plasmide en utilisant l'agent de transfection FuGENE (#E231A, Promega) selon un ratio ADN : FuGENE de 1 : 3, et selon les recommandations du fabricant.

Après 24h de transfection, les cellules sont sélectionnées pendant 5 jours avec 1.2mg/ml de G418. Après la sélection, le G418 est maintenu à 0.4mg/ml dans le milieu de culture pour l'entretien des cellules, et retiré du milieu pour la réalisation des expériences.

G. Expériences de vidéomicroscopie

1. Etude du succès de la mitose et de la localisation d'AuroraB

Pour réaliser des expériences de vidéomicroscopie sur cellule vivante, les cellules HeLa H2B-mCherry WT ou surexprimant la protéine EGFP-AuroraB sontensemencées à 40 000 cellules par puits en plaque 12 puits. Le lendemain, les cellules sont synchronisées avec 2mM de thymidine pendant 20h. Après trois lavages dans du milieu chaud, les cellules sont relâchées dans un milieu contenant les traitements appropriés selon les conditions expérimentales.

Après 9h de relâche, les cellules sont placées dans une chambre à CO₂ à 5% sur la platine du microscope à épifluorescence Leica DMI8 et dans un incubateur à 37°C. 3 positions par condition sont enregistrées dans le module « Multiposition » du microscope. Ce microscope est équipé d'un objectif sec x20 (NA 0.40), d'une caméra digitale CMOS (Hamamatsu

photonics), et de blocs filtre pour la détection du contraste de phase, de la fluorescence de l'EGFP (exc : 460-500nm / em : 512-542nm) et du mCherry (exc : 541-551nm / em : 565-605nm). Les images sont acquises toutes les 15min pendant 4h.

Le traitement des images est réalisé avec ImageJ, les informations recueillies sont notamment le succès de la mitose (pour les cellules HeLa H2B-mCherry WT) et la localisation d'AuroraB (pour les cellules HeLa H2B-mCherry surexprimant la protéine EGFP-AuroraB).

2. Analyse du cycle cellulaire avec les cellules A549 FUCCI

Ce rapporteur FUCCI constitue un système basé sur des protéines fluorescentes couplées à des protéines régulatrices du cycle cellulaire qui sont dégradées par le protéasome en fonction des différentes phases du cycle. Les cellules que nous utilisons présentent la protéine RFP-Ctd1 (*chromatin licensing and DNA replication factor 1*) qui sert de marqueur de la phase G1, ainsi que la protéine GFP-Geminin comme marqueur des phases S et G2.

Les cellules A549 FUCCI sont ensemencées à 5 000 cellules par puits en plaque 96 puits et traitées selon différentes conditions expérimentales juste avant le début de l'acquisition. Les cellules sont placées dans une chambre à CO₂ à 5% sur la platine du microscope à épifluorescence Leica DMI8 et dans un incubateur à 37°C. 2 positions par condition sont enregistrées dans le module « Multiposition » du microscope.

Les images sont acquises toutes les 30min pendant 48h à travers un objectif sec x20 (NA 0.40), de blocs filtre pour la détection du contraste de phase, de la fluorescence de l'EGFP (exc : 460-500nm / em : 512-542nm) et du mCherry (exc : 541-551nm / em : 565-605nm), et d'une caméra digitale CMOS (Hamamatsu photonics).

Le traitement des images est réalisé avec ImageJ, les cellules sont suivies individuellement afin de reporter la phase du cycle cellulaire de la cellule considérée à chaque temps de l'acquisition et de réaliser un pédigrée cellulaire. Les données recueillies nous permettent d'évaluer pour chaque cellule le temps total passé dans les phases G1 et G2 du cycle cellulaire ainsi que le nombre maximal de mitoses réalisées au cours des 48h. Nous évaluons également la répartition des cellules mononucléées ou binucléées selon les caractéristiques d'arrêt « apparent » en phase G1, et de mortalité.

Le temps total passé en phase G1 et G2 et le nombre maximal de mitose qui est réalisé au cours des 48h d'acquisition sont analysés uniquement sur les cellules qui sont vivantes à la fin de l'enregistrement. Les valeurs affectées à une cellule correspondent à la moyenne des valeurs obtenues au sein d'un lignage cellulaire (pour chaque cellule fille issue de la cellule suivie initialement).

L'arrêt « apparent » en phase G1 est déterminé uniquement sur les cellules vivantes à la fin de l'acquisition, de la façon suivante. Nous avons estimé le temps du déroulement d'un cycle cellulaire normal des cellules A549 FUCCI en condition contrôle (correspondant au temps entre deux mitoses successives) et avons trouvé qu'il était en moyenne de 15h. Ainsi, pour l'analyse de l'arrêt « apparent » en G1 nous avons exclu les cellules qui réalisaient leur première mitose tardivement, c'est-à-dire au moins 15h avant la fin de l'enregistrement. Puis les cellules sont considérées comme « arrêtées » en G1 quand elles expriment le marqueur de la phase G1 depuis leur dernière mitose jusqu'à la fin de l'acquisition. Dès lors qu'une cellule exprime le marqueur de la phase G2 elle est considérée comme en cycle.

La mort cellulaire est estimée sur l'ensemble de la population cellulaire et proclamée quand la cellule a perdu ses adhérences, sa réfringence et sa fluorescence. Le phénotype mononucléé ou binucléé de la cellule avant la mort est alors indiqué.

H. Evaluation de la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial

Au cours de l'apoptose, la rupture de la membrane mitochondriale entraîne une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$). Cette chute du potentiel transmembranaire mitochondrial peut être analysée grâce à des sondes mitochondriales telles que le tétraméthyle rhodamine méthyle ester perchlorate (TMRM). Cette sonde se localise au niveau des mitochondries saines où elle devient fluorescente. Lorsque la cellule entre en apoptose, la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial conduit à une perte de la fluorescence du TMRM. Ainsi nous analysons le pourcentage de cellules non

fluorescentes qui correspond au pourcentage de cellules non viables et qui ont initié l'apoptose.

Les cellules HeLa sontensemencées à 40 000 cellules par puits en plaque 12 puits. Le lendemain, les cellules sont traitées selon les conditions expérimentales pendant 24h. Les cellules sont lavées en PBS, trypsinées et centrifugées à 1800 rpm pendant 5min. Le culot cellulaire est resuspendu dans 100µl de PBS contenant 200nM de TMRM et 200µM de vérapamil pendant 30min à 37°C. Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson) dans le canal FL2 (exc : 488nm / em : 564-606nm).

I. Evaluation de la production de ROS

La production de ROS peut être évaluée par des sondes sensibles à l'oxydation, dont les propriétés de fluorescence sont modifiées en présence d'espèces réactives de l'oxygène. En particulier, la sonde Dichlorohydrofluorescéine 2',7' (H2DCFDA) est perméable aux membranes, clivées par des estérases cellulaires et devient fluorescente en condition d'oxydation dans le milieu intracellulaire. Ainsi, une augmentation de l'intensité de fluorescence de cette sonde traduit une augmentation de la production de ROS, qui peut être observée par cytométrie en flux, et quantifiée par mesure de la médiane d'intensité de fluorescence de la population cellulaire.

Les cellules HeLa sontensemencées à 40 000 cellules par puits en plaque 12 puits. Le lendemain, les cellules sont traitées selon les conditions expérimentales. 15min avant la fin du traitement, les cellules sont incubées avec 10µM de la sonde H2DCFDA à 37°C dans un incubateur à 5% de CO₂. Les cellules sont ensuite lavées en PBS, trypsinées et centrifugées à 1500 rpm pendant 5min. Le culot cellulaire est resuspendu dans 200µl de PBS et analysé par cytométrie en flux (FACSCalibur, Becton Dickinson) dans le canal FL1 (exc : 488nm / em : 515-545nm).

J. Western blot

Les extraits cellulaires sont préparés dans du Tris 10mM, pH 7.4, 1% SDS, 1mM de sodium vanadate, 2mM de PMSF (93482, Sigma-Aldrich), 1% de *Protease Inhibitor Cocktail* (P8849, Sigma-Aldrich), et 1% de *Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail* (1862495, Thermo Fisher Scientific) et traités avec la *Benzonase Endonuclease* (71205, Merck Millipore) pendant 5min à température ambiante.

Les extraits cellulaires sont alors chauffés à 95°C pendant 5min, puis 30 à 50µg d'extraits cellulaires sont soumis à une électrophorèse SDS-PAGE en utilisant un tampon Tris/glycine basé sur la méthode de Laemmli. Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (10600003 Amersham Protrant Premium 0.45 NC, GE Healthcare Life Sciences).

Les membranes sont incubées avec l'anticorps primaire selon les instructions du producteur, suivi de l'anticorps secondaire couplé à la HRP appropriée. Le témoin de charge utilisé est l'actine. Les protéines sont visualisées par un détecteur de chémiluminescence équipé d'une caméra (FUSION FX7, Fisher Bioblock Scientific) en utilisant le système de détection *enhanced chemiluminescence* (ECL).

K. Etude de la sénescence (évaluation de l'activité de la SA-β-gal)

Au cours de l'établissement de la sénescence, les cellules surexpriment l'enzyme lysosomale β-galactosidase qui fonctionne normalement à pH acide (inférieur à 5) (Kurz et al., 2000). Or, cette augmentation de l'expression de l'enzyme conduit à une augmentation de son activité qui peut alors être détectée à un pH sub-optimal (pH 6), et est appelée *senescence-associated β-galactosidase* (SA-β-gal) (Dimri et al., 1995). Ainsi, l'établissement de la sénescence est évalué par une augmentation de l'activité de cette enzyme à pH 6 selon un test utilisant le composé X-gal comme substrat de cette enzyme. En effet, après un clivage du X-gal (incolore) par la SA-β-gal, le composé X est oxydé en un composé bleu insoluble dans l'eau qui précipite et permet une détection facile de l'activité de cette enzyme.

Les cellules HeLa sont ensemencées à 40 000 cellules par puits en plaque 12 puits. Le lendemain, les cellules sont traitées selon les conditions expérimentales pendant 24h. Puis les cellules sont marquées pour l'activité de la SA- β -galactosidase grâce au kit de Cell Signaling Technology (#9860, Cell Signaling Technology, Inc) selon les instructions du fabricant.

Dix images par condition sont acquises grâce à un microscope de paillasse CKX41 Olympus objectif x20. Le pourcentage de cellules positives pour l'activité de la SA- β -gal est alors évalué grâce au logiciel ImageJ. Pour l'analyse, un seuil de coloration est établis afin d'obtenir environ 10% de cellules positives pour l'activité de la SA- β -gal dans la condition contrôle, puis ces paramètres sont appliqués à toutes les images.

L. Analyses statistiques

Chaque expérience a été réalisée au moins deux fois. Les résultats de celles qui ont pu être réalisées au moins trois fois sont exprimés comme valeur moyenne \pm l'écart-type. Les analyses statistiques sont réalisées selon le test Mann-Whitney non apparié. Un test statistique donnant une *p-value* < 0.05 est considéré comme statistiquement significatif. Le logiciel utilisé pour réaliser les analyses statistiques est GraphPad PRISM.

RÉSULTATS

I) Evaluation de l'implication de la voie de réponse des dommages à l'ADN et de l'autophagie dans la sénescence et la mort cellulaire en réponse au 20A

Article 1: Modulation of the ATM/autophagy pathway by a G-quadruplex ligand tips the balance between senescence and apoptosis in cancer cells

1. Contexte

Les LG4 présentent en théorie de nombreux avantages pour une utilisation en thérapie anti-cancéreuse. De nombreux LG4 ont déjà été décrits, mais peu de ces molécules ont montré de véritables avantages thérapeutiques qui soient d'un intérêt pour la clinique. En effet, seul un de ces composés (la Quarfloxine) a été testé au cours d'essais clinique (Balasubramanian et al., 2011).

Le 20A est un LG4 de la famille des triarylpyridines, il a été synthétisé récemment par le laboratoire du Dr Jean-Louis Mergny et identifié comme un potentiel agent anti-cancéreux qui présente des propriétés de stabilisation spécifiques de structures G4 *in vitro*. De plus, des cellules transformées se sont révélées plus sensibles au 20A que des cellules normales.

Ainsi le but de cette étude est de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui influencent la perte de viabilité des cellules cancéreuses en réponse au traitement par le 20A.

Nous avons pour cela réalisé des études de la sénescence et de la mort cellulaire par apoptose qui sont des réponses assez classiquement retrouvées en réponse à des LG4 et qui permettent d'expliquer la perte de viabilité cellulaire. Nous avons également évalué le potentiel thérapeutique de ce composé par une étude réalisée *in vivo*, sur des greffes sous-cutanées de cellules cancéreuses.

Nous avons réalisé des études de transcriptomique et de protéomique afin de vérifier d'une part que le 20A possède des effets de stabilisation des structures G4 *in cellulo*, grâce à l'évaluation de l'expression différentielle de gènes qui présentent des séquences PG4 dans leur régions régulatrices. D'autre part, ces études nous ont permis d'identifier des voies de signalisation activées par le 20A dans les cellules cancéreuses.

Enfin, parmi les nombreuses voies de signalisation qui semblent être modulées par le 20A nous avons validé l'activation de deux de ces voies de signalisation : la voie de réponses des dommages à l'ADN (DDR) ainsi que celle de l'autophagie. Nous avons ensuite évalué leur implication dans la sénescence et la mort cellulaire induite par un traitement au 20A.

Toutes les informations **données supplémentaires** de cet article sont présentées en **Annexes n°1** (pages 282 à 292).

2. Article n°1

Modulation of the ATM/autophagy pathway by a G-quadruplex ligand tips the balance between senescence and apoptosis in cancer cells.

Jennifer Beauvarlet¹, Paul Ben Sadoun*¹, Elodie Darbo*^{1,2}, Gaelle Labrunie*^{1,3}, Benoît Rousseau⁴, Elodie Richard¹, Jean-William Dupuy⁶, Rabindra Nath Das³, Guillaume Robert⁵, Francois Orange⁷, Sabrina Croce⁸, Valerie Valesco⁸, Pierre Soubeyran¹, Kevin M Ryan⁹, Jean-Louis Mergny^{3,10,#}, and Mojgan Djavaheri-Mergny^{1,#}

Affiliations:

- ¹ Université de Bordeaux, INSERM U1218, Institut Bergonié Bordeaux France.
- ² Centre de Bioinformatique de Bordeaux (CBiB), 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux France.
- ³ Université de Bordeaux, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, ARNA Laboratory, IECB, Pessac, France.
- ⁴ Service commun des animaleries, Université de Bordeaux, Bordeaux, France.
- ⁵ Université de Bordeaux, Centre de Génomique Fonctionnelle, Plateforme Protéome, F-33000, Bordeaux, France.
- ⁶ Inserm U1065, C3M, Team: Myeloid Malignancies and Multiple Myeloma, Université Côte d'Azur, Nice, France.
- ⁷ Centre Commun de Microscopie Appliquée, Université Côte d'Azur, Nice, France.
- ⁸ Département de Biopathologie, Institut Bergonié, Bordeaux, France.
- ⁹ Cancer Research UK Beatson Institute, Glasgow, G611BD, UK.
- ¹⁰ Institute of Biophysics of the Czech Academy of Sciences, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic.

* Equal contribution

Authors to whom correspondence may be addressed:

jean-louis.mergny@inserm.fr and mojgan.mergny@inserm.fr

Abstract

G-quadruplex ligands exert their anti-proliferative effects through telomere-dependent and telomere-independent mechanisms, but the inter-relationships among autophagy, cell growth arrest, and cell death induced by these ligands remains largely unexplored. Here, we demonstrated that the G-quadruplex ligand 20A, a 2,4,6-triarylpyridine derivative causes cancer cell growth arrest through induction of senescence and apoptosis through a p53-independent mechanism. The compound also inhibited tumor growth in a mouse cancer model. Transcriptomic and proteomic analysis revealed a significant functional enrichment of biological pathways related to growth arrest, DNA damage response and lysosomal pathways upon 20A treatment. Specifically, we found that ATM and autophagy were activated upon 20A treatment. Genetic inhibition of ATM following 20A treatment inhibits both autophagy and senescence and directed cells to apoptosis. Moreover, loss of autophagy by deletion of two essential autophagy genes *ATG5* and *ATG7* led to failure of CHK1 activation and an increase in cell death triggered by 20A. Our results therefore identify the activation of ATM by 20A as a critical player in the balance between senescence and apoptosis, and autophagy as one of the key mediators of such regulation. Thus, targeting the ATM/autophagy pathway might be a promising strategy to achieve the maximal therapeutic effect of a G4-ligand.

Keywords: G-quadruplex ligand; autophagy; apoptosis; senescence; cancer; DNA damage.

Introduction

G-quadruplexes (G4) are non-canonical DNA or RNA structures found in guanine-rich regions of the genome (1). G4 structures are formed by stacking of two or more G-quartets and are further stabilized by monovalent cations. G4-prone motifs are enriched in telomeres, promoters, and the first introns of genes (2). Evidence for G4 formation in cells comes from studies using DNA structure-specific antibodies, *in vivo* NMR, and small compounds capable of selective binding to G4 and from analysis of genomic instability (for a review: (3)). Compounds that bind to G4 are called G-quadruplex ligands (G4L), and some exhibit exquisite selectivity for this unusual structure (for a review: (4)). G4L were initially developed as telomerase inhibitors. Some G4Ls have antiproliferative effects that are indeed associated with stabilization of the telomeric G4 structures and telomere erosion (5, 6).

Evidence suggests that antiproliferative effects of certain G4Ls result from telomere-independent mechanisms. For example, the majority of G4-antibody foci are actually not found at telomeres (7), and a number of G4Ls alter the expression of genes, such as the *KRAS* and *c-MYC* oncogenes, that contain G4 motifs in their promoters (for a review on G4 in promoters: (8)). In addition, some G4Ls may act by targeting RNA G-quadruplexes (for recent reviews on G4 RNA: (9, 10)). As a general mechanism, G4Ls promote the DNA damage response (DDR) (11), which ultimately leads to senescence, permanent growth arrest, or, when the damage is left unrepaired, cell death (12). These properties make G4Ls attractive for cancer therapy. In addition, some G4Ls are able to activate the p53/p21 pathway, which is implicated in the regulation of DDR, senescence, and cell death (13, 14). It is not clear, however, what determines whether cells undergo senescence or apoptosis in response to a G4L.

A few G4Ls such as RHPS4 (14, 15), naphthalene diimides (16), acridine derivatives (6), and Emicoron (17) exhibit antitumor activity in animal models either alone or in combination with other anticancer agents (for a review: (18)). Despite a flurry of G4Ls described in the literature (for a recent review: (19)), only one, quarfloxin, has been tested in a phase II clinical trial, and none have progressed through the drug-development pipeline. There is therefore an urgent need to identify G4Ls with better

drug-like properties. The 2,4,6-triarylpyridines bind to G4-DNA with fair to excellent selectivity (20). Among these derivatives, compound 20A (compound #3 in reference (20)) has a good affinity and selectivity for G-quadruplexes, and the structure of the G4-ligand complex was recently solved (21). Its ability to inhibit the proliferation of HeLa cells (20) prompted us to study its mechanism of action in *in vitro* and in *in vivo* cancer models.

Macroautophagy (often simply referred to autophagy) is a vesicular mechanism by which cellular components are transported to the lysosome for degradation and recycling (22). This process is orchestrated by autophagy-related (ATG) proteins and is regulated through complex signaling pathways that converge mostly on the AMPK/MTORC1 axis (22–24). Autophagy serves as an adaptive mechanism allowing cell viability in response to stress including those to which cancer cells are exposed (e.g., hypoxia, environmental changes, DNA damage) (25). Autophagy also plays an important function in cell homeostasis by inducing selective degradation of damaged mitochondria, aggregated proteins, and specific signaling proteins (26). Autophagy is now considered indispensable for development, cell survival, differentiation, and immune responses. Over the past decade, it has been established that autophagy and cancer are interconnected (27)(28)(29). Notably, autophagy is activated in response to a variety of anticancer agents (30). In most cases, the activation of autophagy by anti-cancer therapies confers tumor protection that results in therapy resistance. However, in response to some anti-cancer therapies, autophagy induces immunogenic and non-immunogenic cell death or growth arrest (30–33). Upon DNA damage, autophagy modulates the DDR through regulation of cell cycle checkpoints, induction of apoptotic cell death, and the activation of the DNA repair machinery (34, 35).

A few studies have examined the regulation and the role of autophagy in response to G4 ligands (13, 36, 37). In particular, the inter-relationship between autophagy, cell growth arrest, and cell death induced by these ligands is largely unexplored. Using transcriptomic and proteomic approaches, we investigated the molecular connections between DDR and autophagy and explored how these regulatory mechanisms influence cell fate choice between senescence and apoptosis in response to the 20A G4 ligand.

Results

20A exhibits anti-proliferative effects against cancer cells through induction of senescence and apoptosis

20A inhibits the viability of HeLa cells in a dose-dependent manner with a half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 6.5 μ M after 24 h of treatment (**Figure 1A**). 20A treatment compromises cell division as demonstrated by the delay of carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) dye dilution, which occurs due to cell division (38), as compared to untreated cells (**Figure 1B**).

To determine if effects on p53 status or activity influence the loss in cell viability caused by 20A treatment, we used the Saos-2 osteosarcoma cell line. These cells have no endogenous p53 but contain a doxycycline-inducible p53 transgene (39). As illustrated in **Figure 1C**, both Saos-2 control (-Dox) and induced to express p53⁺ (+Dox) cells were equally sensitive to 20A as shown by nearly superimposable survival curves (IC_{50} values of 3.3 μ M and 3.2 μ M, respectively). This experiment demonstrated that the anti-proliferative effect of 20A is independent of the p53 status of cells.

To explore the mechanisms responsible for the anti-proliferative action of 20A, we further examined senescence and apoptotic cell death, two well-defined processes involved in cell growth arrest and programmed cell death, respectively. Senescence was evaluated by using Senescence Associated β -galactosidase assay (SA- β -gal). A 24h treatment with 20A resulted in a three-fold increase in the percentage of cells stained for β -galactosidase (**Figure 1D**), suggesting that 20A induces senescence. We therefore measured levels of p21 and p27, proteins involved in cellular senescence. As shown in **Figure 1D**, 20A treatment caused a significant time-dependent up-regulation of both p21 and p27 proteins in HeLa cells.

Treatment of cells with 20A also induced activation of apoptosis as evidenced by loss of the mitochondrial transmembrane potential as well as the appearance of cleaved forms of Casp3 and PARP1 (**Figure 1E**). Accordingly, in cells treated with QVD-OPh, an inhibitor of caspases, cell death induced by 20A was reduced (data not shown). It is worth noting that 20A treatment also led to senescence and apoptosis in the lung

carcinoma A549 cells, which express p53, as well as Saos-2 cells with and without induction of p53 expression (**Supplementary Figure S1**). Together, these results demonstrate that 20A treatment causes a loss of cell viability by inducing senescence and caspase-driven apoptotic cell death in a p53-independent manner.

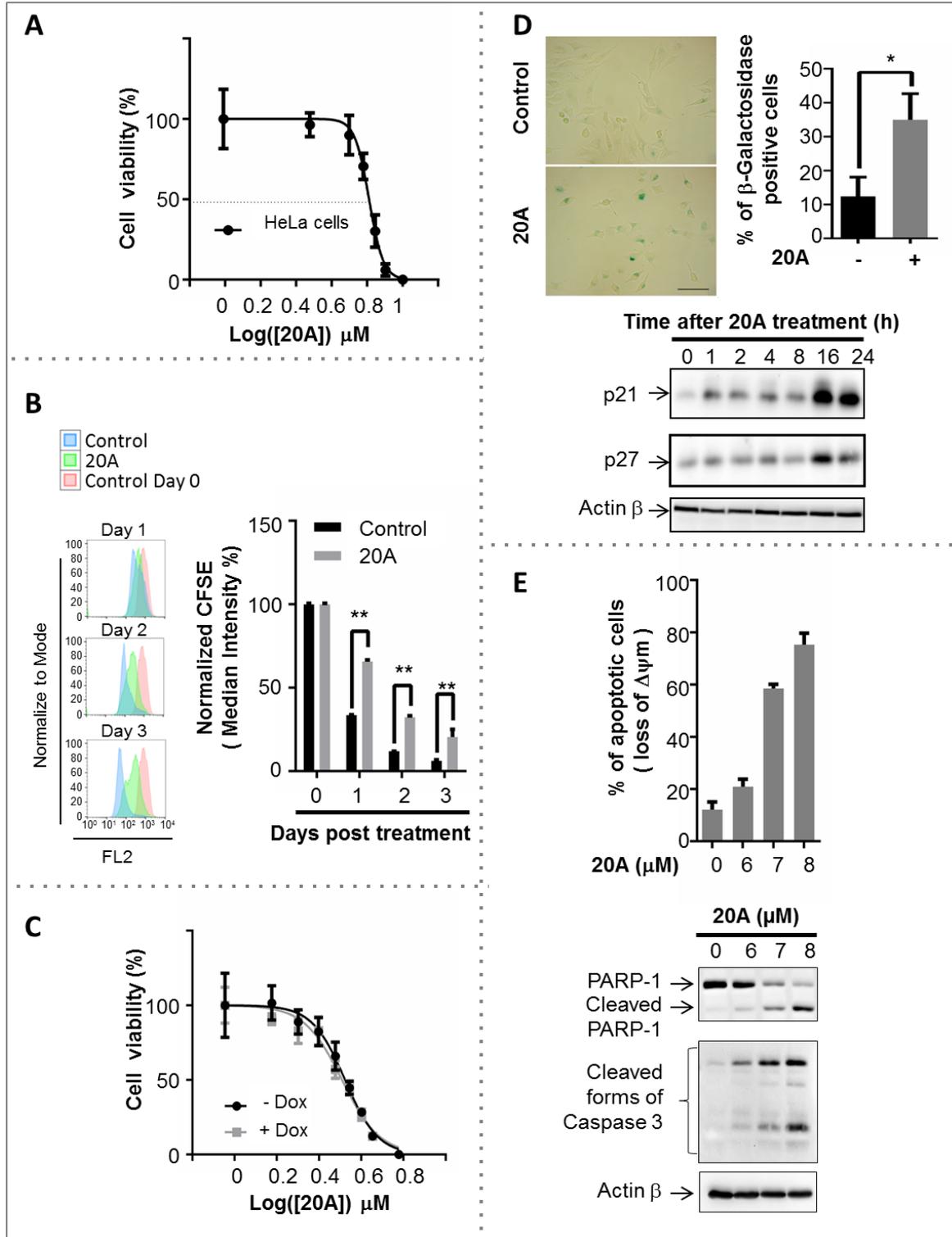


Figure 1: 20A treatment results in cancer cell growth arrest through the induction of senescence and apoptosis (see legend on the next page).

Figure 1 (legend): 20A treatment results in cancer cell growth arrest through the induction of senescence and apoptosis.

A) Viability of HeLa cells after a 24 h exposure to 20A concentrations ranging from 1 to 10 μM . Plotted are means \pm SD of three independent experiments, each performed in quadruplicate.

B) HeLa cells were labeled with 1 μM CFSE (day 0) and then treated with 6 μM 20A. Flow cytometry analysis of the CFSE fluorescence intensity (FI) was monitored on indicated days. *Left*, representative flow cytometry traces in which the red histogram corresponds to the day of cell staining (day 0). Control cells were mock treated. *Right*, results expressed as median fluorescence intensity (MFI) normalized to that obtained from day zero. Plotted are means \pm SD of six values obtained from two independent experiments, each performed in triplicate. ** *p-value* < 0.01 using Mann-Whitney test.

C) Saos-2 cells were grown in the presence or absence of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline (Dox) for 6 h and then treated for 24 h with the indicated concentration of 20A. Plotted are means \pm SD of three independent experiments, each performed in quadruplicate. Inset represents western blot analysis of p53 expression levels in Saos-2 cells grown in the presence or absence of 0.5 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline for 6 h; Actin β was detected as a loading control.

D) HeLa cells were treated with 6 μM 20A for 24 h and then stained for β -galactosidase activity to detect senescence. *Top*, representative images of cells stained for β -galactosidase (scale bar = 50 μm). Total cell number and total number of β -galactosidase-positive cells were scored to determine the percent senescent cells. Data are means \pm SD of four independent experiments; at least 100 cells from 10 randomly chosen fields were counted in each experiment. * *p-value* < 0.05 using Mann-Whitney test. *Bottom*, representative immunoblot analysis of p21, p27, and Actin β levels in HeLa cells treated with 6 μM 20A for the indicated time.

E) Apoptotic cell death evaluated after treatment of HeLa cells with the indicated concentration of 20A for 24 h. *Top*, percentage of cells that have lost mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi\text{m}$) plotted versus 20A concentration. Results are means \pm SD of triplicate data obtained from one experiment. *Bottom*, immunoblot analysis of cleaved forms of Casp3 and PARP1 in cells treated with the indicated concentrations of 20A; Actin β was detected as a loading control.

20A displays antitumor effects *in vivo*

The significant anti-proliferative effect of 20A in HeLa cells prompted us to determine whether this compound had anti-tumor properties in a mouse model of cancer. To this end, HeLa cells that stably express *tdTomato*, which encodes a red fluorescent protein, were subcutaneously injected into the dorsal flank of NOD scid gamma mice. Tumor growth was monitored by live imaging of the red fluorescence within the xenografts. When the fluorescence intensity average within the tumors reached a predetermined threshold value, peritumoral daily injections of 100 μ L (5x per week) of either DMSO (vehicle control) or 10 or 20 mg/kg 20A were given over a period of 12 days. Growth of xenografts in mice treated with 20A was significantly reduced when compared to the DMSO-treated group 7 days after treatment as evidenced by *tdTomato* fluorescence analysis of the xenografts (**Figure 2A**). Tumor growth was significantly reduced after 12 days treatment with both doses as evidenced in live animal images (three representative animals out of ten mice are presented for each group in **Figure 2B**). During the period of the treatment, the average weight of the mice from the two 20A-treated groups did not differ significantly from that of the control group, revealing low toxicity of 20A in this *in vivo* model (**Supplementary Figure S2A**).

At the end of the treatment, the tumor characteristics were analyzed. Hematoxylin, eosin, and saffron staining of DMSO-treated xenografts revealed the presence of marked atypia and mitotic activity with scattered inflammatory cells (**Figure 2C, left**). In contrast, 20A-treated tumor samples had a low density of malignant cells and areas of necrosis, fibrosis, and adiponecrosis were observed (**Figure 2C, right**). Immunohistochemistry labeling for the DNA replication marker Ki67 revealed that the percentage of proliferating cells in 20A-treated tumor xenografts was reduced compared to DMSO-treated tumors (**Figure 2C**). Taken together, these *in vivo* results corroborate those obtained *in vitro* and confirm the anti-proliferative effects of 20A in cancer cells.

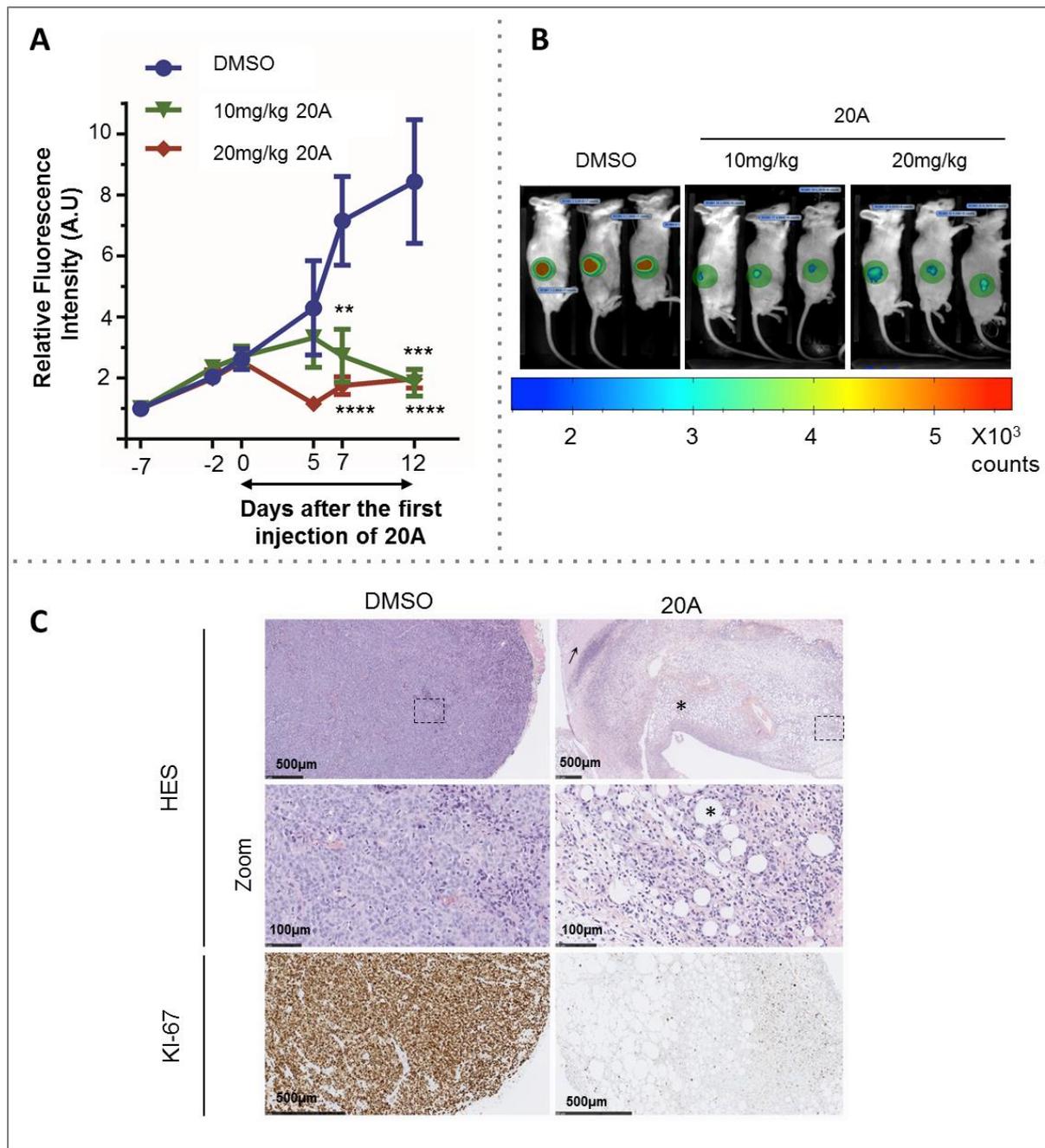


Figure 2: 20A treatment compromises tumor growth in mice bearing HeLa xenografts (see legend on the next page).

Figure 2 (legend): 20A treatment compromises tumor growth in mice bearing HeLa xenografts.

A) The tdTomato fluorescence within tumors was recorded in HeLa xenografts in mice during the treatment period with DMSO (control) or 10 or 20 mg/kg 20A per injection. Tumor growth is plotted as means \pm SEM of the relative fluorescence intensity within the xenografts scored on indicated days following tumor implantation from 10 mice per group. *p-value* **<0.01; ***<0.001; ****<0.0001 with Mann-Whitney test, compared to DMSO-treated group.

B) For each treatment group, images of three representative mice at day 12 post treatment initiation. The fluorescence intensity is presented as a rainbow scale with increasing intensity from blue to red. The green circles represent areas used to measure total fluorescence intensity.

C) Representative images of hematoxylin-eosin-saffron stained DMSO-treated and 20 mg/kg 20A-treated tumor sections performed at the end of the treatment period. Arrow indicates tumor cells with necrosis and asterisk shows fibrosis and adiponecrosis. Immunohistochemistry (IHC) analyses on paraffin-embedded tissue section of Ki67 expression were also performed on the tumor tissues.

Molecular pathways activated upon treatment with 20A

To identify the biological pathways and signaling networks affected by 20A, we investigated in HeLa cells its global effects on gene transcription and protein expression levels. We first monitored changes in gene expression induced by 20A using Agilent microarrays by comparison of transcriptomes of untreated and 20A-treated HeLa cells. Interestingly, a good-correlation ($R=0.68$) was found between the changes found after 6 and 16 h treatment of HeLa cells with 20A (**Supplementary Figure S3A**). An even better correlation was observed at the proteome level ($R = 0.81$) than for the transcriptomics experiments between the changes after 6 and 16 h of treatment with 20A relative to control cells (**Supplementary Figure S3B**). The number of up-regulated genes was higher than the number of downregulated genes (595 vs. 95 after 6 h of treatment; 317 vs. 184 after 16 h) as evidenced by the volcano plots shown in **Supplementary Figure S3C**. An enrichment analysis performed using the Broad Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) and the Molecular Signatures Database (MSigDB) (40, 41) revealed that 20A induces a significant enrichment in a number of biological pathways (**Table 1**; a complete list of genes up- or down-regulated is provided as a **Supplementary File 1** in excel format). Among them were pathways involved in DNA damage (p53_PATHWAY), apoptosis (APOPTOSIS), and lysosomal function (MTORC1_SIGNALING, PROTEIN_SECRETION).

We then performed an additional enrichment analysis using the KEGG database (42). As for GSEA and MSigDB analyses, we found a significant enrichment of biological pathways related to the DNA damage (KEGG_MISMATCH_REPAIR, up-regulated) and cell growth (KEGG_CELL_CYCLE, down-regulated) pathways (**Supplementary Table S1**). Interestingly, this analysis also revealed an important up-regulation of genes involved in the KEGG pathways "REGULATION_OF_AUTOPHAGY" and "LYSOSOME". The diagram in **Figure 3** illustrates the transcriptome analysis of genes differentially expressed in 20A-treated cells in the KEGG pathways for p53, MTOR, and autophagy (a list of different constituents of each pathway and the original KEGG figures are provided as **Supplementary Table S2** and **Supplementary Figure S4**, respectively). 20A promotes activation of DDR as evidenced by up-regulation of *CHK2* and *CHK1*, which encode downstream effectors of ATM and ATR, respectively. 20A also elicits

the up-regulation of two senescence effectors, *p21* and *Rb*, and the down-regulation of the *Rb* target, *E2F* (**Figure 3**). The apoptotic pathway is also affected following 20A treatment as evidenced by up-regulation of *Cytc* and *Casp3* and down-regulation of both *Bax* and *Casp9*. Interestingly, 20A causes a significant repression of expression of genes encoding components of the MTORC1 complex associated with increased expression of a large panel of autophagic and lysosomal genes (e.g. *Beclin1*, *VPS34*, *ATG5*, *ATG12*, *ATG3*, *LC3*, *p62*, *OPTN*, *NBR1*, *LAMP*, and *CTS*). This supports the idea that the autophagy/lysosome pathway is strongly activated by the G4 ligand 20A.

The proteome data were also analysed with the GSEA and MSigDB databases (40, 41) which revealed that several Hallmark sets were affected by 20A treatment (**Table 1**) including those found in the transcriptome experiments (protein secretion, apoptosis, and p53 pathway).

To determine whether a causal link existed between changes in transcript or protein levels and the presence of G-quadruplex target sequences within key regulatory elements of the corresponding genes, we performed a bioinformatics analysis using G4-Hunter (2). We analyzed for the enrichment of sequences with G4-forming potential around transcription start and end sites in up- and down regulated transcripts. The analysis showed an enrichment of sequences with G4-forming potential directly upstream (50-150 bp) of transcription termination sites of down-regulated genes after both 6 h and 16 h of treatment with 20A (**Supplementary Figure S5**). This observation is in line with previous results showing that G4 ligands may not only regulate transcription *via* the regulation of promoter activity but may also influence later transcriptional events as well as the maturation of specific mRNAs (10).

Altogether, these results reveal that 20A treatment affects the transcription of a large number of genes including those involved in DDR and the lysosomal pathway.

		20A treatment (6 hours)			20A treatment(16 hours)		
		HALLMARK	NES	FDR q-val	HALLMARK	NES	FDR q-val
Transcriptomics		MYC_TARGETS_V1	2.6544	0	KRAS_SIGNALING_DN	-2.1145	0
		MTORC1_SIGNALING	2.6135	0	CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS	2.6057	0
		PROTEIN_SECRETION	2.4228	0	MTORC1_SIGNALING	2.4009	0
		CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS	2.4154	0	PROTEIN_SECRETION	2.2930	0
		ANDROGEN_RESPONSE	2.2860	0	FATTY_ACID_METABOLISM	2.0078	0.00077
		TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	2.1413	0	ANDROGEN_RESPONSE	1.9120	0.00081
		COMPLEMENT	1.9466	0.00032	OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	1.7578	0.00396
		HYPOXIA	1.8538	0.00125	BILE_ACID_METABOLISM	1.7664	0.00422
		GLYCOLYSIS	1.7893	0.00273	COMPLEMENT	1.6984	0.00605
		TGF_BETA_SIGNALING	1.8056	0.00281	EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	-1.7906	0.00639
		UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE	1.7613	0.00297	GLYCOLYSIS	1.6756	0.00713
		OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	1.7665	0.00305	KRAS_SIGNALING_UP	1.6542	0.00778
		KRAS_SIGNALING_DN	-1.9267	0.00306	HEDGEHOG_SIGNALING	-1.6975	0.00938
		FATTY_ACID_METABOLISM	1.7571	0.00309	NOTCH_SIGNALING	-1.7226	0.00940
		E2F_TARGETS	1.7529	0.00321	PEROXISOME	1.6287	0.01003
		HEME_METABOLISM	1.6345	0.01004	APICAL_JUNCTION	-1.6543	0.01156
		G2M_CHECKPOINT	1.6470	0.01020	HYPOXIA	-1.5587	0.01568
		IL2_STAT5_SIGNALING	1.6357	0.01067	MYC_TARGETS_V2	-1.5682	0.01711
		UV_RESPONSE_DN	1.5911	0.01544	HEME_METABOLISM	1.5718	0.01773
		P53_PATHWAY	1.5564	0.01965	TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	-1.4714	0.03031
		APOPTOSIS	1.5230	0.02433	MYOGENESIS	-1.4066	0.04704
		KRAS_SIGNALING_UP	1.4755	0.04037	XENOBIOTIC_METABOLISM	1.4561	0.04803
	ESTROGEN_RESPONSE_LATE	1.4584	0.04467	UNFOLDED_PROTEIN_RESPONSE	1.4620	0.04819	
				E2F_TARGETS	1.4496	0.04832	
Proteomics		OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	2.7854	0	OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	2.4181	0
		INFLAMMATORY_RESPONSE	2.0673	0.00315	ESTROGEN_RESPONSE_EARLY	1.8408	0.00976
		ADIPOGENESIS	1.9909	0.00724	ADIPOGENESIS	1.8952	0.00976
		COMPLEMENT	1.8457	0.01836	PROTEIN_SECRETION	1.8448	0.01083
		APOPTOSIS	1.8347	0.01894	APOPTOSIS	1.8111	0.01252
		FATTY_ACID_METABOLISM	1.8702	0.01937	HEME_METABOLISM	1.9069	0.01302
		EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	1.8049	0.02273	IL2_STAT5_SIGNALING	1.6552	0.04166
					P53_PATHWAY	1.6676	0.04325
					COAGULATION	1.6358	0.04325
					ESTROGEN_RESPONSE_LATE	1.5982	0.04647
				EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	1.5855	0.04767	

Table 1: This table summarizes the Hallmarks pathways significantly enriched (FRD q -value < 0.05) after either 6 hours or 16 hours of treatment with 6 μ M 20A, according to the transcriptomic or the proteomic data set. NES correspond to the Normalized Enrichment Score given by GSEA, positive values mean an upregulation of the majority of the genes or proteins involved in the corresponding hallmark, while negative values stand for a downregulation of the majority of genes involved in this pathway. The FDR q -value represents the adjusted p -value.

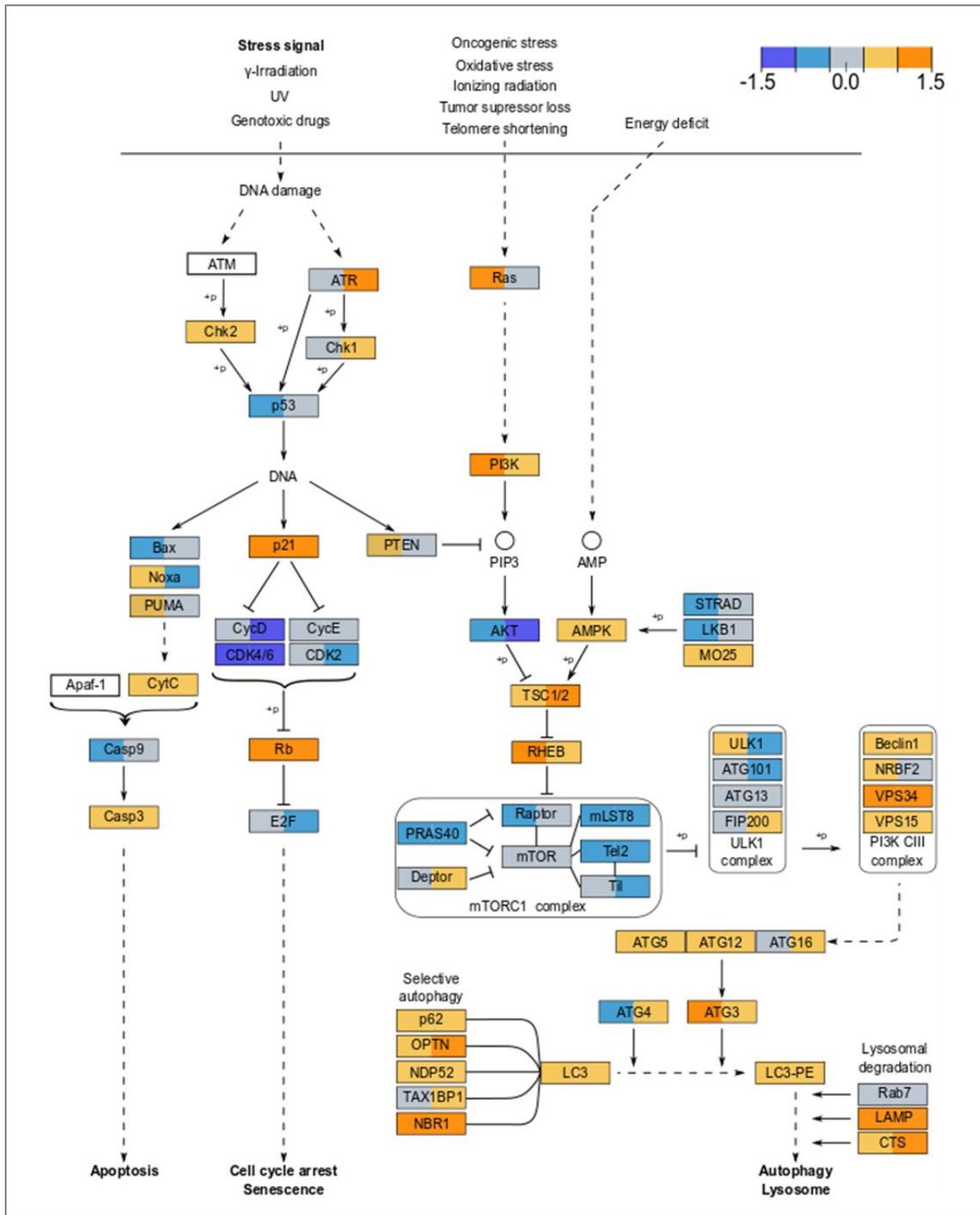


Figure 3: Biological pathways affected by 20A treatment (see legend on the next page).

Figure 3 (legend): Biological pathways affected by 20A treatment

This figure summarizes the transcriptomics results obtained on three interconnected KEGG signaling pathways that are significantly enriched in response to 6 μ M of 20A treatment (p53, MTORC1, and autophagy, individually shown in **Supplementary Figure S3**). Each gene product is represented by its symbol in a box. Each box is divided in two panels and colored according to the value of logFC6h (left part of the box) and logFC16h (right part of the box) with the color code presented on the top right of the figure. LogFC values between -0.3 and 0.3 are colored in gray, those between 0.3 and 0.9 are in light orange, above 0.9 are in orange, between -0.3 and -0.9 are in light blue, and those below -0.9 are in dark blue. Solid lines represent direct regulation, dotted lines represent indirect regulation, and “+p” indicates regulation by phosphorylation.

ATM activation enables cells to escape 20A-induced cell death by entering senescence

To investigate the effect of 20A on the DNA damage response in more detail, we examined the expression levels of γ H2AX (a marker for DNA double-strand breaks) and the status of activation of ATM and CHK1, two proteins that drive the activation of the DNA repair machinery (43). 20A treatment of HeLa cells caused an early and sustained phosphorylation of γ H2AX which was accompanied by a rapid increase in phosphorylation of both ATM (at Ser 1981) and CHK1 (at Ser 345) (**Figure 4A**).

To evaluate the role of ATM in senescence and apoptosis induced by 20A, we reduced levels of ATM in HeLa cells using a specific siRNA. As shown in **Figure 4B**, loss of *ATM* expression significantly reduced the percentage of senescent cells in samples treated with 20A. Moreover, *ATM* silencing markedly enhanced cell killing induced by 20A as evidenced by loss of mitochondrial transmembrane potential and the appearance of the cleaved forms of PARP1 and Casp3 after 24 h (**Figure 4C**). Similar results were found with KU55933, an ATM kinase inhibitor (**Supplementary Figure S6**). Of note, inhibition of ATM activation compromises 20A-induced senescence irrespectively of the presence or absence of the broad caspase inhibitor QVD-OPh, suggesting that ATM is required for the establishment of the senescent onset induced by 20A and that ATM inhibition directs cells toward apoptotic cell death (**Figure 4D**).

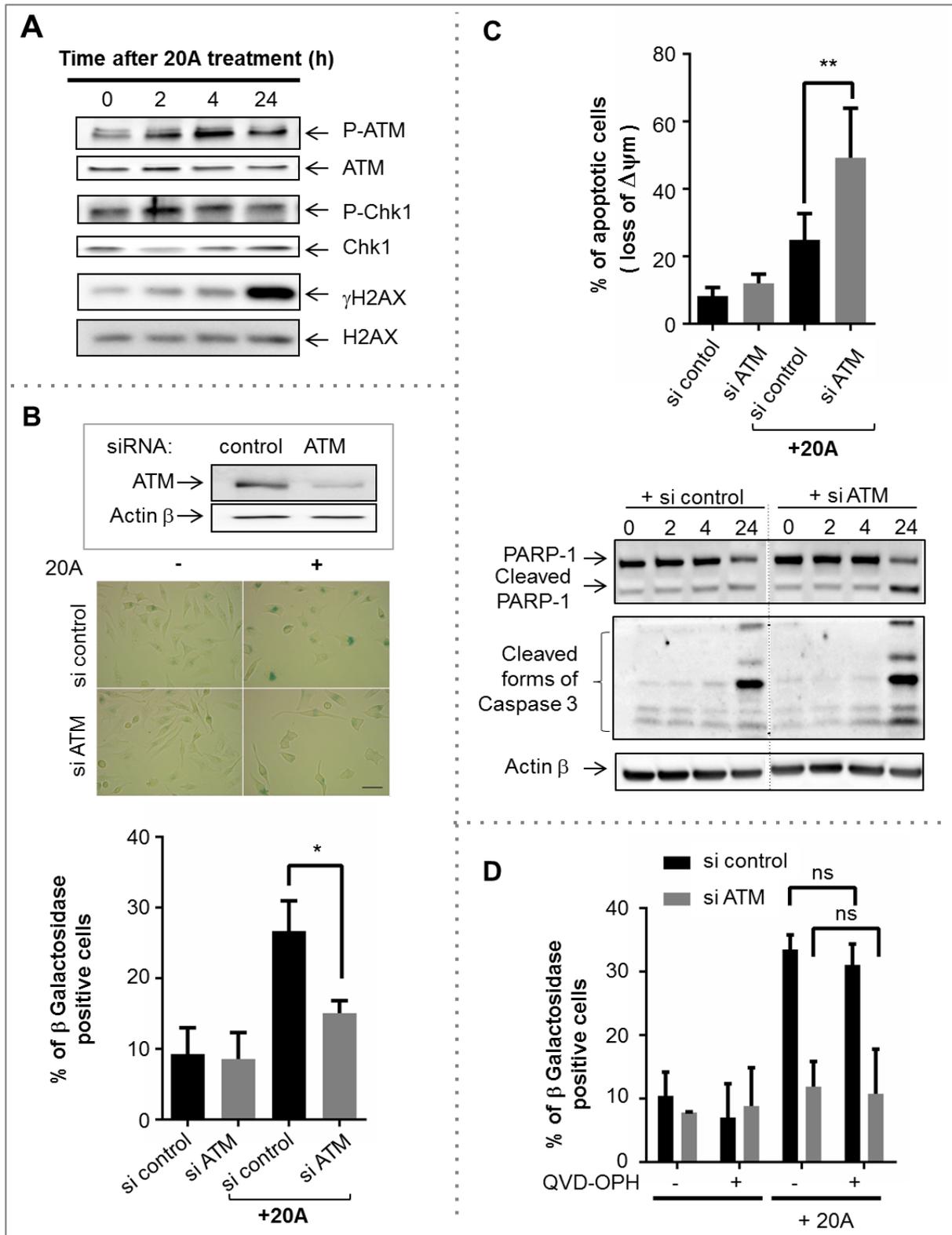


Figure 4: DDR is activated by 20A to direct cells to senescence instead of apoptosis (see legend on the next page).

Figure 4 (legend): DDR is activated by 20A to direct cells to senescence instead of apoptosis.

A) Western blotting analysis of the levels of phospho-ATM (Ser 1981), ATM, phospho-CHK1 (Ser 345), CHK1, γ H2AX (Ser 139), and H2AX in HeLa cells following treatment with 6 μ M 20A for the indicated time.

B, C and D HeLa cells were transiently transfected with either an *ATM*-targeted siRNA or control siRNA. 20A (6 μ M) was added 24 h later for a period of 24 h.

B) *Top*, western blot evaluating the levels of ATM protein expression in either the presence or the absence of ATM siRNA. *Middle*, the percent of senescent cells determined as described in Figure 1D. Data are means \pm SD of four independent experiments. * *p-value* < 0.05 using Mann-Whitney test. *Bottom*, representative images of cells treated as indicated and stained for β -galactosidase (scale bar = 50 μ m).

C) *Top*, apoptotic cell death was scored by measurement of loss of $\Delta\psi$ m. The data are presented as means \pm SD of 8 values obtained from four independent experiments each performed in duplicate. ** *p-value* < 0.01 using Mann-Whitney test. *Bottom*, immunoblot image of the appearance of the cleaved forms of Caspase3 and PARP1.

D) Cells were incubated for 2 hours with QVD-OPH (20 μ M) prior the addition of 6 μ M 20A for 24 hours. The percent of senescent cells determined as described in Figure 1D. Data correspond to the mean \pm SD of three independent experiments. * *ns: not significant*, using Mann-Whitney test.

20A treatment promotes ATM-dependent autophagy activation and p62 up-regulation

Based on the transcriptome and proteome results, we reasoned that the autophagy pathway is triggered by 20A. We thus explored the activation of the MTOR and AMPK axes, two pivotal pathways that control autophagy negatively and positively, respectively (22). As illustrated in **Figure 5A**, treatment of HeLa cells with 20A causes MTOR inhibition as evidenced by a decrease in the phosphorylation levels of two MTOR substrates, p70 and 4-EBP1, observed as early as 4 h after treatment. In parallel, we observed a rapid (by 1 h) and transient (decreased at 4 h) phosphorylation of AMPK (**Figure 5A**) revealing its activation under these conditions.

To further evaluate the autophagy activity in response to 20A, we determine the abundance of autophagosomes by performing cellular ultrastructure analysis and by studying changes in the subcellular localization of the autophagosome marker LC3. Electron micrographs of HeLa cells revealed that 20A treatment caused accumulation of multi-membrane vesicles containing electron-dense materials with features of autophagosomes (**Figure 5B**). The increase in abundance of autophagosomes induced by 20A was confirmed by immunofluorescence, which showed a significant increase in LC3 fluorescent dots in 20A-treated cells as compared to untreated cells (**Figure 5C**, left). Western blotting analysis also showed a time-dependent accumulation of LC3-II, the form of LC3 protein conjugated to phosphatidylethanolamine (**Figure 5C**, center), a marker of the autophagosomal membrane which is eventually degraded by lysosomal proteases (22). Moreover, 20A-induced accumulation of LC3-II was enhanced in the presence of lysosomal protease inhibitors E64d and pepstatin A, indicating that the material sequestered within the autophagosomes are successfully addressed to lysosomes and degraded after 8 h of treatment (**Figure 5C**, right). We also examined p62, a protein involved in the selective transport of specific cellular cargos to autophagosomes (44). As shown in **Figure 5D**, 20A promotes an increase in levels of p62 and in its phosphorylation at serine 403, known to regulate the selective autophagy degradation of ubiquitinated proteins (45).

As ATM activation has been previously reported to stimulate autophagy following DNA damage (34), we further explored the influence of this pathway on autophagy

induction by 20A. The effect of the ATM inhibitor KU55933 was tested on the accumulation of the autophagy marker LC3-II in the presence and absence of two autophagy flux inhibitors. As presented in **Figure 5E**, the inhibition of ATM activation by KU55933 prevented 20A-induced accumulation of LC3-II. This effect was not attributable to the activation of the autophagy flux, as under this condition the levels of LC3-II were not enhanced when autophagy flux was inhibited by bafilomycin A1 or E64d and pepstatin A as compared to that of 20A treatment. Altogether, these data indicate that inhibition of ATM activation counteracts 20A-induced autophagy, supporting the idea that ATM activation is responsible for the activation of autophagy.

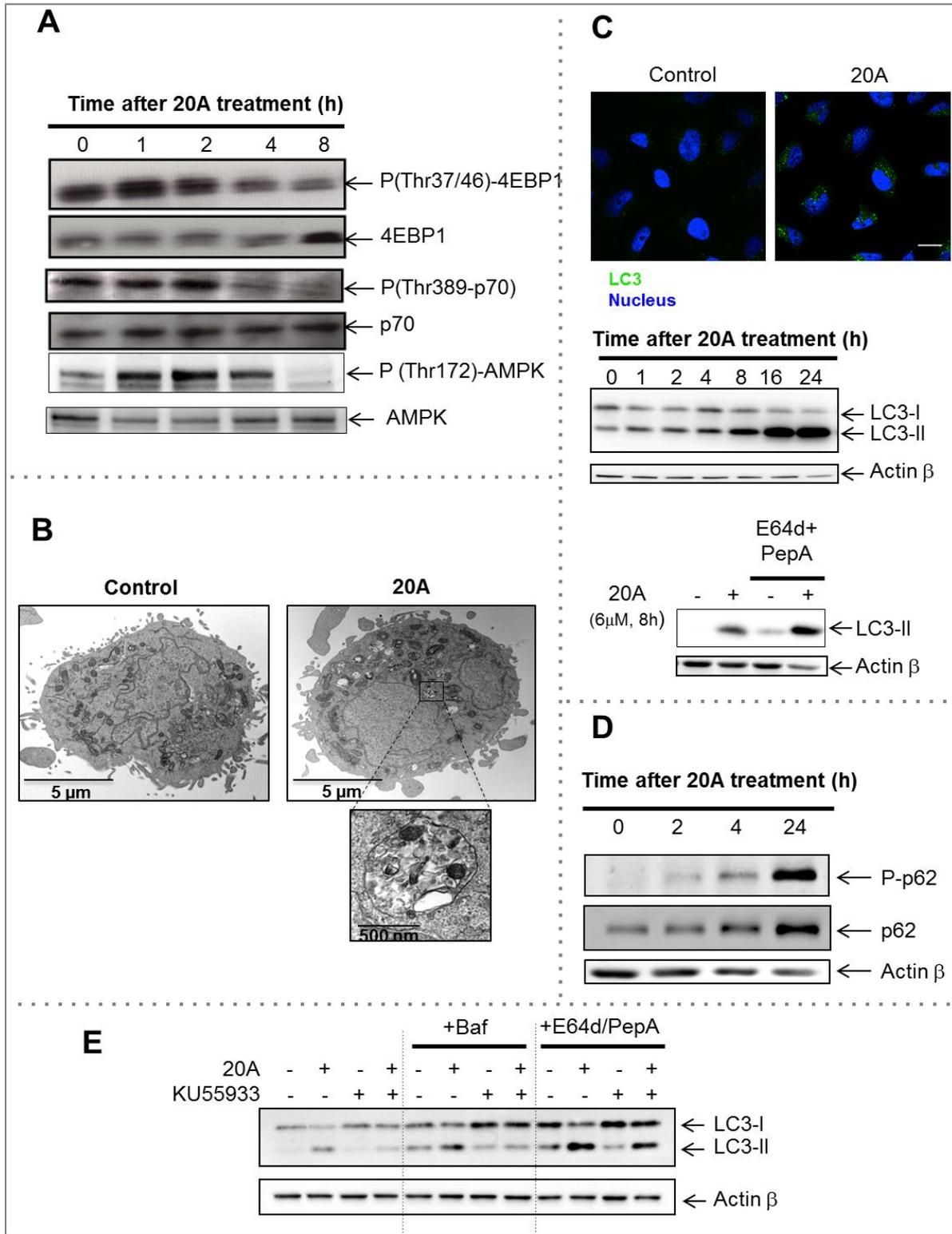


Figure 5: 20A promotes autophagy induction through a mechanism that involves ATM activation (see legend on the next page).

Figure 5 (legend): 20A promotes autophagy induction through a mechanism that involves ATM activation.

A) HeLa cells treated for the indicated times with 6 μ M 20A. The activities of the MTORC1 and AMPK pathways were determined following immunoblot analysis using antibodies directed against phospho-4EBP1 (Thr37/46), 4EBP1, phospho-p70 (Thr 389), p70, phospho-AMPK (Thr 172), and AMPK.

B) Representative electron micrographs of HeLa cells untreated or treated for 16 h with 6 μ M 20A.

C) *Top*, immunofluorescence analysis for the abundance of LC3 puncta (green dots) in HeLa cells was assessed after 3 h in the absence or presence of 6 μ M 20A; Hoechst was used to stain nuclei (blue). Representative confocal images are shown (scale bar = 10 μ m). *Middle*, immunoblot images of LC3-II levels in HeLa cells treated with 6 μ M 20A for the indicated times. *Bottom*, immunoblot of cells treated with or without E64d (10 μ g/ml) plus pepstatin A (2 μ g/ml) 2 h prior 20A treatment (6 μ M, 8 h).

D) Immunoblot analysis of phospho-p62 (Ser 403) and p62 levels in HeLa cells treated with 6 μ M 20A for the indicated times.

E) Immunoblot analysis of LC3-II levels in HeLa cells incubated with or without 10 μ M KU55933 for 2 h and then treated with 6 μ M 20A for 8 h. Where indicated cells were incubated with 10 μ g/ml E64d plus 2 μ g/ml pepstatin A for 2 h prior 20A treatment. When indicated, Bafilomycin A1 (50 nM) was added 3 h before cell lysis.

Loss of autophagy impairs 20A-induced senescence and drives cells to apoptosis

In order to evaluate the role of autophagy on DDR and cell growth arrest responses, we used the CRISPR/Cas9 system to generate two HeLa cell lines with complete autophagy disruption by deletion of key autophagy genes *ATG5* or *ATG7*. *ATG5* or *ATG7* levels were undetectable in the respective CRISPR-targeted cells as shown by western blotting (**Figure 6A**). It is worth noting that disruption of autophagy did not have an effect on cell viability under these growth conditions (data not shown). As expected, loss of *ATG5* or *ATG7* abrogated the induction of basal levels of autophagy as well as of 20A-induced autophagy as evidenced by immunoblot analysis of LC3-II expression levels (**Figure 6A**). Moreover, the disruption of autophagy led to accumulation of the autophagy substrate p62 both in control and 20A-treated cells (data not shown).

To determine the functional role of autophagy in the anti-proliferative effects of 20A, we next examined the effect of autophagy disruption on senescence and apoptosis triggered by 20A treatment. As shown in **Figure 6B**, the 20A-induced senescence phenotype was significantly reduced in both *ATG5*- and *ATG7*-deficient cells as compared to control cells. Concomitantly, autophagy-deficient cells exhibited higher levels of apoptosis relative to control cells as evidenced by loss of mitochondrial transmembrane potential and cleavage of both Casp3 and PARP1 (**Figure 6C**). These results corroborate those observed when ATM was inhibited (**Figure 4C, 4B, and 4D**) underscoring the essential role of autophagy in modulating the balance between senescence and apoptosis upon 20A treatment.

Because loss of autophagy following DNA damage has been reported to cause dephosphorylation of CHK1 (at Ser 345), we explored whether this occurs in response to 20A. As shown in **Figure 6D**, autophagy-deficient cells exhibited significantly lower levels of CHK1 phosphorylation in response to 20A as compared to autophagy-proficient cells (**Figure 6D**). Furthermore, loss of autophagy resulted in an enhanced accumulation of γ H2AX at earlier time points after the addition of 20A, in a time window where apoptotic cell death was not observed, supporting the idea that the accumulation of γ H2AX is, at least in part, independent of apoptotic DNA fragmentation. To determine whether inhibition of CHK1 activation can phenocopy

loss of autophagy, we examined the effect of LY2603618, a specific inhibitor of CHK1 in HeLa cells. Pretreatment of wild-type HeLa cells with LY2603618 enhanced 20A-induced apoptotic cell death to the same extent that what was observed in HeLa cells in which autophagy was disrupted. This suggests that CHK1 activation is one of the regulators of autophagy-mediated DDR and cell survival following 20A treatment.

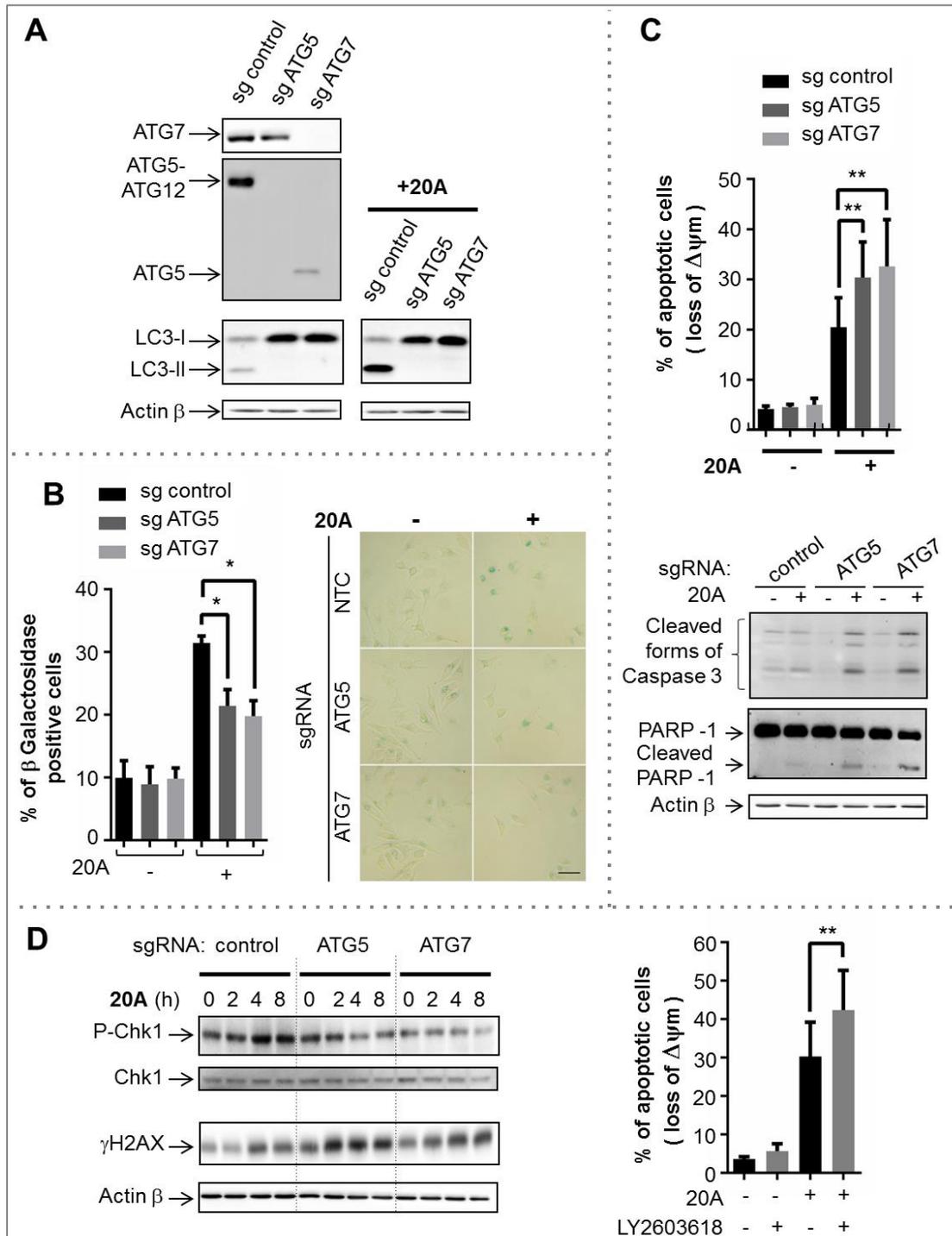


Figure 6: Autophagy disruption causes a deficiency in CHK1 activation and sensitizes cells to apoptosis induced by 20A (see legend on the next page).

Figure 6 (legend): Autophagy disruption causes a deficiency in CHK1 activation and sensitizes cells to apoptosis induced by 20A.

A) Autophagy disruption in HeLa cells was validated by immunoblot analysis of the expression levels of ATG5, ATG7, LC3-II in autophagy-proficient (sg-control) and autophagy-deficient (sgATG5 and sgATG7) cells following treatment with 6 μ M 20A for 16 h.

B) *Left*, the percentages of senescent cells scored by β -galactosidase staining in sg-control, sgATG5, and sg ATG7 cells after 24 h treatment with 6 μ M 20A as described in Figure 1D. The data are presented as means \pm SD of four independent experiments. * *p-value* < 0.05 using Mann-Whitney test. *Right*, representative cell images (scale bar = 50 μ m).

C) Autophagy-proficient (sg-control) and autophagy-deficient (sgATG5 and sgATG7) cells were treated with 6 μ M 20A for 24 h. *Top*, loss of mitochondrial transmembrane potential was evaluated flow cytometry. Data are means \pm SD of 12 values obtained from four independent experiments each performed in triplicate. ** *p-value* < 0.01 using Mann-Whitney test. *Bottom*, immunoblot analysis of cleaved forms of Casp3 and PARP1.

D) *Left*, immunoblot analysis of phospho-CHK1 (Ser 345) and γ H2AX (Ser 139) levels in sg-control and sgATG and sgATG5 cells treated with 6 μ M 20A for the indicated time. *Right*, loss of mitochondrial transmembrane potential was evaluated by flow cytometry assay in HeLa cells pretreated for 2 h with the CHK1 inhibitor LY2603618 (0.5 μ M) prior to treatment with 6 μ M 20A for an additional 24 h. The data are presented as means \pm SD of 9 values obtained from three independent experiments each performed in triplicate. ** *p-value* < 0.01 using Mann-Whitney test.

Discussion

Given that the outcome of cancer therapy relies on the cancer cell fate – survival, senescence, or death – the identification of regulatory mechanisms that impact this fate is required for optimization of the efficacy of cancer treatment (33, 46). The triarylpyridine family of G4 ligands represents a novel class of DNA ligand molecules with potential as anticancer agents (21). In the present study, we provide evidence that 20A, a representative compound of this family of G4 ligands, inhibits cancer cell growth both *in vitro* and *in vivo*. We show that this compound induces senescence and apoptosis through a p53-independent mechanism. Notably, we identify the ATM/autophagy axis as a pivotal player responsible for the cell fate decision upon 20A treatment. To our knowledge, this is the first evidence of the implication of ATM/autophagy axis in the cell fate choice between senescence and apoptosis in cancer cells treated with a G4 ligand.

The ability of G4 ligands to promote senescence was previously attributed to stabilization of the telomeric G4 structures and resulting telomerase inhibition or telomere uncapping (5, 12). It is worth noting that telomerase inhibition should promote senescence only after multiple cycles of cell division (47), whereas 20A is able to induce senescence much more rapidly (within 24 h), suggesting that telomerase inhibition and telomere attrition might not be the cause for this induction of senescence. The premature senescence induced by 20A resembles that observed in response to several compounds targeting DNA including G4 ligands (48). Indeed, a number of G4 ligands are able to elicit DDR through ATM and/or ATR-dependent mechanisms (37, 49, 50). In support of this mechanism, our transcriptomic and proteomic analyses revealed a strong stimulation of the cell growth arrest pathways with the concurrent activation of the DDR in response to 20A treatment. Moreover, we found that 20A promotes a rapid activation of two key pathways implicated in the DDR: ATM and ATR/CHK1. Inhibition of either pathway in the presence of 20A exacerbated apoptotic cell death, indicating the role of these pathways in cell survival under this condition. Our findings extend previous evidence that ATM is required for survival of cancer cells that undergo premature senescence in response to DNA damage agents and oxidative stress conditions (*i.e.*, doxorubicin, camptothecin, and

hydrogen peroxide (48). Along this line, it was reported that the cell sensitivity to G4 ligands is correlated to the basal level of DNA damage and telomere deprotection (11). Moreover, some G4 ligands preferentially target cancer cells deficient for DNA repair, as shown specifically for cells harboring BRCA1 and BRCA2 mutations (15, 51). In the latter study, inhibition of DNA repair by using a PARP inhibitor has been shown to enhanced the antitumor effect of G4 ligand RHPS4 *in vitro* and in tumor xenografts (51). In the same vein, evidence indicates that a dual G4/PARP ligand has a significant anti-proliferative potential in cancer cells (52). Collectively, these data support the idea that the modulation of DDR can influence the susceptibility of cells to the cytotoxic effect of the G4 ligand.

In a transcriptome analysis, we found that 20A caused an enrichment of the lysosomal regulatory pathways (*i.e.*, the MTOR and Protein Secretion Hallmarks, as well as the KEGG pathway REGULATION_OF_AUTOPHAGY). In particular, we provide evidence that ATM activation is responsible for the induction of autophagy by 20A. Such regulation of autophagy has been previously reported in response to other DNA damage agents and may constitute a mechanism through which ATM enable cells to escape death by entering senescence (53, 54). In keeping with this scenario, we found that disruption of autophagy by deletion of either of two key autophagy genes, *ATG5* or *ATG7*, directed cell towards apoptosis instead of senescence. The relationship between autophagy and senescence is complex as in some settings autophagy accelerates the establishment of the senescence phenotype, whereas in other circumstances autophagy impedes this process (32, 55). The activation of autophagic flux and the up-regulation of the autophagy receptor p62 by 20A support the idea that autophagy participates in changes in metabolism and extensive cellular remodeling that occur during cellular senescence, a mechanism that may confer cell adaptation to DNA damage (34). In addition, we found that 20A promoted activation of AMPK with a concurrent inhibition of MTOR activity, two pathways that link autophagy to metabolism and DDR (34). Further investigation is required to determine the exact mechanism through which autophagy operates to maintain the integrity of senescent cells in response to 20A.

Although the induction of senescence by chemo- or radiotherapies was initially considered as a tumor-suppressive mechanism, emerging evidence supports the notion that this response can also promote tumorigenesis (55). In contrast to apoptotic cells, senescent cells are viable and have the ability to influence tumor growth as well as tumor response to treatment by secretion of proinflammatory and mitogenic factors (55). Thus, it will be relevant to determine if 20A treatment results in a senescence-associated secretory phenotype.

We found that the activation of autophagy by 20A regulates DDR through the stabilization of CHK1 phosphorylated at Ser 345; this phosphorylation coordinates the DDR and the cell cycle checkpoint response (56). Deficiency in autophagy coupled with 20A treatment led to failure in CHK1 activation and was associated with increased levels of γ H2AX. Our data are in line with a recent study showing that autophagy-deficient cells have impaired homologous recombination through a mechanism that involves proteasome degradation of phospho-CHK1 (57). Interestingly, the dephosphorylation of CHK1 has been also reported in A549 cells treated with the G4 ligand 12459 (58). In this study, the phosphatase PPM1D (also known as WIP1) was shown to be responsible for CHK1 inactivation. Further investigation is required to address the exact mechanism through which autophagy regulates the expression levels of phospho-CHK1 in response to a G4 ligand.

Autophagy induction by G4 ligands Ant1,5, SYUIQ-5, and CX-5461, three compounds unrelated to 20A, was previously reported (13, 36, 37). Zaffaroni and colleagues showed that Ant1,5 causes cell growth arrest, increased p21 expression, and induction of cytoprotective autophagy in cells (13). It is noteworthy that these responses occurred without induction of senescence, which is different from the mechanism identified here for 20A. The G4 ligand SYUIQ-5 causes cell death through a mechanism that depends on autophagy (37). This suggests that the activation of autophagy in response to a G4 ligand can have different cellular outcomes that may be related to the chemical properties of the compound, the concentration used, and the specific signaling pathways activated by the ligand. Further investigations are required to decipher the context-dependent role of autophagy in response to different classes of G4 ligands. Given that the mechanism

underlying the regulation of autophagy by G4 ligands is yet not understood, it will be interesting to determine if this regulation relies on binding of the ligand to particular G4 structures or a yet-to-be identified mechanism.

Collectively, our data provide evidence for the antiproliferative effects of 20A in cancer models *in vivo* and *in vitro*. Our study also revealed that targeting of the ATM and autophagy pathways is a promising strategy to achieve the optimal efficiency of the G4 ligand in cancer cells. This property, together with its p53-independent anticancer effects underlines the therapeutic potential of 20A in a large panel of tumors.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the BIC platform in Bordeaux and L. Lacroix for G4Hunter bed files. The authors acknowledge funding from *Ligue Régionale d'Aquitaine* (to J.L.M and M.D.M.), INCa-DGOS-Inserm 6046 (to M.D.M), FR Transbiomed (to M.D.M.) and the SYMBIT project (reg. no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000477) financed by the ERDF (to J.L.M.).

Materials and methods

Reagents

The ATM inhibitor, KU-55933 (#SML1109), Hoechst 33258 (#14530), E64d (#516485), bafilomycin A1 (#B1793), MTT (#M2128), blasticidine (#3513-03-9), Fluoromount (#F4680), puromycin (#58-58-2), and doxycycline (#D9891) were purchased from Sigma-Aldrich. Pepstatin A methyl ester (#516485) was obtained from Calbiochem. TMRM (T-668) and CFSE (#C34554) were purchased from Molecular Probes. LY2603618 (#S2626) was purchased from Selleckchem. 20A was synthesized as previously described (compound #3 in (20)).

Antibodies

Antibodies against the following proteins were used: phospho-ATM (Ser 1981) (#5883), ATM (#2873), phospho-AMPK (Thr172) (#2535), AMPK α 1 (#2795), ATG7 (#8558), cleaved Casp3 (#9664), phospho-CHK1 (Ser 345, 133D3) (#2348), CHK1 (2G1D5) (#2360), p21 Waf1/CIP1 (12D1) (#2947), p27 Kip 1 (D69C12)XP (#3686), phospho 4E-BP1 (Thr 37/46) (#9459), 4EPB1 (#9452), phospho-p70S6 kinase (Thr389) (#9205), p70S6 kinase (#9202), γ H2AX (Ser139) (#9718), and H2A.X (D17A3) XP (#7631) all from Cell Signaling Technology; Ki67 (30-9) (#790-4286) from Roche; PARP1 (C-2-10) (#BML-SA249-0050) from Enzo Life Sciences; p62 (#610832) from BD Biosciences; ATG5 (#0262-100/ATG5-7C6) from Nanotools; ACTIN β (#NB600-501) from Novus Biologicals; LC3 (#M152-3) from MBL; phospho-p62 (Ser403) (#MABC186) from Merck Millipore; HRP-conjugated anti-rabbit (#111-035-003) and HRP-conjugated anti-mouse (#115-035-174) from Jackson ImmunoResearch; anti-mouse (#A11001) and anti-rabbit Alexa Fluor 488 antibody (#A11008) from Invitrogen.

Cell culture

The human cervical cancer cell line HeLa and the human lung carcinoma A549 cell line were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC). HeLa and A549 cells were grown in RPMI 1640 and DMEM culture media, respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 2 mM glutamine (Gibco-Life Technologies). Saos-2 cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin (Gibco-Life Technologies). p53 expression was induced in Saos-2 cells by a 6-h treatment with 0.5 μ g/mL doxycycline; medium was then replaced with medium without doxycycline. All cell lines used in this study were cultivated at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Cell viability assay

Cell viability was evaluated using the MTT assay. Cells were seeded in a 96-well plate (4 x 10³ cells/well). After 24 h of drug treatment, MTT was added to each well to a final concentration of 0.5 mg/ml, followed by incubation at 37 °C for 3 h. The medium was then removed, and 100 µl of DMSO was added per well. The absorbance in each well was measured at 570 nm and 630 nm using a Flexstation 3 microplate reader (Molecular Devices). To determine the IC₅₀ of 20A, a non-linear regression curve was fit using GraphPad Prism software.

Cell division assay

HeLa cells were labeled with 1 µM CFSE on day zero and then subjected to flow cytometry analysis to monitor CFSE dilution, which occurs with cell division, on indicated days. The median fluorescence intensity (MFI) was scored every day, and the results are expressed as the mean percentage of MFI normalized to that obtained from day zero.

Apoptosis analysis

Apoptosis was determined by measuring the mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$) using tetramethyl rhodamine methyl ester perchlorate dye (TMRM) as previously described (59). Apoptosis was also evaluated by western blotting analyses of cleaved forms of either PARP1 or Casp3.

Senescence assay

Cells were stained for senescence-associated β -galactosidase activity using the Cell Signaling technology kit #9860 as per the manufacturer's instructions. Ten images were acquired on a CKX41 Olympus microscope 20X objective for each experimental condition. The percentages of β -galactosidase-positive cells were scored using Image J software. For the analysis, the color threshold was set to obtain 10% of β -galactosidase-positive cells in untreated cells, and this setup was applied to all images. Results are given as means \pm S.D. of four independent experiments.

Protein expression analysis

Cell extracts were prepared in 10 mM Tris, pH 7.4, 1% SDS, 1 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF (93482, Sigma-Aldrich), 1% Protease Inhibitor Cocktail (P8849, Sigma-Aldrich), and 1% Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail (1862495, Thermo Fisher Scientific). Extracts were treated with Benzonase Endonuclease (71205, Merck Millipore) and then heated for 5 min at 95 °C. For western blotting, aliquots (20–50 µg) of cellular extracts were subjected to SDS-PAGE using a Tris/glycine buffer system based on the method of Laemmli as previously

described (60). After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences, #10600003). The blots were then probed with primary antibodies using the manufacturer's protocol and then incubated with the appropriate HRP-conjugated secondary antibody. The expression of Actin β - and Ponceau Red staining were scored to evaluate the protein loading levels of the samples. Immunostained proteins were visualized on a chemiluminescence detector equipped with a camera (FUSION FX7, Fisher Bioblock Scientific) using the enhanced chemiluminescence detection system. The densitometry quantification was performed using the ImageJ software. For all of the immunoblots, representative images of at least two experiments are shown.

Label-free quantitative proteomics

This analysis was performed by the Proteomics Core Facility at the University of Bordeaux (<https://proteome.cgfb.u-bordeaux.fr/en>). The steps of sample preparation, protein digestion and nano-liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis were performed as previously described (61). For protein identification, Sequest HT and Mascot 2.4 algorithms through Proteome Discoverer 1.4 Software (Thermo Fisher Scientific) were used for protein identification in batch mode by searching against a *Homo sapiens* database (68,978 entries, Reference Proteome Set, release 2013_12). This database was downloaded from <http://www.uniprot.org>. Two missed enzyme cleavages were allowed. Mass tolerances in MS and MS/MS were set to 10 ppm and 0.02 Da. Oxidation of methionine, acetylation of lysine, and deamidation of asparagine and glutamine were searched as dynamic modifications. Carbamidomethylation on cysteine was searched as static modification. Peptide validation was performed using Percolator algorithm (62), and only “high confidence” peptides were retained corresponding to a 1% false positive rate (FDR) at the peptide level. Raw LC-MS/MS data were imported in Progenesis LC-MS (version 4.1; Nonlinear Dynamics, a Waters Company) for feature detection, alignment, and quantification. All sample features were aligned according to retention times by manually inserting up to 50 landmarks followed by automatic alignment to maximally overlay all the two-dimensional (m/z and retention time) feature maps. Singly charged ions and ions with higher charge states than six were excluded from analysis. All remaining features were used to calculate a normalization factor for each sample that corrects for experimental variation. Peptide identifications (with FDR <1%, see above) were imported into Progenesis. Only non-conflicting features and unique peptides were considered for calculation of quantification at the protein level. A minimum of two peptides matched to a protein was used as the criteria for identification as a differentially expressed protein.

RNA extraction and microarray experiments

Total RNAs were extracted from cells with Trizol reagent (Life Technologies) and purified with the RNeasy Min Elute Cleanup Kit (Qiagen) according to the manufacturer's procedures. RNA were quantified using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) and RNA quality was checked on an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies). Microarray experiments were performed using Agilent-014,850 Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F array according to the manufacturer's recommended protocol.

Transcriptome and proteome analyses

The experimental designs and data filtering results are summarized in Supplementary Figure S7A. Briefly, the variability between replicates for each gene was computed as the standard deviation divided by the mean. Thresholds of 0.5 and 0.1 were set according to distributions in proteomic and transcriptomic analyses, respectively. Using a PCA analysis (Supplementary Figure S7B and C), we identified samples not clustered properly with their respective replicates and discarded them from subsequent analysis.

i) Differential expression

Statistical analyses were performed in R version 3.3.1. We processed the proteomic data using *DESeq2* package version 1.14.1 with default parameters (63). Proteomic data have the same biases as gene expression data in that the high abundance of some proteins and lengths of the proteins are known to distort the signal. We used the normalized abundance per gene as counts. We processed the transcriptomic data using *limma* package version 3.30.13 following usual pre-processing steps (64): load and process Agilent files, apply background correction, filter control probes, apply quantile normalization, compute average signal per gene, and annotate using R package *biomaRt* version 2.30.0 (65) with Ensembl release 87. We used the 6 h control samples for both 6 h and 16 h 20A treated samples and modeled gene expression with linear model functions from the *limma* package. The full transcriptome/proteome analysis is provided as a separate xls file.

ii) Functional enrichment and KEGG pathways

Functional enrichment was computed using command line version of GSEA software and the Hallmark datasets (66)(67)(40). We then deepened the analyses using the KEGG datasets (42). We put a maximum threshold of 0.01 on the FDR. We then used the *pathview* R package version 1.14.0 to visualize the behavior of genes and proteins at 6 h and 16 h in relevant KEGG pathways (41).

iii) G4 enrichment

G4 regions were predicted by analysis of the human genome version hg38 using G4Hunter with default parameters (threshold = 1.52; window = 25). A threshold of 1.2 on the score was used. Statistical enrichment of G4 complexes around the transcription start sites (TSS) and transcription terminal sites (TTS) of differentially expressed transcripts (FDR < 0.01 and the absolute log Fold Change > 1) was computed by a binomial test. The expected frequencies were estimated from the observed frequency in all genes present in the transcriptomics analysis. We used a sliding window of 100 bp with 50-bp step from the TSS or the TTS to 1 kb upstream (promoter, 3'UTR) and downstream (5'UTR, downstream of the gene).

Immunofluorescence analysis

Cells were fixed at room temperature with 4% (v/v) paraformaldehyde for 10 min and then permeabilized with 50 µg/ml digitonin before incubation with the LC3 antibody. Cells were then stained with appropriate Alexa Fluor-conjugated secondary antibody. Nuclei were counterstained for 10 min with Hoechst 33258. The fluorescence of cells was examined using a Zeiss LSM510 META confocal microscope (Zeiss) with an ApoPLAN x63 objective. Identical exposures were used for each channel throughout individual experiments.

Lentiviral vector production and cell transduction

The CRISPR-CAS9 lentivirus system was used to generate autophagy-deficient HeLa cell lines. The pLenti CRISPR (pXPR) vector expressing Cas9 and the sgRNAs that target *ATG5* or *ATG7* nonspecific sgRNA control were constructed and validated in Prof. Kevin M Ryan laboratory (Beatson Institute of Health, University of Glasgow). The lentiviral *tdTomato*-expressing vector (a generous gift from Prof. Richard Iggo, university of Bordeaux, Bordeaux) was used to monitor tumor growth in the *in vivo* experiments. All lentiviral vectors (10 µg) were co-transfected into HEK 293T cells along with 10 µg packaging (psPAX2) and 4 µg envelope (pVSV-G) plasmids by calcium-phosphate transfection. After 48 h of incubation, the supernatants were collected and then concentrated by centrifugation at 3000 g for 15 min in a Concentrator Vivaspin 20 100 000 MWCO (VS2042, Sartorius). Viruses were aliquoted and stored at -80 °C. For cell transduction experiments, HeLa cells were plated in a 6-well plate (10⁵ cells/well) 24 h prior to infection with either the *tdTomato* vector or the CRISPR expressing vectors (sgRNA control, sgRNA *ATG5*, sgRNA *ATG7*) for 48 h. The titer of each lentiviral batch was determined on HeLa cells. At 24 h post infection, cells expressing the vector *tdTomato* or the CRISPR-cas9 vectors were selected in culture media supplemented with either 10 µg/ml blasticidine for 5 days or 2 µg/ml puromycin for 72 h, respectively.

Transient transfection with small interfering RNA

A non-specific control small interfering RNA (siRNA) (Sense: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAtt-3') and a specific siRNA that targets *ATM* (sense 5'-AACATACTACTCAAAGACAtt-3') were previously validated (68) and were synthesized by Eurogentec. Cells were plated in a 12-well plate (4×10^4 cells/well) and were transiently transfected with 100 nM siRNA using Oligofectamine (ThermoFisher) following the manufacturer's instructions. After 24 h, cells were treated with drugs at the indicated concentrations.

Autophagy assay

Autophagy was evaluated by i) western blotting analysis of the abundance of the autophagosome marker LC3 in the presence and absence of the lysosomal inhibitors, ii) a fluorescence microscopy counting of cells with LC3 puncta, and iii) cellular ultrastructure analysis of the presence of autophagosome by transmission electron microscopy (TEM). Briefly, cell pellets were fixed in a 1.6% glutaraldehyde solution in 0.1 M cacodylate buffer at room temperature and stored overnight at 4 °C. After three rinses in 0.1 M cacodylate buffer (15 min each), pellets were post-fixed in a 1% osmium tetroxide and 1% potassium ferrocyanide solution in 0.1 M cacodylate buffer for 1 h at room temperature to enhance the staining of cytoplasmic membranes. The cells were subsequently dehydrated in a series of acetone baths (90%, 100% three times, 15 min each) and progressively embedded in Epon 812 (Fluka) resin (acetone/resin 1:1, 100% resin two times, 2 h for each bath). Resin blocks were hardened in a 60 °C oven for 2 days. Ultrathin sections (70 nm) were obtained with a Reichert Ultracut S ultramicrotome equipped with a Drukker International diamond knife and collected on 200-mesh copper grids. The sections were stained with lead citrate and uranyl acetate. TEM observations were performed with a JEOL JEM-1400 transmission electron microscope equipped with a Morada camera at a 100 kV acceleration voltage.

Xenograft tumor formation and immunohistochemistry

The study was performed in accordance with European Community Standards of Care (animal house authorization number B33063916). Approval for the animal experiments was obtained by the *Comité d'Ethique pour l'Experimentation Animale* (CEEA50), Bordeaux (project number APAFIS# 9321-2017031417171591). For xenograft tumor formation, 2×10^6 *tdTomato*-expressing HeLa cells were suspended in 100 μ l of RPMI medium and subcutaneously injected in the right flank of 8-week-old male NSG mice (NOD-scid IL2RG^{-/-}, Jackson Laboratory) (69). When the *tdTomato* fluorescence average within the tumors reached 6×10^9 , the tumor-bearing mice were randomly assigned to three groups (10 mice/group) and received peritumoral injections of 100 μ l of vehicle (15% DMSO) or 20A at

either 10 or 20 mg/kg per mouse 5 days a week for a total of 12 days. Weights were scored weekly.

The *tdTomato* fluorescence within the tumor was measured twice a week using a PhotonIMAGER (Biospace) from day 35 after cell injection. Results are expressed in photon intensity (photon/second/steradian) and normalized for each group to the values of fluorescence obtained at day 35 post-cell injection. At the day of the sacrifice, tumor blocks were fixed in 4% formol and paraffin embedded for hematoxylin-eosin-saffron staining and immunohistochemical labeling of cell proliferation marker Ki67. High-quality images were made with slide scanner Nanozoomer (Hamamatsu) in the Bordeaux Imaging Center. Tumor morphology and immunohistochemical staining were analyzed by a pathologist.

Statistical analysis

Data are presented as means, error bars as standard deviations (SD) of at least three independent experiments unless otherwise stated. Comparisons of the different groups were made with either Mann-Whitney unpaired test or unpaired t test. For the *in vivo* experiments, the results are expressed as means, error bars as standard errors of the mean (SEM), and comparisons of the different groups were with Mann-Whitney unpaired test. Values of * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ were considered statistically significant. The software used was GraphPad Prism.

Data availability

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (70) partner repository with the dataset identifier PXD009430. We have submitted the list of genes ordered by the log Fold Changes (returned respectively by DESeq2 and limma) to microarray data GEO accession numbers GSE113424.

Bibliography:

1. Huppert, J.L. and Balasubramanian, S. (2007) G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 406–413.
2. Bedrat, A., Lacroix, L. and Mergny, J.-L. (2016) Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 1746–1759.
3. Hänsel-Hertsch, R., Di Antonio, M. and Balasubramanian, S. (2017) DNA G-quadruplexes in the human genome: detection, functions and therapeutic potential. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 279–284.
4. Neidle, S. (2016) Quadruplex Nucleic Acids as Novel Therapeutic Targets. *J. Med. Chem.*, **59**, 5987–6011.
5. Riou, J.F., Guittat, L., Mailliet, P., Laoui, A., Renou, E., Petitgenet, O., Mégnin-Chanet, F., Hélène, C. and Mergny, J.L. (2002) Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 2672–2677.
6. Burger, A.M., Dai, F., Schultes, C.M., Reszka, A.P., Moore, M.J., Double, J.A. and Neidle, S. (2005) The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function. *Cancer Res.*, **65**, 1489–1496.
7. 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.
8. Rigo, R., Palumbo, M. and Sissi, C. (2017) G-quadruplexes in human promoters: A challenge for therapeutic applications. *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 1399–1413.
9. Cammas, A. and Millevoi, S. (2017) RNA G-quadruplexes: emerging mechanisms in disease. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 1584–1595.
10. Fay, M.M., Lyons, S.M. and Ivanov, P. (2017) RNA G-Quadruplexes in Biology: Principles and Molecular Mechanisms. *J. Mol. Biol.*, **429**, 2127–2147.
11. Salvati, E., Rizzo, A., Iachettini, S., Zizza, P., Cingolani, C., D'Angelo, C., Porru, M., Mondello, C., Aiello, A., Farsetti, A., *et al.* (2015) A basal level of DNA damage and telomere deprotection increases the sensitivity of cancer cells to G-quadruplex interactive compounds. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 1759–1769.
12. Huang, F.-C., Chang, C.-C., Wang, J.-M., Chang, T.-C. and Lin, J.-J. (2012) Induction of senescence in cancer cells by the G-quadruplex stabilizer, BMVC4, is independent of its telomerase inhibitory activity. *Br. J. Pharmacol.*, **167**, 393–406.
13. Orlandi, N.I., Cimino-Reale, G., Borghini, E., Pennati, M., Sissi, C., Perrone, F., Palumbo, M., Daidone, M.G., Folini, M. and Zaffaroni, N. (2012) Autophagy acts as a safeguard mechanism against G-quadruplex ligand-mediated DNA damage. *Autophagy*, **8**, 1185–1196.
14. Salvati, E., Leonetti, C., Rizzo, A., Scarsella, M., Mottolese, M., Galati, R., Sperduti, I., Stevens, M.F.G., D'Incalci, M., Blasco, M., *et al.* (2007) Telomere damage induced by the G-quadruplex ligand RHPS4 has an antitumor effect. *J. Clin. Invest.*, **117**, 3236–3247.
15. Zimmer, J., Tacconi, E.M.C., Folio, C., Badie, S., Porru, M., Klare, K., Tumiaty, M., Markkanen, E., Halder, S., Ryan, A., *et al.* (2016) Targeting BRCA1 and BRCA2 Deficiencies with G-Quadruplex-Interacting Compounds. *Mol. Cell*, **61**, 449–460.
16. Ohnmacht, S.A., Marchetti, C., Gunaratnam, M., Besser, R.J., Haider, S.M., Di Vita, G., Lowe, H.L., Mellinas-Gomez, M., Diocou, S., Robson, M., *et al.* (2015) A G-quadruplex-binding compound showing anti-tumour activity in an in vivo model for pancreatic cancer. *Sci. Rep.*, **5**, 11385.
17. Porru, M., Zizza, P., Franceschin, M., Leonetti, C. and Biroccio, A. (2017) EMICORON: A multi-targeting G4 ligand with a promising preclinical profile. *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 1362–1370.
18. Ohnmacht, S.A. and Neidle, S. (2014) Small-molecule quadruplex-targeted drug discovery. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, 2602–2612.
19. Duarte, A.R., Cadoni, E., Ressurreição, A.S., Moreira, R. and Paulo, A. (2018) Design of Modular G-quadruplex Ligands. *ChemMedChem*, 10.1002/cmdc.201700747.
20. Smith, N.M., Labrunie, G., Corry, B., Tran, P.L.T., Norret, M., Djavaheiri-Mergny, M., Raston, C.L. and Mergny, J.-L. (2011) Unraveling the relationship between structure and stabilization of triarylpyridines

as G-quadruplex binding ligands. *Org. Biomol. Chem.*, **9**, 6154–6162.

21. Kerkour,A., Mergny,J.-L. and Salgado,G.F. (2017) NMR based model of human telomeric repeat G-quadruplex in complex with 2,4,6-triarylpyridine family ligand. *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 1293–1302.
22. Klionsky,D.J. and Codogno,P. (2013) The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J. Innate Immun.*, **5**, 427–433.
23. Galluzzi,L., Baehrecke,E.H., Ballabio,A., Boya,P., Bravo-San Pedro,J.M., Cecconi,F., Choi,A.M., Chu,C.T., Codogno,P., Colombo,M.I., *et al.* (2017) Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.*, **36**, 1811–1836.
24. Lamb,C.A., Yoshimori,T. and Tooze,S.A. (2013) The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 759–774.
25. Kroemer,G., Mariño,G. and Levine,B. (2010) Autophagy and the Integrated Stress Response. *Mol. Cell*, **40**, 280–293.
26. Johansen,T. and Lamark,T. (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*, **7**, 279–296.
27. Rosenfeldt,M.T. and Ryan,K.M. (2011) The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis*, **32**, 955–963.
28. White,E. (2015) The role for autophagy in cancer. *J. Clin. Invest.*, **125**, 42–46.
29. Galluzzi,L., Pietrocola,F., Bravo-San Pedro,J.M., Amaravadi,R.K., Baehrecke,E.H., Cecconi,F., Codogno,P., Debnath,J., Gewirtz,D.A., Karantza,V., *et al.* (2015) Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.*, **34**, 856–880.
30. Levy,J.M.M., Towers,C.G. and Thorburn,A. (2017) Targeting autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **17**, 528–542.
31. Kang,C. and Elledge,S.J. (2016) How autophagy both activates and inhibits cellular senescence. *Autophagy*, **12**, 898–899.
32. Gewirtz,D.A. (2014) Autophagy and senescence in cancer therapy. *J. Cell. Physiol.*, **229**, 6–9.
33. Galluzzi,L., Vitale,I., Aaronson,S.A., Abrams,J.M., Adam,D., Agostinis,P., Alnemri,E.S., Altucci,L., Amelio,I., Andrews,D.W., *et al.* (2018) Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.*, **25**, 486–541.
34. Eliopoulos,A.G., Havaki,S. and Gorgoulis,V.G. (2016) DNA Damage Response and Autophagy: A Meaningful Partnership. *Front. Genet.*, **7**.
35. Hewitt,G. and Korolchuk,V.I. (2017) Repair, Reuse, Recycle: The Expanding Role of Autophagy in Genome Maintenance. *Trends Cell Biol.*, **27**, 340–351.
36. Zhou,W.-J., Deng,R., Feng,G.-K. and Zhu,X.-F. (2009) [A G-quadruplex ligand SYUIQ-5 induces autophagy by inhibiting the Akt-FOXO3a pathway in nasopharyngeal cancer cells]. *Ai Zheng Aizheng Chin. J. Cancer*, **28**, 1049–1053.
37. Zhou,W.-J., Deng,R., Zhang,X.-Y., Feng,G.-K., Gu,L.-Q. and Zhu,X.-F. (2009) G-quadruplex ligand SYUIQ-5 induces autophagy by telomere damage and TRF2 delocalization in cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, **8**, 3203–3213.
38. Fulcher,D. and Wong,S. (1999) Carboxyfluorescein succinimidyl ester-based proliferative assays for assessment of T cell function in the diagnostic laboratory. *Immunol. Cell Biol.*, **77**, 559–564.
39. Crichton,D., Wilkinson,S., O'Prey,J., Syed,N., Smith,P., Harrison,P.R., Gasco,M., Garrone,O., Crook,T. and Ryan,K.M. (2006) DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*, **126**, 121–134.
40. Liberzon,A., Birger,C., Thorvaldsdóttir,H., Ghandi,M., Mesirov,J.P. and Tamayo,P. (2015) The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst.*, **1**, 417–425.
41. Luo,W. and Brouwer,C. (2013) Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinforma. Oxf. Engl.*, **29**, 1830–1831.
42. Kanehisa,M., Furumichi,M., Tanabe,M., Sato,Y. and Morishima,K. (2017) KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.*, **45**, D353–D361.
43. Smith,J., Tho,L.M., Xu,N. and Gillespie,D.A. (2010) The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv. Cancer Res.*, **108**, 73–112.
44. Lamark,T., Svenning,S. and Johansen,T. (2017) Regulation of selective autophagy: the

p62/SQSTM1 paradigm. *Essays Biochem.*, **61**, 609–624.

45. Matsumoto,G., Wada,K., Okuno,M., Kurosawa,M. and Nukina,N. (2011) Serine 403 Phosphorylation of p62/SQSTM1 Regulates Selective Autophagic Clearance of Ubiquitinated Proteins. *Mol. Cell*, **44**, 279–289.
46. Schmitt,C.A., Fridman,J.S., Yang,M., Lee,S., Baranov,E., Hoffman,R.M. and Lowe,S.W. (2002) A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*, **109**, 335–346.
47. Shawi,M. and Autexier,C. (2008) Telomerase, senescence and ageing. *Mech. Ageing Dev.*, **129**, 3–10.
48. Maréchal,A. and Zou,L. (2013) DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**.
49. 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.
50. Rizzo,A., Salvati,E., Porru,M., D’Angelo,C., Stevens,M.F., D’Incalci,M., Leonetti,C., Gilson,E., Zupi,G. and Biroccio,A. (2009) Stabilization of quadruplex DNA perturbs telomere replication leading to the activation of an ATR-dependent ATM signaling pathway. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 5353–5364.
51. Xu,H., Di Antonio,M., McKinney,S., Mathew,V., Ho,B., O’Neil,N.J., Santos,N.D., Silvester,J., Wei,V., Garcia,J., *et al.* (2017) CX-5461 is a DNA G-quadruplex stabilizer with selective lethality in BRCA1/2 deficient tumours. *Nat. Commun.*, **8**, 14432.
52. Salvati,E., Botta,L., Amato,J., Di Leva,F.S., Zizza,P., Gioiello,A., Pagano,B., Graziani,G., Tarsounas,M., Randazzo,A., *et al.* (2017) Lead Discovery of Dual G-Quadruplex Stabilizers and Poly(ADP-ribose) Polymerases (PARPs) Inhibitors: A New Avenue in Anticancer Treatment. *J. Med. Chem.*, **60**, 3626–3635.
53. Singh,K., Matsuyama,S., Drazba,J.A. and Almasan,A. (2012) Autophagy-dependent senescence in response to DNA damage and chronic apoptotic stress. *Autophagy*, **8**, 236–251.
54. Kang,H.T., Park,J.T., Choi,K., Kim,Y., Choi,H.J.C., Jung,C.W., Lee,Y.-S. and Chul Park,S. (2017) Chemical screening identifies ATM as a target for alleviating senescence. *Nat. Chem. Biol.*, **10**.1038/nchembio.2342.
55. Campisi,J. and d’Adda di Fagagna,F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 729–740.
56. Sørensen,C.S., Hansen,L.T., Dziegielewska,J., Syljuåsen,R.G., Lundin,C., Bartek,J. and Helleday,T. (2005) The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat. Cell Biol.*, **7**, 195–201.
57. Liu,E.Y., Xu,N., O’Prey,J., Lao,L.Y., Joshi,S., Long,J.S., O’Prey,M., Croft,D.R., Beaumatin,F., Baudot,A.D., *et al.* (2015) Loss of autophagy causes a synthetic lethal deficiency in DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **112**, 773–778.
58. Douarre,C., Mergui,X., Sidibe,A., Gomez,D., Alberti,P., Mailliet,P., Trentesaux,C. and Riou,J.-F. (2013) DNA damage signaling induced by the G-quadruplex ligand 12459 is modulated by PPM1D/WIP1 phosphatase. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 3588–3599.
59. Trocoli,A., Mathieu,J., Priault,M., Reiffers,J., Souquere,S., Pierron,G., Besançon,F. and Djavaheri-Mergny,M. (2011) ATRA-induced upregulation of Beclin 1 prolongs the life span of differentiated acute promyelocytic leukemia cells. *Autophagy*, **7**, 1108.
60. Djavaheri-Mergny,M., Amelotti,M., Mathieu,J., Besançon,F., Bauvy,C., Souquère,S., Pierron,G. and Codogno,P. (2006) NF-kappaB activation represses tumor necrosis factor-alpha-induced autophagy. *J. Biol. Chem.*, **281**, 30373–30382.
61. Henriët,E., Abou Hammoud,A., Dupuy,J.-W., Dartigues,B., Ezzoukry,Z., Dugot-Senant,N., Leste-Lasserre,T., Pallares-Lupon,N., Nikolski,M., Le Bail,B., *et al.* (2017) Argininosuccinate synthase 1 (ASS1): A marker of unclassified hepatocellular adenoma and high bleeding risk. *Hepatol. Baltim. Md*, **66**, 2016–2028.
62. Käll,L., Canterbury,J.D., Weston,J., Noble,W.S. and MacCoss,M.J. (2007) Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat. Methods*, **4**, 923–925.
63. Love,M.I., Huber,W. and Anders,S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for

RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*, **15**, 550.

64. Ritchie,M.E., Phipson,B., Wu,D., Hu,Y., Law,C.W., Shi,W. and Smyth,G.K. (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.*, **43**, e47.

65. Durinck,S., Spellman,P.T., Birney,E. and Huber,W. (2009) Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat. Protoc.*, **4**, 1184–1191.

66. Mootha,V.K., Lindgren,C.M., Eriksson,K.-F., Subramanian,A., Sihag,S., Lehar,J., Puigserver,P., Carlsson,E., Ridderstråle,M., Laurila,E., *et al.* (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.*, **34**, 267–273.

67. Subramanian,A., Tamayo,P., Mootha,V.K., Mukherjee,S., Ebert,B.L., Gillette,M.A., Paulovich,A., Pomeroy,S.L., Golub,T.R., Lander,E.S., *et al.* (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 15545–15550.

68. Li,J. and Stern,D.F. (2005) Regulation of CHK2 by DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **280**, 12041–12050.

69. Shultz,L.D., Lyons,B.L., Burzenski,L.M., Gott,B., Chen,X., Chaleff,S., Kotb,M., Gillies,S.D., King,M., Mangada,J., *et al.* (2005) Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*, **174**, 6477–6489.

70. Vizcaíno,J.A., Csordas,A., del-Toro,N., Dianes,J.A., Griss,J., Lavidas,I., Mayer,G., Perez-Riverol,Y., Reisinger,F., Ternent,T., *et al.* (2016) 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.*, **44**, D447-456.

3. Récapitulatif des résultats principaux et résultats supplémentaires

- **Le 20A induit à la fois la sénescence et l'apoptose indépendamment de p53**

De nombreux cancers présentent des mutations pour p53 qui peuvent influencer la réponse thérapeutique aux agents anti-cancéreux. Il est donc intéressant de pouvoir trouver des molécules anti-cancéreuses dont les effets sont indépendants de l'expression de p53. Les résultats présentés en **Figure 1C** (page 124) suggèrent que l'inhibition de la viabilité cellulaire induite par le 20A est indépendante de la présence de p53. En effet, les cellules Saos, exprimant ou non p53 (grâce à l'induction de cette protéine par la doxycycline), présentent des IC₅₀ quasiment identiques (3.2 et 3.3 μM respectivement).

Nous avons mis en évidence dans ces travaux que la diminution de la sensibilité de plusieurs lignées de cellules cancéreuses à la suite d'un traitement au 20A est liée d'une part à une induction de la sénescence, attestée par une augmentation de l'activité de la SA-β-gal et l'augmentation de l'expression de p21 et p27 (**Figure 1D** et **Figure S1**, pages 124 et 282 respectivement). Cette diminution de la viabilité cellulaire est d'autre part liée à une augmentation de l'apoptose, comme le suggère l'augmentation de la proportion de cellules qui présentent une chute de potentiel transmembranaire mitochondrial, du clivage de PARP1 et du clivage de la caspase 3 (**Figure 1E** et **Figure S1**).

- **Le 20A inhibe la croissance tumorale *in vivo***

Afin de savoir si le 20A peut présenter un potentiel thérapeutique anticancéreux, nous avons réalisé des expériences de xénogreffes sous-cutanées des cellules cancéreuses HeLa, traitées par des injections péri-tumorales de 20A. Le traitement au 20A conduit à une inhibition très prononcée de la croissance tumorale aux deux doses testées (10 et 20 mg/kg de 20A) (**Figure 2A** et **2B** page 127).

Cette diminution de la croissance tumorale est associée à une nette diminution du marqueur de prolifération Ki-67 (**Figure 2C**). A la demande des referees, nous avons aussi réalisé une analyse supplémentaire afin d'évaluer l'implication de la sénescence et de la mort cellulaire dans ce modèle *in vivo*. Nous avons alors réalisé un marquage de la lipofuscine au SBB (pour *Sudan-Black-B*, indicateur de la sénescence adapté pour l'analyse

sur tissus fixé), ainsi que de la caspase 3 clivée. Nous remarquons une augmentation de l'intensité de ces marquages dans les coupes de tumeurs traitées au 20A (**Figure 21**). Ces deux marquages sont exclusifs, les zones tumorales d'apoptose (ou plus généralement de mort) ne sont donc pas positives pour le marqueur de la sénescence.

L'ensemble de ces résultats suggère que le 20A induit également *in vivo* une régression tumorale grâce à l'établissement de la sénescence et l'induction de l'apoptose.

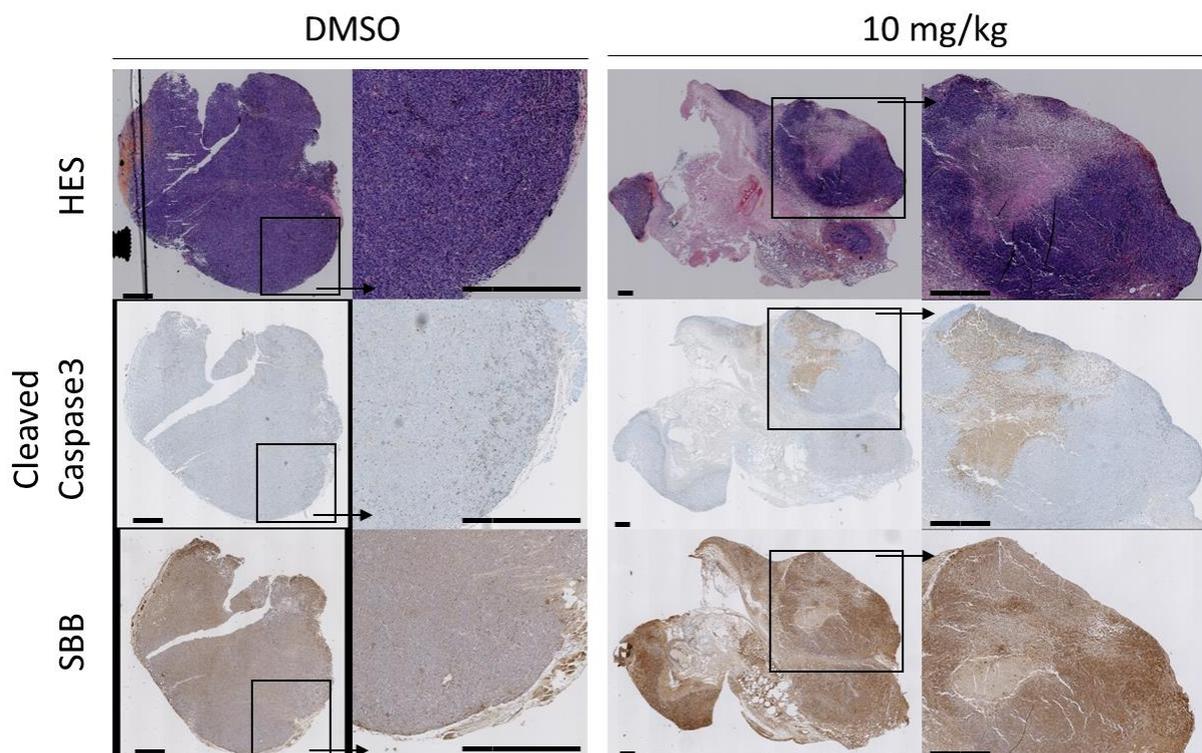


Figure 21: Immunohistochemistry for assessment of senescence and apoptosis *in vivo*.

Representative images of hematoxylin-eosin-saffron (HES) stained DMSO-treated and 10 mg/kg 20A-treated tumor sections performed at the end of the treatment period (scale bar 1mm). Immunohistochemistry analyses on paraffin-embedded tissue section of Cleaved caspases 3 (apoptosis marker) and Sudan-Black-B (SBB, senescence marker) expression were also performed on the tumor tissues.

- **Analyse des effets caractéristiques d'un ligand G4 *in cellulo***

Nous avons analysé des données de transcriptomique et de protéomique, obtenues à partir de cellules HeLa traitées ou non au 20A, afin de savoir si le 20A présente des caractéristiques de LG4 dans un contexte cellulaire (*in cellulo* par opposition à *in vitro*).

Nous avons donc analysé les gènes différentiellement exprimés entre les conditions traitées et non traitées au 20A, et avons estimé l'enrichissement des gènes qui présentent au moins une séquence PG4 (séquence qui forme potentiellement un G-quadruplexe selon les prédictions de séquence) dans des régions régulatrices. Nous nous sommes restreints pour cette analyse à l'étude des séquences PG4 à proximité des sites d'initiation et de terminaison de la transcription. L'analyse de ces résultats a révélé un enrichissement des gènes présentant un PG4 en amont du site de terminaison de la transcription, et ce uniquement dans la fraction de gènes sous exprimés (**Figure S5** page 290). Ces résultats sont en accord avec le rôle connu des LG4 à inhiber l'expression de gènes, soit par la régulation de l'activité du promoteur ou par régulation d'évènements post-transcriptionnels.

De plus, nous avons réalisé une analyse d'enrichissement des gènes qui fonctionnent dans diverses voies de signalisation suite à un traitement au 20A. Cette analyse a révélé l'enrichissement de nombreuses voies de signalisation, dont la voie de réponse des dommages à l'ADN (DDR) (à partir de la base de donnée « HALLMARKS » : « p53_PATHWAY » ou « G2M_CHECKPOINT », **Table 1** page 131 ; ou à partir de la base de données « KEGG » : « MISMATCH_REPAIR » ou « CELL_CYCLE », **Table S1** page 285). Or, l'activation de la voie des DDR est une caractéristique souvent retrouvée en réponse à des traitements par des LG4.

Ainsi, il semblerait qu'en plus de ses propriétés de stabilisation des structures G4 *in vitro*, le 20A présente également cette propriété dans un contexte cellulaire.

- **Activation de la voie des DDR et de l'autophagie**

L'analyse d'enrichissement des gènes qui a été réalisée a permis d'identifier de nombreuses voies de signalisation qui sont modulées par un traitement au 20A, dont la liste exhaustive peut être consultée en **Table 1** et **Table S1** (pages 131 et 285). Parmi ces voies de signalisation, deux d'entre elles nous semblaient intéressantes à étudier : la voie des DDR et celle de l'autophagie qui sont globalement régulées positivement en réponse au 20A (**Figure 3**, page 132). En effet, bien que l'activation de l'autophagie en réponse à des traitements anti-cancéreux inducteurs de dommages à l'ADN soit largement documentée, très peu d'études ont mis en relation cette voie de signalisation avec les effets des LG4 (Orlotti et al., 2012; Zhou et al., 2009). Or l'autophagie est très impliquée dans la régulation des

mécanismes de sénescence et de mort cellulaire, en particulier en réponse à des dommages à l'ADN.

C'est pour cela que nous avons choisis d'étudier ces deux voies de signalisation, en particulier pour tenter de mettre en évidence un lien entre ces processus.

Dans un premier temps, nous avons d'abord vérifié que ces voies de signalisation sont effectivement activées en réponse au 20A. En effet, nous observons une augmentation de la phosphorylation d'ATM (Ser 1981), de CHK1 (Ser 345) et de l'histone H2AX (Ser 139, aussi appelée γ H2AX) (**Figure 4A**, page 135) ainsi que celle de CHK2 (Thr 68) (**Figure 22A**, réalisée à la demande des referees) qui sont des marqueurs de l'activation de la voie des DDR.

A la demande des referees, nous avons également vérifié l'implication des dommages à l'ADN au niveau des télomères (ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire du Dr. Arturo Londono-Vallejo, Institut Curie, France). Nous avons alors réalisé un co-marquage des télomères (indiqué par la sonde télomérique « Telomeric DNA ») avec le marqueur de dommages à l'ADN (γ H2AX), et évalué la répartition du marqueur de dommages à l'ADN sur des chromosomes métaphasiques. Sur l'ensemble des métaphases observées dans trois lignées de cellules cancéreuses (HeLa, A549 et Saos2), un traitement au 20A semble induire une augmentation de la proportion de cellules présentant des dommages à l'ADN de façon globale (Global DDR), avec le marqueur γ H2AX observé tout le long des chromosomes, comme présenté en **Figure 22B et C**. En revanche, il n'y a pas d'augmentation de la proportion de cellules métaphasiques qui présentent une co-localisation de γ H2AX avec les télomères (indiqués par TIF sur la **Figure 22B et C**). Ces résultats suggèrent donc qu'il y a plutôt une activation globale de la voie de réponse des dommages à l'ADN et n'est pas spécifiquement induite au niveau des télomères.

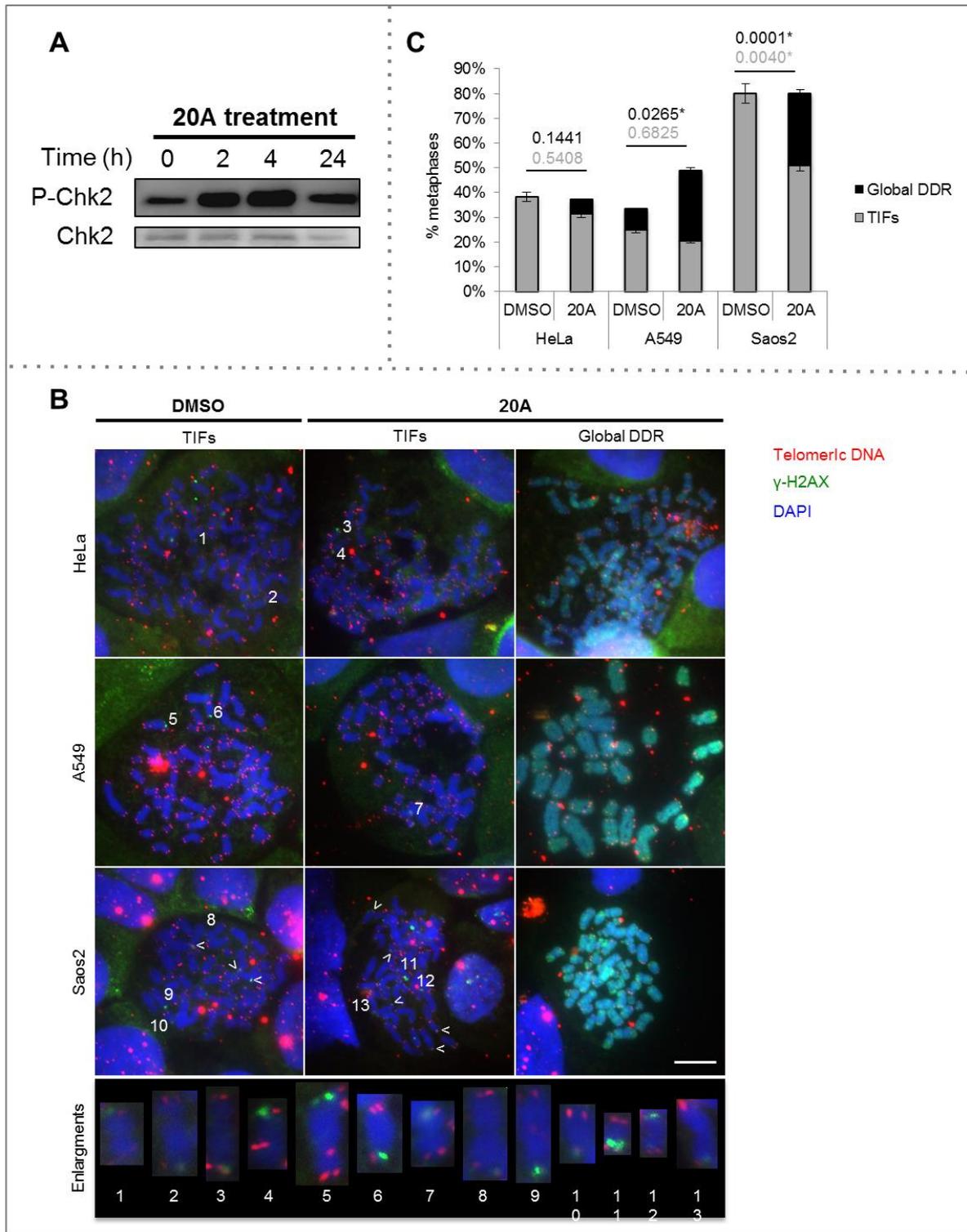


Figure 22 : Analysis of Chk2 activation and Meta-TIF formation

A) Western Blot analysis of Chk2 phosphorylation at Thr68. **B)** Representative metaphases for HeLa, A549 and Saos2 cells displaying TIFs (telomere-induced foci) or global DDR (DNA damage response) under two experimental conditions, 24-hour treatment with 20A or DMSO. Telomeric DNA (red), γ H2AX (green) and DAPI (blue). Enlargements of chromosomes with TIFs are shown. Scale bar, 10 μ M. **C)** Quantification of metaphases with at least one TIF (TIFs) or global DDR. $n = 35$ to 45 metaphases per condition. P-values, statistics of proportions for Global DDR (black print) and TIFs (gray print), $\alpha = 5\%$.

Nous avons ensuite étudié la voie de l'autophagie (**Figure 5**, page 139). Nous observons une augmentation croissante au cours du temps de la forme LC3-II (qui est la forme complexée aux autophagosomes), en réponse au 20A. Cette augmentation de LC3-II est encore plus importante lorsqu'on empêche la dégradation lysosomale par les inhibiteurs de protéases E64d et Pepstatine A, suggérant que le flux autophagique est actif (**Figure 5C**, panneau du milieu et du bas).

De plus, un traitement au 20A conduit également à une activation précoce de la voie activatrice en amont de l'autophagie attestée par une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK (Thr172) (**Figure 5A**). Cette activation de l'AMPK est corrélée avec une inhibition du répresseur de l'autophagie mTORC1, attesté par une diminution des phosphorylations de 4EBP1 (Thr37/46), et p70 (Thr389) qui sont des substrats de mTORC1.

En particulier, nous avons montré que l'activation de l'autophagie est dépendante d'ATM. En effet, en absence d'ATM et en présence de 20A, le flux autophagique est réduit considérablement (**Figure 5E**).

L'ensemble de ces résultats suggère donc fortement une activation importante du flux autophagique en réponse à un traitement au 20A, qui est activé par ATM.

- **Implication de la voie des DDR et de l'autophagie dans les réponses cellulaires au 20A**

Après avoir montré que la voie des DDR et de l'autophagie sont effectivement activées en réponse au 20A, nous avons voulu savoir quels étaient leurs rôles vis-à-vis de la sénescence et de la mort cellulaire. Nous avons donc inhibé la kinase ATM (kinase la plus en amont de la voie de signalisation des DDR) par interférence à ARN ou par inhibition pharmacologique, et inhibé l'expression de gènes clés pour le déroulement de l'autophagie (ATG5 et ATG7) par la technologie de CRISPR-Cas9.

Nous montrons ainsi qu'une inhibition d'ATM et de l'autophagie conduit à des phénotypes similaires, à savoir une réduction de la proportion de cellules sénescents (**Figure 4B** et **6B**, pages 135 et 142 respectivement) et une potentialisation de la mort apoptotique (**Figure 4C** et **6C**). Il semblerait donc que l'activation d'ATM et de l'autophagie en réponse au 20A soient impliquées dans l'établissement de la sénescence et la protection vis-à-vis de la mort cellulaire.

De plus, l'autophagie semble jouer un rôle dans la stabilisation de la protéine CHK1 activée. En effet, dans les cellules déficientes pour l'autophagie, la phosphorylation de CHK1 est diminuée par rapport aux cellules contrôles et corrèle avec une augmentation de la phosphorylation de l'histone H2AX, suggérant donc que cette déstabilisation de P-CHK1 perturbe les mécanismes de réparation (**Figure 6D**, page 142).

4. Conclusion

Dans cette étude, nous avons montré que le 20A possède des activités caractéristiques d'un ligand G-quadruplexe dans un contexte cellulaire en modulant l'expression de gènes possédant une séquence PG4 dans leurs séquences régulatrices et en induisant une activation des voies de réponses des dommages à l'ADN. Bien que de nombreux LG4 aient été décrits pour induire des dommages à l'ADN spécifiquement au niveau des séquences télomériques, il ne semble pas que ce soit un des mécanismes d'action du 20A. En effet, en réponse au 20A il y aurait plutôt une augmentation globale du niveau de dommages à l'ADN.

Nous avons également montré que le 20A est capable d'induire à la fois la sénescence et l'apoptose, dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses et dans un modèle *in vivo*, diminuant la viabilité des cellules cancéreuses et la croissance tumorale respectivement. De plus, cette diminution de viabilité est indépendante de l'expression de p53 suggérant ainsi que le LG4 20A possède des propriétés intéressantes pour la thérapie anti-cancéreuse.

Enfin, cette étude a mis en évidence que la kinase ATM de la voie des réponses aux dommages à l'ADN joue un rôle important dans le choix du destin cellulaire entre la sénescence et la mort cellulaire en réponse au 20A (résumé en **Figure 23**). Son activité passe en partie par une activation de l'autophagie qui favorise l'établissement de la sénescence, et protège de la mort cellulaire. L'autophagie agit en plus dans une boucle de rétrocontrôle positif en stabilisant la forme active de CHK1 afin de favoriser la réparation des dommages à l'ADN causés par le 20A.

Ces données suggèrent donc que des modèles de cancers déficients pour ATM ou pour l'autophagie seraient plus sensibles au 20A.

Cependant, l'inhibition d'ATM semble avoir une influence plus importante sur la sénescence et la mort cellulaire que l'inhibition de l'autophagie. ATM serait alors responsable de l'activation d'autres mécanismes aussi impliqués dans le choix de la sénescence ou de l'apoptose en réponse au 20A et dont l'étude serait très intéressante.

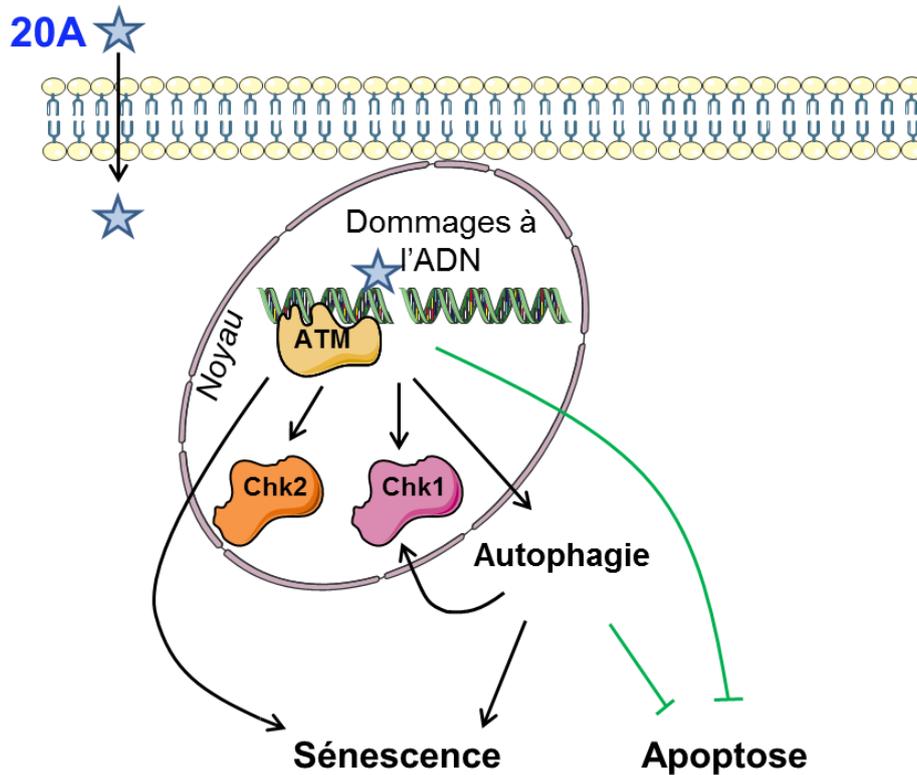


Figure 23 : Implication d'ATM et de l'autophagie dans la balance entre la sénescence et l'apoptose en réponse au 20A

II) Implication de la localisation lysosomale du 20A dans la réponse anti-cancéreuse

Article 2: The combination of triarylpyridine compounds and chloroquine induces LMP and triggers cell death in cancer cells

1. Contexte

Au cours des études réalisées pour cette thèse, nous avons observé de façon hasardeuse que les cellules traitées au 20A présentaient une fluorescence bleue dans leur cytoplasme. De plus cette fluorescence était très regroupée autour du noyau et semblait se localiser dans des vésicules cellulaires denses.

Il a effectivement été décrit que certains LG4 présentent une localisation cytoplasmique. Dans la majorité des études, les hypothèses évoquées sont un ciblage des ARN cytoplasmiques (ARNm ou ARNt) ou encore de l'ADN mitochondrial (Drygin et al., 2009, Faudale et al., 2012, Hampel et al., 2013, Hong et al., 2010). Nous n'avons trouvé que peu d'études qui ont effectivement analysé cette localisation cytoplasmique. Deux études ont alors montré que les LG4 peuvent se localiser au niveau des mitochondries et favorise la mort cellulaire, ou au niveau des lysosomes empêchant ce composé d'atteindre le noyau (Huang et al., 2015; Kang et al., 2013).

Ainsi, nous avons évalué ces deux localisations et avons pu constater que le 20A se localise au niveau des lysosomes. Nous avons donc émis l'hypothèse que le 20A serait séquestré dans le lysosome et que ce mécanisme pourrait constituer un mécanisme de résistance vis-à-vis de la réponse cellulaire au 20A.

Nous avons alors analysé l'implication de cette séquestration lysosomale grâce à l'utilisation d'un agent lysomotropique (la chloroquine), qui a été décrite dans de nombreux contextes pour inhiber la séquestration lysosomale d'agents anti-cancéreux. De plus la chloroquine est déjà utilisée dans de nombreux essais cliniques, en association avec des chimiothérapies, pour sa capacité à inhiber l'autophagie protectrice développée par les cellules cancéreuses.

Dans cette étude, nous avons donc étudié l'intérêt d'utiliser la chloroquine en combinaison avec le 20A et d'autres LG4 dérivés du 20A qui se localisent aussi au niveau cytoplasmique dans des lignées de cellules cancéreuses. Nous avons cherché à déterminer les mécanismes moléculaires responsables des effets observés en combinaison avec la chloroquine.

Enfin, nous avons évalué la sensibilité de modèles cellulaires plus pertinents du point de vue thérapeutique pour cette combinaison grâce à l'utilisation de lignées de cellules issues de xénogreffes dérivés de tumeurs de patients (lignées de cellules PDX, pour *patient-derived tumor xenograft*).

Toutes les **données supplémentaires** relatives à cet article n°2 sont présentées en **Annexes n°2** (pages 293 à 297)

2. Article n°2

The combination of the triarylpyridine compounds and chloroquine induces lysosomal membrane permeabilization and triggers cell death in cancer cells

Jennifer Beauvarlet¹, Elodie Richard ¹, Rabindra Nath Das², Elodie Darbo¹, Pierre Soubeyran¹, Jean Guillon², Jean-Louis Mergny², and Mojgan Djavaheri-Mergny^{1#}

¹ Université de Bordeaux INSERM U1218, Institut Bergonié, Bordeaux France.

² ARNA Laboratory, Université de Bordeaux, INSERM U1212, CNRS UMR 5320, Bordeaux, France.

Author to whom correspondence should be addressed: mojgan.mergny@inserm.fr

Abstract

Lysosomal drug sequestration is widely considered to be an important mechanism of resistance to some chemotherapies in cancer cells. However, little is known regarding the possible lysosomal drug sequestration of G-quadruplex ligands (G4L) in cancer cells. Here, we investigated the relationship between the modulation of the lysosomal membrane damage and the degree to which cancer cells respond to the cytotoxic effects of 20A, a G4L belonging to the triarylpyridine family. Our results revealed that 20A accumulates in cells at the lysosomal compartment and causes an enlargement of the lysosomes. Moreover, the combination of the lysosomotropic agent chloroquine with 20A promotes a significant induction of lysosomal membrane permeabilization (LMP) as compared to a single drug treatment. This response is associated with a robust apoptotic cell death that occurs through caspase-dependent and independent manner. The induction of LMP is also observed with 20A-derivative compounds and, likewise 20A, is associated with increased cell death. Our study uncovers the interest of studying the lysosomal effects of G4L from the triarylpyridine family and delineates the rationale of combining these compounds with chloroquine in order to improve their effectiveness in prevision of further pre-clinical studies as anticancer drugs.

Keywords: lysosomal membrane permeabilization; cell death; cancer; triarylpyridine compounds.

Introduction

Lysosomes are the end points of several vesicular pathways that mediate degradation of intra- and extra-cellular material in cells^{1,2}. As a result, the lysosomes ensure the regulation of numerous biological processes including nutrient sensing, signaling to cell nucleus, cell death pathways and immunosurveillance³. In particular, lysosomes are essential for proper function of autophagy, a cytoprotective process that provides necessary nutrients and energy through promoting the degradation of intracellular material^{4,5}. Hallmarks of lysosomal dysfunction include alterations in lysosomal size, morphology and localization, changes in expression of lysosomal enzymes and in lysosomal membrane properties including lysosomal membrane permeability⁶.

Lysosomes play major roles in cancer, as they undergo multiple alterations during the transformation process which contribute to tumor progression and metastasis⁷. Mounting evidence indicates that lysosomes are involved in resistance to anticancer drugs with weak base properties. These drugs are suggested to sequestration within the lysosome, which results in a loss of accessibility of the drug to its cellular targets and thereby a reduction of its effectiveness. This effect has been suggested ultimately to contribute to resistance to therapy⁸⁻¹². The mechanism of lysosomal sequestration can be passive, through diffusion into the acidic lumen of the lysosome where the drug is protonated and retained within the lysosome¹³. However, some active mechanism has also been described that relies on multidrug efflux transporters¹⁴⁻¹⁶. Accordingly, inhibition of lysosomal sequestration (by increasing lysosomal pH, or inhibiting the active transport) has been shown to increase the sensibility of cancer cells to several cancer drugs^{8,9,11,14,16-18}.

Moreover, it has been reported that the modification of the lysosomal compartment that occur during cellular transformation paradoxically render cancer cells more susceptible to lysosomal membrane permeabilization (LMP)^{19,20}, and associated with lysosomal-dependent cell death (LDCD) induced by anticancer agents^{18,21}.

The lysosomal dependent cell death (LDCD) is characterized as a process that involves LMP and the subsequent release of lysosomal content such as cathepsins into the cytosol¹². Extensive lysosomal leakage can cause necrotic cell death while

partial lysosomal membrane destabilization can result in lysosomal cell death through apoptotic and non-apoptotic dependent mechanisms. LMP is triggered by any stimuli that can affect the lysosomal membrane stability, including lysosomotropic agents, ROS-generating molecules, or agents that affect changes in lipid composition of the lysosomal membrane²².

Moreover, the induction of lysosomal dependent non-apoptotic cell death is of tremendous interest in cancer therapy as cancer cells often display defective apoptotic machinery rendering them resistant to therapy²³.

Hence, the identification of drugs that promote lysosomal cell death is an attractive strategy for treatment of apoptosis- or therapy-resistant cancers. We have previously shown that 20A, a G-quadruplex ligand belonging to the triarylpyridine family, displays a potent anti-proliferative effect in several cancer cells²⁴. We found that one of the gene classes most significantly upregulated by 20A corresponds to the lysosomal pathway. In the present study, we found that 20A was located in the lysosome. From these observations and the literature data, we speculated that the enrichment of the lysosomal pathway by 20A renders cells less vulnerable to the cytotoxic effect of this compound. We thus investigated the involvement of lysosomal sequestration of the triarylpyridine compounds as a potential resistance mechanism of cancer cells towards their cytotoxic effect, using a combination treatment with the well-known antimalarial drug chloroquine.

Results

20A accumulates at the lysosomal compartment and causes enlargement of the lysosomes.

Because 20A causes enrichment of genes involved in the lysosomal pathway (**Figure S1** showing the expression profile of genes involved in the “KEGG_Lysosome_pathway” of 20A-treated cells), we first examined whether this compound affects the lysosomal compartment in HeLa cells with the lysosomal marker LysoTracker Red. As shown in **Figure 1A**, the size of the lysosomes is increased following exposure of HeLa cells to 20A treatment. While performing this experiment, we also observed an

unexpected result indicating the presence of blue fluorescence puncta in the cytosol only when cells are subjected to 20A treatment (**Figure 1A**) suggesting that 20A is responsible for the formation of these puncta. *In vitro* fluorescence experiments confirmed also that 20A is fluorescent in this wavelength range following excitation in the near UV (data not shown).

Co-localization experiments with LysoTracker and Mitotracker (specific markers of lysosome and mitochondria respectively) showed that the blue fluorescence puncta mostly co-localize with the lysosome and not with mitochondria (**Figure 1B**). Altogether, these results indicate that 20A accumulates at the lysosomal compartment and causes the enlargement of the lysosomes.

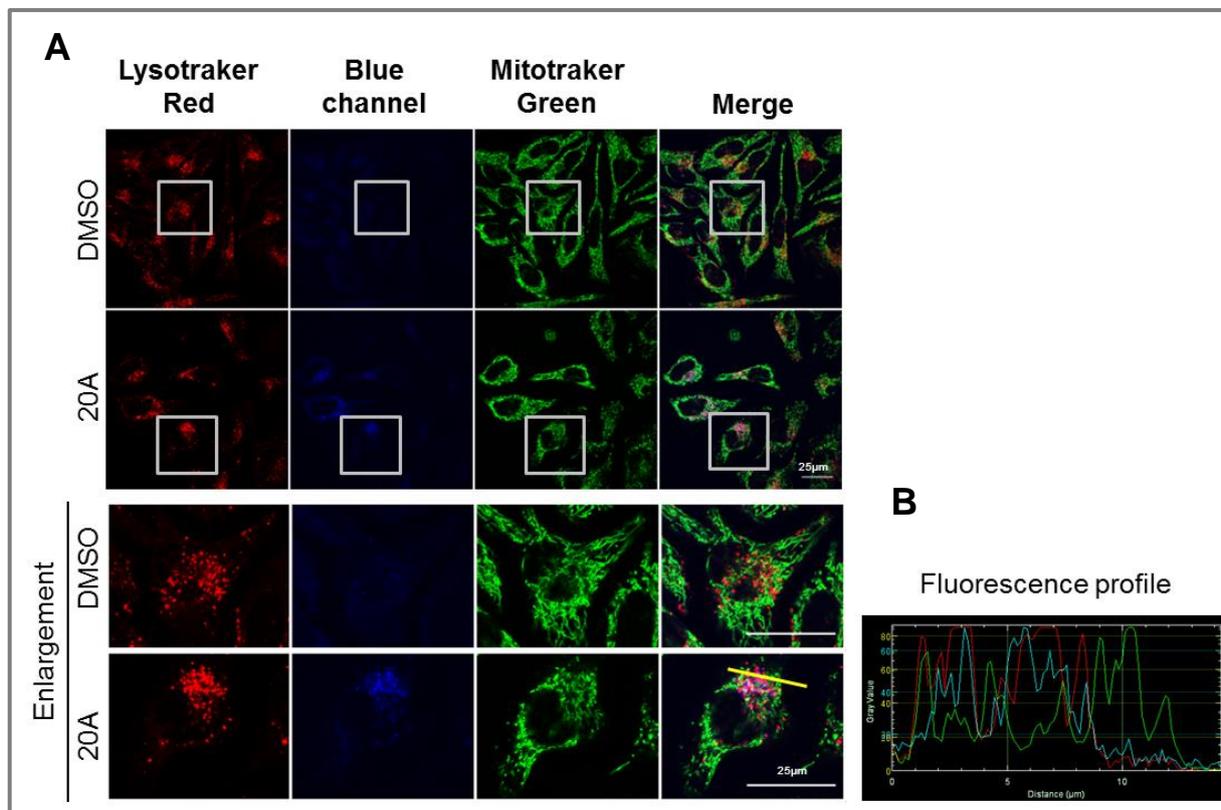


Figure 1: 20A accumulates in the lysosomes and causes lysosomal enlargement

A) HeLa cells were treated with or without 5µM 20A for 6h and then stained with LysoTracker Red (LTR) and Mitotracker Green (MTG) to visualize lysosomes and mitochondria, respectively. Representative confocal images are presented for 20A fluorescence (blue signal), LTR (red signal) and MTG (green signal), scale bar 25µm. Magnified views of boxes are presented for both condition.

B) The fluorescence profile represents the intensity of blue, red and green fluorescence signals respectively along the yellow bar presented on 20A-treated cell image.

20A and Chloroquine act in concert to trigger LMP and cell death.

The presence of 20A within the lysosome resembles to a mechanism referred as lysosomal drug sequestration that has been observed in response to some anticancer drugs²³. Growing evidence revealed that lysosomotropic agents such as chloroquine can prevent lysosomal drug sequestration and thus sensitize cells towards cancer therapies^{11,13,25}. To test this hypothesis, we investigated the effect of combination of 20A and chloroquine on cell death in both HeLa and A549 cancer cell lines. In order to properly evaluate the effect of the combination of the two drugs (20A and chloroquine), we decided to use drug doses that trigger a low level of cell death (<10%) when used alone (5 μ M and 3.5 μ M for HeLa cells and A549 cells respectively, knowing that the IC₅₀ of 20A is 6.3 μ M and 5 μ M for HeLa and A549 cells, respectively). For all experiments, we also used a sublethal dose of Chloroquine (25 μ M)

As shown in **Figure 2A**, the combination of chloroquine (25 μ M) and 20A (5 μ M) promotes a robust activation of cell death process (50% cell death) in HeLa cells as compared to 20A or chloroquine alone (less than 5% cell death). A similar effect is observed when A549 cells are treated with the combination of 20A (3.5 μ M) and chloroquine (25 μ M) indicating that chloroquine greatly potentiates 20A-induced cell death.

We next examined the lysosome size and number in response to the combined 20A/chloroquine treatment. **Figure 2B** revealed that 20A and chloroquine both causes the lysosomal enlargement as evidenced by LAMP1 staining. It is worth noting that this phenotype is markedly increased when the two drugs are combined.

One mechanism through which chloroquine has been shown to prevent lysosomal drug sequestration relies on its ability to elevate the lysosomal lumen pH²⁶. To test this hypothesis, we used the LysoTracker red dye that allows staining of any acidic compartment vesicle with an internal pH of less than about 6.5 (lysosomes, endosomes or autophagosomes), but unable to stain vesicles displaying pH higher than 6.5. Under treatment with chloroquine, we observed the presence of LysoTracker red puncta, as expected for acidic compartments described in the literature (**Figure S2**), thus, ruling out any effect of chloroquine on the intravesicular pH of the

lysosome, at least under our conditions (25 μ M chloroquine). Of note, Bafilomycin A1 (an inhibitor of lysosomal v-ATPase that increases the intravesicular pH of the lysosome) leads to a diffuse staining of the dye indicating that an increase in intralysosomal pH can be efficiently observed with this assay.

We previously showed that 20A promotes the activation of functional autophagy that operates as a linchpin between cell survival and cell death (unpublished data). As chloroquine is a well-known inhibitor of autophagy degradation step, we next explored whether the accumulation of autophagosomes is responsible for the robust induction of cell death observed under the combination of 20A and chloroquine. To this purpose, we compared cell death induced by the combination of 20A and chloroquine in autophagy-proficient cells and autophagy-deficient cells (cell line with complete autophagy disruption by deletion of two key autophagy genes, ATG5 and ATG7). As shown in **Figure 2C**, the autophagy-deficient cells (in which the formation of autophagosomes is completely inhibited, data not shown) manifest a comparable rate of cell death in response to the combination of 20A and chloroquine cells than the autophagy-proficient cells, suggesting that chloroquine sensitizes cells to 20A treatment through an autophagy-independent mechanism.

Another mechanism through which chloroquine can promote cell death relies on the induction of lysosomal membrane permeabilization (LMP) ²⁶. Recently, the detection of Galectin 3 puncta at damaged endo-lysosome membranes was shown to be a highly sensitive method to evaluate LMP ²⁷. To explore this possibility, we used a cell line expressing mCherry-tagged Galectin 3 and counted cells with one or more Galectin 3 puncta as “Gal3 positive cells”. As shown in the **Figure 3A**, the percentage of Gal3 positive cells is nearly equal in cells subjected to a sublethal dose of 20A and untreated cells (respectively 3% and 2%) but increases to 8 % when cells are exposed to Chloroquine. More importantly, the percentage of Gal3 positive cells increased massively (39%) when chloroquine is associated with 20A treatment. It is worth noting that under the latter condition, 26% of Gal3 positive cells harbor one or two Gal3 puncta and the rest (13%) display either 3 or more Gal3 punctae (**Figure 3A bottom panel**) suggesting the presence of several endo-lysosomal membrane damages under this condition.

We next analysed if the Gal3 puncta are situated at the lysosomal membrane by co-staining cells with LAMP1, a specific marker of the lysosome. As shown in the **Figure 3B**, a large overlap in colocalization is observed when cells are simultaneously exposed to both drugs confirming that Gal3 positive cells represent cells harboring leaky lysosomes. This observation combined with the increased size of the lysosome (observed with LAMP1 staining) in cells treated with chloroquine and 20A suggest that the lysosomal swelling process could be a cause of LMP.

Altogether, these results clearly showed that the combination of 20A and chloroquine caused important lysosomal enlargement associated with important damages to the lysosomal membrane.

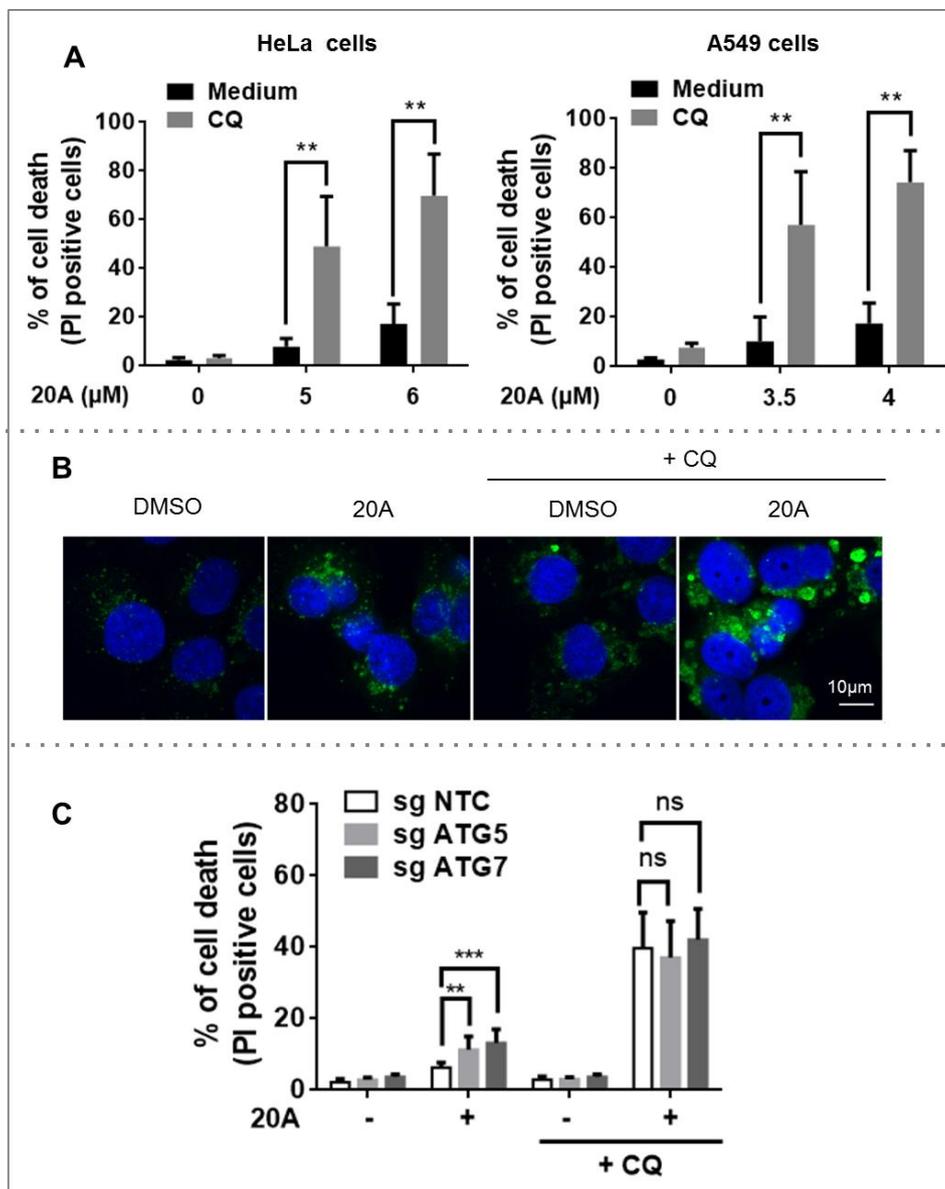


Figure 2: 20A and chloroquine act in concert to trigger enlarged lysosomes associated with a robust cell death (see legend next page).

Figure 2 (legend): 20A and chloroquine act in concert to trigger enlarged lysosomes associated with a robust cell death.

A) HeLa cells (left) and A549 cells (right) were treated with the indicated concentration of 20A with or without 25 μ M of chloroquine for 24h. Cell death was assessed by scoring the percentage of propidium iodide (PI) positive cells after flow cytometer analysis. The data represents the mean \pm SD of 6 values obtained from three independent experiments each performed in duplicate. ** *p-value* < 0.01 using Mann-Whitney test.

B) Galectin3-mcherry expressing U2OS cells were treated or not with 3 μ M 20A either the presence or absence of 25 μ M chloroquine for 24h and then immunostained for LAMP1. Representative z-projection of merge confocal images of nuclei (blue signal) and LAMP1 (green signal), scale bar 10 μ m.

C) Autophagy-proficient (NTC) and -deficient (ATG5 and ATG7 KO) HeLa cells were treated with 5 μ M 20A either in the presence or absence 25 μ M of chloroquine for 24h. Cell death was assessed by scoring the percentage of PI positive cells after flow cytometer analysis. The data represents the mean \pm SD of 9 values obtained from three independent experiments each performed in triplicate. *p-value* ** < 0.01 and *** < 0.001, ns = non significant using Mann-Whitney test.

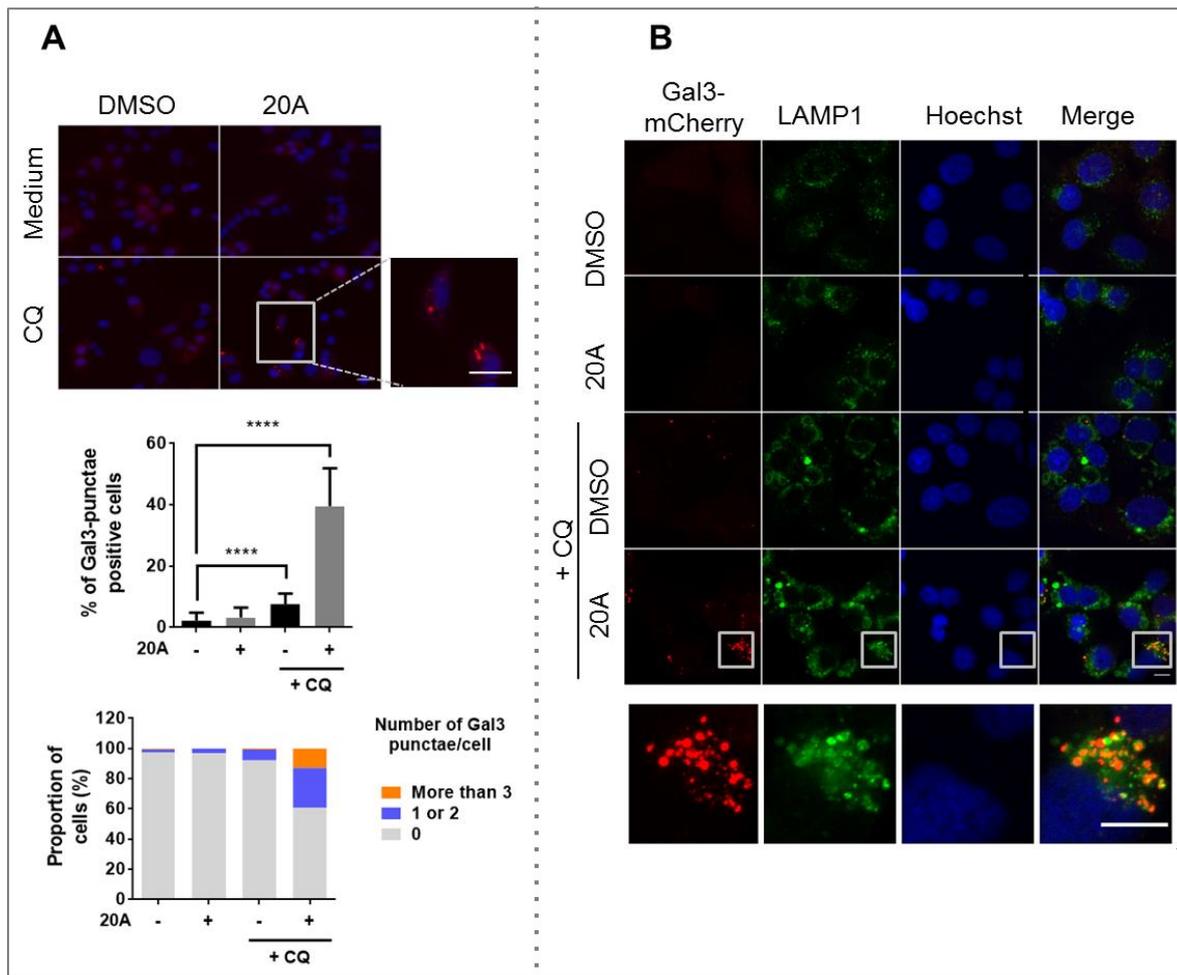


Figure 3: 20A and chloroquine act in concert to trigger LMP in cancer cells

A) Top, Galectin3-mcherry expressing U2OS cells were treated or not with 3 μ M 20A in either the presence or absence 25 μ M chloroquine for 24h. Representative epifluorescence of merge images are presented with Galectin 3 (red signal) and Hoechst (blue signal), scale bar 25 μ m. Middle, Percentage of cells displaying at least one Galectin 3 punctae are scored. Data are presented as mean \pm SD of 15 values obtained from 5 randomly chosen fields in each of the three independent experiments. Bottom, The number of Galectin 3 punctae per cell was scored and results are expressed as percentage of cells with indicated Gal-3 puncta. Data are presented as the mean percentage of at least 1000 cells analyzed from 5 randomly chosen fields in each of the three independent experiments. **** *p*-value < 0.0001 using Mann-Whitney test

B) Galectin3-mcherry expressing U2OS cells were treated or not with 3 μ M 20A either the presence or absence of 25 μ M chloroquine for 24h and then immunostained for LAMP1. Representative z-projection of confocal images of Galectin 3 (red signal), nuclei (blue signal) and LAMP1 (green signal), scale bar 10 μ m. LMP is assessed by colocalization of LAMP1 with Galectin 3 punctae, as observed on the magnified view from box area presented for 20A-treated cells.

Apoptosis is involved in cell death induced by chloroquine/20A

We next investigated if apoptosis is implicated in the massive cell death induced by chloroquine/20A treatment. To this purpose, we analysed apoptosis by examining the appearance of the cleaved form of caspase 3 and PARP1, loss of mitochondria transmembrane potential (early apoptosis) and the increase in the plasma membrane permeability (late apoptosis). As presented in **Figure 4A**, the combination of chloroquine and 20A treatment promotes a robust cleavage of PARP-1 and caspase 3 in both HeLa and A549 cells while no significant cleavage is observed when cells are treated solely with sublethal dose of each compound.

To further evaluate the role of caspase in the occurrence of cell death, we used a pan-inhibitor of caspase (QVD-OPH) and evaluated two features of cell death, namely increase in the plasma membrane permeability and loss of mitochondrial transmembrane potential. As shown in **Figures 4B** and **Figure S3**, these features of cell death are significantly reduced when cells were treated with QVD-OPH prior the addition of chloroquine/20A, suggesting that caspases play a key role in the execution of cell death.

Using pharmacological approach, we also investigated the possible implication of ferroptosis as well as necroptosis in cell death induced by chloroquine/20A treatment. As shown in **Figure S4A**, Ferrostatin 1, an inhibitor of ferroptosis, markedly inhibits cell death induced by Erastin (a known inducer of ferroptosis) but has no significant effect on cell demise triggered by the combination of 20A and chloroquine. Similarly, inhibition of necroptosis by Necrostatin 1 did not impact cell death induced by the combination of 20A and chloroquine (**Figure S4B**). Together, these data reveal that both ferroptosis and necroptosis are probably not involved in the cytotoxicity effect triggered by the 20A/chloroquine combination.

To gain further insight into the mechanism linking LMP and cell death, we evaluated the involvement of two cathepsins families in 20A/chloroquine-induced cell death by using E64d, an inhibitor of the cystein cathepsin family and Pepstatin A, an inhibitor of the aspartic cathepsin family. While E64d and Pepstatin A efficiently compromise cell death induced by LLOMe, a well-known inducer of cathepsin-dependent cell death, they fail to inhibit cell death induced by 20A/chloroquine treatment (**Figure S4C**). These results suggest that the cysteine and aspartic cathepsins are probably

not required for the execution of cell death induced by 20A and chloroquine combination.

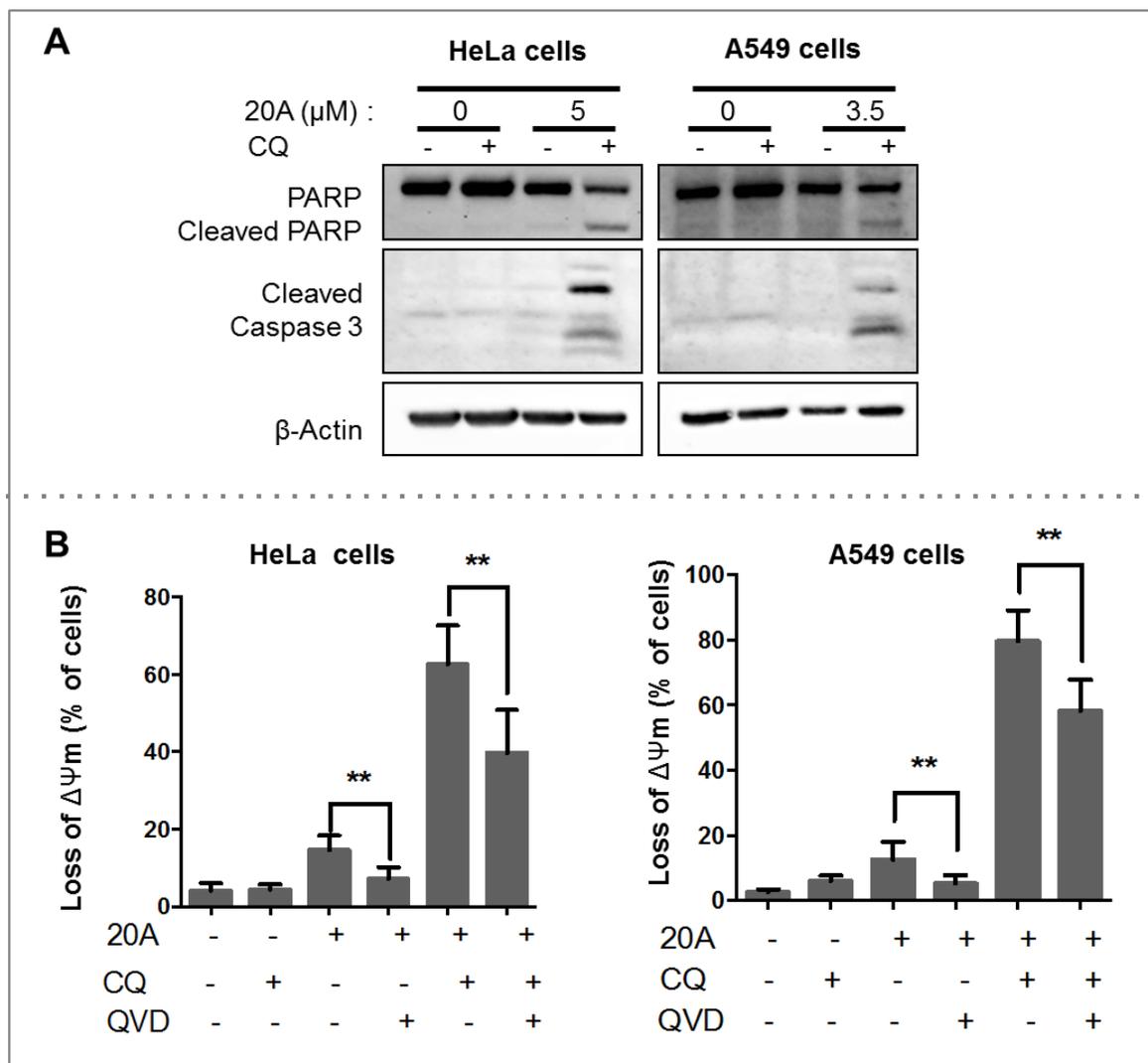


Figure 4: Apoptosis is involved in cell death induced by the combination of chloroquine and 20A

A) HeLa cells (left panel) and A549 (right panel) cells were treated with 5 μM and 3.5 μM 20A respectively in either the presence or absence of 25 μM chloroquine for 24h. Apoptotic cell death was assessed by immunoblot analysis of cleaved forms of either Caspase 3 or PARP1. Actin β was detected as a loading control.

B) HeLa cells (left panel) and A549 (right panel) cells were treated with or without 20 μM QVD-OPH two hours prior to the addition of 20A (5 μM and 3.5 μM for HeLa cells and A549 cells, respectively). Where indicated, cells are also exposed to 25 μM chloroquine (CQ) for 24h. Apoptotic cell death was assessed by measurement of loss of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi_m$). The data represents the mean \pm SD of 6 values obtained from three independent experiments each performed in duplicate. ** *p-value* < 0.01 using Mann-Whitney test.

Chloroquine significantly activates LMP triggered by 20A–derived compounds.

To find out whether the cooperation between chloroquine and 20A in induction of cell death can be extended to other triallylpyridine compounds, we tested three new compounds: RD046 and RD050, RD052 (formula shown in Materials and methods **Figure S5**) and determine their IC₅₀ in HeLa cells (**Figure S6**) before performing the drug combination assay. As shown in **Figure S6**, these compounds significantly inhibited HeLa cell viability (with IC₅₀ values even lower than the one found for 20A). Next, we choose, likewise 20A, sublethal doses (mortality < 10%) for each compound to analyse LMP and cell death in either the presence or absence of chloroquine treatment.

We first analysed LMP by counting Galectin 3 positive cells. As shown in **Figure 5A** and **Figure 5B**, unlike 20A, all three compounds (RD050, RD052 and RD046) have a potent ability to induce LMP alone (compared to untreated cells) as evidenced by the percentage of Gal3 positive cells which corresponds to 26%, 31% and 25% respectively. More importantly, the percentage of Gal3 punctae positive cells markedly raised when chloroquine is added to each drug RD050, RD052 and RD046 (57%, 56% and 45% respectively). This response is accompanied by an increase in the percentage of cells harboring more than three Gal3 punctae (**Figure 5B**, right panel) suggesting that a non-negligible portion of cells manifests intensive lysosomal membrane damage. Thus, likewise 20A, the combination of chloroquine and 20A-derived compounds triggered a massive increase in LMP induction.

Combined treatment with chloroquine and 20A–derived compounds significantly activates cell death in lung adenocarcinoma cells

The induction of LMP by 20A-derived compounds prompted us to investigate if combined treatment with chloroquine and 20A-derived compound can exacerbate cell death modalities as seen for 20A. We thus compared the induction of cell death in response to 20A and 20A-derived compounds in either the presence or absence of chloroquine in A549 lung adenocarcinoma cell line. As shown in **Figure 6A**, cell death is markedly enhanced when chloroquine is combined with RD050. Similar results are also observed with RD052 and RD046, supporting the idea that the

trialpyridine compounds have the ability to cooperate with chloroquine to trigger a robust cell death.

To validate our results in a clinically relevant setting, we also examined the effect of chloroquine and 20A (or its derivatives) in patient-derived xenograft cell lines from lung adenocarcinomas (PDX2 and PDX3). As shown in **Figure 6B**, both PDX cell lines are highly sensitive to the combination treatment, suggesting the relevance of this combination for further studies in *in vivo* lung cancer models.

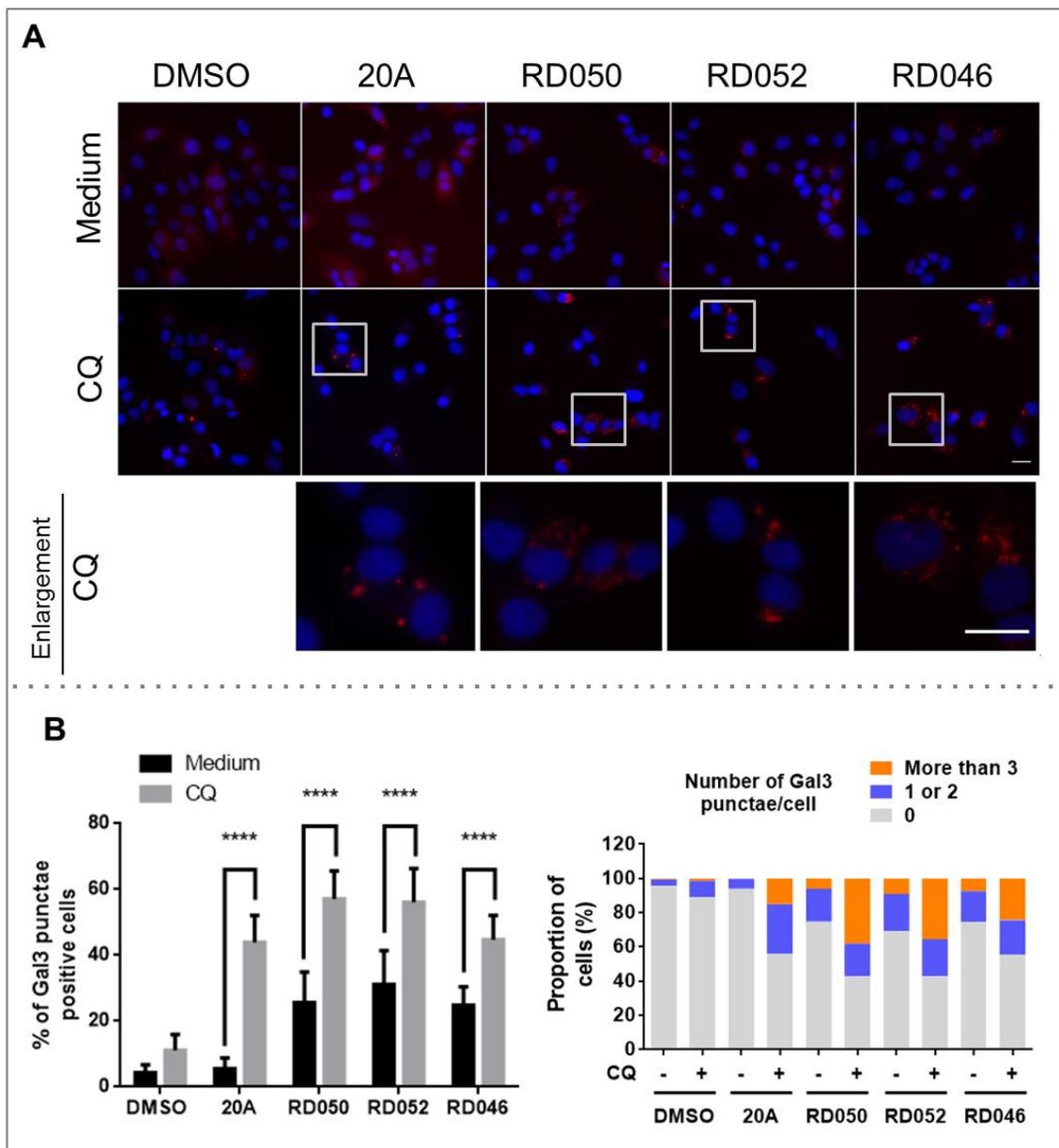


Figure 5: Chloroquine potentiates LMP triggered by 20A-derived compounds.

A) Galectin3-mcherry expressing U2OS cells were treated with or without 3 μ M 20A, 1.5 μ M RD043, 2 μ M RD050, 1 μ M RD051, 1 μ M RD052 or 1 μ M RD046 in either the presence or

absence of 25 μ M chloroquine for 24h. Representative epifluorescence merge images are presented with Galectin 3 (red signal) and Hoechst (blue signal), scale bar 25 μ m. Magnified views of boxes are presented for each designated condition.

B) Left Panel, quantification of the percentage of cells displaying at least one Galectin3 puncta. Data are presented as mean \pm SD of 15 values obtained from 5 randomly chosen areas in each of the three independent experiments. *Right panel*, quantification of cell displaying the indicated number of Galectin 3 punctae. Data are presented as the mean percentage of at least 1000 cells analyzed from 5 randomly chosen field in each of the three independent experiments. **** *p-value* < 0.0001 using Mann-Whitney test.

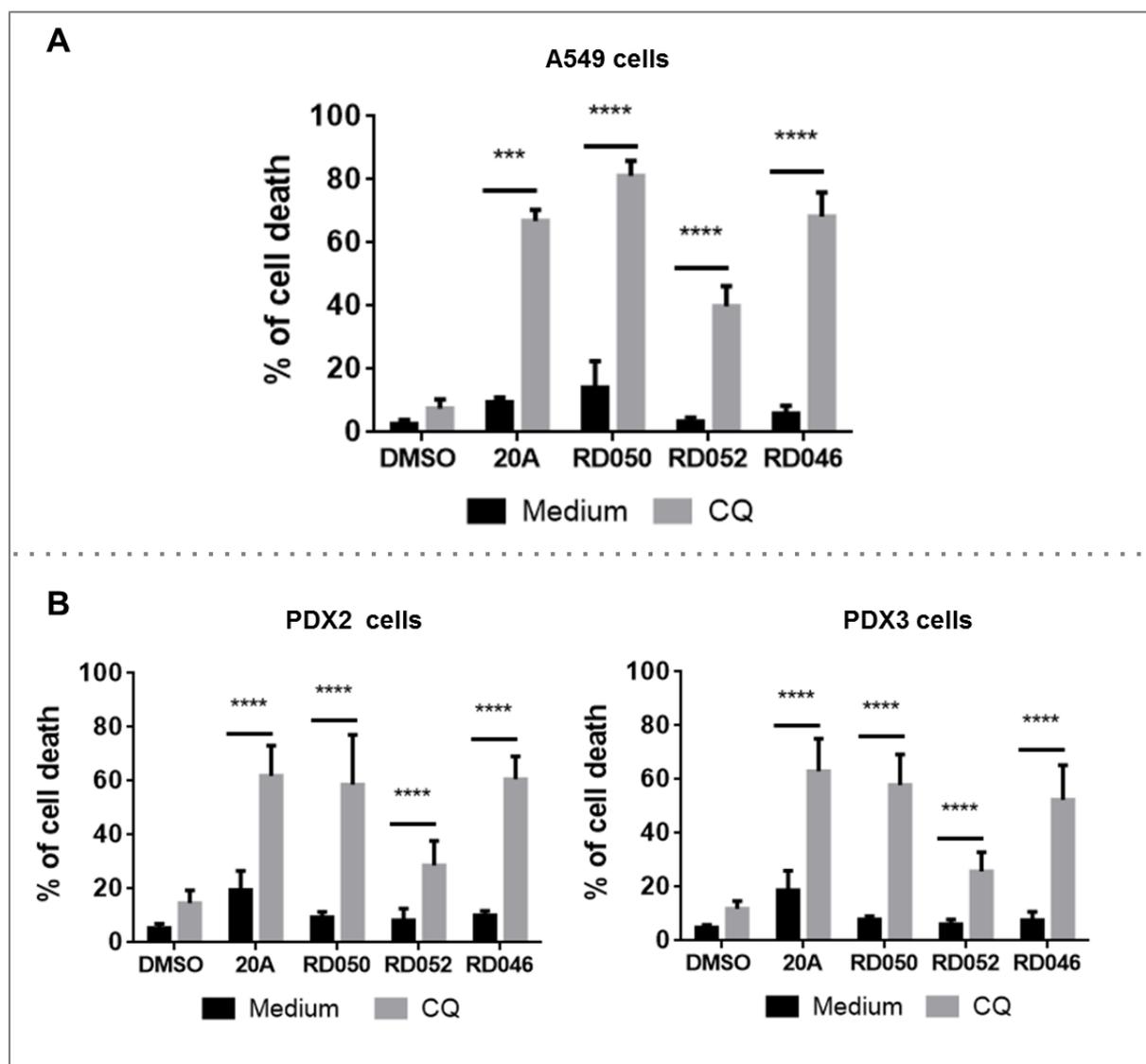


Figure 6: Combined treatment with chloroquine and 20A-derived compounds significantly activates cell death in both A549 lung cancer cells and patient – derived xenograft cell lines from lung cancer

A and B. A549 lung cancer cell lines (**A**) and two PDX from lung cancer PDX2 (left) and PDX3 (right) (**B**) were treated with either 3.5 μ M 20A, 2.5 μ M RD050, 1.5 μ M RD052 or 2 μ M of RD046 in either the presence or absence of 25 μ M chloroquine for 24h. Cell death was assessed by scoring the percentage of PI positive cells by flow cytometer analysis. The data represents the mean \pm SD of 9 values obtained from three independent experiments each performed in triplicate. *p*-value *** < 0.001 and **** < 0.0001 using Mann-Whitney test.

Discussion

Lysosomal sequestration of cancer therapy agents is recognized as a mechanism of resistance to chemotherapy by preventing access of these agents to their molecular targets. We have shown here that 20A-treated cells emit blue fluorescence at the level of lysosomes, suggesting that this compound accumulates, at least in part, at the lysosomes compartment. From screening of a serie of triallylpyridine coumpounds, we first characterized 20A as a potent G-quadruplex stablizing DNA Ligand (G4L). The accumulation of G4L in lysosomes has been described only for two other ligands, BMVC and DAOTA^{28,29}. However, many G4Ls, whose localization could be examined by virtue of their fluorescent property, have shown to display perinuclear cytoplasmic localization. This cytoplasmic localization of G4L was suggested to be attributed to their ability to target the mitochondria DNA or the cytoplasmic RNAs³⁰⁻³³. However, we cannot rule out the possibility of the sequestration of these ligands in lysosomes and its impact in their anti-proliferative efficacy. Although the involvement of lysosomal sequestration in the anti-cancer effect of BMVC has not been investigated, it has been shown that BMVC is particularly localized in the lysosomes of cancer cells resistant to chemotherapy and that the induction of LMP with LLOMe promotes its nuclear relocation²⁸. This study, together with our findings suggest that targeting the lysosomal sequestration of G4L with LMP inducing agents can have interesting therapeutic potential either by increasing the access of G4L to their nuclear target, or by potentiating cell death by LDCD.

The accumulation of 20A in lysosomes prompted us to examine its effects on lysosomal functions and morphology. Labeling cells with the LysoTracker Red probe suggests that the 20A-treated cells do not exhibit a major change in their intralysosomal pH. Moreover, we found that 20A causes lysosome enlargement and the addition of chloroquine to 20A markedly enhanced this lysosomal phenotype as compared to a single drug treatment (20A or chloroquine alone) supporting the idea that lysosome fission/fusion is affected under these conditions. It has been shown that the lysosomal calcium source plays a major role in the fission and fusion processes of the lysosomes. In fact, the lysosomal Ca²⁺ channels P2X4 and

mucolipin 1 (TRPML1) were shown to be involved in lysosomal fusion and fission, respectively^{34,35}. The possible contribution of Na⁺ and other cations to lysosomal enlargement has been also suggested in the literature. Whether or not Ca²⁺ and other cations are involved in the lysosomal phenotype observed in response to 20A and chloroquine/20A remains to be clarified.

Another factor that regulates the lysosomal size and number is the TFEB transcription factor which is responsible for the induction of genes encoding lysosomal proteins through a mechanism that depends on mTOR inhibition^{36,37}. The fact that 20A causes both upregulation of several genes encoding for lysosomal proteins and inhibition of mTOR, argues in favor of the activation of TFEB in response to 20A. It would be thus interesting to determine if and how TFEB regulates lysosome functions and cell death in cells exposed to both 20A and the combination of 20A and chloroquine. Further experiments will be necessary to better understand the characteristic of lysosome enlargement induced by 20A either as a single agent or in combination with chloroquine.

Most importantly, we found that the combination of 20A and chloroquine provokes lysosomal membrane permeability and triggers a massive cell death in both HeLa and A549 cell lines as well as PDX cells from lung cancer. Lysosomal membrane permeability can be initiated by several agents namely i) lysosomotropic agents, such as chloroquine, which destabilize the lysosomal membrane through either hydrophobic or electrostatic interactions with the lysosomal membrane^{25,39}; ii) agents that affect the lipid composition (*i.e.* cholesterol or sphingolipid) of the lysosomal membrane; iii) ROS-generating agents that cause lipid peroxidation of lysosomal membrane.

We found that the addition of antioxidants did not significantly affect LMP triggered by 20A/chloroquine treatment, suggesting the implication of ROS-independent mechanisms in this process. Whether or not the accumulation of enlarged lysosomes and/or changes of lysosomal lipid composition are responsible for the induction of LMP warrant further investigation.

Interestingly, we found that the cooperation between chloroquine and 20A in induction of LMP can be also extended to other 20A derivative compounds suggesting a general mechanism triggered by the trialkylpyridine family of compounds

in promoting the lysosomal membrane destabilization. As the induction of LMP is considered an attractive strategy in cancer therapy, the characterization of the chemical properties of these molecules and their precise mode of action in regulating LMP warrant to be further investigated.

Of particular interest are the results showing that in addition to the robust activation of LMP, the combined treatment with chloroquine and triallylpyridine compounds promotes a massive cell death in several cancer cells including PDX cells from lung cancer (while the single treatment with each compound leads to limited cell death). We found that apoptosis but neither necroptosis nor ferroptosis, nor cathepsins are involved in the execution of cell death as evidence by using specific pharmacological inhibitors of each pathway, although further investigation is required to validate the effects of these inhibitors on cell death pathways. Strikingly, the pan caspase inhibitor only partially recovered the loss of mitochondrial transmembrane potential triggered by 20A/chloroquine suggesting that apoptosis might take place through caspase-dependent and -independent manner.

Moreover, we showed that the induction of LMP is not a consequence of caspase activation (data not shown) as the pan inhibitor of caspase has no effect on this response. However, as mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) is a critical step of lysosome-induced apoptosis²¹, it would be interesting to explore if and how the BCL-2 family (which control MOMP) is implicated in the regulation of the observed cell death process.

Further research are necessary to better understand the regulation and characteristic of cell death induced by triallylpyridine components either as a single agent or in combination with chloroquine.

In conclusion, our study uncovers the interest of studying the lysosomal sequestration of G4L and propose the rational of combining these compounds with agents that induce LMP in order to increase their effectiveness, in view of development of novel strategy in cancer therapy. It would be interesting to carry out a comprehensive study on several LG4 families in order to determine which ones might or might not be susceptible to modulate lysosomal pathways. In fact, the chemical properties of the molecules including the pKa value and the lipophilicity are critical factors that determine the ability of the molecule to be trapped within the

lysosomes and provoke LMP⁴⁰. This information should then be taken into account for the development of new G-quadruplex ligands designed for cancer therapy in order to optimize their antitumour efficacy.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the BIC platform in Bordeaux. The authors acknowledge funding from *Ligue Régionale d'Aquitaine, comité de Dordogne* (to J.L.M and M.D.M.), SIRIC BRIO (to M.D.M), FRTransbiomed (to M.D.M.), *Ligue Régionale d'Aquitaine, 2011* (to M.D.M).

Materials and methods

Cell culture

The human cervical cancer cell line HeLa was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) and the human lung carcinoma A549 cell line is a generous gift of Prof. Jean-François Riou (CNRS UMR 7196, Paris France). The autophagy-deficient (ATG5 and ATG7 depleted) HeLa cell lines were generated as previously described⁴¹. U2OS expressing Galectin3-mCherry cell line is a generous gift from Dr. A. H. Woldrich (CNRS UMR5, Bordeaux France)⁴². The lung adenocarcinoma PDX cell lines (PDX2) and (PDX3) are generous gifts from Dr. D. Santamaria¹ (INSERM U1218, Bordeaux France).

HeLa cells were grown in RPMI 1640 culture media supplemented with 2 mM glutamine (Gibco-Life technologies), 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin, while A549, U2OS and PDX cell lines were grown in DMEM, supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. For U2OS expressing Galectin3-mCherry 200 µg/ml hygromycin B (#10687010, Invitrogen) was added for cell culture, and removed from media before the experiments. All cell lines used in this study were cultivated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Reagents and antibodies

Antibodies against the following proteins were used: Cleaved-Caspase3 (#9664), LAMP-1 (#9091) from Cell Signaling Technology, PARP-1 (C-2-10) (#BML-SA249-0050) from Enzo life sciences, β-Actin (#NB600-501) from Novus Biologicals, HRP conjugated rabbit (#111-035-003) and HRP conjugated mouse (#115-035-174) from Jackson ImmunoResearch, Alexa488 conjugated anti-rabbit (#A11008) from invitrogen.

The Hoechst 33258 (#14530), E64d (#E8640), Bafilomycin A1 (# B1793), Propidium iodide (#P4864), Chloroquine diphosphate salt (#C6628), QVD-OPH (#SML0063) were purchased from Sigma-Aldrich. Tetramethylrhodamine methyl-ester, TMRM (T-668) was purchased from Molecular Probes, Fluoromount G (#00-4958-02) was purchased from Invitrogen. 20A was synthesized as previously described (Smith, OBC, 2011). CA-074 (#205530), Ferrostatin-1 (#341494) were purchased from Calbiochem, LLOME (#16008), U18666A (#10009085), Erastin (#17754) were purchased from Cayman chemical.

Synthesis of bis-triazole triarylpyridines

A series of novel bis-triazole 2,4,6-triarylpyridines have been synthesized through three steps procedure (supplementary data 5). The synthetic route involves the base-catalysed condensation of commercially available *p*-aminoacetophenone (**1**) with *p*-thiomethyl

benzaldehyde (**2**) in PEG300 resulting the formation of di-amino derivative of 2,4,6-triarylpyridines **3**. The di-amino is then converted to corresponding diazido derivatives (**4**) which is then subjected for copper-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reaction with various amine-terminal alkynes to afford 1,2,3-triazole derivatives (supplementary data 4).

Synthesis of 4,4'-(4-(4-(methylthio) phenyl)pyridine-2,6-diyl)dianiline, **3:**

p-Aminoacetophenone, **1** (5 g, 37 mmol) was added to a suspension of crushed NaOH (1.5 g, 37 mmol) in PEG300 (20 mL) at room temperature. The suspension was stirred and heated to 80 °C to make a clear solution. Then, *p*-thiomethyl benzaldehyde **2** (2.8 g, 18.5 mmol) was added to the reaction mixture and heated at 110 °C for 4 h, after which NH₄OAc (42.7 g, 555 mmol) was added and the heating was reduced to 100 °C and stirred for 4 h. After cooling to room temperature, 400 mL cold water was added to the mixture to get a precipitate which was filtered and further purified through silica gel chromatography by using DCM:MeOH (0-5%) affording compound **3**.

Brown yellow powder, yield: 52%; ¹H-NMR δ (CDCl₃) 8.375 (d, 4H, J= 8.7 Hz), 7.951 (s, 2H), 7.923 (d, 4H, J=8.7 Hz), 7.730 (d, 2H, J= 8.7 Hz), 7.442 (d, 2H, J=8.7 Hz), 5.893 (br, 4H), 2.587 (s, 3H). ¹³C NMR δ (100 MHz, CDCl₃) 144.352, 142.014, 139.638, 135.189, 128.752, 128.615, 128.045, 121.629, 120.189, 117.894, 15.742. MALDI-TOF MS *m/z* [M + H]⁺ Calcd C₂₄H₂₁N₃S: 384.1529, Found: 384.1523.

Synthesis of 2,6-bis(4-azidophenyl)-4-(4-(methylthio)phenyl)pyridine **4.**

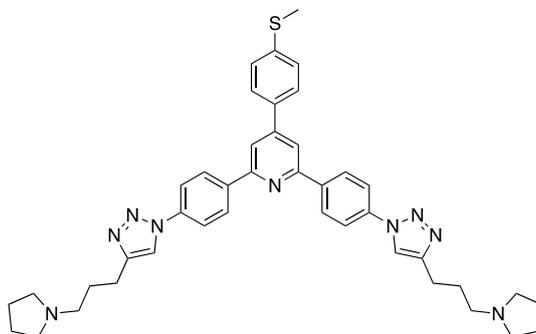
Compound **3** (200 mg, 0.5 mmol) was added to 15 mL 6N HCl and the reaction mixture was cooled to 0 °C and NaNO₂ (138 mg, 2 mmol) was added and was stirred for 30 mins under cold condition. Sodium azide (195 mg, 3 mmol) was added to the reaction mixture portion wise under cold condition and the reaction mixture was allowed to stir at room temperature for 2 h. The mixture was neutralized with sodium bicarbonate and extracted with ethyl acetate (3x30 mL). The organic part was evaporated under vacuum at 30 °C to afford compound **4** (98%) as a yellow solid which was used for next reaction. The diazido compound was characterized through IR spectra which showed a sharp peak at 2105 cm⁻¹. MALDI-TOF MS *m/z* [M+H]⁺ Calcd for C₂₄H₁₈N₇S; 436.1339, Found: 436.1326.

General procedure for the synthesis of RD050, RD052, RD046:

Compound **5** (50 mg, 0.1 mmol) was added to the mixture of 4 mL H₂O and THF (1:1). CuSO₄ · 5H₂O (0.002 mmol) and sodium ascorbate (0.1 mmol) was added to the mixture and stirred. After 5 mins the alkyne (0.3 mmol) was added and stirred for 12 hr at room

temperature. The solvent was evaporated and the residue was washed with water followed by diethyl ether to afford the desired bis-triazole compounds.

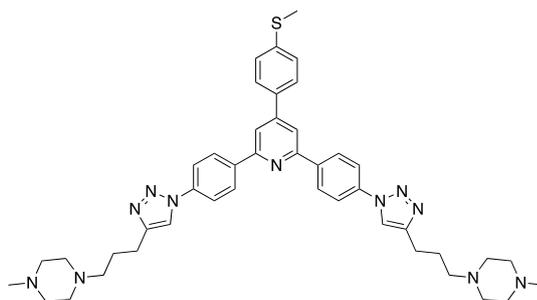
RD050



4-(4-(methylthio)phenyl)-2,6-bis(4-(4-(3-(pyrrolidin-1-yl)propyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)phenyl)pyridine

Yellow powder; yield: 84 %; $^1\text{H NMR}$ δ (300 MHz, CDCl_3) 8.400 (d, 4H, $J=8.7$ Hz), 7.962 (s, 2H), 7.939 (d, 4H, $J=8.7$ Hz), 7.865 (s, 2H), 7.749 (d, 2H, $J=8.7$ Hz), 7.452 (s, 2H, $J=8.7$ Hz), 2.935 (t, 4H, $J=7.5$ Hz), 2.594 (s, 3H), 2.574 (m, 12H), 2.022 (qn, 4H, $J=7.5$ Hz), 1.821 (qn, 8H, $J=3.9$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ δ (100 MHz, CDCl_3) 157.483, 151.352, 150.194, 140.594, 138.917, 135.891, 129.781, 128.729, 127.892, 121.836, 120.197, 118.451, 58.277, 56.782, 54.819, 39.819, 28.851, 24.953. MALDI-TOF MS m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ Calcd for $\text{C}_{42}\text{H}_{48}\text{N}_9\text{S}$; 710.3748, Found: 710.3740.

RD052

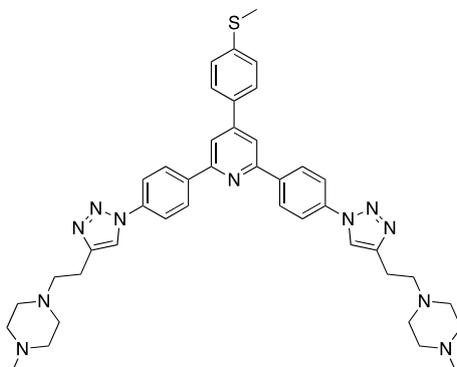


4,4'-((((4-(4-(methylthio)phenyl)pyridine-2,6-diyl)bis(4,1-phenylene))bis(1H-1,2,3-triazole-1,4-diyl))bis(propane-3,1-diyl))bis(1-methylpiperazine)

Yellowish red powder; yield: 68 %; $^1\text{H NMR}$ δ (300 MHz, CDCl_3) 8.397 (d, 4H, $J=8.7$ Hz), 7.959 (s, 2H), 7.932 (d, 4H, $J=8.7$ Hz), 7.856 (s, 2H), 7.746 (d, 2H, $J=8.7$ Hz), 7.449 (s, 2H, $J=8.7$ Hz), 2.911 (t, 4H, $J=7.5$ Hz), 2.592 (s, 3H), 2.530 (br, 20H), 2.321 (s, 6H) 1.997 (qn, 4H, $J=7.5$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ δ (100 MHz, CDCl_3) 157.463, 151.320, 150.154, 140.624, 139.017, 136.091, 129.741, 128.781, 127.992, 121.736, 120.237, 118.351, 59.147, 56.472,

54.529, 47.419, 27.978, 24.953. MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calcd for $C_{44}H_{54}N_{11}S$; 768.4279, Found: 768.4269.

RD046



4,4'-((((4-(4-(methylthio)phenyl)pyridine-2,6-diyl)bis(4,1-phenylene))bis(1H-1,2,3-triazole-1,4-diyl))bis(ethane-2,1-diyl))bis(1-methylpiperazine)

Yellow powder; yield: 64 % ; 1H NMR δ (300 MHz, $CDCl_3$) 8.389 (d, 4H, $J=8.7$ Hz), 7.956 (s, 2H), 7.938 (d, 4H, $J=8.7$ Hz), 7.900 (s, 2H), 7.741 (d, 2H, $J=8.7$ Hz), 7.446 (s, 2H, $J=8.7$ Hz), 3.065 (t, 4H, $J=7.8$ Hz), 2.811 (t, 4H, $J=7.8$ Hz), 2.558 (br, 16 H), 2.589 (s, 3H), 2.341 (s, 6H). ^{13}C NMR δ (100 MHz, $CDCl_3$) 157.534, 151.462, 147.985, 142.162, 140.798, 138.987, 129.806, 128.811, 128.042, 121.855, 120.813, 118.485, 58.564, 55.770, 53.124, 46.525, 24.594, MALDI-TOF MS m/z $[M+H]^+$ Calcd for $C_{42}H_{50}N_{11}S$; 740.3966, Found: 740.3924.

Mitochondrial and lysosomal staining and evaluation of 20A localization

Cells were grown on glass coverslips on a 6-well plate (6×10^4 cells/well), treated with or without 5 μM 20A for 6h. Cells were stained with 50nM Mitotracker Green (#M7514, Molecular probes) and 50nM LysoTracker Red DN-99 (#L7528, Molecular probes) 30 min before the end of the incubation time of 20A. Cells were placed in a perfusion chamber with DMEM without red Phenol containing 15nM LysoTracker Red DN-99. Image acquisition was made on a Zeiss LSM 510 META confocal microscope, with an Apoplan x63 objective. Identical exposures were used for each channel throughout individual experiments, and no images were altered after capture. Co-localization of blue fluorescence (20A) with the lysosome cellular compartment was analyzed by superposing fluorescence profile of the different cellular compartments.

Lysosomal membrane permeabilization (LMP) analysis

i. Quantification of Galectin 3 puncta

Lysosomal membrane damage was assessed thanks to U2OS expressing Galectin3-mCherry cells. Cells were plated on 12-well plates (7.5×10^4 cells/well) treated with or

without 20A in either the presence or absence of 25 μ M chloroquine for 24h. Cells were then washed with PBS, fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde for 10 min at room temperature and then nuclei were counterstained for 15 min with Hoechst 33258. Image acquisition was made with a Leica DMI8 epifluorescence microscope, with a x20 objective (NA 0.40) equipped with a digital CMOS camera (Hamamatsu photonics) and filter bloc for detection of phase contrast and blue (exc: 325-375nm / em: 435-485nm) and red (exc: 541-551nm / em: 565-605nm) fluorescence. Each images of cells was collected with identical exposure times and scaled equally. Five images were acquired on each condition and then analysed thanks to *ImageJ* software in order to count manually the number of cells, and automatically the number of Galectin3 punctae within each cell by using the "Find Maxima" tool.

ii. *Evaluation of Galectin 3 and LAMP1 co-localization*

To assess for lysosomal membrane permeabilization (LMP) co-localization study of Galectin3 puncta and LAMP1 was carried out by immunofluorescence study.

Cells grown on glass coverslips were fixed in ice-cold methanol at -20°C for 15 min then blocked/permeabilized with 3% BSA containing 0.3% Triton X-100 for 1h. Then cells were incubated with primary antibody overnight at 4°C. After washing, cells were incubated with secondary antibody (anti-rabbit Alexa Fluor 488 antibody) for 1h at room temperature in a dark chamber and stained with 2 μ g/ml of Hoechst 33258 (H3569, Promega) for 10min. After two PBS wash, cells were mounted with Fluoromount (F4680, Sigma-Aldrich) and images were acquired using a Zeiss LSM510 Meta confocal microscope (Zeiss, Göttingen, Germany) with an oil immersion Apoplan 63x objective (NA 0.75). z-stack series were made with 0.6 μ m interval and the corresponding images represent a z-projection of maximal intensity. Identical exposures were used for each channel throughout individual experiment. No images were altered after capture. Processing of images is performed thanks to *ImageJ* software.

Evaluation of cell death

The cell death process was monitored by measuring the plasma membrane permeability by using propidium iodide (P4864, Sigma) uptake by cytometer analysis. Briefly, supernatant and attached cells were collected, pelleted at 1800rpm for 5min and loaded with 1 μ g/ml PI for 15min. Cells were then analyzed by flow cytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) in the FL2 channel (exc: 488nm / em: 564-606nm).

Apoptotic cell death was also determined by measuring the loss of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi$ m) by using tetramethyl rhodamin methyl ester perchlorate dye (TMRM) followed by cytometer analysis as previously described⁴³. Apoptosis was also evaluated by Western blotting analyses of cleaved forms of either PARP 1 or caspase 3.

Where indicated, the caspase inhibitor, QVD-OPH was added to cells to evaluate the possible implication of caspases in cell demise.

Immunoblot assay

Cell extracts were prepared in 10mM Tris, pH 7.4, 1% SDS, 1mM sodium vanadate, 2mM PMSF (93482, Sigma-Aldrich), 1% Protease Inhibitor Cocktail (P8849, Sigma-Aldrich), and 1% Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail (1862495, Thermo Fisher Scientific) and treated with Benzonase Endonuclease (71205, Merck Millipore) for 5min at room temperature, and boiled for 5min. Fractions (30–50 µg) of cellular extract proteins were subjected to SDS-PAGE using a Tris/glycine buffer system based on the method of Laemmli. After electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (10600003 Amersham Protrant Premium 0.45 NC, GE Healthcare Life Sciences). Protein loading was assessed by Ponceau red staining of membranes. Blots were then incubated with primary antibodies using the manufacturer's protocol followed by the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Mouse anti-Actin antibody was used to assess equal loading of the samples. Immunostained proteins were visualized on a chemiluminescence detector equipped with a camera (FUSION FX7, Fisher Bioblock Scientific) using the enhanced chemiluminescence (ECL) detection system.

Cell viability assay

Cell viability was evaluated using the MTT assay. Cells were seeded in a 96-well plate (4×10^3 cells/well). After 24 h of drug treatment, MTT was added to each well to a final concentration of 0.5 mg/ml, followed by incubation at 37 °C for 3 h. The medium was then removed, and 100 µl of DMSO was added per well. The absorbance in each well was measured at 570 nm and 630 nm using a Flexstation 3 microplate reader (Molecular Devices). To determine the IC₅₀ of 20A, a non-linear regression curve was fit using GraphPad Prism software.

Statistical analysis.

Each experiment was performed three times. Results were expressed as the mean value ± standard deviation (SD). Unless otherwise stated, statistical analysis was performed by Mann-Whitney unpaired statistical test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. The software used was GraphPad PRISM.

Bibliography

- 1 Ambrogio C, Gómez-López G, Falcone M, Vidal A, Nadal E, Crosetto N *et al.* Combined inhibition of DDR1 and Notch signaling is a therapeutic strategy for KRAS-driven lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2016; 22: 270–277.
- 2 Xu H, Ren D. Lysosomal physiology. *Annu Rev Physiol* 2015; 77: 57–80.
- 3 Appelqvist H, Wäster P, Kågedal K, Öllinger K. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J Mol Cell Biol* 2013; 5: 214–226.
- 4 Kroemer G, Jäättelä M. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 886–897.
- 5 Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007; 21: 2861–2873.
- 6 Boya P. Lysosomal function and dysfunction: mechanism and disease. *Antioxid Redox Signal* 2012; 17: 766–774.
- 7 Kallunki T, Olsen OD, Jäättelä M. Cancer-associated lysosomal changes: friends or foes? *Oncogene* 2013; 32: 1995–2004.
- 8 Gong Y, Duvvuri M, Duncan MB, Liu J, Krise JP. Niemann-Pick C1 protein facilitates the efflux of the anticancer drug daunorubicin from cells according to a novel vesicle-mediated pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316: 242–247.
- 9 Herlevsen M, Oxford G, Owens CR, Conaway M, Theodorescu D. Depletion of major vault protein increases doxorubicin sensitivity and nuclear accumulation and disrupts its sequestration in lysosomes. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1804–1813.
- 10 Smith PJ, Sykes HR, Fox ME, Furlong IJ. Subcellular distribution of the anticancer drug mitoxantrone in human and drug-resistant murine cells analyzed by flow cytometry and confocal microscopy and its relationship to the induction of DNA damage. *Cancer Res* 1992; 52: 4000–4008.
- 11 Zhitomirsky B, Assaraf YG. Lysosomal sequestration of hydrophobic weak base chemotherapeutics triggers lysosomal biogenesis and lysosome-dependent cancer multidrug resistance. *Oncotarget* 2015; 6: 1143–1156.
- 12 Kroemer G, Galluzzi L. Lysosome-targeting agents in cancer therapy. *Oncotarget* 2017; 8: 112168–112169.
- 13 Goldman SDB, Funk RS, Rajewski RA, Krise JP. Mechanisms of amine accumulation in, and egress from, lysosomes. *Bioanalysis* 2009; 1: 1445–1459.
- 14 Ferrao P, Sincock P, Cole S, Ashman L. Intracellular P-gp contributes to functional drug efflux and resistance in acute myeloid leukaemia. *Leuk Res* 2001; 25: 395–405.
- 15 Yamagishi T, Sahni S, Sharp DM, Arvind A, Jansson PJ, Richardson DR. P-glycoprotein mediates drug resistance via a novel mechanism involving lysosomal sequestration. *J Biol Chem* 2013; 288: 31761–31771.
- 16 Yamagishi T, Sahni S, Sharp DM, Arvind A, Jansson PJ, Richardson DR. P-glycoprotein mediates drug resistance via a novel mechanism involving lysosomal sequestration. *J Biol Chem* 2013; 288: 31761–31771.
- 17 Hrabeta J, Groh T, Khalil MA, Poljakova J, Adam V, Kizek R *et al.* Vacuolar-ATPase-mediated intracellular sequestration of ellipticine contributes to drug resistance in neuroblastoma cells. *Int J Oncol* 2015; 47: 971–980.
- 18 Repnik U, Hafner Česen M, Turk B. Lysosomal membrane permeabilization in cell death: Concepts and challenges. *Mitochondrion* 2014; 19: 49–57.
- 19 Fehrenbacher N, Gyrd-Hansen M, Poulsen B, Felbor U, Kallunki T, Boes M *et al.* Sensitization to the Lysosomal Cell Death Pathway upon Immortalization and Transformation. *Cancer Res* 2004; 64: 5301–5310.
- 20 Petersen NHT, Olsen OD, Groth-Pedersen L, Ellegaard A-M, Bilgin M, Redmer S *et al.* Transformation-Associated Changes in Sphingolipid Metabolism Sensitize Cells to Lysosomal Cell Death Induced by Inhibitors of Acid Sphingomyelinase. *Cancer Cell* 2013; 24: 379–393.

- 21 Boya P, Andreau K, Poncet D, Zamzami N, Perfettini J-L, Metivier D *et al.* Lysosomal membrane permeabilization induces cell death in a mitochondrion-dependent fashion. *J Exp Med* 2003; 197: 1323–1334.
- 22 Aits S, Jäättelä M. Lysosomal cell death at a glance. *J Cell Sci* 2013; 126: 1905–1912.
- 23 Piao S, Amaravadi RK. Targeting the lysosome in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2016; 1371: 45–54.
- 24 Smith NM, Labrunie G, Corry B, Tran PLT, Norret M, Djavaheiri-Mergny M *et al.* Unraveling the relationship between structure and stabilization of triarylpyridines as G-quadruplex binding ligands. *Org Biomol Chem* 2011; 9: 6154–6162.
- 25 Kazmi F, Hensley T, Pope C, Funk RS, Loewen GJ, Buckley DB *et al.* Lysosomal Sequestration (Trapping) of Lipophilic Amine (Cationic Amphiphilic) Drugs in Immortalized Human Hepatocytes (Fa2N-4 Cells). *Drug Metab Dispos* 2013; 41: 897–905.
- 26 Homewood CA, Warhurst DC, Peters W, Baggaley VC. Lysosomes, pH and the Anti-malarial Action of Chloroquine. *Nature* 1972; 235: 50–52.
- 27 Aits S, Kricker J, Liu B, Ellegaard A-M, Hämälistö S, Tvingsholm S *et al.* Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay. *Autophagy* 2015; 11: 1408–1424.
- 28 Kang C-C, Huang W-C, Kouh C-W, Wang Z-F, Cho C-C, Chang C-C *et al.* Chemical principles for the design of a novel fluorescent probe with high cancer-targeting selectivity and sensitivity. *Integr Biol Quant Biosci Nano Macro* 2013; 5: 1217–1228.
- 29 Shivalingam A, Izquierdo MA, Le Marois A, Vyšniauskas A, Suhling K, Kuimova MK *et al.* The interactions between a small molecule and G-quadruplexes are visualized by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat Commun* 2015; 6: 8178.
- 30 Drygin D, Siddiqui-Jain A, O'Brien S, Schwaebe M, Lin A, Bliesath J *et al.* Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Res* 2009; 69: 7653–7661.
- 31 Faudale M, Cogoi S, Xodo LE. Photoactivated cationic alkyl-substituted porphyrin binding to g4-RNA in the 5'-UTR of KRAS oncogene represses translation. *Chem Commun Camb Engl* 2012; 48: 874–876.
- 32 Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K *et al.* A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet* 2007; 39: 207–211.
- 33 Hong ES, Yoon H-J, Kim B, Yim Y-H, So H-Y, Shin SK. Mass spectrometric studies of alkali metal ion binding on thrombin-binding aptamer DNA. *J Am Soc Mass Spectrom* 2010; 21: 1245–1255.
- 34 Cao Q, Zhong XZ, Zou Y, Murrell-Lagnado R, Zhu MX, Dong X-P. Calcium release through P2X4 activates calmodulin to promote endolysosomal membrane fusion. *J Cell Biol* 2015; 209: 879–894.
- 35 Cao Q, Yang Y, Zhong XZ, Dong X-P. The lysosomal Ca²⁺ release channel TRPML1 regulates lysosome size by activating calmodulin. *J Biol Chem* 2017; 292: 8424–8435.
- 36 Martina JA, Chen Y, Gucek M, Puertollano R. mTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* 2012; 8: 903–914.
- 37 Settembre C, Fraldi A, Medina DL, Ballabio A. Signals for the lysosome: a control center for cellular clearance and energy metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; 14: 283–296.
- 38 Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S *et al.* TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* 2011; 332: 1429–1433.
- 39 Wang F, Gómez-Sintes R, Boya P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic Cph Den* 2018. doi:10.1111/tra.12613.
- 40 Trapp S, Rosania GR, Horobin RW, Kornhuber J. Quantitative modeling of selective lysosomal targeting for drug design. *Eur Biophys J EBJ* 2008; 37: 1317–1328.
- 41 O'Prey J, Sakamaki J, Baudot AD, New M, Van Acker T, Tooze SA *et al.* Application of CRISPR/Cas9 to Autophagy Research. *Methods Enzymol* 2017; 588: 79–108.
- 42 Montespan C, Marvin SA, Austin S, Burrage AM, Roger B, Rayne F *et al.* Multi-layered control of Galectin-8 mediated autophagy during adenovirus cell entry through a conserved PPxY motif in the viral capsid. *PLoS Pathog* 2017; 13: e1006217.

- 43 Trocoli A, Bensadoun P, Richard E, Labrunie G, Merhi F, Schläfli AM *et al.* p62/SQSTM1 upregulation constitutes a survival mechanism that occurs during granulocytic differentiation of acute myeloid leukemia cells. *Cell Death Differ* 2014; 21: 1852.

3. Récapitulatif des résultats principaux

- **Un traitement combiné chloroquine/20A potentialise la mort cellulaire et la LMP**

Le 20A se retrouve accumulé dans les lysosomes et semble conduire à un élargissement de la taille de ces derniers (**Figure 1A** et **1B**, page 172), suggérant que le 20A est séquestré dans les lysosomes.

Afin de surmonter la séquestration lysosomale, nous avons utilisé la chloroquine (agent anti-paludéen qui se retrouve aussi accumulé dans les lysosomes et induit une dysfonction lysosomale). Nous avons alors observé que la combinaison du 20A et de la chloroquine potentialise de façon très importante la mort cellulaire dans plusieurs lignées de cellules cancéreuses (**Figure 2A**, page 175). Cette augmentation de la mort cellulaire est indépendante de l'autophagie (**Figure 2C**) et est associée à une augmentation importante de la taille des lysosomes (**Figure 2B**) et de la perméabilisation de la membrane lysosomale (LMP) (**Figure 3**, page 177).

Ces résultats suggèrent donc que la chloroquine favorise la mort induite par le 20A en potentialisant la LMP.

- **La combinaison chloroquine/20A entraîne une mort apoptotique**

Afin de connaître la nature de la mort cellulaire induite par cette combinaison de traitement, nous avons utilisé différents inhibiteurs de différents mécanismes de mort cellulaire (apoptose, nécroptose, ferroptose, mort cellulaire liée à l'activité des cathepsines). Seule l'inhibition de l'apoptose (par inhibition de l'activité des caspases) réduit la mort cellulaire induite par la combinaison de traitement (**Figure S3** et **S4** pages 294 et 295 respectivement). De plus, la potentialisation de la mort cellulaire induite par la combinaison du 20A et de la chloroquine est associée à une augmentation importante de la perte du potentiel transmembranaire mitochondrial et du clivage de PARP1 et de la caspase 3 (**Figure 4**, page 179).

L'ensemble de ces données confirment l'implication de l'apoptose dans la mort cellulaire induite par le traitement combiné du 20A et de la chloroquine. Cependant, les inhibiteurs d'apoptose n'inhibent pas totalement la mort cellulaire soulevant l'hypothèse de l'intervention d'un autre mécanisme impliqué dans cette mort.

- **La chloroquine potentialise la LMP induite par d'autres LG4**

Nous avons voulu savoir si l'effet de la chloroquine sur la potentialisation de la LMP pouvait être généralisable à d'autres LG4. En particulier, nous avons étudié des dérivés du 20A dont la localisation a également été observée au niveau du cytoplasme (données non présentées). A la différence du 20A, les dérivés induisent à eux seuls la LMP. L'ajout de la chloroquine conduit à une hausse significative du pourcentage de cellules positives pour la LMP, mais également au nombre de lysosomes qui sont atteints par la LMP dans chaque cellule positive (**Figure 5**, page 181).

Ces résultats montrent donc qu'en plus du 20A, d'autres LG4 peuvent en effet se localiser au niveau des lysosomes et participer à une déstabilisation de la membrane lysosomale, avec ou sans traitement supplémentaire à la chloroquine. De plus, l'induction de la LMP par les dérivés du 20A utilisés en traitement unique suggère que ces derniers possèdent des propriétés différentes du 20A.

- **La combinaison de la chloroquine et des dérivés du 20A entraîne la mort massive des cellules cancéreuses d'adénocarcinome pulmonaire**

Enfin, nous avons voulu savoir si un traitement à la chloroquine, en potentialisant la LMP induite par les dérivés du 20A pouvait aussi conduire à une potentialisation de la mort cellulaire. En effet, nous observons une nette augmentation de la mort cellulaire en condition de combinaison des dérivés du 20A et de la chloroquine dans la lignée cellulaire A549 (**Figure 6A**, page 183).

De plus, ces observations sont aussi valables dans deux modèles cellulaires plus relevant pour la clinique. En effet, nous observons aussi une potentialisation majeure de la mort cellulaire dans deux lignées de cellules PDX issus de patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires (**Figure 6B** et **6C**). Ces résultats suggèrent donc que la combinaison de la chloroquine avec le LG4 20A ou ses dérivés peut présenter un potentiel thérapeutique intéressant en potentialisation de façon importante la mort cellulaire.

4. Conclusion

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que le 20A se localise au niveau des lysosomes et semble constituer un mécanisme de résistance vis-à-vis de la mort cellulaire. Cette résistance peut être surmontée grâce à un traitement combiné avec la chloroquine qui potentialise de façon importante la mort cellulaire. La potentialisation de la mort cellulaire par la chloroquine peut être généralisable à d'autres LG4 de la même famille que le 20A.

L'augmentation de la mort cellulaire est accompagnée d'une augmentation de la taille des lysosomes et d'une induction massive de la perméabilisation de la membrane lysosomale, suggérant donc que la LMP pourrait être un facteur majeur de cette potentialisation de la mort cellulaire (schématisé en **Figure 24**).

De façon intéressante, la combinaison de traitement entre le 20A et la chloroquine est partiellement dépendante d'une mort de type apoptotique. Les autres types de mort cellulaire qui sont impliqués dans cette combinaison de traitement restent de nature inconnue pour l'instant. Mais ces résultats suggèrent que même dans des modèles de cancers dont l'apoptose est déficiente (par surexpression d'inhibiteurs de caspases), cette combinaison serait tout de même partiellement efficace pour induire la mort.

Enfin, la sensibilité importante de plusieurs lignées de cellules issues d'adénocarcinomes pulmonaires (la lignée commerciale A549 et deux lignées de PDX) suggère que cette combinaison pourrait être intéressante à étudier plus précisément dans des modèles *in vivo* de xénogreffes pulmonaires chez la souris.

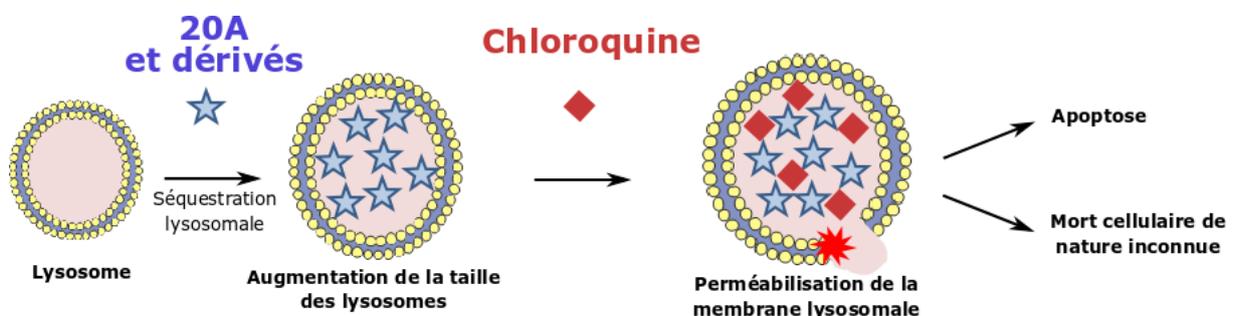


Figure 24: Effet de la combinaison chloroquine/20A sur les lysosomes et la mort cellulaire

III) Etude des mécanismes de formation des cellules à doubles noyaux par le 20A et de leur rôle dans la réponse au 20A

Résultats complémentaires

1. Contexte

Dans cette dernière partie, nous allons présenter quelques résultats obtenus concernant une particularité du 20A (qui n'est pas retrouvée avec ses dérivés, et que nous n'avons pas retrouvée décrite pour d'autres ligands G-quadruplexes dans la littérature). Cette particularité est liée à l'apparition d'une proportion importante de cellules binucléées à la suite d'un traitement au 20A.

De nombreux agents anti-cancéreux, en particulier des inducteurs de dommages à l'ADN ou des agents déstabilisant les microtubules peuvent conduire à l'apparition de cellules tétraploïdes par un échec de cytokinèse (Erenpreisa et al., 2008; Ivanov et al., 2003; Panvichian et al., 1998; Shen et al., 2013). Ces cellules tétraploïdes peuvent influencer considérablement la réponse au traitement. En effet, il a été décrit que ces cellules tétraploïdes peuvent être à la fois plus sensibles et plus résistantes à la mort cellulaire (Coward and Harding, 2014; Erenpreisa and Cragg, 2013; Gascoigne and Taylor, 2009).

La sensibilité de ces cellules à la mort cellulaire est notamment liée au fait qu'au cours des divisions suivantes, ces cellules vont présenter des anomalies de mitose qui conduiront à la mort mitotique.

Cependant, dans de très rares cas, ces cellules présentant des anomalies de mitose peuvent survivre et favoriser la progression tumorale. Il est également observé dans certaines conditions que les cellules tétraploïdes ne prolifèrent plus à cause de l'activation du point de contrôle de la tétraploïdie, et deviennent sénescents. Or, le mode de fonctionnement de nombreux anti-cancéreux repose sur la capacité proliférative des cellules cancéreuses. Ainsi,

la diminution du taux de prolifération des cellules tétraploïdes rendent les chimiothérapies moins efficaces.

Nous avons donc voulu savoir par quel mécanisme ces cellules binucléées se forment et quel est leur rôle dans la mort cellulaire induite par le 20A. Afin de répondre à ces questions, nous avons d'abord identifié l'origine de ces cellules grâce à des expériences de vidéomicroscopie.

Nous avons également analysé la progression des cellules binucléées dans le cycle cellulaire grâce à l'utilisation de cellules exprimant un reporteur FUCCI (*Fluorescent Ubiquitination based Cell Cycle Indicator*). Ces expériences nous ont permis notamment de déterminer la sensibilité des cellules binucléées à la mort cellulaire induite par le 20A.

Enfin, étant donné le rôle potentiellement néfaste que les cellules binucléées peuvent avoir sur la réponse aux anti-cancéreux, nous avons recherché des stratégies qui permettraient de diminuer la proportion de ces cellules binucléées en réponse au 20A. Nous avons alors identifié deux stratégies possibles, soit en évitant leur formation, soit en sensibilisant les cellules binucléées à la mort cellulaire.

2. Résultats

- **Un traitement au 20A entraîne la formation de cellules à doubles noyaux à cause d'un défaut de division.**

Les cellules traitées au 20A présentent une proportion de cellules binucléées très importante après 24h de traitement (**Figure 25A**). En effet, par un comptage manuel on observe environ 38% de cellules à doubles noyaux pour des cellules HeLa, de plus l'analyse du contenu en ADN par cytométrie en flux confirme l'augmentation de la proportion de cellules tétraploïdes (4n) pour des cellules HeLa et A549 (**Figure 25B**).

Nous avons ensuite voulu savoir quelle était l'origine de ces cellules binucléées. Deux hypothèses peuvent expliquer l'apparition de cellules binucléées, la première étant la fusion de deux cellules, la deuxième étant à la suite d'un défaut de mitose. Nous avons donc réalisé des expériences de vidéomicroscopie sur 24h avec des cellules HeLa qui expriment une histone couplée au marqueur fluorescent mCherry (HeLa H2B-mCherry). Nous avons observé qu'il s'agissait plutôt d'un défaut de mitose puisque les cellules binucléées surviennent toutes à la suite d'une mitose (indiquées par des étoiles sur la **Figure 25C**).

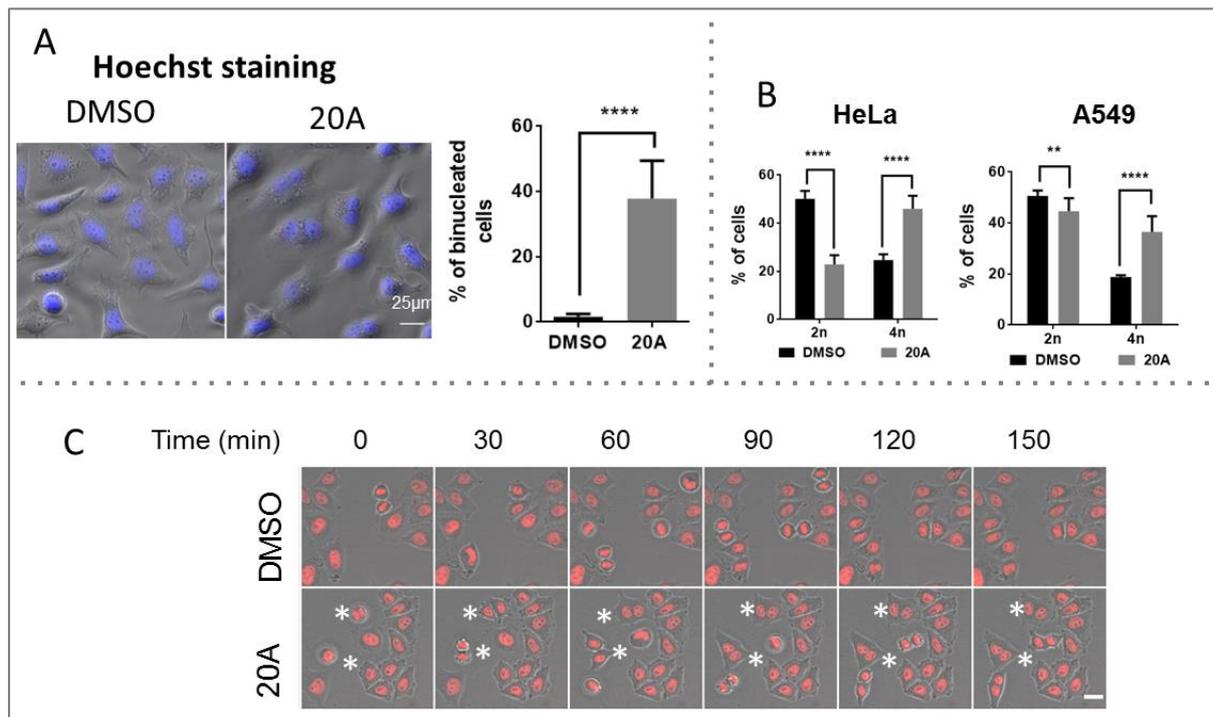


Figure 25: 20A treatment induces binucleation due to mitosis failure.

A) HeLa cells were treated or not with 6 μ M 20A for 24h and then stained with Hoechst to detect binucleated cells. *Left panel*, Representative merged images of Hoechst staining (blue signal) and phase contrast are presented, scale bar 25 μ m. *Right panel*, Percentage of binucleated cells are scored, the data are presented as mean \pm SD of fifteen values obtained from three independent experiments counting at least 100 cells from 5 randomly chosen field in each experiment. **** p -value < 0.0001 using Mann-Whitney test.

B) HeLa (left) and A549 (right) cells were treated with or without 20A (6 μ M or 4 μ M respectively) for 24h and then analyzed for DNA content by FACS analysis. The data are presented as mean \pm SD of 9 values obtained from three independent experiments each performed in triplicate. p -value ** < 0.01 and **** < 0.0001 using Mann-Whitney test.

C) Time-lapse videomicroscopy of HeLa cells expressing H2B-mCherry during mitosis, upon treatment with either DMSO or 6 μ M of 20A. Representative epifluorescence merged images of nucleus H2B-mCherry (red signal) and phase contrast of cells are shown at the indicated time after the start of mitosis, scale bar 25 μ m. The time-lapse videomicroscopy was carried out during 24h. The asterisks indicated binucleated cells due to mitosis failure.

- **Impact des cellules à doubles noyaux dans la réponse au 20A : arrêt en phase G1 et résistance à la mort cellulaire**

Les cellules binucléées peuvent présenter à la fois un avantage et un inconvénient thérapeutique. En effet, la tétraploïdie est connue pour conduire à l'activation d'un point de contrôle de la tétraploïdie qui fait intervenir un arrêt des cellules en phase G1 du cycle

cellulaire, et l'induction de la sénescence. Cette induction de la sénescence peut être considérée comme un avantage thérapeutique du fait de l'arrêt de la prolifération des cellules. De plus, dans le cas où les cellules échappent à la sénescence des cellules binucléées ont souvent été décrites pour subir une catastrophe mitotique à la mitose suivante et mourir au cours de cette mitose.

Mais, il a aussi été décrit qu'un très faible pourcentage de cellules est capable de survivre à la catastrophe mitotique et devient alors polyploïde. Et ces cellules polyploïdes qui survivent sont notamment capables de régénérer des cellules presque diploïdes qui possèdent des propriétés tumorigéniques et de cellules souches cancéreuses (Puig et al., 2008; Vitale et al., 2010).

Ainsi, nous avons évalué le devenir de ces cellules binucléées par un suivi de la progression dans le cycle cellulaire, en définissant en particulier si les cellules sont arrêtées ou capables de proliférer et dans ce dernier cas, meurent-elles au cours de la mitose qui suit.

Nous avons donc réalisé une expérience de vidéomicroscopie de 48h avec des cellules A549 qui expriment le reporteur FUCCI (*Fluorescence Ubiquitination based Cell Cycle Indicator*) avec des intervalles de temps de 30minutes. Nous avons suivis chaque cellule et reporté la succession de phases du cycle cellulaire. A des concentrations de 20A non létales, à la fin des 48h d'enregistrement, on observe une différence importante de confluence des cellules entre la condition contrôle et traitée au 20A, suggérant que les cellules traitées au 20A prolifèrent moins vite (**Figure 26A**, panneau du haut).

Nous avons ensuite quantifié le temps total que les cellules ont passé en phase G1 et en phase G2, ainsi que le nombre de mitoses réalisées au cours des 48h d'acquisition. Nous observons notamment que les cellules traitées au 20A passent significativement plus de temps en phase G1 que les cellules contrôles (en moyenne 39h contre 26h) (**Figure 26B**, panneau de gauche). De plus les cellules traitées au 20A semblent réaliser moins de mitoses que les cellules contrôles. En effet la majorité des cellules traitées au 20A (71%) ne font qu'une mitose au cours des 48h, avec 14% de ces cellules qui font au maximum 2 mitose (**Figure 26B**, panneau de droite). Alors que la grande majorité des cellules contrôle (88%) en réalisent au moins 2, avec 40 et 48% des cellules qui réalisent 2 et 3 mitoses respectivement.

Ces résultats suggèrent donc fortement que les cellules traitées au 20A sont arrêtées en phase G1 du cycle cellulaire.

Afin de savoir si les cellules à double noyaux sont plus susceptibles ou non d'être arrêtées en phase G1 que les cellules mononucléées, nous avons analysé la répartition de ces cellules en fonction de leur arrêt « apparent » en phase G1. Avec une concentration non létale de 20A, nous observons environ 30% de cellules binucléées, et la grande majorité de ces cellules (60%) présente un arrêt « apparent » en phase G1 (**Figure 26C**). Lorsque nous considérons la population de cellules mononucléées, une proportion équivalente des cellules est soit arrêtée en phase G1, soit toujours en cycle (respectivement 47% et 53% de la population de cellules mononucléées, ce qui représente respectivement 33 et 37% des cellules totales). Ces données suggèrent fortement que les cellules binucléées sont plus susceptibles d'être arrêtée en phase G1 et activent donc le point de contrôle de la tétraploïdie. En revanche une petite proportion de ces cellules à doubles noyaux est capable de continuer leur progression dans le cycle cellulaire.

Nous avons également voulu savoir le devenir de ces cellules binucléées à des doses létales de 20A. Nous avons alors analysé la répartition des cellules mono- et binucléées en fonction de la mort cellulaire lorsque les cellules sont traitées avec une concentration plus forte de 20A qui induit environ 33% de mort cellulaire.

A cette concentration de 20A, on observe la formation de 30% de cellules binucléées qui sont majoritairement vivantes (93% de la population de cellules binucléées, représentant environ 28% de la population totale) (**Figure 26D**). Dans la population mononucléée, la proportion de cellules vivantes ou mortes est équitable (53% contre 47% respectivement). Ainsi, ces données suggèrent que la population de cellules binucléée est plutôt résistante à la mort cellulaire induite par le 20A.

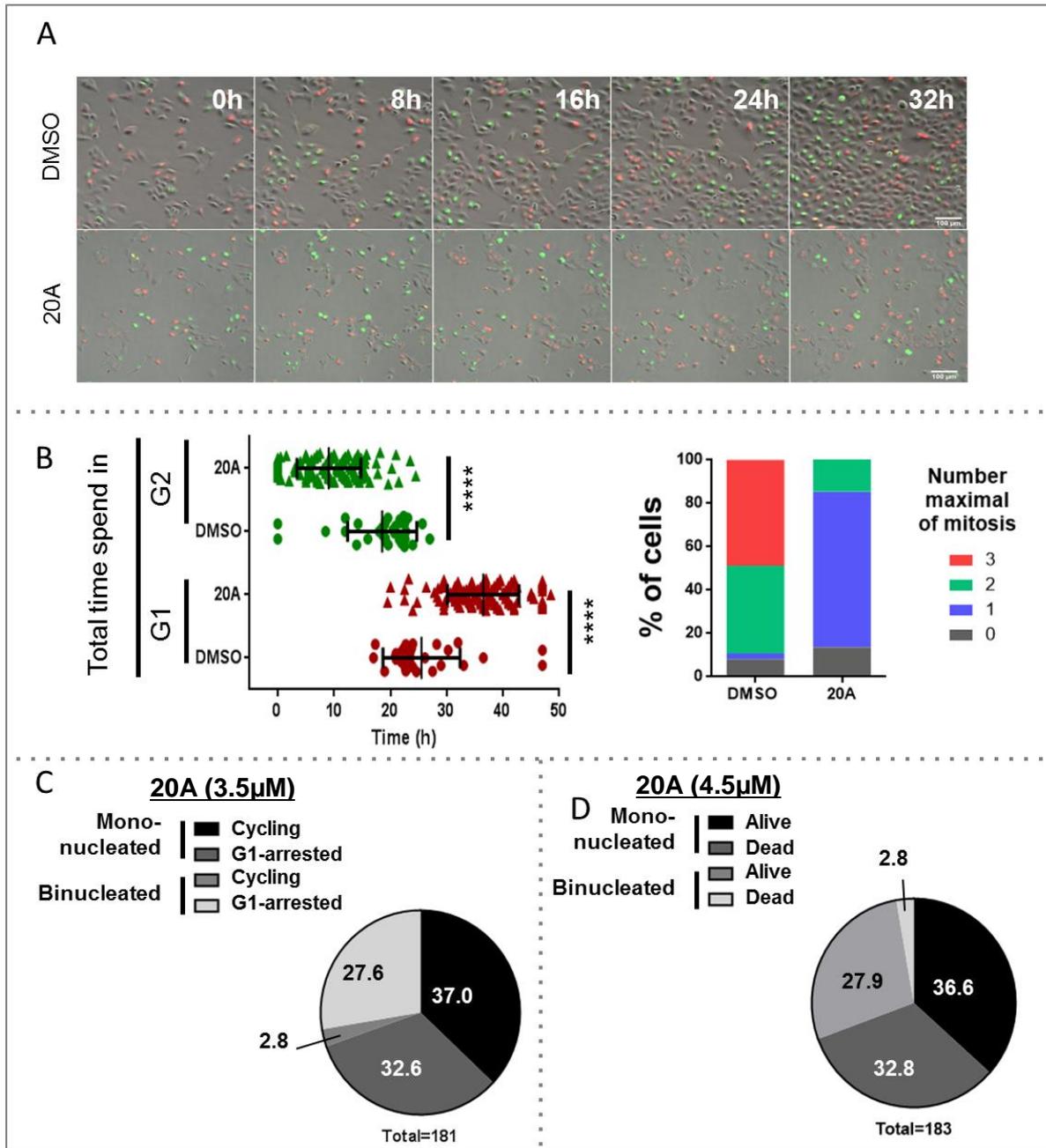


Figure 26: Most of the binucleated cells are arrested in G1 phase and manifest reduced sensitivity to 20A-induced cell death than mononucleated ones.

A) Time-lapse videomicroscopy of A549 cells expressing FUCCI reporter treated with or without 3.5µM 20A. Representative epifluorescence merged images at the indicated time obtained from time-lapse videomicroscopy monitored for 48h, scale bar 100µm. Image were pseudo-colored in red for G1 phase cells and in green for S-G2 phase. Each cell was tracked to monitor cell cycle phase as well as cell death.

B) Individual follow-up of cells treated as in A. *Left panel*, Dot plots of the mean total time spent in G1 phase or G2 phase was evaluated during 48h for each cell lineage subjected to either DMSO or 20A treatment. Data are presented as mean ± SD of at least 50 followed cells in each condition from two independent experiments. **** *p-value* < 0.0001 using Mann-Whitney test. *Right panel*, The maximal number of mitosis realized in 48h is scored for cell treated with or without 20A. Data are

presented as the mean percentage of at least 50 followed cells in each condition from two independent experiments.

C) Representation of the percentage of mononucleated and binucleated cells that display G1 phase arrest after treatment with 3.5 μ M 20A for 48h. Data are presented as the mean percentage of at least 150 followed cells (total cell number =181) from two independent experiments.

D) Cells were treated with 4.5 μ M 20A for 48h and the percentage of mononucleated and binucleated cells that are alive or undergo cell death were scored. Cells that lost their refringency are considered as dead cells. Data are presented as the mean percentage of at least 150 followed cells (total cell number =183) from two independent experiments.

L'ensemble de ces résultats semble indiquer donc que les cellules binucléées, issues d'un défaut de division, participent à l'effet cytotatique (anti-prolifératif) du 20A en s'arrêtant en phase G1 du cycle cellulaire, et sont en revanche plus résistantes à la mort induite par le 20A. Etant donné que très peu de cellules binucléées étaient considérées comme toujours en cycle, mais que la durée du cycle est tout de même rallongée, nous n'avons pas pu observer la mitose suivante de ces cellules binucléées. Nous ne pouvons donc pas dire si ces cellules binucléées peuvent favoriser la mort cellulaire à la suite d'une catastrophe mitotique.

De plus, nos expériences sont réalisées sur des temps trop courts et ne permettent pas d'observer une éventuelle réversibilité de la sénescence. Or cette réversibilité de la sénescence est associée au potentiel de ces cellules polyploïdes de générer des cellules à très fort potentiel tumorigénique ayant des propriétés de cellules souches cancéreuses (Weihua et al., 2011). Ainsi, il faudrait réaliser des acquisitions sur du plus long terme pour obtenir ces informations déterminantes dans la compréhension du rôle de ces cellules binucléées dans la réponse au 20A.

- **Un échec de la cytokinèse est responsable de la formation des cellules binucléées à la suite d'un traitement au 20A.**

A cause de leurs potentiels effets négatifs sur la réponse au traitement par le 20A, nous avons voulu déterminer les causes de ce défaut de mitose pour tenter d'y remédier. Afin de savoir plus précisément à quelle étape de la mitose les problèmes surviennent nous avons réalisé une immunofluorescence de la tubuline. Les cellules ont alors été synchronisées en phase S grâce à un blocage par la thymidine. A la suite de la relâche du blocage à la thymidine dans du milieu frais, avec ou sans le 20A, quelques cellules commencent à entrer en mitose à 9h post-relâche, un plus grand nombre de cellules entrant en mitose après 10h de relâche. Nous réalisons donc une fixation des cellules à 10h30 après la relâche pour pouvoir observer des cellules dans chaque étape de la mitose. Au préalable, nous avons vérifié que dans ces conditions de synchronisation et de traitement au 20A pendant seulement 10h30, des cellules binucléées peuvent également se former (données non présentées).

Nous avons présenté en **Figure 27** des images représentatives de cellules en métaphase, anaphase et en phase de cytokinèse marquées pour la tubuline. Nous observons que le réseau de microtubules est organisé de façon similaire en métaphase et en anaphase entre la condition contrôle et la condition traitée au 20A. En revanche, à la fin de la mitose, alors que les cellules contrôle présentent des filaments très fins de microtubules entre deux cellules qui se divisent (représentés par des flèches sur la **Figure 27** panneau de droite), très peu de cellules traitées au 20A présentent ce phénotype. A l'inverse on observe plutôt une désorganisation du fuseau central de microtubules (représenté par des étoiles sur la **Figure 27** panneau de droite). Ces résultats suggèrent donc que la tétraploïdisation issue d'un traitement au 20A est issue d'un défaut de cytokinèse.

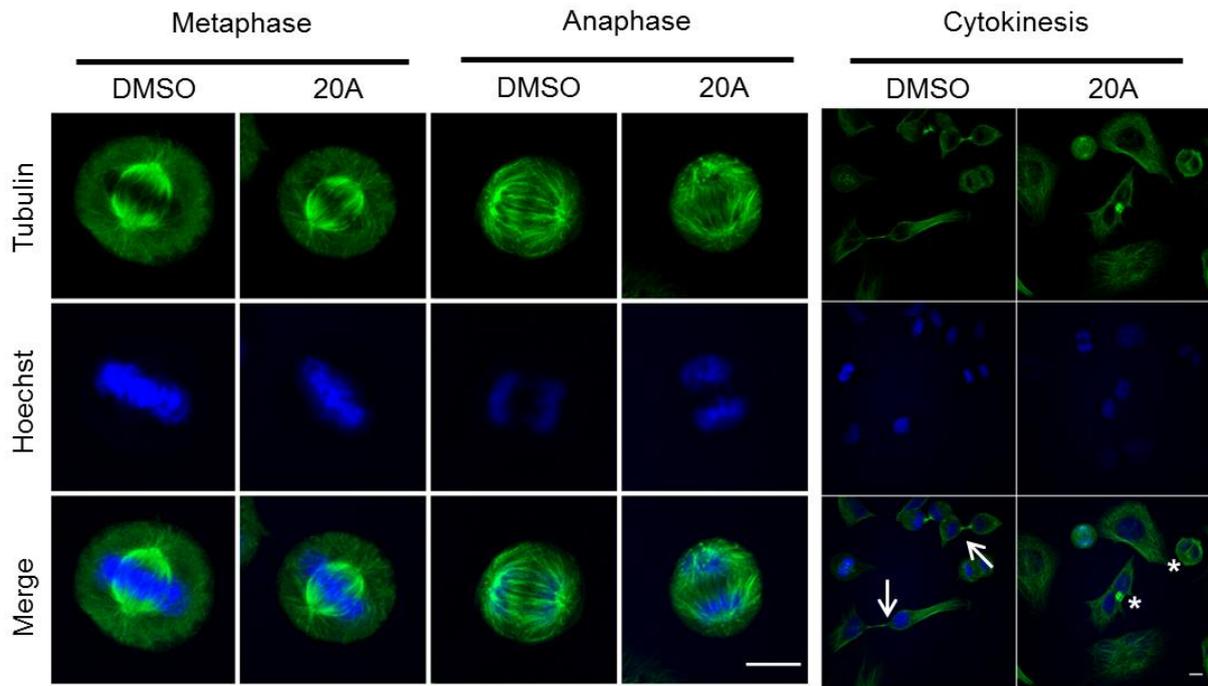


Figure 27: 20A treatment disrupts microtubule organization during cytokinesis.

HeLa cells were synchronized in S-phase, released in DMSO or 6 μ M 20A for 10h30 and then fixed in ice cold methanol for tubulin immunostaining. Representative confocal image of cells during metaphase, anaphase or cytokinesis are presented, scale bar 10 μ m. Arrows indicate thin microtubule filaments within cytoplasmic bridge, asterisks indicate destabilized microtubule organization between dividing cells.

- **L'échec de la cytokinèse est associé à une sous-expression et mauvaise localisation de RhoA pendant la cytokinèse**

Nous nous sommes donc intéressés un peu plus précisément aux mécanismes moléculaires qui pourraient être responsables de ce phénotype. Deux effecteurs majeurs de la cytokinèse ont alors été étudiés : la kinase Aurora B et la Rho GTPase RhoA, dont la localisation et l'activité sont primordiales pour le bon déroulement de la cytokinèse.

En effet, de façon générale Aurora B est localisée au niveau des centromères des chromosomes pendant la métaphase, où elle joue un rôle important dans le contrôle de l'attachement correcte de chaque chromatide d'un même chromosome aux pôles opposés du fuseau mitotique. Elle participe donc au point de contrôle de l'assemblage du fuseau

mitotique (SAC pour *Spindle Assembly Checkpoint*). Puis après la séparation des chromatides sœurs, Aurora B se relocalise au niveau de la *spindle midzone* pour favoriser l'organisation de l'anneau contractile d'actine qui permettra ensuite l'invagination de la membrane. Enfin, Aurora B se localise au niveau du midbody lorsque la membrane s'est invaginée et participe au contrôle de l'abscission. En particulier une activation d'Aurora B à cette étape conduit à un retard dans l'abscission et au maintien du pont intercytoplasmique pour empêcher sa régression (Carmena et al., 2012; Steigemann et al., 2009).

Afin d'étudier la localisation d'Aurora B au cours de la mitose, nous avons transfecté les cellules HeLa H2B-mCherry avec un vecteur d'expression d'Aurora B couplé à la EGFP. Puis nous avons réalisé des expériences de vidéomicroscopie sur des cellules synchronisées afin d'enrichir notre population de cellules en mitose. Nous avons observé au cours de ces expériences qu'Aurora B se localise de façon similaire dans les cellules contrôles et les cellules traitées au 20A, et ce même dans des cellules qui deviennent binucléées (cellules représentées par des étoiles sur la **Figure 28A**).

Ainsi la localisation d'Aurora B n'étant pas différente entre les cellules qui réussissent ou qui échouent leur cytokinèse, il ne semblerait pas que ce soit la localisation d'Aurora B qui soit responsable de ce phénotype.

En ce qui concerne RhoA, il s'agit d'une RhoA GTPase très importante dans le processus de cytokinèse. Elle est activée de façon très restreinte au niveau de la membrane de la *spindle midzone*, notamment grâce à l'activité d'Aurora B. RhoA est ensuite responsable de la polymérisation de l'actine afin de former l'anneau contractile d'actine responsable de l'invagination de la membrane.

Malheureusement, nous n'avons pas pu réaliser d'expériences de vidéomicroscopie comme pour Aurora B car lorsque nous réalisons la transfection de cellules avec le vecteur d'expression RhoA-GFP, même sans traitement les cellules développaient rapidement un phénotype de cellules binucléées potentiellement causé par un défaut de cytokinèse. Nous avons donc choisi d'analyser l'implication de RhoA par une technique d'immunofluorescence de RhoA, en utilisant une fixation particulière (à l'acide trichloroacétique) qui permet d'extraire uniquement le pool de RhoA qui est transloqué au niveau des membranes et représentant donc le pool actif de RhoA (Yonemura et al., 2004).

Les cellules contrôles présentent un marquage très intense de RhoA au niveau de la membrane d'invagination des cellules qui sont en division et également au niveau du midbody (représenté par des flèches sur la **Figure 28B**). En revanche, suite à un traitement au 20A, de nombreuses cellules présentent une intensité de fluorescence très faible, voire inexistante de RhoA au niveau de la membrane d'invagination (représenté par des étoiles dans la **Figure 28B**). Ces résultats suggèrent donc que le recrutement de RhoA au niveau de la membrane d'invagination est défectueux dans les cellules traitées au 20A.

De plus, nous avons réalisé un Western blot de cellules synchronisées, relâchées et traitées ou non au 20A, arrêtées à différents temps pour tenter de couvrir toute la durée de la mitose. On observe en particulier que le niveau de RhoA est similaire entre les cellules contrôles et les cellules traitées au 20A après 10h de relâche (qui correspond à un temps où une majorité des cellules commencent à entrer en mitose) (**Figure 28C**). A 11h et 12h post-relâche, qui correspondent donc à des temps où les cellules sont en majorité en télophase ou bien ont terminé leur mitose respectivement, le niveau de RhoA est augmenté dans les cellules contrôles par rapport au temps 10h. En revanche, dans les cellules traitées au 20A nous n'observons pas d'augmentation du niveau de RhoA.

Ces données suggèrent donc qu'il y aurait une diminution de la quantité globale de RhoA au cours de la mitose des cellules traitées au 20A, qui causerait donc un défaut de localisation de RhoA au niveau de la membrane d'invagination et serait ainsi responsable du défaut de cytokinèse.

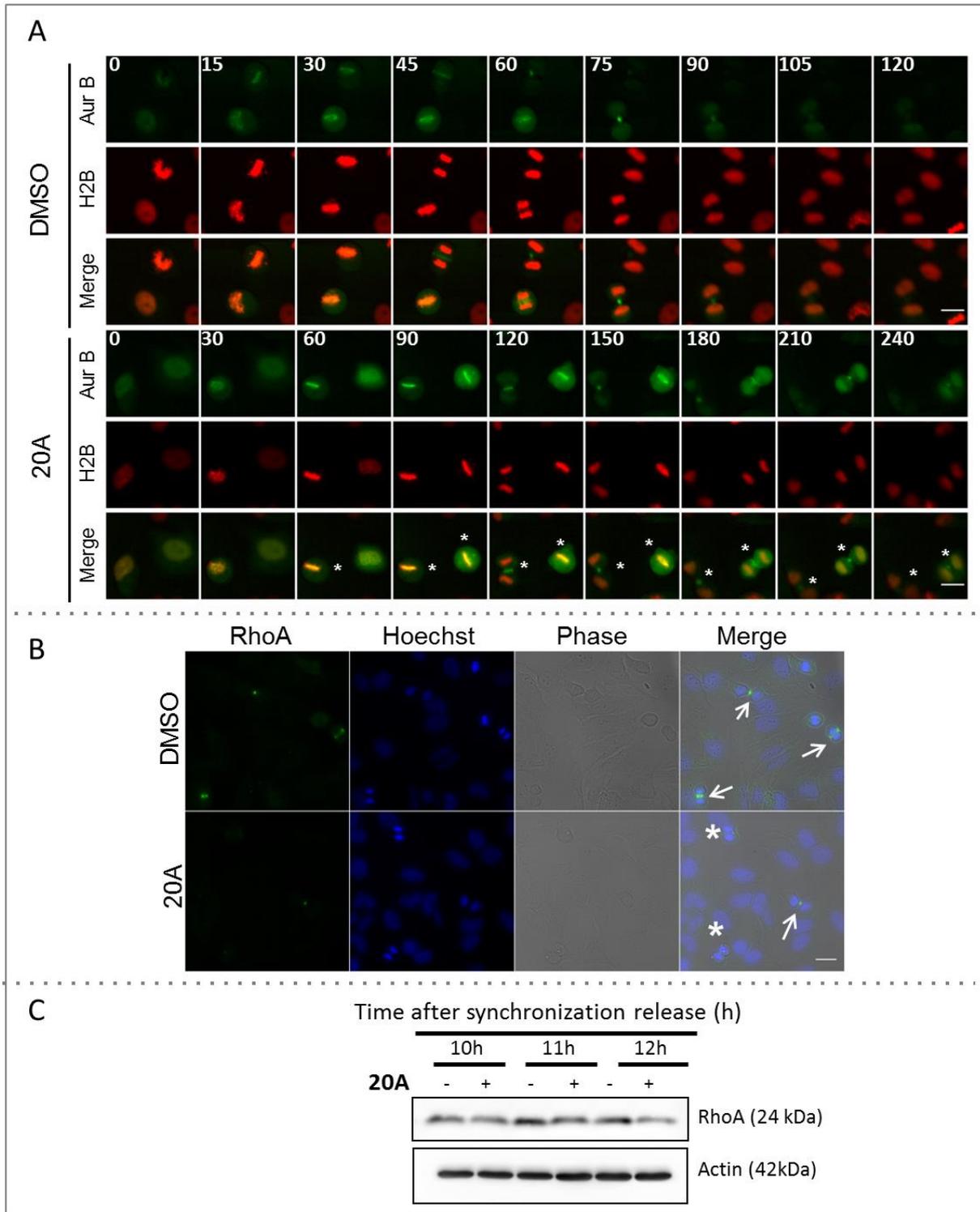


Figure 28: 20A treatment leads to failure in recruitment of RhoA at the invaginating membrane.

A) Time-lapse videomicroscopy of S-phase synchronized HeLa cells expressing H2B-mCherry transfected with EGFP-AuroraB, treated with or without 6 μ M 20A at the indicated time after mitosis start. Representative epifluorescence images of dividing cells, scale bar 25 μ m. Asterisks indicate two cells that undergo cytokinesis failure in 20A-treated condition.

B) HeLa cells were synchronized in S-phase and then released in either the presence or absence of 20A for 11h and then fixed in 10% ice cold TCA for RhoA immunostaining. Representative

epifluorescence z-projection of cells during cytokinesis are presented, scale bar 25µm. Arrows indicate RhoA localized at the invaginating membrane, asterisks indicate absence of RhoA at the invaginating membrane.

C) Immunoblot analysis of RhoA level in HeLa cells synchronized in S-phase and then released in either the presence or absence of 6µM 20A for the indicated time.

- **Implication des ROS dans l'échec de la cytokinèse.**

Pour l'étude des mécanismes en amont de RhoA et de l'échec de la cytokinèse, nous nous sommes intéressés aux ROS. En effet, certaines études ont montré une implication des ROS dans l'échec de la cytokinèse (Cho et al., 2017; Tormos et al., 2015), de plus RhoA est une protéine sensible au ROS (Hobbs et al., 2014), et certains articles ont montré que les LG4 peuvent être responsables de la production de ROS (Douarre et al., 2013; Zhuang and Yao, 2013).

Nous avons donc d'abord vérifié que le 20A induit la production de ROS par analyse en cytométrie de flux. En effet, on observe à partir de 4h de traitement une augmentation de la médiane d'intensité de fluorescence de la sonde H2DCFDA (**Figure 29A**).

Afin d'étudier le rôle de cette production de ROS, nous avons utilisé une combinaison d'antioxydants (BHA pour Butylated Hydroxyanisole et NAC pour N-Acétyl-Cystéine) qui inhibe efficacement la production de ROS induite par le 20A, en effet on observe un décalage vers la gauche de l'histogramme de fluorescence de la sonde H2DCFDA (**Figure 29B** panneau de gauche), ainsi qu'une diminution significative de la médiane d'intensité de fluorescence en présence de la combinaison de BHA-NAC par rapport à la condition de traitement au 20A seul (**Figure 29B** panneau de droite).

Puis, nous avons vérifié l'effet de ces antioxydants sur la production de cellules binucléées. Nous observons qu'en présence d'antioxydants, la proportion de cellules à double noyaux est significativement diminuée par rapport à la condition de traitement au 20A seul (20% contre 41% respectivement), ainsi que de la proportion de cellules tétraploïdes (32% contre 46% respectivement) (**Figure 29C**, panneaux de gauche et du milieu).

Il est reconnu que la production de ROS joue un rôle important dans la progression du cycle cellulaire, ainsi un niveau trop faible de ROS pourrait réduire la proportion de cellules qui progressent dans leur cycle cellulaire et réduirait donc le nombre de cellules qui arrivent en mitose. Afin de s'assurer que l'effet de l'inhibition des ROS est responsable d'une amélioration de la cytokinèse, nous avons réalisé des expériences de vidéomicroscopie à partir des cellules synchronisées en phase S et relâchées dans du milieu en présence ou non de 20A, avec ou sans les antioxydants. Puis, nous avons déterminé la proportion de cellules qui réussissent leur cytokinèse parmi la population de cellules qui réalise une mitose. Lorsque les cellules sont traitées au 20A, seul 22% des mitoses sont réalisées avec succès (**Figure 29D**). En revanche, en combinant le 20A avec des antioxydants le pourcentage de réussite des mitoses est significativement plus important, avec 47% de succès.

Nous avons également observé que les cellules en phase de cytokinèse, traitées avec la combinaison de 20A et des antioxydants, réussissent à établir un midbody (indiqué par des flèches en **Figure 29E**) en proportion plus grande que les cellules traitées au 20A seul (51% contre 21%).

Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère fortement que les antioxydants favorisent le bon déroulement du processus de cytokinèse en présence de 20A. Il semblerait donc que la production de ROS induite par un traitement au 20A est en partie responsable de l'échec de la cytokinèse que nous avons observé. Nous avons donc voulu savoir si cette production de ROS pouvait être responsable du niveau de RhoA plus faible qui est observée pendant la mitose des cellules traitées au 20A. Or il semblerait que l'utilisation des antioxydants en combinaison avec le 20A ne restaure pas le niveau de RhoA dans les cellules contrôles lorsque les cellules sont majoritairement en cytokinèse (c'est-à-dire après 11h de relâche du blocage par la thymidine) (**Figure 29F**). Nous avons également réalisé des marquages d'immunofluorescence de RhoA en présence de la combinaison du 20A et des antioxydants et nous n'observons pas non plus de restauration de la localisation de RhoA au niveau de la membrane d'invagination (résultats non présentés).

Il semblerait donc que le 20A soit responsable de l'activation de deux mécanismes, potentiellement indépendants, qui contribuent à l'échec de la cytokinèse et donc à la formation des cellules binucléées. Ces deux mécanismes sont la production de ROS et une

diminution du niveau d'expression de RhoA ainsi que de sa délocalisation de la membrane d'invagination au cours de la cytokinèse.

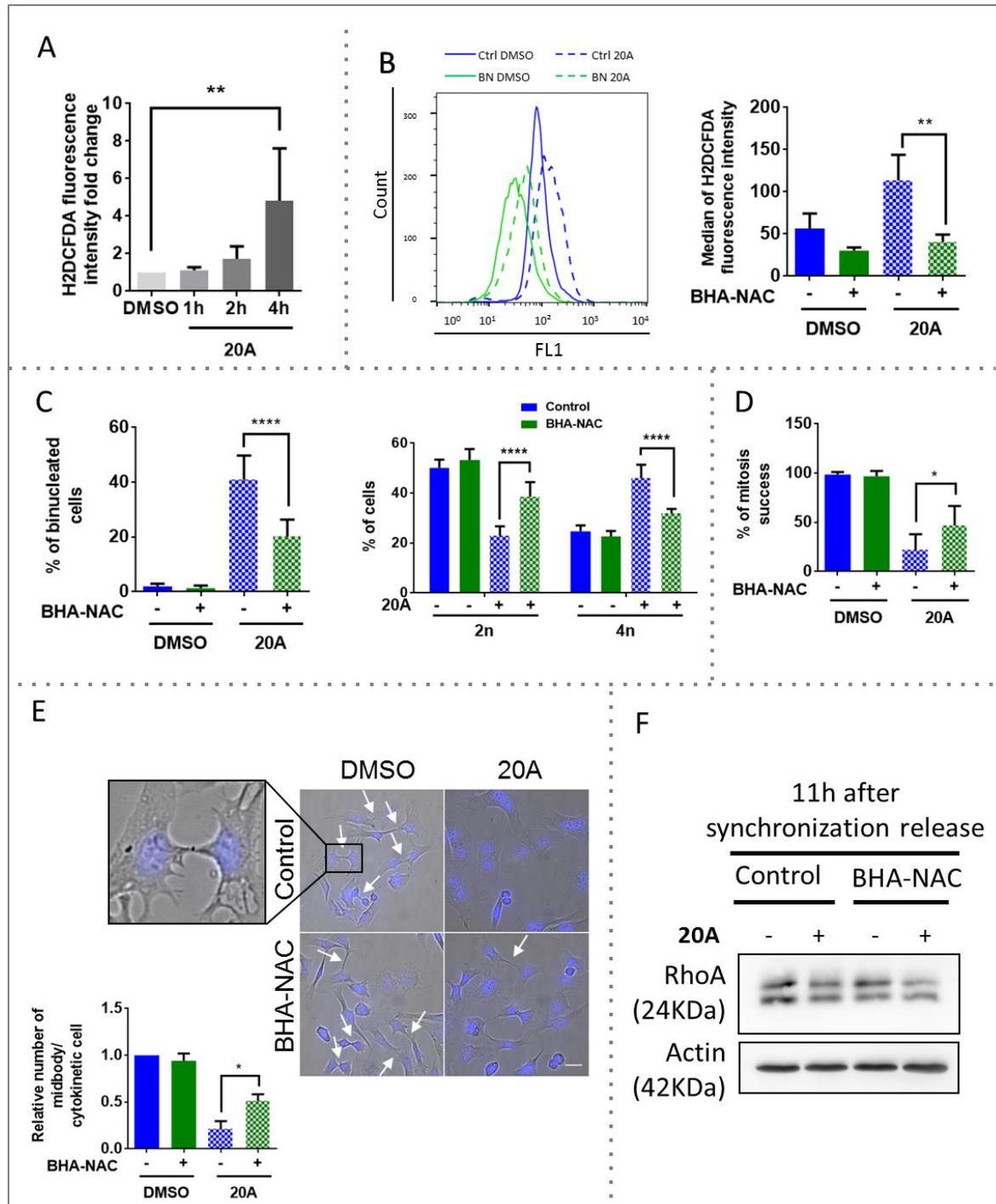


Figure 29: 20A treatment induces ROS production which contributes to cytokinesis failure. A) HeLa cells treated with or without 6 μ M 20A for the indicated time and then subjected to flow cytometer analysis for ROS production. Results are expressed as median fluorescence intensity. Data are presented as mean \pm SD of 9 values obtained from three independent experiments each performed in triplicate. ** *p*-value < 0.01 using Mann-Whitney test.

B) HeLa cells were treated for 2h with a combination of two antioxidants (100µM BHA and 5mM NAC), prior to treatment with either DMSO or 6µM 20A for 4h and then analyzed for ROS production as described in A. *Left panel*, Representative histogram of flow cytometer analysis. *Right panel*, Quantification of data presented as mean ± SD of 6 values obtained from two independent experiments each performed in triplicate. ** *p-value* < 0.01 using Mann-Whitney test.

C) HeLa cells were treated for 2h with a combination of two antioxidants (100µM BHA and 5mM NAC), prior to treatment with either DMSO or 6µM 20A for 4h. Cells were either stained with Hoechst for quantification of binucleated cells (*left panel*, as in **Figure 25A**) or harvested for DNA content analysis by flow cytometer (*right panel*, as in **Figure 25B**). The data represent the mean ± SD of values obtained from three independent experiments. **** *p-value* < 0.0001 using Mann-Whitney test.

D) HeLa cells were synchronized in S-phase by thymidine block and released in culture medium either in the presence or absence of antioxidants (100µM BHA and 5mM NAC), with or without 6µM 20A. Time lapse videomicroscopy experiments were carried out after 9h of release for assessment of cytokinesis success. Data are presented as mean ± SD of at least 50 followed cells in each condition from three independent experiments. * *p-value* < 0.05 using Mann-Whitney test.

E) HeLa cells were synchronized in S-phase by thymidine block and then released in culture medium either in the presence or absence of antioxidants (100µM BHA and 5mM NAC), with or without 6µM 20A for 11h. Cells were fixed, counterstained with Hoechst and analysed for midbody formation (dense structure between dividing cells, indicated by arrows). Data are presented as mean ± SD of at least 50 dividing cells in each condition from three independent experiments. * *p-value* < 0.05 using Mann-Whitney test.

F) Immunoblot analysis of RhoA level in HeLa cells synchronized in S-phase, released in medium containing or not 100µM BHA and 5mM NAC, with or without 6µM of 20A for 11h.

- **L'inhibition de la production des ROS en réponse au 20A ne modifie pas l'établissement de la sénescence ni l'induction de l'apoptose**

Les ROS ont souvent été associés à l'établissement de la sénescence, en particulier lorsqu'ils interviennent dans les voies de signalisation oncogéniques où ils induisent des dommages à l'ADN et favorisent ainsi l'établissement de la sénescence. De plus, dans certains contextes, la production de ROS est létale comme c'est le cas dans la ferroptose, ou dans de nombreux traitements anti-cancéreux pour lesquels il a été montré qu'une inhibition de la production de ROS par des antioxydants n'est pas souhaitable pour la thérapie. Nous avons donc voulu savoir si cette production de ROS avait un rôle dans la sénescence et la mort cellulaire induite par le 20A.

La production de ROS induite par le 20A ne semble pas être impliquée dans la sénescence, puisque les cellules traitées avec la combinaison d'antioxydants et de 20A présentent le même pourcentage de cellules sénescents que les cellules traitées au 20A seul (32% contre 35% respectivement (**Figure 30A**). Ceci est corrélé avec un niveau de p21 qui est similaire entre la condition de traitement au 20A ou en combinaison avec les antioxydants (**Figure 30B**).

De même, nous n'observons pas de différence dans la mort induite par le 20A ou par la combinaison du 20A avec les antioxydants. En effet, nous observons respectivement 37% et 41% de cellules qui présentent une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial (**Figure 30C**).

Ces données suggèrent donc que l'utilisation des antioxydants en combinaison avec le 20A ne modifient pas la réponse des cellules à l'induction de la sénescence et de la mort cellulaire. La formation de cellules binucléées suite à des traitements anti-cancéreux a été décrite pour être la cause potentielle de résistance aux traitements ou de l'apparition de métastases (Erenpreisa and Cragg, 2013; Puig et al., 2008; Weihua et al., 2011). Ainsi, la capacité des antioxydants à limiter la formation de cellules binucléées sans modifier les effets anti-prolifératifs du 20A est intéressante en termes de perspective thérapeutique.

- **L'addition de la chloroquine au 20A entraîne la mort des cellules binucléées**

Bien que l'utilisation des antioxydants en combinaison avec le 20A réduise de façon importante la proportion de cellules binucléées, celles-ci ne sont pas totalement éliminées. Il serait alors intéressant de pouvoir identifier des combinaisons de traitement qui sensibilisent ces cellules à la mort cellulaire. Or, des études suggèrent qu'une activation de l'AMPK conduit à l'induction spécifique de la mort dans des cellules tétraploïdes (Lissa et al., 2014). De plus, certaines études ont également mis en évidence que la chloroquine peut dans certains contextes activer l'AMPK (Jeong et al., 2018; Spears et al., 2016). Ainsi, comme nous avons montré dans le 2^e article que la chloroquine sensibilise de façon très importante à la mort cellulaire, nous nous sommes demandés si elle pouvait sensibiliser les cellules binucléées à la mort cellulaire.

Nous avons donc à nouveau réalisé des expériences de vidéomicroscopie afin de pouvoir suivre les cellules sur 48h de traitement, en identifiant les cellules qui sont mono- ou binucléées. En combinant le 20A avec la chloroquine aux doses habituelles, en 48h nous obtenons 100% de cellules mortes. Ainsi, afin de pouvoir observer des cellules vivantes et pouvoir répartir les cellules mono- et binucléées dans la catégorie de cellules vivantes ou mortes, nous avons dû utiliser une concentration de 20A plus faible qu'habituellement. Nous avons ainsi pu obtenir 45% de cellules mortes dans ces conditions de traitement.

Avec cette concentration plus faible de 20A, en combinaison avec la chloroquine il n'y a plus alors que 12% de cellules binucléées (**Figure 30D**). Dans ce contexte, une grande majorité de ces cellules binucléées meurent (76% des cellules binucléées, représentant 9% des cellules totales). Ces résultats suggèrent donc que la chloroquine sensibilise de façon importante les cellules binucléées à la mort cellulaire.

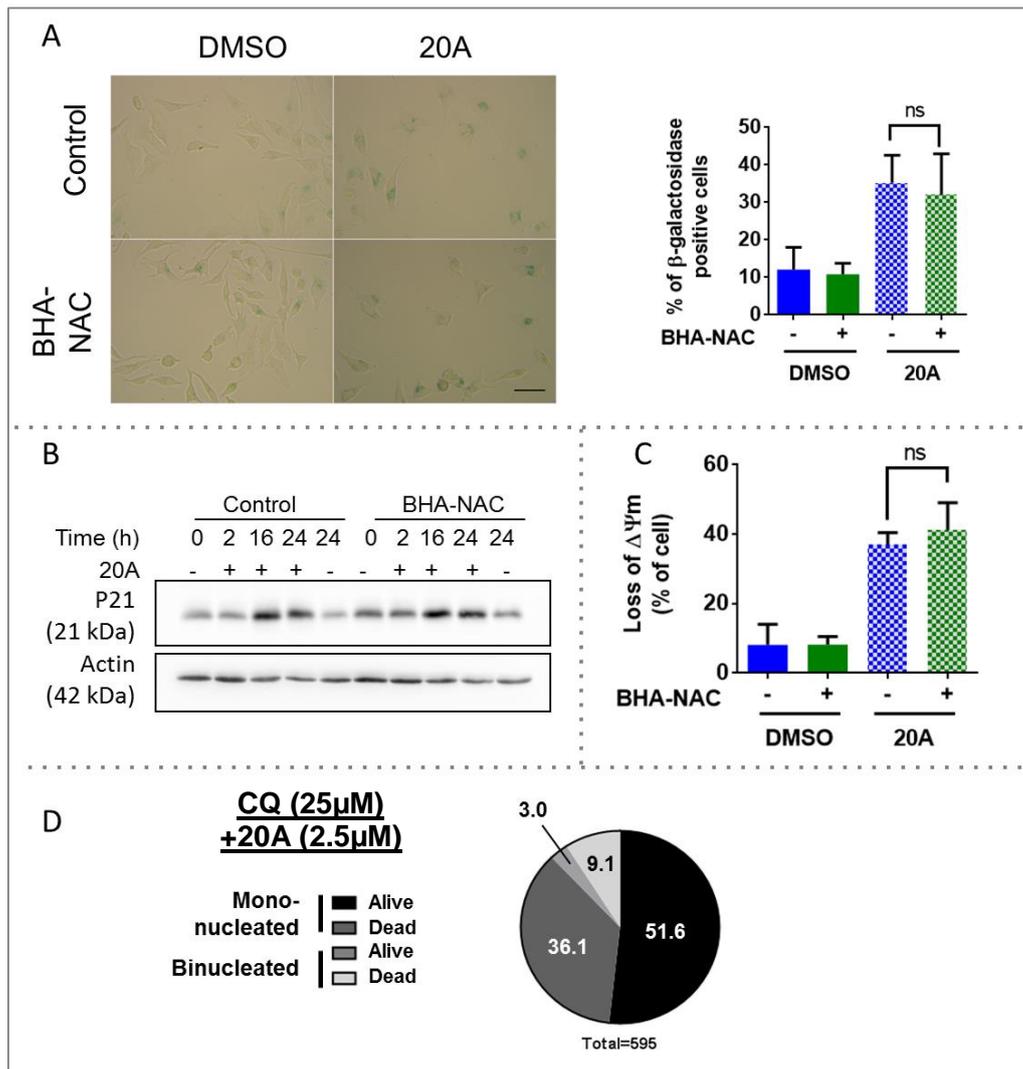


Figure 30: Effect of antioxidants and chloroquine on the outcome of 20A-treated cells.

A) HeLa cells were treated for 2h with a combination of two antioxidants (100 μ M BHA and 5mM NAC) prior to treatment with either DMSO or 6 μ M 20A for 24h. Cells were then stained for SA- β -galactosidase to detect senescence. *Left panel*, Representative images of cells harboring SA- β -galactosidase staining. *Right panel*, Percentage of senescent cells is scored for each condition. The data are presented as mean \pm SD of four independent experiments counting at least 100 cells from 10 randomly chosen fields in each experiment. ns : non significant using Mann-Whitney test.

B) and **C)** Cells were treated as in A and then subjected to either immunoblot analysis for the evaluation of p21 level (**B**), or flow cytometry analysis for evaluation of loss of mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\psi_m$) (**C**). The data represents the mean \pm SD of 9 values obtained from three independent experiments each performed in triplicate. ns : non significant using Mann-Whitney test.

D) A549 cells expressing FUCCI reporter were treated with 2.5 μ M 20A and 25 μ M chloroquine. Time lapse videomicroscopy experiments were performed to monitor the occurrence of both binucleation and cell death phenotype by tracking each cell for 48h. Data are presented as the mean percentage of cells obtained from at least 50 cells for each phenotype (total cell number = 595) from two independent experiments each performed in duplicate.

3. Conclusion

Dans cette étude, nous avons montré que des cellules traitées au 20A peuvent subir un échec de la cytokinèse au cours de la mitose, conduisant à l'apparition de cellules à doubles noyaux. Ces cellules binucléées sont alors plus sensibles à un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire et en revanche plus résistantes à la mort induite par le 20A. Ces résultats suggèrent donc que les cellules binucléées induites en réponse au 20A peuvent participer à la réponse anti-proliférative du 20A. Mais, leur résistance à la mort laisse suggérer qu'elles pourraient permettre la régénération tardive de cellules prolifératives.

Nous avons alors analysé les causes de cet échec de la cytokinèse et avons mis en évidence deux causes probables (résumées en **Figure 31**).

D'une part, nous avons observé que le traitement au 20A conduit à une réduction importante du recrutement de la Rho GTPase RhoA au niveau de la membrane d'invagination au cours de la cytokinèse. Or cette protéine joue un rôle clé dans le processus de cytokinèse, donc son absence pourrait être une cause de l'échec.

D'autre part, nous avons montré que le 20A induit une production de ROS qui est en partie responsable de ce défaut de cytokinèse, puisqu'une réduction du niveau de ROS par l'utilisation d'antioxydants améliore le déroulement de la cytokinèse. Cependant, nous n'avons pas observé de meilleur recrutement de RhoA en présence des antioxydants.

Ainsi, la compréhension des mécanismes impliqués dans le défaut de recrutement de RhoA pourraient alors permettre de mieux prévenir l'échec de la cytokinèse. Un traitement combiné des antioxydants avec un agent qui permet de restaurer le recrutement de RhoA permettrait d'abolir totalement la formation des cellules binucléées.

Enfin, nous avons montré que les cellules binucléées peuvent être sensibilisées à la mort induite par le 20A grâce à la combinaison avec la chloroquine, suggérant que la combinaison du 20A et de la chloroquine serait une stratégie thérapeutique plus avantageuse que celle des antioxydants et du 20A. Il serait alors intéressant d'identifier les mécanismes moléculaires responsables de cette potentialisation de la mort cellulaire et également d'évaluer sa généralisation à d'autres agents anti-cancéreux qui induisent la formation de cellules tétraploïdes.

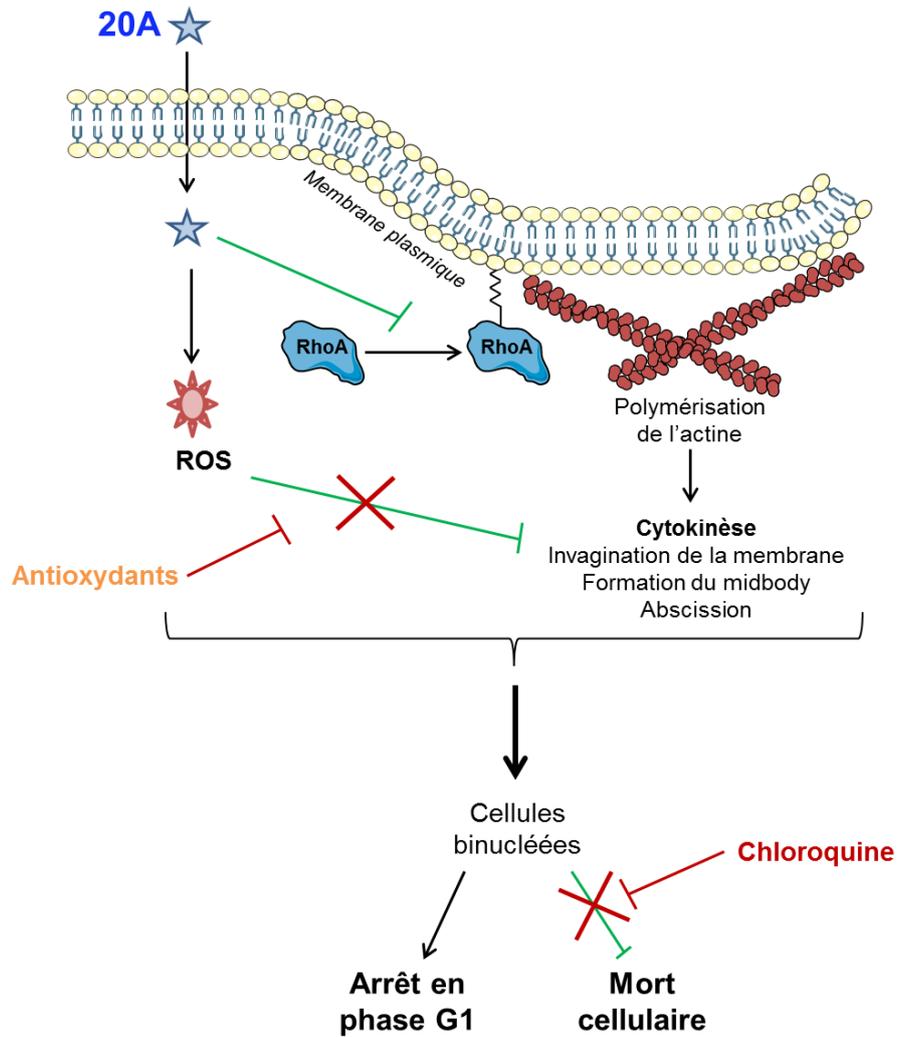


Figure 31: Schéma récapitulatif des mécanismes responsables de la formation des cellules binucléées induites par le 20A et de potentielles combinaisons thérapeutiques

DISCUSSION

ET

PERSPECTIVES

I) Activation des voies de survie par ATM en réponse à un ligand G-quadruplexe

A. ATM contrôle le destin cellulaire en réponse au LG4 20A

Nous avons vu que le 20A induit l'apoptose et la sénescence dans diverses lignées de cellules cancéreuses, et que la kinase ATM semble jouer un rôle primordial dans le destin cellulaire. L'activation d'ATM a très souvent été décrite dans la réponse aux ligands G-quadruplexe, mais son rôle dans les réponses cellulaires semble être très dépendant du LG4 utilisé. De plus, il ne semble pas y avoir de consensus sur le rôle d'ATM selon le mode d'action de LG4.

En effet, en réponse au LG4 360A, qui a été décrit pour être très sélectif des télomères, l'activation d'ATM protège d'une réparation inappropriée des télomères dysfonctionnels par les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN (Pennarun et al., 2008). Dans cette étude, les auteurs ont également montré que l'absence d'ATM ne modifie pas la réponse cellulaire vis-à-vis de la mort induite par le 360A. A l'inverse, d'autres LG4 agissant également au niveau des télomères, tels que RHPS4 ou SYUIQ-5, ont été décrits pour induire la mort cellulaire de façon dépendante d'ATM. En effet, l'inhibition d'ATM ou de la voie des DDR dépendante d'ATM réduit la sensibilité des cellules traitées à la mort cellulaire (Rizzo et al., 2009; Zhou et al., 2009).

La pyridostatine est un autre LG4 qui induit la formation de dommages à l'ADN au niveau des télomères, mais aussi de façon globale à la suite des processus de réplication et de transcription. Dans ce contexte, l'activation d'ATM est alors responsable de l'arrêt du cycle cellulaire (Rodriguez et al., 2012). Cependant, dans cette étude, la mort cellulaire n'a pas été analysée.

Enfin, nos travaux ont mis en évidence que le 20A induit des dommages à l'ADN de façon globale, et pas spécifiquement au niveau des télomères. L'activation d'ATM en réponse au 20A est alors responsable de la mise en place d'un arrêt du cycle cellulaire et de la

sénescence, et de l'induction de mécanismes protecteurs vis-à-vis de la mort cellulaire. Le rôle d'ATM en réponse au 20A semble donc corrélé avec le rôle d'ATM en réponse aux traitements anti-cancéreux inducteurs de dommages à l'ADN (tels que de nombreuses chimiothérapies ou la radiothérapie). En effet, une déficience pour ATM a très souvent été décrite pour sensibiliser les cellules cancéreuses à la mort induite par ces traitements (Aguilar-Quesada et al., 2007; Ayars et al., 2017; Batey et al., 2013; Korwek et al., 2012).

Ce résultat est particulièrement intéressant car ATM est muté et sous-exprimé dans de nombreux types de cancers tels que le poumon, le sein, les cancers colorectaux ou hématopoïétiques (Weber and Ryan, 2015). Ainsi, l'utilisation du 20A dans des modèles de cancers déficients pour ATM pourrait révéler une sensibilité plus importante de ces types de cancers vis-à-vis de cancers non mutés. Cette étude serait donc intéressante à réaliser afin de pouvoir mieux définir les modèles cancéreux les plus susceptibles au 20A.

B. Activation de l'autophagie par ATM comme voie de survie en réponse à des dommages à l'ADN

L'implication d'ATM dans l'établissement de la sénescence et dans la protection vis-à-vis de la mort cellulaire induite par le 20A soulève la question de savoir par quels mécanismes ATM joue ce rôle. En particulier, au vu du rôle potentiellement pro-tumoral de la sénescence, il est préférable de définir des stratégies thérapeutiques qui favorisent la mort cellulaire.

Parmi les voies de survie qui peuvent être activées par ATM, les données de transcriptomique et de protéomique ont montré une induction importante des voies de signalisation ATM/CHK2 et ATR/CHK1, suggérant donc l'activation des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN. De plus, ces données nous ont indiqué une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans des processus lysosomaux et en particulier de l'autophagie.

De nombreuses études ont déjà montré un lien entre ATM et l'autophagie en réponse à des inducteurs de dommages à l'ADN. Notre étude contribue donc à montrer que ce lien existe

aussi avec une autre classe de molécules induisant des dommages à l'ADN, les ligands G4. En effet, nous avons montré que l'autophagie joue le rôle de médiateur d'ATM en réponse au 20A car : d'une part l'activation de l'autophagie est dépendante d'ATM ; et d'autre part cette autophagie est impliquée dans l'établissement de la sénescence et la protection vis-à-vis de la mort cellulaire en réponse au 20A (comme ATM).

1. Cibler les mécanismes moléculaires de l'activation de l'autophagie

Dans notre étude, nous n'avons pas mis en évidence les mécanismes moléculaires responsables de l'activation de l'autophagie en aval d'ATM suite à un traitement au 20A. Or l'identification de ces mécanismes permettrait de mieux définir des cibles thérapeutiques potentielles. Ce travail servirait alors à identifier des associations entre le 20A et des agents pharmaceutiques déjà utilisés en clinique et avec lesquels il pourrait agir en synergie. De plus, nous pourrions alors définir plus précisément d'autres modèles de cancers dans lesquels le 20A serait le plus efficace.

Il existe plusieurs mécanismes d'activation de l'autophagie en réponse à des dommages à l'ADN qui ont été décrits. Ils peuvent notamment faire intervenir les voies de signalisation ATM/AMPK, PARP1/AMPK, ou encore p53/DRAM (Eliopoulos et al., 2016).

Dans notre contexte, la voie qui semble la plus intéressante à étudier serait celle décrite entre ATM et l'AMPK puisqu'en effet nous avons observé une activation de l'AMPK en réponse au 20A.

En réponse à des stress génotoxiques, ATM a été décrit pour activer l'AMPK de différentes façon. En particulier, il a été décrit qu'ATM peut phosphoryler et activer directement la kinase LKB1 (Sapkota et al., 2002). Or, cette kinase est bien connue pour activer l'AMPK, en particulier en réponse à des stress génotoxiques (Alexander et al., 2010b; Luo et al., 2013). Mais d'autres études suggèrent que LKB1 n'est pas nécessaire à l'activation de l'AMPK en réponse à ATM (Sanli et al., 2010; Storozhuk et al., 2012). En particulier, LKB1 est retrouvé muté dans de nombreux cancers (pulmonaires, ovariens, pancréatiques...) (Zhao and Xu, 2014), ainsi que dans deux les lignées cellulaires que nous avons utilisé pour cette étude

(A549 et HeLa) (Fogarty et al., 2016; Wang et al., 2016). Nos résultats suggèrent donc que LKB1 ne serait pas nécessaire pour l'activation de l'autophagie par ATM en réponse au 20A.

La voie de l'activation de l'autophagie par ATM, à la suite de stress génotoxiques, et qui serait indépendante de LKB1 pourrait notamment faire intervenir la phosphatase PTEN. En effet, une étude récente a montré qu'ATM peut phosphoryler directement PTEN, conduisant à sa translocation nucléaire où il favorise l'activité du facteur de transcription c-Jun. L'activité de c-Jun est alors responsable de l'induction de l'expression de la Sestrine 2, qui est un activateur de l'AMPK (Chen et al., 2015).

De plus, PTEN est largement connu pour son implication dans l'inhibition de l'activité de la voie PI3K/Akt. Or cette voie de signalisation, en activant le complexe mTORC1, est inhibitrice de l'autophagie. Dans leur étude ils n'ont pas observé d'effet de l'activation de PTEN par ATM sur cette voie de signalisation (Chen et al., 2015), cependant il n'est pas exclue qu'il puisse avoir un rôle dans d'autres modèles cellulaires et en réponse à d'autres agents génotoxiques.

La perte de fonction de PTEN est retrouvée dans de nombreux cancers (hématologiques, gastriques, prostatiques...) (Dillon and Miller, 2014), mais PTEN est fonctionnel dans nos lignées cellulaires et pourrait alors influencer la réponse au 20A.

Le ciblage de modèles de cancers qui présentent une déficience pour l'activation de l'AMPK en réponse à des stress génotoxiques pourrait se révéler intéressante dans un contexte de traitement au 20A. Mais, il est tout de même important de souligner que l'AMPK n'est pas uniquement impliquée dans la régulation de l'autophagie. En effet, bien que l'activation de l'autophagie par l'AMPK ait été décrite comme un mécanisme protecteur vis-à-vis des traitements anti-cancéreux (Harhaji-Trajkovic et al., 2009; Xie et al., 2011), l'activation de l'AMPK est aussi impliquée dans la potentialisation de la mort induite par des agents anti-cancéreux tels que le paclitaxel ou la vincristine (Chen et al., 2011; Rocha et al., 2011).

Ainsi, afin de pouvoir définir au mieux le potentiel thérapeutique du 20A, il est important d'étudier l'implication des différentes voies d'activation de l'AMPK dans l'induction de l'autophagie en réponse aux dommages à l'ADN induits par le 20A.

2. Cibler la stabilisation de CHK1 par l'autophagie

En plus de comprendre les mécanismes par lesquels ATM peut activer l'autophagie, la compréhension des mécanismes impliqués dans la protection vis-à-vis de l'apoptose par l'autophagie peut également être une piste intéressante à étudier pour l'amélioration de la stratégie thérapeutique.

En particulier, nous avons montré que l'autophagie pourrait favoriser la survie grâce à sa capacité de stabilisation de la forme activée de CHK1 (forme phosphorylée) probablement en améliorant l'efficacité de la réparation des dommages à l'ADN. La protéine phosphatase PPM1D/WIP1 est largement connue pour son rôle dans l'inactivation de la voie de signalisation des DDR et a été décrite pour inhiber la phosphorylation de CHK1 en réponse au ligand G4 12459 (Douarre et al., 2013). Une hypothèse serait donc que l'inhibition de l'autophagie pourrait conduire à l'augmentation de l'expression ou de l'activité de cette protéine.

La régulation de l'activation de CHK1 par l'autophagie peut également dépendre de sa dégradation par le protéasome ou le processus de CMA. En effet, il semblerait qu'une déficience de l'autophagie conduit à une augmentation de l'activité du protéasome et de la dégradation protéasomale de P-CHK1 en réponse à des dommages à l'ADN (Liu et al., 2015). Mais P-CHK1 peut aussi être dégradé par la CMA (Park et al., 2015), or cette dernière est augmentée en absence d'autophagie (Kaushik et al., 2008).

Ainsi, il serait intéressant de comprendre comment l'autophagie protège P-CHK1 de sa déphosphorylation ou de sa dégradation soit par le protéasome, soit par la CMA.

Au cours de nos travaux, nous avons observé qu'une inhibition de CHK1 en combinaison avec le 20A sensibilise les cellules à la mort, de façon similaire à l'inhibition de l'autophagie. Cela suggère qu'en réponse au 20A, l'inhibition ou la dégradation de CHK1 favorise la mort cellulaire. En revanche, nous n'avons pas étudié les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN qui sont impliqués dans la protection vis-à-vis de la mort. L'étude de ces mécanismes pourrait alors donner des pistes intéressantes afin de mieux définir les contextes cancéreux à cibler avec une combinaison de traitement entre le 20A et un inhibiteur de CHK1. Cette stratégie est particulièrement intéressante puisque le

développement d'inhibiteur de CHK1 connaît une progression importante, avec de nombreux inhibiteurs de CHK1 qui ont déjà été testés dans des essais cliniques (Ronco et al., 2016).

Il serait également intéressant d'étudier ces questions en réponse à des inhibiteurs d'ATR qui est la kinase amont de l'activation de CHK1 en réponse à des dommages à l'ADN. L'étude de l'implication d'ATR dans la réponse cellulaire au 20A permettrait aussi de mieux définir les propriétés de cette molécule.

C. D'autres mécanismes de survie activés par ATM

Notre étude a révélé tout de même que l'inhibition de l'autophagie n'est pas aussi efficace que celle d'ATM dans les réponses de sénescence ou d'apoptose, suggérant qu'il existerait d'autres mécanismes régulés par ATM qui seraient impliqués dans la résistance à l'apoptose, et favoriseraient plutôt la sénescence.

1. Activation de la voie de signalisation de p53

La voie de signalisation classique activée par la voie ATM/CHK2 (en coordination avec ATR/CHK1) en réponse à des dommages à l'ADN conduit à la phosphorylation activatrice de p53 qui génère à la fois des signaux de survie et de mort cellulaire. De façon intéressante, nous avons montré dans notre étude que les effets du 20A dans l'induction de la sénescence et de la mort cellulaire sont indépendants de l'expression de la protéine p53.

Nos études de transcriptomique et de protéomique ont montré une augmentation de la voie de signalisation de p53, malgré l'utilisation pour ces études de cellules HeLa, dont l'activité de la protéine p53 est inhibée à cause de la surexpression de la protéine E6 du virus HPV. Ainsi, ces données suggèrent fortement qu'en absence de p53 il y aurait des mécanismes de compensation qui se mettent en place en aval de la signalisation d'ATM/CHK2. En particulier dans un contexte de déficience pour p53, il a souvent été décrit que la protéine p73, qui

présente des homologies fonctionnelles et structurelles avec p53, peut surmonter cette déficience (Matt and Hofmann, 2016; Nicolai et al., 2015).

En effet, comme p53, la protéine p73 peut être activée en réponse à de nombreux signaux de stress, et en particulier des signaux génotoxiques, et en conséquence conduire à l'activation la transcription de gènes cibles de p53 tels que p21, MDM2, BAX ou PUMA. Ainsi cette propriété de p73 lui donne la possibilité de réguler l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Qian and Chen, 2013).

L'activation de p73 en réponse à des dommages à l'ADN a été moins bien étudiée que celle de p53, mais quelques mécanismes ont été mis en évidence. En particulier, ces mécanismes peuvent faire intervenir l'induction de l'expression de p73 par les kinases CHK1 et CHK2 *via* l'activité du facteur de transcription E2F1 (Urist et al., 2004). Il a aussi été décrit que l'activation de la kinase cytosolique c-Abl par ATM (Baskaran, 1997 ; Shafman, 1997) est responsable de la phosphorylation activatrice de p73 (Gong, 1999 ; Yuan, 1999). ATM peut également phosphoryler la sous-unité IKK α du complexe régulateur du NF- κ B (IKK) (Yoshida, 2007), entraînant la translocation de cette sous-unité dans le noyau où elle interagit avec p73 et favorise son activité transcriptionnelle (Furuya, 2007).

A la différence de p53, p73 possède plusieurs isoformes, dont le variant Δ Np73 tronqué en N-terminal et pour lequel il manque le domaine de transactivation. Ce variant agit comme un dominant négatif et empêche alors l'expression des gènes cibles de p73, conduisant à la survie de la cellule (Maisse et al., 2004; Nakagawa et al., 2002). C'est alors le niveau d'expression des différents variants de p73 qui permet de définir le destin cellulaire.

De plus, il a été décrit que l'expression de p73 peut être activée en réponse à un ligand G-quadruplexe (Orlotti, 2012), et p73 peut également réguler l'autophagie en réponse à des dommages à l'ADN (Kenzelmann Broz et al., 2013; Napoli and Flores, 2013). L'ensemble de ces informations suggèrent donc que l'activation de la voie de p73 semble être une bonne piste à étudier dans la réponse au 20A, et en particulier il serait intéressant de comprendre les mécanismes qui favorisent ou inhibent la mort cellulaire afin de pouvoir tenter de les moduler pour améliorer l'efficacité du 20A (Bisso et al., 2011).

2. D'autres voies de signalisation

En plus de l'implication potentielle des isoformes de p73 dans l'activation de signaux de survie en réponse au 20A à la suite de l'activation d'ATM, d'autres voies de signalisation pourraient également être impliquées et agir de concert avec p73 ou indépendamment.

En particulier, la voie du NF- κ B a été décrite pour être activée en réponse à de nombreux agents anti-cancéreux (l'étoposide, le cisplatine ou la camptothécine) et pour induire l'expression de gènes pro-survie (cycline D, survivine, BCL-2 ou BCL-XL) (McCool and Miyamoto, 2012; Wang et al., 2017). Cependant, nous avons réalisé des tests de cytotoxicité en comparant des lignées de cellules qui expriment ou non un dominant négatif de l'inhibiteur du NF- κ B, rendant la voie active, mais nous n'avons pas observé de différence d'efficacité du 20A (données non présentées). A l'inverse, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de cette voie de signalisation et n'avons pas obtenu non plus de différence concernant la mort cellulaire induite par le 20A. Nous avons donc considéré que la voie du NF- κ B ne serait certainement pas impliquée dans les mécanismes de survie en réponse au 20A.

La voie de la p38MAPK peut aussi être impliquée dans l'induction de signaux de survie en réponse à des dommages à l'ADN de façon indépendante de p53 (Reinhardt et al., 2007) et nous semble intéressante à étudier également parce qu'elle possède une implication forte dans la sénescence (Freund et al., 2011). De plus, nous avons également vu que le 20A conduit à la production de ROS, et cette voie de signalisation est très sensible au stress oxydant (Liou and Storz, 2010).

D. Complexité de la balance entre la sénescence et la mort cellulaire en réponse au 20A

1. Rôle de p21

Dans notre étude, nous avons montré que l'établissement de la sénescence est associé à une augmentation de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire p21, p27 et p16. Lorsque nous avons réalisé une sous expression de p21, nous avons effectivement observé une réduction de l'établissement de la sénescence, mais associée à peu d'augmentation de la mort cellulaire (données non présentées). Ce résultat est en contradiction avec certaines études qui montrent un rôle de p21 dans l'inhibition de l'apoptose. En effet il a souvent été décrit que l'inhibition de la sénescence par délétion de p21 favorise la mort cellulaire (Javelaud and Besançon, 2002; Martinez et al., 2002; Zhang et al., 2011). La question se pose donc de savoir quelle est la destinée des cellules qui auraient dû mourir à cause de l'inhibition de l'expression de p21 (et donc de l'inhibition de l'entrée en sénescence).

Il est important de relever qu'en réponse au 20A l'induction de l'expression de p21 est assez rapide (dès 8h de traitement), alors que l'expression des autres inhibiteurs du cycle cellulaire (p27 et p16) est plus tardive (vers 24h). Ces autres inhibiteurs et en particulier p16 peuvent aussi être impliqués dans l'établissement de la sénescence, suggérant que la sénescence pourrait s'établir plus tardivement. En effet des études ont montré qu'à la suite de l'activation de la voie de réponse des dommages à l'ADN, l'expression rapide de p21 est premièrement impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et se fait parallèlement à l'augmentation de l'expression de la SA- β -Galactosidase. Puis, un mécanisme de régulation épigénétique conduit à l'expression de p16 et des gènes des SASP plus tardivement, qui sont alors impliqués dans la stabilisation de la sénescence préalablement établie. Mais, même en absence d'augmentation de p21, la surexpression de p16 peut conduire à la sénescence de façon donc plus tardive (Ito et al., 2018; Robles and Adami, 1998).

Ces données suggèrent donc que le phénotype de sénescence, en absence de p21 pourrait se mettre en place selon une cinétique plus lente, *via* la surexpression plus tardive de p16. Il

serait alors nécessaire de réaliser une analyse de la sénescence à la suite d'un plus long traitement sur ces cellules déficientes pour p21 afin de vérifier cette hypothèse. Une autre explication pourrait être que les cellules, en absence de p21 se sont adaptées à la survie, ou alors développeront des mécanismes de mort plus tardivement.

2. Rôle d'ATM

A l'inverse de la sous expression de p21, une sous expression d'ATM réduit la sénescence et en parallèle augmente l'apoptose, et est en accord avec les nombreuses études montrant un rôle d'ATM dans la protection vis-à-vis de la mort cellulaire (Aguilar-Quesada et al., 2007; Ayars et al., 2017; Batey et al., 2013; Korwek et al., 2012). Cependant en condition de sous expression d'ATM, l'inhibition de l'apoptose ne conduit pas à une augmentation de la sénescence cellulaire. Une question intéressante qui se pose est donc de savoir ce que deviennent ces cellules qui devaient être destinées à mourir.

Il est alors important de considérer que pour l'inhibition de l'apoptose, nous avons utilisé un inhibiteur des caspases, qui intervient donc à une étape tardive dans la voie de signalisation de l'apoptose. En effet, concernant la voie de l'apoptose intrinsèque, il est admis que le point de non retour est constitué par la perméabilisation de la membrane mitochondriale (MOMP). De ce fait, l'activation des caspases qui est en aval de la MOMP devrait mener la cellule vers un mécanisme de mort cellulaire alternatif indépendant des caspases. Ce mécanisme est appelé CICD (pour *caspase-independent cell death*) et décrit plusieurs mécanismes de mort qui sont activés initialement par des stimuli apoptotiques dans des contextes où l'activation des caspases est inhibée (Tait and Green, 2008; Tait et al., 2014).

La mort par CICD présente des avantages pour la thérapie anti-cancéreuse par rapport à l'apoptose puisque d'une part, contrairement à l'apoptose la CICD a été décrite pour induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires qui faciliteraient la régression tumorale en permettant le recrutement des cellules immunitaires (Giampazolias et al., 2017). De plus, alors que l'apoptose peut favoriser la prolifération paracrine des cellules voisines,

constituant un obstacle pour la thérapie anti-cancéreuse, cette caractéristique est absente lors de l'induction de la mort par CICD (Roumane et al., 2018)

Une des caractéristique de la CICD c'est qu'elle se déroule en générale selon une cinétique beaucoup plus lente que l'apoptose, elle peut prendre plusieurs jours (Ekert et al., 2004). Mais certaines résistance à la mort par CICD ont tout de même été décrites (Hoffarth et al., 2008; Tamm et al., 2004).

De ce fait, l'analyse à plus long terme des cellules en condition d'inhibition d'ATM traitées au 20A et aux inhibiteurs de caspases permettrait de déterminer si les cellules subissent la CICD, ou si au contraire elles survivent et entrent éventuellement en sénescence. Ces études permettraient ainsi de savoir si des modèles cancéreux déficients pour ATM et pour la signalisation apoptotique peuvent être sensibles à la mort induite par le 20A.

Ces études pourraient aussi être complétées avec l'évaluation de l'inhibition de la MOMP (par exemple par sur-expression de l'anti-apoptotique BCL-2) en condition d'inhibition d'ATM afin de comprendre un peu plus le rôle des mitochondries dans le choix de la survie, de la sénescence et de la mort en réponse à l'activation d'ATM induite par le 20A.

II) La séquestration lysosomale des LG4 : quels avantages peut-on en tirer ?

A. Implication de la séquestration lysosomale pour d'autres LG4

Nous avons montré que les cellules traitées au 20A émettent une fluorescence bleue au niveau du compartiment lysosomal, suggérant que le 20A se localiserait au moins en partie au niveau des lysosomes. La séquestration lysosomale des agents anti-cancéreux est reconnue pour constituer un mécanisme de résistance aux chimiothérapies en empêchant l'accès de ces agents à leur cible moléculaire (en général l'ADN nucléaire).

Les deux seules observations avérées de LG4 dans les lysosomes ont été décrites pour les ligands BMVC et DAOTA (Kang et al., 2013; Shivalingam et al., 2015). Cependant, de nombreux LG4, dont la localisation a pu être examinée grâce à leur propriété fluorescente, présentent une localisation cytoplasmique périnucléaire. L'hypothèse souvent avancée de cette localisation cytoplasmique est que le LG4 concerné se localiserait au niveau des mitochondries ou ciblerait des ARN cytoplasmiques (Drygin et al., 2009; Faudale et al., 2012; Hampel et al., 2013; Hong et al., 2010).

Cependant, il ne faudrait pas exclure l'hypothèse que ces ligands soient séquestrés dans les lysosomes et que ce mécanisme constitue une limite dans l'efficacité anti-proliférative des LG4. En effet bien que l'implication de la séquestration lysosomale dans l'effet anti-cancéreux du BMVC n'ait pas été évaluée, il a été montré que le BMVC se localise en particulier dans les lysosomes des cellules cancéreuses résistantes aux chimiothérapies et que l'induction de la LMP avec la LLOMe favorise sa relocalisation nucléaire (Kang et al., 2013).

Dans notre étude, en combinant la chloroquine avec le 20A, nous induisons la LMP et augmentons la mort cellulaire induite par le 20A. Ces données suggèrent que le 20A pourrait être libéré de sa séquestration par la combinaison de traitement grâce à la LMP et serait ainsi adressé au niveau de ses cibles cellulaires spécifiques pour favoriser la mort cellulaire.

Nous n'avons pas pu observer de fluorescence du noyau lors de ces expériences, une des explications possible serait une faible capacité de fluorescence du 20A qui se retrouverait en faible concentration dans le volume important que constitue le noyau, ne permettant pas sa détection avec le matériel dont nous disposons.

Il serait alors intéressant de réaliser un marquage du 20A avec un fluorochrome plus puissant afin de pouvoir le localiser à la suite de la LMP. Une technique utilisable serait la « *click chemistry* ». Cette technique nécessiterait alors de produire un dérivé du 20A fonctionnalisé avec un groupement orthogonal alkyne afin que ce dernier puisse s'associer avec un fluorophore (contenant un groupement azide) en présence de sulfate de cuivre selon une réaction dite de "cycloaddition alkyne-azide catalysée par le cuivre ». Cette réaction peut se réaliser sur cellules fixées après un traitement avec le 20A fonctionnalisé (Kolb et al., 2001; Mai et al., 2017; Rodriguez et al., 2012).

Ainsi, notre étude et celle de Kang et al. mettent en évidence l'intérêt d'étudier la séquestration lysosomale des LG4 et de la cibler avec des agents qui induisent la LMP afin d'augmenter l'effet anti-cancéreux de ces molécules. Il serait alors intéressant de réaliser une étude plus globale sur plusieurs familles de LG4 afin de déterminer ceux qui pourraient être susceptibles à cette séquestration. De plus, les propriétés chimiques des molécules constituent des facteurs déterminants dans la localisation lysosomale, en particulier la valeur du pKa (indicateur de la constante d'acidité), et la lipophilicité (Trapp et al., 2008). Des études de la relation entre ces propriétés physico-chimiques et la séquestration lysosomale des LG4 permettraient d'améliorer la synthèse de nouveaux composés, qui seraient moins susceptibles d'être séquestrés dans les lysosomes, et potentiellement plus efficaces.

B. Effets de l'accumulation des LG4 sur les fonctions lysosomales

1. Identification des cibles moléculaires du 20A

L'accumulation du 20A au niveau des lysosomes soulève la question de ses effets au niveau des fonctions lysosomales. En particulier, nous avons remarqué une légère augmentation de

la taille des lysosomes dans les cellules traitées avec le 20A (qui est largement plus importante pour la chloroquine seule et dans la condition de combinaison). Cette augmentation de la taille des lysosomes est bien connue suite à la séquestration de composés cationiques dans les lysosomes et serait causé par un influx d'eau dans les lysosomes qui pourrait, dans certains contextes, moduler le pH de ces lysosomes (Marceau et al., 2012).

Le marquage des cellules traitées au 20A avec la sonde LysoTracker Red DND-99 (qui marque les vésicules acides) suggère qu'un traitement au 20A n'induit pas d'élévation importante du pH des lysosomes. Cependant, cette sonde n'est pas très sensible à de faibles variations de pH, suggérant que d'autres sondes plus sensibles devraient être utilisées pour répondre à cette question (Guha et al., 2014).

De plus, nous n'avons pas adressé la question des cibles potentielles du 20A dans les lysosomes telles que les hydrolases acides, ou d'autres protéines situées dans ce compartiment cellulaire. Il serait alors intéressant d'identifier les cibles moléculaires du 20A *in situ*. Des modifications chimiques du 20A permettraient l'ajout d'un groupement multifonctionnel (par exemple en conjuguant le 20A avec des nanopolymères ou en le fonctionnalisant par un « *chloroalcane capture tag* »). Ces groupements multifonctionnels permettront alors de conserver l'interaction entre le 20A et ses cibles moléculaires, de purifier le 20A et de ses interactants, et enfin d'identifier ces interactants par spectrométrie de masse (Hu et al., 2011; Ohana et al., 2015).

La recherche de la meilleure technique qui ne modifie pas la localisation subcellulaire du 20A et ses propriétés anti-prolifératives sera alors nécessaire. Cette technique pourrait en plus être adaptée pour le couplage à un fluorochrome qui permettrait donc de visualiser l'éventuelle relocalisation du 20A dans le noyau lors d'un traitement combiné de la chloroquine et du 20A. Cela permettrait de confirmer l'hypothèse que nous avons émise et se substituerait à la technique de « *click chemistry* » que nous avons cité précédemment.

2. Activation de l'autophagie par la séquestration lysosomale du 20A ?

Il a été décrit que l'accumulation de bases faibles dans les lysosomes peut être responsable de l'activation de TFEB (Zhitomirsky and Assaraf, 2015a). TFEB est le facteur de transcription principal de la biogenèse des lysosomes, mais il peut aussi induire l'expression de gènes autophagiques, et contribuer ainsi à l'activation de ce processus (Settembre et al., 2011). Il est régulé en amont par mTOR, qui joue un rôle inhibiteur de TFEB (Martina et al., 2012). Nous avons effectivement observé qu'en réponse au 20A, mTOR est inhibé, et les études de transcriptomique et de protéomique montrent une augmentation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans les fonctions lysosomales, et en particulier de gènes impliqués dans l'autophagie. Ces résultats suggèrent donc fortement que TFEB pourrait être activé en réponse à l'accumulation lysosomale du 20A.

De plus, nous avons mis en évidence (dans le premier article) que l'autophagie est activée à la suite d'un traitement au 20A, de façon dépendante d'ATM. Cette voie de signalisation est généralement impliquée dans l'activation du processus autophagique par une cascade de phosphorylation de différents acteurs de l'autophagie, passant par l'activation de l'AMPK qui est responsable de l'inhibition de mTOR (régulateur négatif de l'autophagie) et l'activation du complexe ULK1 (complexe initiateur de l'autophagie).

Ainsi, en réponse au 20A, il se pourrait que la combinaison des effets du 20A au niveau lysosomal et au niveau nucléaire favorise l'autophagie. En effet, la séquestration du 20A par les lysosomes induirait l'augmentation de l'expression des gènes de l'autophagie par l'inhibition de mTOR et l'activation de TFEB. Alors que les dommages à l'ADN causés par le 20A au niveau nucléaire, conduirait à des phosphorylations activatrices des protéines de l'autophagie.

TFEB pourrait alors constituer une cible potentielle à inhiber pour améliorer l'efficacité du 20A, mais également l'efficacité d'autres agents anti-cancéreux qui sont séquestrés dans les lysosomes. L'inhibition de TFEB pourrait alors avoir deux objectifs : d'une part inhiber sa capacité à activer l'autophagie, et d'autre part inhiber la production de nouveaux lysosomes qui contribuent à augmenter le potentiel de séquestration des agents anti-cancéreux dans ces nouveaux lysosomes.

Cependant, à l'heure actuelle, les stratégies thérapeutiques de ciblage de TFEB sont plutôt à visée de stimulation de son activité, en particulier dans des contextes d'obésité, de maladie de Parkinson, ou encore de maladies de stockage lysosomales (Napolitano and Ballabio, 2016). De ce fait, peu de molécules ont été étudiées pour leur potentiel à inhiber TFEB, et son inhibition pourrait d'ailleurs être très délétère d'un point de vue global, en particulier au niveau d'organes qui présentent une activité lysosomale intense telle que le foie.

Il est donc nécessaire d'étudier plus en détail les mécanismes impliqués dans l'activation de TFEB à la suite de la séquestration lysosomale du 20A (et d'autres agents anti-cancéreux), et de comprendre le rôle qu'il y joue.

C. Conséquences de la LMP sur la mort cellulaire

La combinaison de traitement du 20A (ou de ses dérivés) et de la chloroquine conduit à l'augmentation importante de la proportion de cellules qui subissent la LMP et est associée à une augmentation importante de la mort cellulaire. L'augmentation de la mort cellulaire pourrait être liée à plusieurs phénomènes : d'une part la libération du 20A de sa séquestration lysosomale qui pourrait plus facilement atteindre ses cibles nucléaires ; d'autre part par induction de la mort lysosomale (LDCD pour *lysosomal dependent cell death*) qui est liée au déversement du contenu lysosomal dans le cytoplasme. La LDCD peut être impliquée dans les processus de mort de plusieurs façons : les cathepsines lysosomales peuvent interagir avec la machinerie apoptotique pour favoriser ce processus, elles peuvent aussi induire la mort cellulaire à elles seules, ou alors l'acidification généralisée du cytoplasme peut conduire à un type de mort nécrotique (Aits and Jäättelä, 2013; Wang et al., 2018).

Nous avons montré que la combinaison du 20A et de la chloroquine conduit à une augmentation importante de la mort apoptotique, cependant la mort cellulaire n'est pas totalement inhibée par l'inhibition des caspases, suggérant d'une part que la combinaison du 20A et de la chloroquine pourrait être partiellement efficace dans des modèles de

cancers déficients pour l'apoptose. Mais elle suggère également que d'autres types de mort cellulaire pourraient être impliqués.

Nous avons alors testé l'implication de la LDCD, de la ferroptose et de la nécroptose. La LDCD est souvent dépendante de l'activité de cathepsines lysosomales, et peut être inhibée par des inhibiteurs de cathepsine tels que E64d et Pepstatine A (Droga-Mazovec et al., 2008; Emert-Sedlak et al., 2005). La ferroptose est dépendante d'une peroxydation importante des lipides catalysée par le fer, et peut être inhibée par la Ferrostatine 1 (Cao and Dixon, 2016; Dixon et al., 2012). La nécroptose est dépendante de l'activité de la kinase RIP1 et peut être inhibée par la Nécrostatine-1 (Degterev et al., 2005; Proskuryakov and Gabai, 2010). Cependant aucun de ces inhibiteurs n'a montré d'effets d'inhibition de la mort cellulaire induite par le 20A et la chloroquine.

Des analyses complémentaires doivent être réalisées avec d'autres inhibiteurs de ces voies de mort cellulaires (ou par des sous-expressions de gènes) afin de confirmer ces résultats. De plus, il faudrait réaliser un large criblage d'inhibiteurs d'autres voies de mort cellulaire afin d'identifier des inhibiteurs potentiels de cette mort cellulaire, d'en comprendre les mécanismes et d'étudier son intérêt pour une éventuelle thérapie anti-cancéreuse.

De plus, comme nous l'avons indiqué précédemment, des études complémentaires doivent être réalisées afin de confirmer l'hypothèse de la relocalisation nucléaire du 20A (ou de ses dérivés) suite à la LMP induite par la combinaison avec la chloroquine, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'augmentation de la mort cellulaire induite par la combinaison de ces LG4 avec la chloroquine.

Il est intéressant de noter également que l'induction de la LMP conduit à une inhibition du processus de l'autophagie (par inhibition de la capacité des lysosomes à dégrader le contenu des autophagosomes). Or, l'autophagie est impliquée dans de nombreux contextes dans la mort cellulaire soit en la favorisant, soit en l'inhibant (Fitzwalter and Thorburn, 2015). Pour rappel, il existe trois types d'autophagie selon le mode d'adressage des cargos à dégrader : la macro-autophagie, la micro-autophagie et la CMA.

Dans notre étude, nous n'avons pas observé de différence de mort cellulaire induite par la combinaison du 20A et de la chloroquine dans des cellules déficientes pour la macro-autophagie « conventionnelle », c'est-à-dire déficientes pour ATG5 et ATG7 (et de ce fait

déficientes pour la production du LC3-II). Ces résultats suggèrent donc que l'autophagie « conventionnelle » n'est pas impliquée dans cette potentialisation. Cependant, même en absence d'ATG5 et d'ATG7, il a été décrit qu'une macro-autophagie « alternative » permet la formation de vésicules autophagosomales, de façon indépendante de LC3, qui sont dégradées par fusion avec le lysosome (Nishida et al., 2009). Bien que l'implication de ce processus dans les phénomènes de mort cellulaire n'ait pas encore été définie (Shimizu, 2018), il se pourrait que cette autophagie puisse être perturbée par la LMP induite par la combinaison du 20A et de la chloroquine et puisse contribuer au phénotype de mort cellulaire observé.

La CMA ne fait pas non plus intervenir les protéines ATG5 et ATG7 au cours de son processus. Ce type d'autophagie est en plus déjà connu pour son implication dans des mécanismes de mort cellulaire, soit en favorisant celle-ci ou en l'inhibant (Ouchida et al., 2018; Xie et al., 2015).

Il serait alors intéressant de savoir si ces processus autophagiques sont induits en réponse au 20A, et en particulier si l'addition de la chloroquine peut favoriser la mort cellulaire en inhibant ces processus.

D. Origine de la LMP

Nous avons montré que la combinaison de la chloroquine et du 20A ou de ses dérivés conduit à une augmentation importante de la LMP. De plus les dérivés du 20A sont aussi capables d'induire la LMP lorsqu'ils sont utilisés seuls. Cette propriété pourrait ainsi expliquer leur meilleure efficacité anti-proliférative par rapport au 20A. L'étude des mécanismes moléculaires responsables de l'induction de la LMP permettrait de mieux comprendre le rôle de la chloroquine dans la potentialisation de la mort induite par la combinaison, ainsi que la relation entre la structure et l'effet anti-prolifératif des dérivés du 20A.

1. Les interactions directes avec les lipides de la membrane lysosomale

Les agents lysosomotropiques, selon leurs propriétés physico-chimiques, peuvent interagir avec la membrane lysosomale. Ces interactions peuvent constituer soit des interactions hydrophobes ou électrostatiques et peuvent ainsi conduire à déstabiliser la membrane lysosomale (Kazmi et al., 2013; Kornhuber et al., 2010).

Les interactions hydrophobes conduisent à une intercalation des agents lysosomotropiques dans la membrane lysosomale, mais restent en contact avec le milieu acide de la lumière des lysosomes et sont donc en équilibre entre des formes chargées positivement ou non. Les formes chargées sont insérées de façon moins stable dans la membrane lysosomale et peuvent alors se relocaliser dans la lumière des lysosomes. Ce sont ces mouvements qui seraient responsables de la LMP.

Les interactions électrostatiques se font en général avec des phospholipides chargés négativement, c'est en particulier le cas de la chloroquine (Barroso et al., 2015). Ces interactions pourraient aussi déstabiliser la membrane lysosomale.

Ainsi, une interaction différentielle avec les lipides de la membrane lysosomale pourrait permettre d'expliquer les différences d'induction de LMP entre le 20A et ses dérivés.

De plus, il a été décrit qu'un traitement combiné d'agents lysosomotropiques peut contribuer à une intercalation préférentielle de l'agent le plus lipophile dans la membrane lysosomale, et diminuer la concentration intralysosomale de ces agents par induction de la LMP (Kornhuber et al., 2010). Ce mécanisme pourrait alors expliquer la potentialisation de la LMP observée entre les traitements par le 20A seul (ou ses dérivés seuls) et la combinaison de traitement de ces LG4 avec la chloroquine.

2. Modifications de la structure de la membrane lysosomale

En plus des interactions directes que les agents lysosomotropiques peuvent avoir avec les constituants de la membrane lysosomale, ces molécules peuvent aussi influencer de façon indirecte la structure de cette dernière. La composition en lipides de la membrane

lysosomale peut contribuer à déstabiliser cette dernière. En particulier, la membrane est plus sensible à la LMP lorsqu'elles sont riches en acide arachidonique (Windelborn and Lipton, 2008; Zhang et al., 2006), ou en sphingomyéline (Heinrich et al., 2004; Ullio et al., 2012). A l'inverse, elle est plus résistante à la LMP lorsque le niveau de cholestérol est élevé (Appelqvist et al., 2011; Hao et al., 2008).

En particulier, nos études de transcriptomique et de protéomique ont montré une augmentation importante de l'expression des enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique en réponse au 20A. Ces résultats suggèrent donc que des modifications dans ce métabolisme pourraient contribuer à modifier la composition en lipide de la membrane lysosomale et sensibiliser ainsi à la LMP induite par la combinaison du 20A et de la chloroquine.

Etant donné qu'il a déjà été décrit que la chloroquine rend les cellules plus sensibles à la LMP lorsque les membranes lysosomales sont pauvre en cholestérol (King et al., 2016), nous avons évalué cette hypothèse en utilisant un inhibiteur du transport du cholestérol qui conduit à l'augmentation du cholestérol dans la membrane lysosomale (Appelqvist et al., 2011). Cependant, nous n'avons pas observé d'effet protecteur vis-à-vis de la LMP induite par la combinaison du 20A et de la chloroquine, ni sur la mort cellulaire (données non présentées). Cette étude pourrait alors être complétée par une expérience qui consiste à ajouter directement du cholestérol (une forme soluble dans l'eau et qui s'intercale dans les membranes lysosomales) afin de s'assurer que la composition en cholestérol de la membrane lysosomale ne protège pas de la LMP induite par la combinaison du 20A et de la chloroquine.

D'autres modifications de la composition en lipide de la membrane lysosomale pourraient alors être évaluées. En particulier, il a été décrit que la modulation de l'activité enzymatique de l'ASM (*acid sphingomyelinase*) par un composé lysosomotropique (la simarésine), conduit à l'accumulation de la sphingomyéline dans la membrane lysosomale et favorise la LMP (Petersen et al., 2013). L'inhibition de l'activité enzymatique de l'ASM induite par la simarésine peut être contrée par une surexpression de la protéine chaperonne Hsp70. Il pourrait alors être intéressant d'étudier l'effet d'une surexpression de Hsp70 afin de mieux comprendre les différents mécanismes impliqués dans cette LMP.

Il a également été décrit que BAX peut se retrouver transloqué au niveau de la membrane lysosomale et participer ainsi à la mort par LMP (Guan et al., 2015; Karch et al., 2017). Cette translocation semble dépendante de l'interaction de BAX avec la protéine lysosomale DRAM1. Ainsi la question de l'implication de BAX et DRAM1 dans la LMP induite par la combinaison de 20A et de chloroquine pourrait aussi être adressée.

De nombreuses études ont également souligné l'implication des ROS dans l'induction de la LMP (Doulias et al., 2007; Eno et al., 2013; Leow et al., 2016; Mai et al., 2017; Ostefeld et al., 2005). Nous avons montré que le 20A induit une augmentation de la production de ROS qui peut être efficacement inhibée par la combinaison des antioxydants BHA et NAC. Nous avons donc évalué l'effet de ces antioxydants sur la LMP induite par le traitement combiné du 20A et de la chloroquine, mais n'avons pas observé de diminution de la LMP.

Cependant, il n'est pas exclu que la production de ROS soit impliquée dans cette LMP et des études supplémentaires avec d'autres antioxydants sont nécessaires. En effet, en réponse à la simarésine, il a été montré que seuls certains antioxydants (α -tocophérol et γ -tocophérol) peuvent inhiber la mort induite par la LMP. Et en particulier les antioxydants BHA et NAC se sont révélés inefficaces (Ostefeld et al., 2005). Ces antioxydants ciblent des types de ROS différents (lipidiques ou cytosoliques), suggérant que la LMP peut aussi dépendre de la nature de la cible des ROS.

E. Un ciblage plus spécifique des cellules cancéreuses ?

Il a été décrit qu'au cours de la tumorigenèse des modifications du compartiment lysosomal importantes s'établissent, les rendant plus sensibles à la LMP et à la mort par LMP (Fehrenbacher et al., 2004; Kallunki et al., 2013). Nous avons mis en évidence que les dérivés du 20A, peuvent induire la LMP à eux seuls dans des cellules cancéreuses.

En parallèle, de nombreuses études ont reporté que les cellules transformées sont plus sensibles aux LG4 que les cellules normales. A l'heure actuelle, les mécanismes qui permettent d'expliquer une augmentation de la sensibilité des cellules cancéreuses à un

traitement aux LG4 suggèrent l'implication d'une augmentation du niveau basale de dommages à l'ADN et de déprotection des télomères dans les cellules transformées (Salvati et al., 2015).

Ainsi, la mise en évidence de la séquestration lysosomale de certains LG4 et de leur capacité à déstabiliser la membrane lysosomale laisse suggérer que l'induction de la LMP par les LG4 pourrait aussi être un mécanisme par lequel les LG4 sensibilisent les cellules transformées à la mort cellulaire. Il serait alors très intéressant d'analyser la capacité des dérivés du 20A à sensibiliser les cellules transformées à la mort cellulaire par rapport à des cellules normales. Il pourrait aussi être envisagé d'analyser la capacité des LG4, pour lesquels il a été affirmé que les cellules cancéreuses sont plus sensibles que les cellules normales, à induire la LMP.

De plus, certains LG4 pourraient être séquestrés dans les lysosomes sans être capable à eux seuls de déstabiliser la membrane lysosomale (comme c'est le cas pour le 20A). De ce fait, une combinaison avec la chloroquine pourrait favoriser la LMP, et potentiellement participer à une mort différentielle entre des cellules normales et transformées. Ainsi, l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la LMP induite par la combinaison de la chloroquine et du 20A (ou de ses dérivés) permettrait de mieux évaluer le potentiel thérapeutique d'une combinaison de la chloroquine avec des LG4.

Si ces études se révèlent concluantes, nous disposerions d'une plus large fenêtre thérapeutique pour le 20A (ou ses dérivés), et pourrions envisager de progresser vers des modèles *in vivo* pour l'étude de cette combinaison.

III) Améliorer l'efficacité thérapeutique du 20A en ciblant les cellules binucléées

Nous avons montré qu'un traitement au 20A conduit à une augmentation de la proportion de cellules binucléées à cause d'un échec de la cytokinèse. De plus ces cellules binucléées sont plus susceptibles à un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire et plus résistantes à la mort induite par le 20A que les cellules mononucléées. Cet échec de la cytokinèse semble être la conséquence d'un mauvais recrutement de RhoA au site de division et d'une augmentation de la production de ROS dans les cellules. Cependant, l'inhibition de la production de ROS n'inhibe pas totalement la formation de ces cellules binucléées.

De nombreuses études ont suggéré que les cellules polyploïdes sénescents (induites par de nombreux agents anti-cancéreux) peuvent participer au risque métastatique ou à la résistance aux chimiothérapies en s'échappant de leur état de sénescence (Coward and Harding, 2014; Erenpreisa and Cragg, 2013). Ainsi, la compréhension des mécanismes moléculaires responsables de cette binucléation permettrait d'identifier des cibles spécifiques à moduler pour empêcher la survenue de ce phénotype. Une autre stratégie qui peut être utilisée serait de sensibiliser ces cellules binucléées à la mort cellulaire afin de les éliminer.

A. Empêcher la formation de cellules binucléées

1. Mécanismes du défaut de recrutement de RhoA

RhoA est une protéine majeure impliquée dans la régulation de la formation de l'anneau contractile d'actine au cours de la cytokinèse. Il s'agit d'une RhoA GTPase, qui est active sous forme liée au GTP et inactive sous forme liée au GDP. Sous sa forme active elle favorise l'activité de protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine. Ainsi, au cours de son activation elle se retrouve transloquée à la membrane plasmique (grâce à l'insertion dans la

membrane plasmique d'un groupement prénylé de RhoA) et échange son GDP en GTP sous l'action de facteurs d'échange de nucléotides (GEF). Une fois à la membrane et activée, RhoA peut être inactivée par des protéines régulatrices qui activent l'activité GTPasique de RhoA (GAP), conduisant à l'hydrolyse de son GTP et à l'apparition de la forme RhoA-GDP inactive (Jordan and Canman, 2012).

En plus de la régulation de RhoA par les GEF et les GAP, la forme cytoplasmique libre et inactive de RhoA est stabilisée par une interaction avec des GDI (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*). En effet, en absence de GDI, le lot inactif de RhoA est dégradé par le protéasome (Boulter et al., 2010).

Il a également été décrit que le lot actif de RhoA à la membrane plasmique peut être dégradé par l'autophagie au cours de la cytokinèse (Belaid et al., 2013).

Ainsi, en réponse au 20A, l'observation à la fois d'une diminution du recrutement de RhoA à la membrane d'invagination et d'une diminution du niveau de RhoA total au cours de la cytokinèse pourrait être liée à une dérégulation de l'interaction entre RhoA et le facteur GDI qui joue un rôle important dans sa stabilisation, ou à une augmentation de la dégradation de RhoA actif par l'autophagie.

En inhibant l'autophagie, nous n'avons pas observé de différence de proportion de cellules binucléées induite par le 20A, nous avons donc écarté son implication dans ce processus.

Nous avons alors tenté d'évaluer le rôle du protéasome dans la dégradation de RhoA, cependant nous avons été confrontés à des problèmes de toxicité importante lorsque le protéasome est inhibé dans des conditions de traitement au 20A. Nous avons alors tenté des expériences à temps plus court en synchronisant les cellules en phase S et en les relâchant soit en milieu avec le 20A seul ou en combinaison avec l'inhibiteur de protéasome. Cependant, nous n'avons observé aucune cellule en mitose après 10h30 de relâche dans la condition avec l'inhibiteur de protéasome, et ce même lorsque cet inhibiteur est ajouté à 9h30 après la relâche. Ces observations sont liées au fait que le protéasome joue un rôle trop important dans la progression dans le cycle cellulaire.

Ainsi, afin de vérifier l'hypothèse de la dégradation accrue de RhoA par le protéasome, il serait intéressant d'étudier l'implication d'une dérégulation de ces GDI en réponse au 20A, soit en termes de niveau d'expression ou alors en termes d'interaction avec RhoA. En

particulier, il a été décrit que l'activité de la kinase Src, par phosphorylation du GDI, peut inhiber l'interaction entre RhoA et son GDI (DerMardirossian et al., 2006).

Cette kinase Src semble particulièrement intéressante car son activité serait également impliquée dans la formation de cellules tétraploïdes dans le foie. En effet, le foie adulte des mammifères présente de façon physiologique des hépatocytes binucléés, qui sont issus d'un défaut de cytokinèse. Il a été mis en évidence qu'une des voies de régulation de cet échec de la cytokinèse fait intervenir l'activation de la voie du TGF β , et une délocalisation de RhoA du site de division de façon dépendante de l'activité de la kinase Src (De Santis Puzzonia et al., 2016).

Ainsi, il serait intéressant de savoir si la kinase Src peut également être impliquée dans la formation de cellules binucléées en réponse au 20A, et s'il est possible de moduler son activité afin d'éviter l'apparition de ces cellules.

2. Mécanismes de l'implication des ROS dans la cytokinèse

De façon intéressante, nous avons mis en évidence que la production de ROS induite par le 20A est en partie responsable de l'échec de la cytokinèse observé. Les ROS ont déjà été impliqués dans un échec de la cytokinèse dans des cellules hépatiques normales ou des lignées de cellules cancéreuses (Cho et al., 2017; Tormos et al., 2015). Dans l'étude de Cho et al., il a été proposé que les ROS conduisent à l'apparition de dommages à l'ADN qui sont responsables de la formation de ponts de chromatine au cours de l'anaphase et activent ainsi le point de contrôle de la tétraploïdie (via l'activation d'Aurora B). Cependant nous n'avons pas observé d'augmentation importante de la proportion de cellules présentant des ponts de chromatine à la suite d'un traitement au 20A.

Dans ces deux études, la localisation de RhoA n'a pas été étudiée, alors qu'il a été décrit que l'activité de RhoA peut être modulée par les ROS. En particulier, un niveau élevé de stress oxydant conduit à l'inactivation de RhoA (Heo et al., 2006). Dans notre étude nous n'avons pas observé de relocalisation de RhoA à la membrane d'invagination ni de restauration du

niveau de RhoA en présence d'antioxydants. Pourtant, l'inhibition de la production de ROS induite par le 20A améliore de façon importante le déroulement de la cytokinèse.

Une explication potentielle à cette observation serait que RhoA possède des homologues RhoB et RhoC, qui peuvent compenser une déficience de RhoA pour favoriser le bon déroulement de la cytokinèse en se localisant au niveau de la membrane d'invagination (Kamijo et al., 2006). Ces deux homologues possèdent également le site de sensibilité aux ROS, mais celui de RhoC est légèrement différent et serait donc potentiellement moins sensible à une inactivation par les ROS (Heo et al., 2006; Xu et al., 2017).

L'hypothèse qui émane de ces données est qu'en réponse au 20A, une régulation différentielle de la stabilité et de l'activité de RhoA et ses homologues serait responsable du défaut de cytokinèse et de la sensibilité partielle aux ROS. En particulier, RhoA serait dégradé de façon indépendante des ROS, RhoB serait inactivé par les ROS et RhoC pourrait alors compenser partiellement pour la perte d'activité de RhoA et RhoB.

Les ROS pourraient aussi avoir un rôle sur des régulateurs en amont de RhoA. En effet la Src kinase est sensible au ROS et a été décrite pour être soit activée, soit inhibée par les ROS selon les conditions réductrices de la cellule (Sun and Kemble, 2009). Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'implication de la Src kinase dans le défaut de cytokinèse et son éventuelle régulation par les ROS en réponse au 20A.

De façon intéressante, nous avons mis en évidence que l'utilisation des antioxydants réduit la proportion de cellules binucléées sans modifier les réponses au 20A en termes de sénescence et de mort cellulaire. Cependant, il faut noter que nous avons évalué ces réponses cellulaires à 24h après traitement. Or, les ROS ont souvent été décrits pour favoriser l'établissement de la sénescence (Davalli et al., 2016), avec éventuellement une cinétique lente de l'établissement de cette sénescence (en plus de 24h) (Passos et al., 2010). Ces données suggèrent donc qu'il ne faut pas exclure l'implication des ROS dans la sénescence induite par le 20A sur le long terme.

De nombreuses études restent encore à mener afin de comprendre le rôle des ROS dans ce défaut de cytokinèse en réponse au 20A, ainsi que la connexion entre cette production de ROS et le défaut de recrutement de RhoA. La compréhension des mécanismes responsables

de la formation de cellules binucléées en réponse au 20A, pourrait permettre de prévenir des effets potentiellement délétères de ces cellules tétraploïdes.

B. Sensibiliser les cellules binucléées à la mort

Afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique du 20A (ou des autres agents chimiothérapeutiques qui induisent la formation de cellules binucléées), une autre stratégie qui peut être envisagée est d'éliminer particulièrement ces cellules en trouvant leurs points faibles. Dans notre étude, nous avons trouvé de façon intéressante que les cellules binucléées, qui sont résistantes à la mort induite par le 20A, peuvent être sensibilisées à la mort en présence de chloroquine. Il serait alors intéressant de déterminer les causes de cette sensibilisation.

La LMP qui est observée dans les conditions de combinaison de traitement entre le 20A et la chloroquine pourrait être une bonne piste pour la sensibilisation des cellules binucléées à la mort. En effet, il a été décrit qu'une inhibition de mTOR peut conduire à la mort sélective de cellules polyploïdes (Sharma et al., 2013; Zeng et al., 2014). Or en condition de déstabilisation de la membrane lysosomale, mTOR est inactivé *via* le système des galectines afin de permettre l'activation de TFEB et la réparation de la membrane lysosomale (Jia et al., 2018; Settembre et al., 2011). De ce fait, l'inhibition de mTOR médiée par la rupture de la membrane lysosomale pourrait permettre d'expliquer l'augmentation de la sensibilité des cellules binucléées à la mort cellulaire induite par la combinaison du 20A et de la chloroquine.

Nous avons donc analysé la proportion de cellules positives pour la formation de Gal3 puncta (et qui ont donc subi la LMP) dans les deux populations de cellules mono- et binucléées. Cependant, nous n'avons observé qu'une légère augmentation du pourcentage de cellules binucléées qui sont positives pour la LMP par rapport aux cellules mononucléées, suggérant qu'un autre mécanisme pourrait être impliqué (données non présentées).

Quelques études se sont portées sur l'identification de molécules qui peuvent tuer spécifiquement les cellules tétraploïdes. Des cibles appartenant à l'appareil mitotique ont ainsi été identifiées, telles que la kinase AuroraB, les protéines du SAC ou la kinésine Eg5. L'inhibition de l'activité de ces protéines favorise la mort des cellules polyploïdes au fur et à mesure des cycles de division (Marxer et al., 2012; Rello-Varona et al., 2009; Vitale et al., 2007). Cependant, dans notre contexte, la majorité des cellules tétraploïdes ne progresse pas dans le cycle, suggérant que ce n'est pas par ce mécanisme que la chloroquine pourrait favoriser la mort des cellules binucléées.

Une étude a été réalisée afin d'identifier des agents pharmacologiques qui permettent de tuer sélectivement des cellules tétraploïdes. Le resveratrol a ainsi été identifié à partir de ce criblage, et le mécanisme responsable de cette sensibilisation à la mort cellulaire fait intervenir une augmentation de l'activité de l'AMPK (Lissa et al., 2014). Or, nous avons montré que le 20A induit une augmentation de l'activité de l'AMPK et des études récentes ont également montré que l'AMPK peut être activée par la chloroquine (Jeong et al., 2018; Spears et al., 2016). Ainsi, ces données suggèrent que la combinaison de la chloroquine et du 20A pourrait aussi favoriser la mort des cellules binucléées par sa capacité à augmenter l'activité de l'AMPK.

Il serait alors intéressant de réaliser des études afin de vérifier l'implication de mTOR et de l'AMPK dans l'effet sensibilisateur de la chloroquine sur la mort des cellules binucléées. Il serait aussi intéressant de pouvoir analyser la capacité de la chloroquine de sensibiliser à la mort cellulaire les cellules tétraploïdes qui sont générées par des traitements avec d'autres agents chimiothérapeutiques.

IV) Quels rôles de la stabilisation des structures G4 par le 20A dans ses effets cellulaires ?

Dans cette partie de la discussion, nous nous focaliserons un peu plus sur les liens potentiels entre l'activité du LG4 20A à stabiliser des structures G4 dans l'ADN ou l'ARN et les effets cellulaires observés. En particulier, nous évoquerons des hypothèses et des pistes à étudier concernant des activités de modulation de l'expression des gènes, la séquestration lysosomale et la propriété d'induire la binucléation en relation avec une activité de LG4.

A. Quel rôle dans la régulation de l'expression des gènes ?

Dans le premier article, nous avons montré un enrichissement des séquences formant potentiellement des structures G4 (PG4) juste en amont du site de terminaison de la transcription (TTS) des gènes sous-exprimés en réponse au 20A. Ce résultat soulève l'hypothèse que des structures G4 des régions 3'-UTR des ARNm pourraient être ciblées par le 20A pour moduler l'expression de ces gènes.

Cependant l'analyse qui avait été réalisée ne prenait pas en considération la localisation de la séquence PG4 sur le brin transcrit ou sur le brin codant. Nous avons donc réalisé une nouvelle analyse en faisant cette distinction, mais nous n'avons pas observé d'enrichissement particulier de séquences PG4 dans le brin d'ADN codant par rapport au brin transcrit dans la population de gènes sous-exprimés (données non présentées). Cela suggère donc que la sous-expression des gènes, observée en réponse au 20A, ne peut pas s'expliquer de façon globale par une capacité à stabiliser des structures G4 dans la région 3'-UTR des ARNm.

Mais, pour certains ARNm spécifiques, il pourrait être intéressant de considérer cette hypothèse du rôle des structures G4 de la région 3'-UTR des ARNm dans la modulation de l'expression des gènes en réponse au 20A. En effet, la formation de structures G4 dans la région 3'-UTR des ARNm a été décrite pour jouer de nombreux rôles dans le métabolisme de

certaines ARNm, au cours d'évènements post-transcriptionnels (polyadénylation, transport, traduction) (pour revue Fay et al., 2017). En particulier, la formation des structures G4 dans cette région peut favoriser la polyadénylation des ARNm, or il s'agit d'une étape importante pour leur stabilité, leur translocation du noyau au cytoplasme et leur traduction (Dalziel et al., 2007; Decorsière et al., 2011).

Les structures G4 formées dans la région 3'-UTR des ARNm peuvent également moduler la traduction de ces ARNm, soit en la favorisant, soit en l'inhibant. Les mécanismes moléculaires responsables de la modulation de la traduction ne sont pas encore élucidés, mais des hypothèses suggèrent l'implication de protéines qui seraient recrutées au niveau de l'ARNm *via* des interactions spécifiques avec les structures G4, pour stimuler ou inhiber les processus traductionnels (Arora and Sues, 2011; Bolduc et al., 2016; Fay et al., 2017).

Il reste donc de nombreuses études à mener pour mieux comprendre les effets potentiels du 20A dans la stabilisation de structures G4 dans les ARNm et dans la modulation de l'expression des gènes et du niveau de protéines. Ces études permettraient de mieux définir des voies de signalisation qui seraient affectées directement par la stabilisation des structures G4 *in cellulo* par le 20A, et ainsi de mieux comprendre son mécanisme d'action.

B. Quel rôle dans la localisation lysosomale du 20A ?

Précédemment dans cette discussion, nous avons suggéré que les propriétés physico-chimiques du 20A pourraient être responsables de sa localisation lysosomale. Nous nous posons alors la question de savoir si les propriétés de stabilisation de structures G4 par le 20A pourraient permettre d'expliquer cette localisation.

En effet, il a été décrit que l'exposition de cellules cancéreuses pendant 2h à des séquences oligonucléotidiques riches en guanines (GRO pour *Guanine-Rich Oligonucleotides*), qui forment des structures G4 de configuration parallèle, conduit à une internalisation de ces GRO dans les lysosomes (Tseng et al., 2013). De façon intéressante, les auteurs ont montré que dans les lysosomes, les structures G4 peuvent être conservées. Ils ont pour cela utilisé le

LG4 BMVC, qui est une molécule qui fluoresce de façon très intense suite à une interaction avec des structures G4. Lorsqu'il est appliqué sur des cellules cancéreuses, sa fluorescence se retrouve localisée majoritairement dans le noyau. Mais, lorsque le BMVC est appliqué sur des cellules qui ont préalablement intégrées les GRO dans les lysosomes, le BMVC fluoresce alors également de façon importante dans les lysosomes. De plus, des études de FRET ont permis de confirmer que la configuration de la structure G4 parallèle est également conservée dans les lysosomes. Ces résultats suggèrent donc que la détection de structures G4 dans les lysosomes est possible lorsque des oligonucléotides sont internalisés.

Cette hypothèse soulève alors la question de savoir si la localisation du 20A (ou d'autres LG4) dans les lysosomes pourrait dépendre d'une interaction du 20A avec des structures G4 d'ARN ou d'ADN qui se retrouvent internalisés dans les lysosomes. En particulier, il a été décrit que les structures G4 des ARN sont plus susceptibles d'adopter une configuration parallèle, à cause de contraintes stériques particulières (Fay et al., 2017), suggérant donc que les structures G4 d'ARN pourraient être conservées dans les lysosomes.

La localisation lysosomale des ARN est d'ailleurs tout à fait possible par le mécanisme de « *RNautophagy/DNautophagy* » qui permet la reconnaissance des ARN par la protéine lysosomale LAMP2C, en partie grâce à des séquences riches en guanines qui interagissent avec LAMP2C. Puis ces ARN sont transportés dans le lysosome selon un processus qui ressemblerait à l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA), potentiellement *via* le transporteur SIDT2 (Aizawa et al., 2016; Frankel et al., 2016; Hase et al., 2015). De plus la macroautophagie, *via* l'internalisation de structures plus grosses telles que les ribosomes ou les granules d'ARN, peut expliquer la localisation lysosomale des ARN (Fujiwara et al., 2017). Cependant ces processus autophagiques mènent normalement à la dégradation des acides nucléiques. Cela laisse supposer que si les structures G4 des ARN sont conservées dans les lysosomes, un mécanisme de résistance à la dégradation existerait.

Ainsi, l'étude du rôle de la stabilisation des structures G4 des ARN par des LG4 dans la localisation lysosomale des complexes ARN/LG4 serait doublement intéressante. D'une part, elle permettrait de savoir si effectivement des LG4 peuvent se retrouver localisés dans les lysosomes grâce à leur interaction avec des structures G4 des ARN. Et d'autre part, des

informations sur la capacité des LG4 à moduler la stabilité des ARN *via* des processus de dégradation lysosomale pourraient émerger.

C. Quel rôle dans la régulation de RhoA par le 20A ?

Nous avons montré qu'à l'arrivée en cytokinèse, le niveau de protéine RhoA n'est pas augmenté lorsque les cellules sont traitées au 20A. Nous avons alors discuté de la possible implication de la kinase Src et de son éventuelle régulation par les ROS dans ce processus. Mais il serait aussi intéressant de savoir comment le 20A pourrait intervenir dans ce phénomène *via* son activité de LG4.

Bien que la séquence du gène de RhoA ne présente pas de séquences PG4 dans les zones de régulation de l'expression (promoteur, 5'- et 3'-UTR), il a été décrit que des structures G4 peuvent effectivement se former dans le gène de la kinase Src, et que la stabilisation de ces structures par le LG4 pyridostatine conduit à l'inhibition de son expression (Rodriguez et al., 2012). Cette observation suggère que la stabilisation des structures G4 dans le gène de la kinase Src par le 20A pourrait conduire à des modifications de l'activité ou du niveau de RhoA.

D'autre part, il a été montré que le LG4 RHPS4 peut moduler l'activité de RhoA indirectement par l'inhibition de la voie du VEGF (Salvati et al., 2014). En effet, cette étude a mis en évidence la présence d'une séquence PG4 dans le promoteur du gène du récepteur du VEGF (VEGFR2), et qui forme une structure G4 *in vitro*. Ils ont également montré la stabilisation de cette structure G4 par RHPS4 est responsable de l'inhibition de l'expression de VEGFR2, qui conduit à une diminution de l'activité de RhoA.

Nous voyons donc qu'il pourrait exister un lien entre l'activité de RhoA et la propriété de stabilisation des structures G4 du 20A. L'étude de ces mécanismes potentiels pourrait ainsi permettre d'identifier de nouvelles cibles du 20A et de mieux comprendre les mécanismes responsables de la binucléation.

V) Conclusion générale

Dans cette étude, nous avons montré que le LG4 20A peut présenter des effets anticancéreux intéressants en induisant une diminution de la viabilité cellulaire grâce à l'établissement de la sénescence et à l'induction de la mort cellulaire par apoptose.

Nous avons également mis en évidence que certains mécanismes cellulaires contribuent à protéger les cellules de la mort induite par le 20A, en particulier l'activation des voies de réponse des dommages à l'ADN *via* la kinase ATM, l'autophagie, la séquestration lysosomale ainsi que la formation de cellules binucléées.

La compréhension de ces mécanismes de résistance à la mort induite par le 20A permettrait d'établir les meilleurs modèles cancéreux qui puissent répondre au 20A selon les voies de signalisation qui sont affectées, ou alors de pouvoir définir des associations thérapeutiques qui seraient les plus avantageuses. En particulier, nos résultats suggèrent que le 20A pourrait se révéler plus efficace dans des modèles de cancers qui sont déficients pour ATM, et également pour la voie de l'activation de l'autophagie en réponse à des dommages à l'ADN. Nous avons également émis l'hypothèse qu'une association du 20A avec l'agent antipaludéen chloroquine pourrait se révéler particulièrement intéressante pour tuer les cellules cancéreuses résistantes à l'activation des caspases.

Les mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse au 20A présentent certaines similitudes avec d'autres LG4 et d'autres agents chimiothérapeutiques. Ainsi, la compréhension de ces mécanismes en réponse au 20A peut aussi conduire à des avancées sur la connaissance du fonctionnement de ces autres molécules. En particulier, nous pensons qu'il serait intéressant d'étudier la possible implication de la séquestration lysosomale dans les réponses aux LG4. De plus, nous pensons qu'une combinaison de la chloroquine avec d'autres agents qui induisent l'apparition de cellules binucléées pourrait favoriser leur éradication et éviter leur potentiel effet délétère sur la résistance aux chimiothérapies.

De nombreuses études restent encore à réaliser afin de savoir si le 20A, ses dérivés, ou d'autres ligands G-quadruplexes pourront un jour être utilisés en thérapie anti-cancéreuse, seuls ou en association avec des chimiothérapies ou de la radiothérapie. La recherche des associations de traitement les plus efficaces est primordiale pour améliorer la prise en charge thérapeutique des patients et leur donner de plus grandes chances de survie.

Bibliographie

- Acilan, C., Potter, D.M., and Saunders, W.S. (2007). DNA repair pathways involved in anaphase bridge formation. *Genes. Chromosomes Cancer* 46, 522–531.
- Acosta, J.C., O’Loughlen, A., Banito, A., Guijarro, M.V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N., et al. (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* 133, 1006–1018.
- Aguilar-Quesada, R., Muñoz-Gámez, J.A., Martín-Oliva, D., Peralta, A., Valenzuela, M.T., Matínez-Romero, R., Quiles-Pérez, R., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G., Ruiz de Almodóvar, M., et al. (2007). Interaction between ATM and PARP-1 in response to DNA damage and sensitization of ATM deficient cells through PARP inhibition. *BMC Mol. Biol.* 8, 29.
- Ahn, J.Y., Schwarz, J.K., Piwnica-Worms, H., and Canman, C.E. (2000). Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res.* 60, 5934–5936.
- Aits, S., and Jäättelä, M. (2013). Lysosomal cell death at a glance. *J Cell Sci* 126, 1905–1912.
- Aits, S., Krickler, J., Liu, B., Ellegaard, A.-M., Hämälistö, S., Tvingsholm, S., Corcelle-Termeau, E., Høgh, S., Farkas, T., Holm Jonassen, A., et al. (2015). Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay. *Autophagy* 11, 1408–1424.
- Aizawa, S., Fujiwara, Y., Contu, V.R., Hase, K., Takahashi, M., Kikuchi, H., Kabuta, C., Wada, K., and Kabuta, T. (2016). Lysosomal putative RNA transporter SIDT2 mediates direct uptake of RNA by lysosomes. *Autophagy* 12, 565–578.
- Alexander, J.L., and Orr-Weaver, T.L. (2016). Replication fork instability and the consequences of fork collisions from rereplication. *Genes Dev.* 30, 2241–2252.
- Alexander, A., Kim, J., and Walker, C.L. (2010a). ATM engages the TSC2/mTORC1 signaling node to regulate autophagy. *Autophagy* 6, 672–673.
- Alexander, A., Cai, S.-L., Kim, J., Nanez, A., Sahin, M., MacLean, K.H., Inoki, K., Guan, K.-L., Shen, J., Person, M.D., et al. (2010b). ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4153–4158.
- Allory, Y., Beukers, W., Sagraera, A., Flández, M., Marqués, M., Márquez, M., van der Keur, K.A., Dyrskjot, L., Lurkin, I., Vermeij, M., et al. (2014). Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in bladder cancer: high frequency across stages, detection in urine, and lack of association with outcome. *Eur. Urol.* 65, 360–366.
- Altan, N., Chen, Y., Schindler, M., and Simon, S.M. (1998). Defective acidification in human breast tumor cells and implications for chemotherapy. *J. Exp. Med.* 187, 1583–1598.
- Andreassen, P.R., Lohez, O.D., Lacroix, F.B., and Margolis, R.L. (2001). Tetraploid State Induces p53-dependent Arrest of Nontransformed Mammalian Cells in G1. *Mol. Biol. Cell* 12, 1315–1328.

- Appelqvist, H., Nilsson, C., Garner, B., Brown, A.J., Kågedal, K., and Öllinger, K. (2011). Attenuation of the Lysosomal Death Pathway by Lysosomal Cholesterol Accumulation. *Am. J. Pathol.* *178*, 629–639.
- Appelqvist, H., Wäster, P., Kågedal, K., and Öllinger, K. (2013). The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J. Mol. Cell Biol.* *5*, 214–226.
- Arnoult, N., Correia, A., Ma, J., Merlo, A., Garcia-Gomez, S., Maric, M., Tognetti, M., Benner, C.W., Boulton, S.J., Saghatelian, A., et al. (2017). Regulation of DNA repair pathway choice in S and G2 phases by the NHEJ inhibitor CYREN. *Nature* *549*, 548–552.
- Arora, A., and Suess, B. (2011). An RNA G-quadruplex in the 3' UTR of the proto-oncogene PIM1 represses translation. *RNA Biol.* *8*, 802–805.
- Ayars, M., Eshleman, J., and Goggins, M. (2017). Susceptibility of ATM-deficient pancreatic cancer cells to radiation. *Cell Cycle Georget. Tex* *16*, 991–998.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* *421*, 499–506.
- Balasubramanian, S., and Neidle, S. (2009). G-quadruplex nucleic acids as therapeutic targets. *Curr. Opin. Chem. Biol.* *13*, 345–353.
- Balasubramanian, S., Hurley, L.H., and Neidle, S. (2011). Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 261–275.
- Baldin, V., and Ducommun, B. (1995). Subcellular localisation of human wee1 kinase is regulated during the cell cycle. *J. Cell Sci.* *108 (Pt 6)*, 2425–2432.
- Barroso, R.P., Basso, L.G.M., and Costa-Filho, A.J. (2015). Interactions of the antimalarial amodiaquine with lipid model membranes. *Chem. Phys. Lipids* *186*, 68–78.
- Bartkova, J., Horejsí, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K., Guldborg, P., Sehested, M., Nesland, J.M., Lukas, C., et al. (2005). DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* *434*, 864–870.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.-V.F., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* *444*, 633–637.
- Bassermann, F., Frescas, D., Guardavaccaro, D., Busino, L., Peschiaroli, A., and Pagano, M. (2008). The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell* *134*, 256–267.
- Batchelor, E., Mock, C.S., Bhan, I., Loewer, A., and Lahav, G. (2008). Recurrent initiation: a mechanism for triggering p53 pulses in response to DNA damage. *Mol. Cell* *30*, 277–289.
- Batey, M.A., Zhao, Y., Kyle, S., Richardson, C., Slade, A., Martin, N.M.B., Lau, A., Newell, D.R., and Curtin, N.J. (2013). Preclinical Evaluation of a Novel ATM Inhibitor, KU59403, In Vitro and In Vivo in p53 Functional and Dysfunctional Models of Human Cancer. *Mol. Cancer Ther.* *12*, 959–967.
- Bedrat, A., Lacroix, L., and Mergny, J.-L. (2016). Re-evaluation of G-quadruplex propensity with G4Hunter. *Nucleic Acids Res.* *44*, 1746–1759.

- Belaid, A., Cerezo, M., Chargui, A., Corcelle-Termeau, E., Pedetour, F., Giuliano, S., Ilie, M., Rubera, I., Tauc, M., Barale, S., et al. (2013). Autophagy plays a critical role in the degradation of active RHOA, the control of cell cytokinesis, and genomic stability. *Cancer Res.* **73**, 4311–4322.
- Bell, R.J.A., Rube, H.T., Kreig, A., Mancini, A., Fouse, S.D., Nagarajan, R.P., Choi, S., Hong, C., He, D., Pekmezci, M., et al. (2015). Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science* **348**, 1036–1039.
- Bergamaschi, D., Gasco, M., Hiller, L., Sullivan, A., Syed, N., Trigiantè, G., Yulug, I., Merlano, M., Numico, G., Comino, A., et al. (2003). p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* **3**, 387–402.
- Besnard, E., Babled, A., Lapasset, L., Milhavet, O., Parrinello, H., Dantec, C., Marin, J.-M., and Lemaitre, J.-M. (2012). Unraveling cell type-specific and reprogrammable human replication origin signatures associated with G-quadruplex consensus motifs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 837–844.
- Besson, A., Dowdy, S.F., and Roberts, J.M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev. Cell* **14**, 159–169.
- Betin, V.M.S., and Lane, J.D. (2009). Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis. *J. Cell Sci.* **122**, 2554–2566.
- Bharti, S.K., Sommers, J.A., Zhou, J., Kaplan, D.L., Spelbrink, J.N., Mergny, J.-L., and Brosh, R.M. (2014). DNA sequences proximal to human mitochondrial DNA deletion breakpoints prevalent in human disease form G-quadruplexes, a class of DNA structures inefficiently unwound by the mitochondrial replicative Twinkle helicase. *J. Biol. Chem.* **289**, 29975–29993.
- Bidère, N., Lorenzo, H.K., Carmona, S., Laforge, M., Harper, F., Dumont, C., and Senik, A. (2003). Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J. Biol. Chem.* **278**, 31401–31411.
- Bielski, C.M., Zehir, A., Penson, A.V., Donoghue, M.T.A., Chatila, W., Armenia, J., Chang, M.T., Schram, A.M., Jonsson, P., Bandlamudi, C., et al. (2018). Genome doubling shapes the evolution and prognosis of advanced cancers. *Nat. Genet.* **50**, 1189–1195.
- 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.
- Biffi, G., Di Antonio, M., Tannahill, D., and Balasubramanian, S. (2014). Visualization and selective chemical targeting of RNA G-quadruplex structures in the cytoplasm of human cells. *Nat. Chem.* **6**, 75–80.
- Bisso, A., Collavin, L., and Del Sal, G. (2011). p73 as a pharmaceutical target for cancer therapy. *Curr. Pharm. Des.* **17**, 578–590.
- Biton, S., and Ashkenazi, A. (2011). NEMO and RIP1 control cell fate in response to extensive DNA damage via TNF- α feedforward signaling. *Cell* **145**, 92–103.
- Bivik, C.A., Larsson, P.K., Kågedal, K.M., Rosdahl, I.K., and Ollinger, K.M. (2006). UVA/B-induced apoptosis in human melanocytes involves translocation of cathepsins and Bcl-2 family members. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1119–1127.

- Blackford, A.N., and Jackson, S.P. (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* 66, 801–817.
- Blasina, A., de Weyer, I.V., Laus, M.C., Luyten, W.H., Parker, A.E., and McGowan, C.H. (1999). A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase. *Curr. Biol. CB* 9, 1–10.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349–352.
- Boehme, K.A., Kulikov, R., and Blattner, C. (2008). p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7785–7790.
- Bolduc, F., Garant, J.-M., Allard, F., and Perreault, J.-P. (2016). Irregular G-quadruplexes Found in the Untranslated Regions of Human mRNAs Influence Translation. *J. Biol. Chem.* 291, 21751–21760.
- Borner, C., and Andrews, D.W. (2014). The apoptotic pore on mitochondria: are we breaking through or still stuck? *Cell Death Differ.* 21, 187–191.
- Borner, C., and Monney, L. (1999). Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ.* 6, 497–507.
- Boulter, E., Garcia-Mata, R., Guilluy, C., Dubash, A., Rossi, G., Brennwald, P.J., and Burridge, K. (2010). Regulation of RhoGTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1. *Nat. Cell Biol.* 12, 477–483.
- Bouwman, P., and Jonkers, J. (2012). The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance. *Nat. Rev. Cancer* 12, 587–598.
- Bové, J., Martínez-Vicente, M., Dehay, B., Perier, C., Recasens, A., Bombrun, A., Antonsson, B., and Vila, M. (2014). BAX channel activity mediates lysosomal disruption linked to Parkinson disease. *Autophagy* 10, 889–900.
- Boya, P., and Kroemer, G. (2008). Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 27, 6434–6451.
- Boya, P., Andreau, K., Poncet, D., Zamzami, N., Perfettini, J.-L., Metivier, D., Ojcius, D.M., Jäättelä, M., and Kroemer, G. (2003). Lysosomal Membrane Permeabilization Induces Cell Death in a Mitochondrion-dependent Fashion. *J. Exp. Med.* 197, 1323–1334.
- Boya, P., Reggiori, F., and Codogno, P. (2013). Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat. Cell Biol.* 15, 713–720.
- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H.F.M., Schlegelberger, B., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2005). Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436, 660–665.
- Bray, K., Mathew, R., Lau, A., Kamphorst, J.J., Fan, J., Chen, J., Chen, H.-Y., Ghavami, A., Stein, M., DiPaola, R.S., et al. (2012). Autophagy suppresses RIP kinase-dependent necrosis enabling survival to mTOR inhibition. *PloS One* 7, e41831.

- Brehm, A., Miska, E.A., McCance, D.J., Reid, J.L., Bannister, A.J., and Kouzarides, T. (1998). Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597–601.
- Bröker, L.E., Huisman, C., Span, S.W., Rodriguez, J.A., Kruyt, F.A.E., and Giaccone, G. (2004). Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 64, 27–30.
- Brown, E.J., and Baltimore, D. (2003). Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev.* 17, 615–628.
- Bryant, H.E., Schultz, N., Thomas, H.D., Parker, K.M., Flower, D., Lopez, E., Kyle, S., Meuth, M., Curtin, N.J., and Helleday, T. (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434, 913–917.
- Budanov, A.V., and Karin, M. (2008). The p53-regulated Sestrin gene products inhibit mTOR signaling. *Cell* 134, 451–460.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497–1501.
- Burger, A.M., Dai, F., Schultes, C.M., Reszka, A.P., Moore, M.J., Double, J.A., and Neidle, S. (2005). The G-Quadruplex-Interactive Molecule BRACO-19 Inhibits Tumor Growth, Consistent with Telomere Targeting and Interference with Telomerase Function. *Cancer Res.* 65, 1489–1496.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* 276, 42462–42467.
- Byun, T.S., Pacek, M., Yee, M., Walter, J.C., and Cimprich, K.A. (2005). Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint. *Genes Dev.* 19, 1040–1052.
- Campbell, K.J., Witty, J.M., Rocha, S., and Perkins, N.D. (2006). Cisplatin mimics ARF tumor suppressor regulation of RelA (p65) nuclear factor-kappaB transactivation. *Cancer Res.* 66, 929–935.
- Cao, J.Y., and Dixon, S.J. (2016). Mechanisms of ferroptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 2195–2209.
- Caporali, S., Levati, L., Starace, G., Ragone, G., Bonmassar, E., Alvino, E., and D’Atri, S. (2008). AKT is activated in an ataxia-telangiectasia and Rad3-related-dependent manner in response to temozolomide and confers protection against drug-induced cell growth inhibition. *Mol. Pharmacol.* 74, 173–183.
- Capparelli, C., Chiavarina, B., Whitaker-Menezes, D., Pestell, T.G., Pestell, R.G., Hult, J., Andò, S., Howell, A., Martinez-Outschoorn, U.E., Sotgia, F., et al. (2012). CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, “fueling” tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis. *Cell Cycle* 11, 3599–3610.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C. (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282, 1318–1321.

- Carlton, J.G., and Martin-Serrano, J. (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* 316, 1908–1912.
- Carlton, J.G., Caballe, A., Agromayor, M., Kloc, M., and Martin-Serrano, J. (2012). ESCRT-III Governs the Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Through CHMP4C. *Science* 336, 220–225.
- Carmena, M., Wheelock, M., Funabiki, H., and Earnshaw, W.C. (2012). The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 789–803.
- Carson, C.T., Schwartz, R.A., Stracker, T.H., Lilley, C.E., Lee, D.V., and Weitzman, M.D. (2003). The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *EMBO J.* 22, 6610–6620.
- Caruso, J.A., Mathieu, P.A., Joiakim, A., Zhang, H., and Reiners, J.J. (2006). Aryl hydrocarbon receptor modulation of tumor necrosis factor- α -induced apoptosis and lysosomal disruption in a hepatoma model that is caspase-8-independent. *J. Biol. Chem.* 281, 10954–10967.
- Castedo, M., Perfettini, J.-L., Roumier, T., Valent, A., Raslova, H., Yakushijin, K., Horne, D., Feunteun, J., Lenoir, G., Medema, R., et al. (2004). Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene* 23, 4362–4370.
- Cauwels, A., Janssen, B., Waeytens, A., Cuvelier, C., and Brouckaert, P. (2003). Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2. *Nat. Immunol.* 4, 387–393.
- Cayrol, C., Knibiehler, M., and Ducommun, B. (1998). p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 16, 311–320.
- 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, 1244–1251.
- Cesare, A.J., Hayashi, M.T., Crabbe, L., and Karlseder, J. (2013). The telomere deprotection response is functionally distinct from the genomic DNA damage response. *Mol. Cell* 51, 141–155.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855–862.
- Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1999). 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 401, 616–620.
- Chang, B.D., Xuan, Y., Broude, E.V., Zhu, H., Schott, B., Fang, J., and Roninson, I.B. (1999a). Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 18, 4808–4818.
- Chang, B.D., Broude, E.V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E.S., Lausch, E., Christov, K., and Roninson, I.B. (1999b). A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res.* 59, 3761–3767.

- Chang, B.-D., Swift, M.E., Shen, M., Fang, J., Broude, E.V., and Roninson, I.B. (2002). Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 389–394.
- Chauhan, S., Kumar, S., Jain, A., Ponpuak, M., Mudd, M.H., Kimura, T., Choi, S.W., Peters, R., Mandell, M., Bruun, J.-A., et al. (2016). TRIMs and Galectins Globally Cooperate and TRIM16 and Galectin-3 Co-direct Autophagy in Endomembrane Damage Homeostasis. *Dev. Cell* *39*, 13–27.
- Chehab, N.H., Malikzay, A., Appel, M., and Halazonetis, T.D. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev.* *14*, 278–288.
- Chen, J.-H., Zhang, P., Chen, W.-D., Li, D.-D., Wu, X.-Q., Deng, R., Jiao, L., Li, X., Ji, J., Feng, G.-K., et al. (2015). ATM-mediated PTEN phosphorylation promotes PTEN nuclear translocation and autophagy in response to DNA-damaging agents in cancer cells. *Autophagy* *11*, 239–252.
- Chen, L., Gilkes, D.M., Pan, Y., Lane, W.S., and Chen, J. (2005a). ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage. *EMBO J.* *24*, 3411–3422.
- Chen, M.-B., Shen, W.-X., Yang, Y., Wu, X.-Y., Gu, J.-H., and Lu, P.-H. (2011). Activation of AMP-activated protein kinase is involved in vincristine-induced cell apoptosis in B16 melanoma cell. *J. Cell. Physiol.* *226*, 1915–1925.
- Chen, X., Chen, J., Gan, S., Guan, H., Zhou, Y., Ouyang, Q., and Shi, J. (2013). DNA damage strength modulates a bimodal switch of p53 dynamics for cell-fate control. *BMC Biol.* *11*, 73.
- Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.-K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., et al. (2005b). Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* *436*, 725–730.
- Chinnaiyan, A.M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V.M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* *81*, 505–512.
- Cho, M.-G., Ahn, J.-H., Choi, H.-S., and Lee, J.-H. (2017). DNA double-strand breaks and Aurora B mislocalization induced by exposure of early mitotic cells to H2O2 appear to increase chromatin bridges and resultant cytokinesis failure. *Free Radic. Biol. Med.* *108*, 129–145.
- Chu, P.-C., Yang, M.-C., Kulp, S.K., Salunke, S.B., Himmel, L.E., Fang, C.-S., Jadhav, A.M., Shan, Y.-S., Lee, C.-T., Lai, M.-D., et al. (2016). Regulation of oncogenic KRAS signaling via a novel KRAS-integrin-linked kinase-hnRNPA1 regulatory loop in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* *35*, 3897–3908.
- Chude, C.I., and Amaravadi, R.K. (2017). Targeting Autophagy in Cancer: Update on Clinical Trials and Novel Inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.
- Circu, M., Cardelli, J., Barr, M., O'Byrne, K., Mills, G., and El-Osta, H. (2017). Modulating lysosomal function through lysosome membrane permeabilization or autophagy suppression restores sensitivity to cisplatin in refractory non-small-cell lung cancer cells. *PLoS ONE* *12*.
- Codogno, P., and Morel, E. (2018). FOXO3a Provides a Quickstep from Autophagy Inhibition to Apoptosis in Cancer Therapy. *Dev. Cell* *44*, 537–539.

- Cogoj, S., Paramasivam, M., Spolaore, B., and Xodo, L.E. (2008). Structural polymorphism within a regulatory element of the human KRAS promoter: formation of G4-DNA recognized by nuclear proteins. *Nucleic Acids Res.* *36*, 3765–3780.
- Cogoj, S., Shchekotikhin, A.E., Membrino, A., Sinkevich, Y.B., and Xodo, L.E. (2013). Guanidino anthrathiophenediones as G-quadruplex binders: uptake, intracellular localization, and anti-Harvey-Ras gene activity in bladder cancer cells. *J. Med. Chem.* *56*, 2764–2778.
- Cosme-Blanco, W., Shen, M.-F., Lazar, A.J.F., Pathak, S., Lozano, G., Multani, A.S., and Chang, S. (2007). Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence. *EMBO Rep.* *8*, 497–503.
- Coward, J., and Harding, A. (2014). Size Does Matter: Why Polyploid Tumor Cells are Critical Drug Targets in the War on Cancer. *Front. Oncol.* *4*.
- Cree, I.A., and Charlton, P. (2017). Molecular chess? Hallmarks of anti-cancer drug resistance. *BMC Cancer* *17*.
- Crescenzi, E., Palumbo, G., and Brady, H.J.M. (2003). Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochem. J.* *375*, 263–274.
- Crighton, D., Wilkinson, S., O’Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P.R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., and Ryan, K.M. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* *126*, 121–134.
- Cuadrado, M., Martinez-Pastor, B., Murga, M., Toledo, L.I., Gutierrez-Martinez, P., Lopez, E., and Fernandez-Capetillo, O. (2006). ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks. *J. Exp. Med.* *203*, 297–303.
- Cufí, S., Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferreros, C., Martin-Castillo, B., Vellon, L., and Menendez, J.A. (2011). Autophagy positively regulates the CD44(+) CD24(-/low) breast cancer stem-like phenotype. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 3871–3885.
- Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 49–63.
- Dai, J., Chen, D., Jones, R.A., Hurley, L.H., and Yang, D. (2006). NMR solution structure of the major G-quadruplex structure formed in the human BCL2 promoter region. *Nucleic Acids Res.* *34*, 5133–5144.
- Dalziel, M., Nunes, N.M., and Furger, A. (2007). Two G-rich regulatory elements located adjacent to and 440 nucleotides downstream of the core poly(A) site of the intronless melanocortin receptor 1 gene are critical for efficient 3’ end processing. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 1568–1580.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* *91*, 231–241.
- Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., and D’Arca, D. (2016). ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2016*.

- Davis, J.T. (2004). G-quartets 40 years later: from 5'-GMP to molecular biology and supramolecular chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *43*, 668–698.
- Dawar, S., Lim, Y., Puccini, J., White, M., Thomas, P., Bouchier-Hayes, L., Green, D.R., Dorstyn, L., and Kumar, S. (2017). Caspase-2-mediated cell death is required for deleting aneuploid cells. *Oncogene* *36*, 2704–2714.
- De Santis Puzzonina, M., Cozzolino, A.M., Grassi, G., Bisceglia, F., Strippoli, R., Guarguaglini, G., Citarella, F., Sacchetti, B., Tripodi, M., Marchetti, A., et al. (2016). TGFbeta Induces Binucleation/Polyploidization in Hepatocytes through a Src-Dependent Cytokinesis Failure. *PLoS One* *11*, e0167158.
- Déas, O., Dumont, C., MacFarlane, M., Rouleau, M., Hebib, C., Harper, F., Hirsch, F., Charpentier, B., Cohen, G.M., and Senik, A. (1998). Caspase-independent cell death induced by anti-CD2 or staurosporine in activated human peripheral T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 3375–3383.
- Decorsière, A., Cayrel, A., Vagner, S., and Millevoi, S. (2011). Essential role for the interaction between hnRNP H/F and a G quadruplex in maintaining p53 pre-mRNA 3'-end processing and function during DNA damage. *Genes Dev.* *25*, 220–225.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., and Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat. Chem. Biol.* *1*, 112–119.
- Delacroix, S., Wagner, J.M., Kobayashi, M., Yamamoto, K., and Karnitz, L.M. (2007). The Rad9–Hus1–Rad1 (9–1–1) clamp activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes Dev.* *21*, 1472–1477.
- Delettre, C., Yuste, V.J., Moubarak, R.S., Bras, M., Lesbordes-Brion, J.-C., Petres, S., Bellalou, J., and Susin, S.A. (2006). AIFsh, a novel apoptosis-inducing factor (AIF) pro-apoptotic isoform with potential pathological relevance in human cancer. *J. Biol. Chem.* *281*, 6413–6427.
- Denchi, E.L., and de Lange, T. (2007). Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* *448*, 1068–1071.
- Deng, Y., Chan, S., and Chang, S. (2008). Telomere dysfunction and Tumor Suppression-the Senescence Connection. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 450–458.
- DerMardirossian, C., Rocklin, G., Seo, J.-Y., and Bokoch, G.M. (2006). Phosphorylation of RhoGDI by Src regulates Rho GTPase binding and cytosol-membrane cycling. *Mol. Biol. Cell* *17*, 4760–4768.
- DeVita, V.T., and Chu, E. (2008). A History of Cancer Chemotherapy. *Cancer Res.* *68*, 8643–8653.
- Dewhurst, S.M., McGranahan, N., Burrell, R.A., Rowan, A.J., Grönroos, E., Endesfelder, D., Joshi, T., Mouradov, D., Gibbs, P., Ward, R.L., et al. (2014). Tolerance of whole-genome doubling propagates chromosomal instability and accelerates cancer genome evolution. *Cancer Discov.* *4*, 175–185.
- Dexheimer, T.S., Carey, S.S., Zuohe, S., Gokhale, V.M., Hu, X., Murata, L.B., Maes, E.M., Weichsel, A., Sun, D., Meuillet, E.J., et al. (2009). NM23-H2 may play an indirect role in transcriptional activation of c-myc gene expression but does not cleave the nuclease hypersensitive element III(1). *Mol. Cancer Ther.* *8*, 1363–1377.

- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* *444*, 638–642.
- Diaz-Moralli, S., Tarrado-Castellarnau, M., Miranda, A., and Cascante, M. (2013). Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* *138*, 255–271.
- Dickens, L.S., Boyd, R.S., Jukes-Jones, R., Hughes, M.A., Robinson, G.L., Fairall, L., Schwabe, J.W.R., Cain, K., and MacFarlane, M. (2012). A Death Effector Domain Chain DISC Model Reveals a Crucial Role for Caspase-8 Chain Assembly in Mediating Apoptotic Cell Death. *Mol. Cell* *47*, 291–305.
- Dielschneider, R.F., Henson, E.S., and Gibson, S.B. (2017). Lysosomes as Oxidative Targets for Cancer Therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2017*.
- Dikmen, Z.G., Gellert, G.C., Jackson, S., Gryaznov, S., Tressler, R., Dogan, P., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2005). In vivo inhibition of lung cancer by GRN163L: a novel human telomerase inhibitor. *Cancer Res.* *65*, 7866–7873.
- Dillon, L.M., and Miller, T.W. (2014). Therapeutic targeting of cancers with loss of PTEN function. *Curr. Drug Targets* *15*, 65–79.
- 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.
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., et al. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell* *149*, 1060–1072.
- Dohn, M., Zhang, S., and Chen, X. (2001). p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene* *20*, 3193–3205.
- 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.
- Dooley, H.C., Razi, M., Polson, H.E.J., Girardin, S.E., Wilson, M.I., and Tooze, S.A. (2014). WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12–5-16L1. *Mol. Cell* *55*, 238–252.
- Dörr, J.R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Däbritz, J.H.M., Lisec, J., Lenze, D., Gerhardt, A., Schleicher, K., et al. (2013). Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* *501*, 421–425.
- Douarre, C., Mergui, X., Sidibe, A., Gomez, D., Alberti, P., Mailliet, P., Trentesaux, C., and Riou, J.-F. (2013). DNA damage signaling induced by the G-quadruplex ligand 12459 is modulated by PPM1D/WIP1 phosphatase. *Nucleic Acids Res.* *41*, 3588–3599.
- Douglas, M.E., Davies, T., Joseph, N., and Mishima, M. (2010). Aurora B and 14-3-3 Coordinately Regulate Clustering of Centralspindlin during Cytokinesis. *Curr. Biol. CB* *20*, 927–933.
- Doulias, P.-T., Kotoglou, P., Tenopoulou, M., Keramisanou, D., Tzavaras, T., Brunk, U., Galaris, D., and Angelidis, C. (2007). Involvement of heat shock protein-70 in the mechanism of

hydrogen peroxide-induced DNA damage: the role of lysosomes and iron. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 567–577.

- Droga-Mazovec, G., Bojic, L., Petelin, A., Ivanova, S., Romih, R., Repnik, U., Salvesen, G.S., Stoka, V., Turk, V., and Turk, B. (2008). Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J. Biol. Chem.* **283**, 19140–19150.
- Drygin, D., Siddiqui-Jain, A., O'Brien, S., Schwaebe, M., Lin, A., Bliesath, J., Ho, C.B., Proffitt, C., Trent, K., Whitten, J.P., et al. (2009). Anticancer activity of CX-3543: a direct inhibitor of rRNA biogenesis. *Cancer Res.* **69**, 7653–7661.
- Duvvuri, M., Konkar, S., Funk, R.S., Krise, J.M., and Krise, J.P. (2005). A Chemical Strategy To Manipulate the Intracellular Localization of Drugs in Resistant Cancer Cells. *Biochemistry* **44**, 15743–15749.
- Eddy, J., and Maizels, N. (2008). Conserved elements with potential to form polymorphic G-quadruplex structures in the first intron of human genes. *Nucleic Acids Res.* **36**, 1321–1333.
- Edwards, S.L., Brough, R., Lord, C.J., Natrajan, R., Vatcheva, R., Levine, D.A., Boyd, J., Reis-Filho, J.S., and Ashworth, A. (2008). Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature* **451**, 1111–1115.
- Ekert, P.G., Read, S.H., Silke, J., Marsden, V.S., Kaufmann, H., Hawkins, C.J., Gerl, R., Kumar, S., and Vaux, D.L. (2004). Apaf-1 and caspase-9 accelerate apoptosis, but do not determine whether factor-deprived or drug-treated cells die. *J. Cell Biol.* **165**, 835–842.
- Eliopoulos, A.G., Havaki, S., and Gorgoulis, V.G. (2016). DNA Damage Response and Autophagy: A Meaningful Partnership. *Front. Genet.* **7**.
- Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**, 1664–1672.
- Elmore, L.W., Rehder, C.W., Di, X., McChesney, P.A., Jackson-Cook, C.K., Gewirtz, D.A., and Holt, S.E. (2002). Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. *J. Biol. Chem.* **277**, 35509–35515.
- Emert-Sedlak, L., Shangary, S., Rabinovitz, A., Miranda, M.B., Delach, S.M., and Johnson, D.E. (2005). Involvement of cathepsin D in chemotherapy-induced cytochrome c release, caspase activation, and cell death. *Mol. Cancer Ther.* **4**, 733–742.
- Emoto, K., Inadome, H., Kanaho, Y., Narumiya, S., and Umeda, M. (2005). Local change in phospholipid composition at the cleavage furrow is essential for completion of cytokinesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 37901–37907.
- Eno, C.O., Zhao, G., Venkatanarayan, A., Wang, B., Flores, E.R., and Li, C. (2013). Noxa couples lysosomal membrane permeabilization and apoptosis during oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 26–37.
- Erdal, H., Berndtsson, M., Castro, J., Brunk, U., Shoshan, M.C., and Linder, S. (2005). Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 192–197.
- Erenpreisa, J., and Cragg, M.S. (2013). Three steps to the immortality of cancer cells: senescence, polyploidy and self-renewal. *Cancer Cell Int.* **13**, 92.

- Erenpreisa, J., Ivanov, A., Wheatley, S.P., Kosmacek, E.A., Ianzini, F., Anisimov, A.P., Mackey, M., Davis, P.J., Plakhins, G., and Illidge, T.M. (2008). Endopolyploidy in irradiated p53-deficient tumour cell lines: persistence of cell division activity in giant cells expressing Aurora-B kinase. *Cell Biol. Int.* 32, 1044–1056.
- Espina, V., Mariani, B.D., Gallagher, R.I., Tran, K., Banks, S., Wiedemann, J., Huryk, H., Mueller, C., Adamo, L., Deng, J., et al. (2010). Malignant precursor cells pre-exist in human breast DCIS and require autophagy for survival. *PLoS One* 5, e10240.
- Ettinger, A.W., Wilsch-Bräuninger, M., Marzesco, A.-M., Bickle, M., Lohmann, A., Maliga, Z., Karbanová, J., Corbeil, D., Hyman, A.A., and Huttner, W.B. (2011). Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour. *Nat. Commun.* 2, 503.
- Evangelou, K., and Gorgoulis, V.G. (2017). Sudan Black B, The Specific Histochemical Stain for Lipofuscin: A Novel Method to Detect Senescent Cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1534, 111–119.
- d’Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194–198.
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N.J., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., et al. (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* 434, 917–921.
- Faudale, M., Cogoi, S., and Xodo, L.E. (2012). Photoactivated cationic alkyl-substituted porphyrin binding to g4-RNA in the 5’-UTR of KRAS oncogene represses translation. *Chem. Commun. Camb. Engl.* 48, 874–876.
- Fay, M.M., Lyons, S.M., and Ivanov, P. (2017). RNA G-Quadruplexes in Biology: Principles and Molecular Mechanisms. *J. Mol. Biol.* 429, 2127–2147.
- Fedoroff, O.Y., Salazar, M., Han, H., Chemeris, V.V., Kerwin, S.M., and Hurley, L.H. (1998). NMR-Based model of a telomerase-inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA. *Biochemistry* 37, 12367–12374.
- Fehrenbacher, N., Gyrd-Hansen, M., Poulsen, B., Felbor, U., Kallunki, T., Boes, M., Weber, E., Leist, M., and Jäättelä, M. (2004). Sensitization to the Lysosomal Cell Death Pathway upon Immortalization and Transformation. *Cancer Res.* 64, 5301–5310.
- Fehrenbacher, N., Bastholm, L., Kirkegaard-Sørensen, T., Rafn, B., Bøttzauw, T., Nielsen, C., Weber, E., Shirasawa, S., Kallunki, T., and Jäättelä, M. (2008). Sensitization to the lysosomal cell death pathway by oncogene-induced down-regulation of lysosome-associated membrane proteins 1 and 2. *Cancer Res.* 68, 6623–6633.
- Felty, Q., Singh, K.P., and Roy, D. (2005). Estrogen-induced G1/S transition of G0-arrested estrogen-dependent breast cancer cells is regulated by mitochondrial oxidant signaling. *Oncogene* 24, 4883–4893.
- Feng, J., Funk, W.D., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., and Yu, J. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236–1241.

- Feng, Z., Hu, W., de Stanchina, E., Teresky, A.K., Jin, S., Lowe, S., and Levine, A.J. (2007). The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res.* 67, 3043–3053.
- Fernald, K., and Kurokawa, M. (2013). Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol.* 23, 620–633.
- Fernando, H., Reszka, A.P., Huppert, J., Ladame, S., Rankin, S., Venkitaraman, A.R., Neidle, S., and Balasubramanian, S. (2006). A conserved quadruplex motif located in a transcription activation site of the human c-kit oncogene. *Biochemistry* 45, 7854–7860.
- Ferrao, P., Sincock, P., Cole, S., and Ashman, L. (2001). Intracellular P-gp contributes to functional drug efflux and resistance in acute myeloid leukaemia. *Leuk. Res.* 25, 395–405.
- Fitzwalter, B., and Thorburn, A. (2015). Recent insights into cell death and autophagy. *FEBS J.* 282, 4279–4288.
- Fitzwalter, B.E., Towers, C.G., Sullivan, K.D., Andrysiak, Z., Hoh, M., Ludwig, M., O’Prey, J., Ryan, K.M., Espinosa, J.M., Morgan, M.J., et al. (2018). Autophagy Inhibition Mediates Apoptosis Sensitization in Cancer Therapy by Relieving FOXO3a Turnover. *Dev. Cell* 44, 555–565.e3.
- Flores, E.R., Tsai, K.Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F., and Jacks, T. (2002). p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* 416, 560–564.
- Fogarty, S., Ross, F.A., Ciruelos, D.V., Gray, A., Gowans, G.J., and Hardie, D.G. (2016). AMPK Causes Cell Cycle Arrest in LKB1-deficient Cells via Activation of CAMKK2. *Mol. Cancer Res.* MCR 14, 683–695.
- Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M., and Jäättelä, M. (2001). Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J. Cell Biol.* 153, 999–1010.
- Frankel, L.B., Lubas, M., and Lund, A.H. (2016). Emerging connections between RNA and autophagy. *Autophagy* 13, 3–23.
- Fraser, M., Harding, S.M., Zhao, H., Coackley, C., Durocher, D., and Bristow, R.G. (2011). MRE11 promotes AKT phosphorylation in direct response to DNA double-strand breaks. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 2218–2232.
- Freund, A., Patil, C.K., and Campisi, J. (2011). p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* 30, 1536–1548.
- Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E.V., Bronson, R.T., and Pellman, D. (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* 437, 1043–1047.
- Fujiwara, Y., Wada, K., and Kabuta, T. (2017). Lysosomal degradation of intracellular nucleic acids—multiple autophagic pathways. *J. Biochem. (Tokyo)* 161, 145–154.
- Fulda, S. (2017). Autophagy in Cancer Therapy. *Front. Oncol.* 7.

- Furuya, K., Ozaki, T., Hanamoto, T., Hosoda, M., Hayashi, S., Barker, P.A., Takano, K., Matsumoto, M., and Nakagawara, A. (2007). Stabilization of p73 by Nuclear IκB Kinase-α Mediates Cisplatin-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* *282*, 18365–18378.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S.A., Abrams, J.M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E.S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D.W., et al. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* *25*, 486–541.
- Ganem, N.J., Cornils, H., Chiu, S.-Y., O'Rourke, K.P., Arnaud, J., Yimlamai, D., Théry, M., Camargo, F.D., and Pellman, D. (2014). Cytokinesis failure triggers hippo tumor suppressor pathway activation. *Cell* *158*, 833–848.
- Gascoigne, K.E., and Taylor, S.S. (2009). How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *J. Cell Sci.* *122*, 2579–2585.
- Gatei, M., Sloper, K., Sörensen, C., Syljuäsen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B.-B., Bartek, J., et al. (2003). Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent Phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in Response to Ionizing Radiation. *J. Biol. Chem.* *278*, 14806–14811.
- Ge, X.Q., and Blow, J.J. (2010). Chk1 inhibits replication factory activation but allows dormant origin firing in existing factories. *J. Cell Biol.* *191*, 1285–1297.
- Gellert, M., Lipsett, M.N., and Davies, D.R. (1962). Helix formation by guanylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *48*, 2013–2018.
- Gewirtz, D.A. (2013). Autophagy and senescence. *Autophagy* *9*, 808–812.
- Gewirtz, D.A., Holt, S.E., and Elmore, L.W. (2008). Accelerated senescence: an emerging role in tumor cell response to chemotherapy and radiation. *Biochem. Pharmacol.* *76*, 947–957.
- Giampazolias, E., Zunino, B., Dhayade, S., Bock, F., Cloix, C., Cao, K., Roca, A., Lopez, J., Ichim, G., Proïcs, E., et al. (2017). Mitochondrial permeabilization engages NF-κB-dependent anti-tumour activity under caspase deficiency. *Nat. Cell Biol.* *19*, 1116–1129.
- Gillet, J.-P., Wang, J., Calcagno, A.M., Green, L.J., Varma, S., Elstrand, M.B., Trope, C.G., Ambudkar, S.V., Davidson, B., and Gottesman, M.M. (2011). Clinical Relevance of Multidrug Resistance Gene Expression in Ovarian Serous Carcinoma Effusions. *Mol. Pharm.* *8*, 2080–2088.
- Girard, P.-M., Pozzebon, M., Delacôte, F., Douki, T., Smirnova, V., and Sage, E. (2008). Inhibition of S-phase progression triggered by UVA-induced ROS does not require a functional DNA damage checkpoint response in mammalian cells. *DNA Repair* *7*, 1500–1516.
- Gire, V., and Dulic, V. (2015). Senescence from G2 arrest, revisited. *Cell Cycle Georget. Tex* *14*, 297–304.
- Goehe, R.W., Di, X., Sharma, K., Bristol, M.L., Henderson, S.C., Valerie, K., Rodier, F., Davalos, A.R., and Gewirtz, D.A. (2012). The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *343*, 763–778.
- Gomez, D., Wenner, T., Brassart, B., Douarre, C., O'Donohue, M.-F., Khoury, V.E., Shin-ya, K., Morjani, H., Trentesaux, C., and Riou, J.-F. (2006). Telomestatin-induced Telomere Uncapping

Is Modulated by POT1 through G-overhang Extension in HT1080 Human Tumor Cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 38721–38729.

- Gong, Y., and de Lange, T. (2010). A Shld1-controlled POT1a provides support for repression of ATR signaling at telomeres through RPA exclusion. *Mol. Cell* **40**, 377–387.
- Gong, J., Costanzo, A., Yang, H.-Q., Melino, G., Kaelin Jnr, W.G., Levrero, M., and Wang, J.Y.J. (1999). The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* **399**, 806–809.
- Gong, Y., Duvvuri, M., and Krise, J.P. (2003). Separate Roles for the Golgi Apparatus and Lysosomes in the Sequestration of Drugs in the Multidrug-resistant Human Leukemic Cell Line HL-60. *J. Biol. Chem.* **278**, 50234–50239.
- Gong, Y., Duvvuri, M., Duncan, M.B., Liu, J., and Krise, J.P. (2006). Niemann-Pick C1 protein facilitates the efflux of the anticancer drug daunorubicin from cells according to a novel vesicle-mediated pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **316**, 242–247.
- González, V., Guo, K., Hurley, L., and Sun, D. (2009). Identification and Characterization of Nucleolin as a c-myc G-quadruplex-binding Protein. *J. Biol. Chem.* **284**, 23622–23635.
- Goodall, M.L., Fitzwalter, B.E., Zahedi, S., Wu, M., Rodriguez, D., Mulcahy-Levy, J.M., Green, D.R., Morgan, M., Cramer, S.D., and Thorburn, A. (2016). The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis. *Dev. Cell* **37**, 337–349.
- Goodrich, D.W. (2006). The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene* **25**, 5233–5243.
- Goto, H., Yasui, Y., Kawajiri, A., Nigg, E.A., Terada, Y., Tatsuka, M., Nagata, K., and Inagaki, M. (2003). Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process. *J. Biol. Chem.* **278**, 8526–8530.
- Gottesman, M.M., and Pastan, I.H. (2015). The Role of Multidrug Resistance Efflux Pumps in Cancer: Revisiting a JNCI Publication Exploring Expression of the MDR1 (P-glycoprotein) Gene. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **107**.
- Gottlieb, T.M., Leal, J.F.M., Seger, R., Taya, Y., and Oren, M. (2002). Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene* **21**, 1299–1303.
- Gowan, S.M., Heald, R., Stevens, M.F.G., and Kelland, L.R. (2001). Potent Inhibition of Telomerase by Small-Molecule Pentacyclic Acridines Capable of Interacting with G-Quadruplexes. *Mol. Pharmacol.* **60**, 981–988.
- Granotier, C., Pennarun, G., Riou, L., Hoffschir, F., Gauthier, L.R., De Cian, A., Gomez, D., Mandine, E., Riou, J.-F., Mergny, J.-L., et al. (2005). Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends. *Nucleic Acids Res.* **33**, 4182–4190.
- 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.

- Gros, P., Ben Neriah, Y.B., Croop, J.M., and Housman, D.E. (1986). Isolation and expression of a complementary DNA that confers multidrug resistance. *Nature* 323, 728–731.
- Gross, A., Yin, X.M., Wang, K., Wei, M.C., Jockel, J., Milliman, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Korsmeyer, S.J. (1999). Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* 274, 1156–1163.
- Groth-Pedersen, L., and Jäättelä, M. (2013). Combating apoptosis and multidrug resistant cancers by targeting lysosomes. *Cancer Lett.* 332, 265–274.
- Guan, J.-J., Zhang, X.-D., Sun, W., Qi, L., Wu, J.-C., and Qin, Z.-H. (2015). DRAM1 regulates apoptosis through increasing protein levels and lysosomal localization of BAX. *Cell Death Dis.* 6, e1624.
- Guédin, A., Gros, J., Alberti, P., and Mergny, J.-L. (2010). How long is too long? Effects of loop size on G-quadruplex stability. *Nucleic Acids Res.* 38, 7858–7868.
- Guha, S., Coffey, E.E., Lu, W., Lim, J.C., Beckel, J.M., Laties, A.M., Boesze-Battaglia, K., and Mitchell, C.H. (2014). Approaches for detecting lysosomal alkalization and impaired degradation in fresh and cultured RPE cells: evidence for a role in retinal degenerations. *Exp. Eye Res.* 126, 68–76.
- Gunaratnam, M., Greciano, O., Martins, C., Reszka, A.P., Schultes, C.M., Morjani, H., Riou, J.-F., and Neidle, S. (2007). Mechanism of acridine-based telomerase inhibition and telomere shortening. *Biochem. Pharmacol.* 74, 679–689.
- Guo, J.Y., Chen, H.-Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A.M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J.J., Chen, G., Lemons, J.M.S., Karantza, V., et al. (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev.* 25, 460–470.
- Guo, X., Keyes, W.M., Papazoglu, C., Zuber, J., Li, W., Lowe, S.W., Vogel, H., and Mills, A.A. (2009). TAp63 induces senescence and suppresses tumorigenesis in vivo. *Nat. Cell Biol.* 11, 1451–1457.
- Guo, Z., Deshpande, R., and Paull, T.T. (2010a). ATM activation in the presence of oxidative stress. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 4805–4811.
- Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M.F., Person, M.D., and Paull, T.T. (2010b). ATM activation by oxidative stress. *Science* 330, 517–521.
- Gutierrez, M.G., Munafó, D.B., Berón, W., and Colombo, M.I. (2004). Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 117, 2687–2697.
- Hahn, W.C., Stewart, S.A., Brooks, M.W., York, S.G., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R.L., Knoll, J.H., Meyerson, M., and Weinberg, R.A. (1999). Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat. Med.* 5, 1164–1170.
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., et al. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495, 389–393.

- Hampel, S.M., Pepe, A., Greulich-Bode, K.M., Malhotra, S.V., Reszka, A.P., Veith, S., Boukamp, P., and Neidle, S. (2013). Mechanism of the Antiproliferative Activity of Some Naphthalene Diimide G-Quadruplex Ligands. *Mol. Pharmacol.* **83**, 470–480.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674.
- Hanakahi, L.A., Sun, H., and Maizels, N. (1999). High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA. *J. Biol. Chem.* **274**, 15908–15912.
- Hänsel-Hertsch, R., Di Antonio, M., and Balasubramanian, S. (2017). DNA G-quadruplexes in the human genome: detection, functions and therapeutic potential. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 279–284.
- Hao, S.-J., Hou, J.-F., Jiang, N., and Zhang, G.-J. (2008). Loss of membrane cholesterol affects lysosomal osmotic stability. *Gen. Physiol. Biophys.* **27**, 278–283.
- Harhaji-Trajkovic, L., Vilimanovich, U., Kravic-Stevovic, T., Bumbasirevic, V., and Trajkovic, V. (2009). AMPK-mediated autophagy inhibits apoptosis in cisplatin-treated tumour cells. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 3644–3654.
- Hase, K., Fujiwara, Y., Kikuchi, H., Aizawa, S., Hakuno, F., Takahashi, S.-I., Wada, K., and Kabuta, T. (2015). RNautophagy/DNautophagy possesses selectivity for RNA/DNA substrates. *Nucleic Acids Res.* **43**, 6439–6449.
- Havens, C.G., Ho, A., Yoshioka, N., and Dowdy, S.F. (2006). Regulation of Late G1/S Phase Transition and APCCdh1 by Reactive Oxygen Species. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4701–4711.
- Hayflick, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp. Cell Res.* **37**, 614–636.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621.
- Heinrich, M., Neumeyer, J., Jakob, M., Hallas, C., Tchikov, V., Winoto-Morbach, S., Wickel, M., Schneider-Brachert, W., Trauzold, A., Hethke, A., et al. (2004). Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell Death Differ.* **11**, 550–563.
- Henderson, A., Wu, Y., Huang, Y.C., Chavez, E.A., Platt, J., Johnson, F.B., Brosh, R.M., Sen, D., and Lansdorp, P.M. (2014). Detection of G-quadruplex DNA in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* **42**, 860–869.
- 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.
- Heo, J., Raines, K.W., Mocanu, V., and Campbell, S.L. (2006). Redox regulation of RhoA. *Biochemistry* **45**, 14481–14489.
- Herbert, B., Pitts, A.E., Baker, S.I., Hamilton, S.E., Wright, W.E., Shay, J.W., and Corey, D.R. (1999). Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 14276–14281.

- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P.C., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol. Cell* 14, 501–513.
- Herlevsen, M., Oxford, G., Owens, C.R., Conaway, M., and Theodorescu, D. (2007). Depletion of major vault protein increases doxorubicin sensitivity and nuclear accumulation and disrupts its sequestration in lysosomes. *Mol. Cancer Ther.* 6, 1804–1813.
- Hewitt, G., Carroll, B., Sarallah, R., Correia-Melo, C., Ogrodnik, M., Nelson, G., Otten, E.G., Manni, D., Antrobus, R., Morgan, B.A., et al. (2016). SQSTM1/p62 mediates crosstalk between autophagy and the UPS in DNA repair. *Autophagy* 12, 1917–1930.
- Hientz, K., Mohr, A., Bhakta-Guha, D., and Efferth, T. (2016). The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* 8, 8921–8946.
- Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J., and Mak, T.W. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 287, 1824–1827.
- Ho, J., and Benchimol, S. (2003). Transcriptional repression mediated by the p53 tumour suppressor. *Cell Death Differ.* 10, 404–408.
- Hobbs, G.A., Zhou, B., Cox, A.D., and Campbell, S.L. (2014). Rho GTPases, oxidation, and cell redox control. *Small GTPases* 5.
- Hoffarth, S., Zitzer, A., Wiewrodt, R., Hähnel, P.S., Beyer, V., Kreft, A., Biesterfeld, S., and Schuler, M. (2008). pp32/PHAPI determines the apoptosis response of non-small-cell lung cancer. *Cell Death Differ.* 15, 161–170.
- Hoffmann, I., Clarke, P.R., Marcote, M.J., Karsenti, E., and Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *EMBO J.* 12, 53–63.
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 1, 489–495.
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B., and Johnston, P.G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat. Rev. Cancer* 13, 714–726.
- Hong, Y., Xiong, H., Lam, J.W.Y., Häussler, M., Liu, J., Yu, Y., Zhong, Y., Sung, H.H.Y., Williams, I.D., Wong, K.S., et al. (2010). Fluorescent bioprobes: structural matching in the docking processes of aggregation-induced emission fluorogens on DNA surfaces. *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* 16, 1232–1245.
- 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.
- Hou, W., Han, J., Lu, C., Goldstein, L.A., and Rabinowich, H. (2010). Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy* 6, 891–900.
- Hoyt, M.A., Totis, L., and Roberts, B.T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66, 507–517.

- Hrabeta, J., Groh, T., Khalil, M.A., Poljakova, J., Adam, V., Kizek, R., Uhlik, J., Doktorova, H., Cerna, T., Frei, E., et al. (2015). Vacuolar-ATPase-mediated intracellular sequestration of ellipticine contributes to drug resistance in neuroblastoma cells. *Int. J. Oncol.* *47*, 971–980.
- Hu, L., Iliuk, A., Galan, J., Hans, M., and W. Andy, T. (2011). Identification of Drug Targets in vitro and in Living Cells by Soluble Nanopolymer-based Proteomics. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *50*, 4133–4136.
- Huai, J., Vögtle, F.-N., Jöckel, L., Li, Y., Kiefer, T., Ricci, J.-E., and Borner, C. (2013). TNF α -induced lysosomal membrane permeability is downstream of MOMP and triggered by caspase-mediated NDUF51 cleavage and ROS formation. *J. Cell Sci.* *126*, 4015–4025.
- Huang, K., Zhang, J., O’Neill, K.L., Gurumurthy, C.B., Quadros, R.M., Tu, Y., and Luo, X. (2016). Cleavage by Caspase 8 and Mitochondrial Membrane Association Activate the BH3-only Protein Bid during TRAIL-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* *291*, 11843–11851.
- Huang, W.-C., Tseng, T.-Y., Chen, Y.-T., Chang, C.-C., Wang, Z.-F., Wang, C.-L., Hsu, T.-N., Li, P.-T., Chen, C.-T., Lin, J.-J., et al. (2015). Direct evidence of mitochondrial G-quadruplex DNA by using fluorescent anti-cancer agents. *Nucleic Acids Res.* *43*, 10102–10113.
- Huff, L.M., Lee, J.-S., Robey, R.W., and Fojo, T. (2006). Characterization of gene rearrangements leading to activation of MDR-1. *J. Biol. Chem.* *281*, 36501–36509.
- Hümmer, S., and Mayer, T.U. (2009). Cdk1 Negatively Regulates Midzone Localization of the Mitotic Kinesin Mklp2 and the Chromosomal Passenger Complex. *Curr. Biol.* *19*, 607–612.
- Huppert, J.L., and Balasubramanian, S. (2005). Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res.* *33*, 2908–2916.
- Huppert, J.L., and Balasubramanian, S. (2007). G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* *35*, 406–413.
- Huppert, J.L., Bugaut, A., Kumari, S., and Balasubramanian, S. (2008). G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs. *Nucleic Acids Res.* *36*, 6260–6268.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., et al. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* *408*, 488–492.
- Ichwan, S.J.A., Yamada, S., Sumrejkanchanakij, P., Ibrahim-Auerkari, E., Eto, K., and Ikeda, M.-A. (2006). Defect in serine 46 phosphorylation of p53 contributes to acquisition of p53 resistance in oral squamous cell carcinoma cells. *Oncogene* *25*, 1216–1224.
- Inga, A., Storici, F., Darden, T.A., and Resnick, M.A. (2002). Differential transactivation by the p53 transcription factor is highly dependent on p53 level and promoter target sequence. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 8612–8625.
- Inoki, K., Zhu, T., and Guan, K.-L. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* *115*, 577–590.
- Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H., et al. (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* *407*, 645–648.

- Irwin, M.S., Kondo, K., Marin, M.C., Cheng, L.S., Hahn, W.C., and Kaelin, W.G. (2003). Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell* 3, 403–410.
- Itakura, E., and Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* 6, 764–776.
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., and Mizushima, N. (2012). The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* 151, 1256–1269.
- Ito, T., Teo, Y.V., Evans, S.A., Neretti, N., and Sedivy, J.M. (2018). Regulation of Cellular Senescence by Polycomb Chromatin Modifiers through Distinct DNA Damage- and Histone Methylation-Dependent Pathways. *Cell Rep.* 22, 3480–3492.
- Ivanov, A., Cragg, M.S., Erenpreisa, J., Emzinsh, D., Lukman, H., and Illidge, T.M. (2003). Endopolyploid cells produced after severe genotoxic damage have the potential to repair DNA double strand breaks. *J. Cell Sci.* 116, 4095–4106.
- Jäättelä, M., and Tschopp, J. (2003). Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat. Immunol.* 4, 416–423.
- Jafri, M.A., Ansari, S.A., Alqahtani, M.H., and Shay, J.W. (2016). Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med.* 8.
- Janssens, S., Tinel, A., Lippens, S., and Tschopp, J. (2005). PIDD mediates NF-kappaB activation in response to DNA damage. *Cell* 123, 1079–1092.
- Javelaud, D., and Besançon, F. (2002). Inactivation of p21 WAF1 Sensitizes Cells to Apoptosis via an Increase of Both p14ARF and p53 Levels and an Alteration of the Bax/Bcl-2 Ratio. *J. Biol. Chem.* 277, 37949–37954.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C.M., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 8, 37–45.
- Jeong, H.Y., Kang, J.M., Jun, H.H., Kim, D.-J., Park, S.H., Sung, M.J., Heo, J.H., Yang, D.H., Lee, S.H., and Lee, S.-Y. (2018). Chloroquine and amodiaquine enhance AMPK phosphorylation and improve mitochondrial fragmentation in diabetic tubulopathy. *Sci. Rep.* 8, 8774.
- Jeong, S.-Y., Kumagai, A., Lee, J., and Dunphy, W.G. (2003). Phosphorylated claspin interacts with a phosphate-binding site in the kinase domain of Chk1 during ATR-mediated activation. *J. Biol. Chem.* 278, 46782–46788.
- Jia, J., Abudu, Y.P., Claude-Taupin, A., Gu, Y., Kumar, S., Choi, S.W., Peters, R., Mudd, M.H., Allers, L., Salemi, M., et al. (2018). Galectins Control mTOR in Response to Endomembrane Damage. *Mol. Cell* 70, 120-135.e8.
- Jiang, H., Reinhardt, H.C., Bartkova, J., Tommiska, J., Blomqvist, C., Nevanlinna, H., Bartek, J., Yaffe, M.B., and Hemann, M.T. (2009). The combined status of ATM and p53 link tumor development with therapeutic response. *Genes Dev.* 23, 1895–1909.
- Jones, K.R., Elmore, L.W., Jackson-Cook, C., Demasters, G., Povirk, L.F., Holt, S.E., and Gewirtz, D.A. (2005). p53-Dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 81, 445–458.

- Jordan, S.N., and Canman, J.C. (2012). Rho GTPases in animal cell cytokinesis: An occupation by the one percent. *Cytoskelet.* Hoboken NJ 69, 919–930.
- Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* 20, 1992–2003.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720–5728.
- Kågedal, K., Johansson, A.-C., Johansson, U., Heimlich, G., Roberg, K., Wang, N.S., Jürgensmeier, J.M., and Öllinger, K. (2005). Lysosomal membrane permeabilization during apoptosis – involvement of Bax? *Int. J. Exp. Pathol.* 86, 309–321.
- Kallunki, T., Olsen, O.D., and Jäättelä, M. (2013). Cancer-associated lysosomal changes: friends or foes? *Oncogene* 32, 1995–2004.
- Kamijo, K., Ohara, N., Abe, M., Uchimura, T., Hosoya, H., Lee, J.-S., and Miki, T. (2006). Dissecting the role of Rho-mediated signaling in contractile ring formation. *Mol. Biol. Cell* 17, 43–55.
- Kang, C., Xu, Q., Martin, T.D., Li, M.Z., Demaria, M., Aron, L., Lu, T., Yankner, B.A., Campisi, J., and Elledge, S.J. (2015). The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science* 349, aaa5612.
- Kang, C.-C., Huang, W.-C., Kouh, C.-W., Wang, Z.-F., Cho, C.-C., Chang, C.-C., Wang, C.-L., Chang, T.-C., Seemann, J., and Huang, L.J. (2013). Chemical principles for the design of a novel fluorescent probe with high cancer-targeting selectivity and sensitivity. *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro* 5, 1217–1228.
- Kang, T.-W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., et al. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 479, 547–551.
- Kanzawa, T., Germano, I.M., Komata, T., Ito, H., Kondo, Y., and Kondo, S. (2004). Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* 11, 448–457.
- Karch, J., Schips, T.G., Maliken, B.D., Brody, M.J., Sargent, M.A., Kanisicak, O., and Molkenin, J.D. (2017). Autophagic cell death is dependent on lysosomal membrane permeability through Bax and Bak. *ELife* 6.
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and de Lange, T. (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321–1325.
- Katheder, N.S., Khezri, R., O’Farrell, F., Schultz, S.W., Jain, A., Rahman, M.M., Schink, K.O., Theodossiou, T.A., Johansen, T., Juhász, G., et al. (2017). Microenvironmental autophagy promotes tumour growth. *Nature* 541, 417–420.
- Kato, J., Matsushime, H., Hiebert, S.W., Ewen, M.E., and Sherr, C.J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.* 7, 331–342.

- Kaushik, S., Massey, A.C., Mizushima, N., and Cuervo, A.M. (2008). Constitutive Activation of Chaperone-mediated Autophagy in Cells with Impaired Macroautophagy. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2179–2192.
- Kazemier, H.G., Paeschke, K., and Lansdorp, P.M. (2017). Guanine quadruplex monoclonal antibody 1H6 cross-reacts with restrained thymidine-rich single stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* *45*, 5913–5919.
- Kazmi, F., Hensley, T., Pope, C., Funk, R.S., Loewen, G.J., Buckley, D.B., and Parkinson, A. (2013). Lysosomal Sequestration (Trapping) of Lipophilic Amine (Cationic Amphiphilic) Drugs in Immortalized Human Hepatocytes (Fa2N-4 Cells). *Drug Metab. Dispos.* *41*, 897–905.
- Kenzelmann Broz, D., Spano Mello, S., Biegging, K.T., Jiang, D., Dusek, R.L., Brady, C.A., Sidow, A., and Attardi, L.D. (2013). Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses. *Genes Dev.* *27*, 1016–1031.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* *26*, 239–257.
- Khosravi, R., Maya, R., Gottlieb, T., Oren, M., Shiloh, Y., and Shkedy, D. (1999). Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14973–14977.
- 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, I., and Lemasters, J.J. (2011). Mitophagy selectively degrades individual damaged mitochondria after photoirradiation. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 1919–1928.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* *13*, 132–141.
- 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.
- King, M.A., Ganley, I.G., and Flemington, V. (2016). Inhibition of cholesterol metabolism underlies synergy between mTOR pathway inhibition and chloroquine in bladder cancer cells. *Oncogene* *35*, 4518–4528.
- Kirkegaard, T., and Jäättelä, M. (2009). Lysosomal involvement in cell death and cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* *1793*, 746–754.
- Kirkegaard, T., Roth, A.G., Petersen, N.H.T., Mahalka, A.K., Olsen, O.D., Moilanen, I., Zylicz, A., Knudsen, J., Sandhoff, K., Arenz, C., et al. (2010). Hsp70 stabilizes lysosomes and reverts Niemann-Pick disease-associated lysosomal pathology. *Nature* *463*, 549–553.
- Kischkel, F.C., Lawrence, D.A., Chuntharapai, A., Schow, P., Kim, K.J., and Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity* *12*, 611–620.

- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Acevedo Arozena, A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* *12*, 1–222.
- Knizhnik, A.V., Roos, W.P., Nikolova, T., Quiros, S., Tomaszowski, K.-H., Christmann, M., and Kaina, B. (2013). Survival and death strategies in glioma cells: autophagy, senescence and apoptosis triggered by a single type of temozolomide-induced DNA damage. *PLoS One* *8*, e55665.
- Kodama, R., Kato, M., Furuta, S., Ueno, S., Zhang, Y., Matsuno, K., Yabe-Nishimura, C., Tanaka, E., and Kamata, T. (2013). ROS-generating oxidases Nox1 and Nox4 contribute to oncogenic Ras-induced premature senescence. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *18*, 32–41.
- Kolb, H.C., Finn, M.G., and Sharpless, K.B. (2001). Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *40*, 2004–2021.
- Konecny, G.E., and Kristeleit, R.S. (2016). PARP inhibitors for BRCA1/2-mutated and sporadic ovarian cancer: current practice and future directions. *Br. J. Cancer* *115*, 1157–1173.
- Kornhuber, J., Henkel, A.W., Groemer, T.W., Städtler, S., Welzel, O., Tripal, P., Rotter, A., Bleich, S., and Trapp, S. (2010). Lipophilic cationic drugs increase the permeability of lysosomal membranes in a cell culture system. *J. Cell. Physiol.* *224*, 152–164.
- Korolchuk, V.I., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2009). A novel link between autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Autophagy* *5*, 862–863.
- Korwek, Z., Sewastianik, T., Bielak-Zmijewska, A., Mosieniak, G., Alster, O., Moreno-Villaneuva, M., Burkle, A., and Sikora, E. (2012). Inhibition of ATM blocks the etoposide-induced DNA damage response and apoptosis of resting human T cells. *DNA Repair* *11*, 864–873.
- Kosako, H., Yoshida, T., Matsumura, F., Ishizaki, T., Narumiya, S., and Inagaki, M. (2000). Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene* *19*, 6059–6064.
- Koyama-Honda, I., Itakura, E., Fujiwara, T.K., and Mizushima, N. (2013). Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy* *9*, 1491–1499.
- Krämer, A., Mailand, N., Lukas, C., Syljuåsen, R.G., Wilkinson, C.J., Nigg, E.A., Bartek, J., and Lukas, J. (2004). Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase. *Nat. Cell Biol.* *6*, 884–891.
- Krenning, L., Feringa, F.M., Shaltiel, I.A., van den Berg, J., and Medema, R.H. (2014). Transient activation of p53 in G2 phase is sufficient to induce senescence. *Mol. Cell* *55*, 59–72.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev.* *24*, 2463–2479.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H.Y., and Dunphy, W.G. (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* *124*, 943–955.

- Kumari, S., Bugaut, A., Huppert, J.L., and Balasubramanian, S. (2007). An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nat. Chem. Biol.* *3*, 218–221.
- Kundra, R., and Kornfeld, S. (1999). Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis. *J. Biol. Chem.* *274*, 31039–31046.
- Kuo, T.-C., Chen, C.-T., Baron, D., Onder, T.T., Loewer, S., Almeida, S., Weismann, C., Xu, P., Houghton, J.-M., Gao, F.-B., et al. (2011). Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1214–1223.
- Kurasawa, Y., Earnshaw, W.C., Mochizuki, Y., Dohmae, N., and Todokoro, K. (2004). Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation. *EMBO J.* *23*, 3237–3248.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J. Cell Sci.* *113*, 3613–3622.
- Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B., and Brunk, U.T. (2008). Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem. Cell Biol.* *129*, 389–406.
- Kyte, J.A. (2009). Cancer vaccination with telomerase peptide GV1001. *Expert Opin. Investig. Drugs* *18*, 687–694.
- Lafarga, V., Cuadrado, A., Lopez de Silanes, I., Bengoechea, R., Fernandez-Capetillo, O., and Nebreda, A.R. (2009). p38 Mitogen-activated protein kinase- and HuR-dependent stabilization of p21(Cip1) mRNA mediates the G(1)/S checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 4341–4351.
- Lam, E.Y.N., Beraldi, D., Tannahill, D., and Balasubramanian, S. (2013). G-Quadruplex structures are stable and detectable in human genomic DNA. *Nat. Commun.* *4*, 1796.
- Lang, G.A., Iwakuma, T., Suh, Y.-A., Liu, G., Rao, V.A., Parant, J.M., Valentin-Vega, Y.A., Terzian, T., Caldwell, L.C., Strong, L.C., et al. (2004). Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* *119*, 861–872.
- Lartigue, L., Kushnareva, Y., Seong, Y., Lin, H., Faustin, B., and Newmeyer, D.D. (2009). Caspase-independent mitochondrial cell death results from loss of respiration, not cytotoxic protein release. *Mol. Biol. Cell* *20*, 4871–4884.
- Lecot, P., Alimirah, F., Desprez, P.-Y., Campisi, J., and Wiley, C. (2016). Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development. *Br. J. Cancer* *114*, 1180–1184.
- Lee, J.-H., and Paull, T.T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science* *308*, 551–554.
- Lee, J., Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2007). The Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR. *J. Biol. Chem.* *282*, 28036–28044.
- Lee, J.H., Jeong, S.A., Khadka, P., Hong, J., and Chung, I.K. (2015). Involvement of SRSF11 in cell cycle-specific recruitment of telomerase to telomeres at nuclear speckles. *Nucleic Acids Res.* *43*, 8435–8451.

- Leonetti, C., Amodei, S., D'Angelo, C., Rizzo, A., Benassi, B., Antonelli, A., Elli, R., Stevens, M.F.G., D'Incalci, M., Zupi, G., et al. (2004). Biological Activity of the G-Quadruplex Ligand RHPS4 (3,11-Difluoro-6,8,13-trimethyl-8H-quinolo[4,3,2-kl]acridinium methosulfate) Is Associated with Telomere Capping Alteration. *Mol. Pharmacol.* *66*, 1138–1146.
- Leow, S.M., Chua, S.X.S., Venkatachalam, G., Shen, L., Luo, L., and Clement, M.-V. (2016). Sub-lethal oxidative stress induces lysosome biogenesis via a lysosomal membrane permeabilization-cathepsin-caspase 3-transcription factor EB-dependent pathway. *Oncotarget* *8*, 16170–16189.
- Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 749–758.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* *91*, 479–489.
- Li, Y., Sun, Y., Jing, L., Wang, J., Yan, Y., Feng, Y., Zhang, Y., Liu, Z., Ma, L., and Diao, A. (2017a). Lysosome Inhibitors Enhance the Chemotherapeutic Activity of Doxorubicin in HepG2 Cells. *Chemotherapy* *62*, 85–93.
- Li, Y.-J., Lei, Y.-H., Yao, N., Wang, C.-R., Hu, N., Ye, W.-C., Zhang, D.-M., and Chen, Z.-S. (2017b). Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin. J. Cancer* *36*, 52.
- Lian, J., Wu, X., He, F., Karnak, D., Tang, W., Meng, Y., Xiang, D., Ji, M., Lawrence, T.S., and Xu, L. (2011). A natural BH3 mimetic induces autophagy in apoptosis-resistant prostate cancer via modulating Bcl-2-Becn1 interaction at endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ.* *18*, 60–71.
- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B.-H., and Jung, J.U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Becn1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.* *8*, 688–699.
- Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C., van Aelst, L., Serrano, M., and Lowe, S.W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev.* *12*, 3008–3019.
- Lin, J., Countryman, P., Buncher, N., Kaur, P., E, L., Zhang, Y., Gibson, G., You, C., Watkins, S.C., Piehler, J., et al. (2014). TRF1 and TRF2 use different mechanisms to find telomeric DNA but share a novel mechanism to search for protein partners at telomeres. *Nucleic Acids Res.* *42*, 2493–2504.
- Lingner, J., Hughes, T.R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., and Cech, T.R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* *276*, 561–567.
- Liou, G.-Y., and Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic. Res.* *44*.
- Lissa, D., Senovilla, L., Rello-Varona, S., Vitale, I., Michaud, M., Pietrocola, F., Boilève, A., Obrist, F., Bordenave, C., Garcia, P., et al. (2014). Resveratrol and aspirin eliminate tetraploid cells for anticancer chemoprevention. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 3020–3025.
- Lissy, N.A., Davis, P.K., Irwin, M., Kaelin, W.G., and Dowdy, S.F. (2000). A common E2F-1 and p73 pathway mediates cell death induced by TCR activation. *Nature* *407*, 642–645.

- 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, E.Y., Xu, N., O'Prey, J., Lao, L.Y., Joshi, S., Long, J.S., O'Prey, M., Croft, D.R., Beaumatin, F., Baudot, A.D., et al. (2015). Loss of autophagy causes a synthetic lethal deficiency in DNA repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 773–778.
- Liu, J., Luo, S., Zhao, H., Liao, J., Li, J., Yang, C., Xu, B., Stern, D.F., Xu, X., and Ye, K. (2012). Structural mechanism of the phosphorylation-dependent dimerization of the MDC1 forkhead-associated domain. *Nucleic Acids Res.* *40*, 3898–3912.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.-S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., et al. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.* *14*, 1448–1459.
- Lock, R., Kenific, C.M., Leidal, A.M., Salas, E., and Debnath, J. (2014). Autophagy-dependent production of secreted factors facilitates oncogenic RAS-driven invasion. *Cancer Discov.* *4*, 466–479.
- Lolli, G., and Johnson, L.N. (2005). CAK—Cyclin-Dependent Activating Kinase: A Key Kinase in Cell Cycle Control and a Target for Drugs? *Cell Cycle* *4*, 565–570.
- Loos, B., du Toit, A., and Hofmeyr, J.-H.S. (2014). Defining and measuring autophagosome flux—concept and reality. *Autophagy* *10*, 2087–2096.
- Lord, C.J., and Ashworth, A. (2012). The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* *481*, 287–294.
- Lordier, L., Jalil, A., Aurade, F., Larbret, F., Larghero, J., Debili, N., Vainchenker, W., and Chang, Y. (2008). Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood* *112*, 3164–3174.
- Lübke, T., Lobel, P., and Sleat, D.E. (2009). Proteomics of the lysosome. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 625–635.
- Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat. Cell Biol.* *5*, 255–260.
- Luo, L., Huang, W., Tao, R., Hu, N., Xiao, Z.-X., and Luo, Z. (2013). ATM and LKB1 dependent activation of AMPK sensitizes cancer cells to etoposide-induced apoptosis. *Cancer Lett.* *328*, 114–119.
- Ma, D.-L., Zhang, Z., Wang, M., Lu, L., Zhong, H.-J., and Leung, C.-H. (2015). Recent Developments in G-Quadruplex Probes. *Chem. Biol.* *22*, 812–828.
- Mabb, A.M., Wuerzberger-Davis, S.M., and Miyamoto, S. (2006). PIASy mediates NEMO sumoylation and NF- κ B activation in response to genotoxic stress. *Nat. Cell Biol.* *8*, 986–993.
- Macheret, M., and Halazonetis, T.D. (2015). DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu. Rev. Pathol.* *10*, 425–448.

- MacIntyre, A.C., and Cutler, D.J. (1988). The potential role of lysosomes in tissue distribution of weak bases. *Biopharm. Drug Dispos.* 9, 513–526.
- Macůrek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M.A., Klompmaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S.S., Yaffe, M.B., and Medema, R.H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* 455, 119–123.
- Maejima, I., Takahashi, A., Omori, H., Kimura, T., Takabatake, Y., Saitoh, T., Yamamoto, A., Hamasaki, M., Noda, T., Isaka, Y., et al. (2013). Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J.* 32, 2336–2347.
- Mai, T.T., Hamai, A., Hienzschi, A., Cañeque, T., Müller, S., Wicinski, J., Cabaud, O., Leroy, C., David, A., Acevedo, V., et al. (2017). Salinomycin kills cancer stem cells by sequestering iron in lysosomes. *Nat. Chem.* 9, 1025–1033.
- Maise, C., Munarriz, E., Barcaroli, D., Melino, G., and De Laurenzi, V. (2004). DNA damage induces the rapid and selective degradation of the DeltaNp73 isoform, allowing apoptosis to occur. *Cell Death Differ.* 11, 685–687.
- Maiuri, M.C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J.M., Tajeddine, N., Hickman, J.A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007). BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* 3, 374–376.
- Maiuri, M.C., Tasdemir, E., Criollo, A., Morselli, E., Vicencio, J.M., Carnuccio, R., and Kroemer, G. (2009). Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ.* 16, 87–93.
- 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.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* 30, 630–641.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* 9, 153–166.
- Mamely, I., van Vugt, M.A., Smits, V.A.J., Semple, J.I., Lemmens, B., Perrakis, A., Medema, R.H., and Freire, R. (2006). Polo-like kinase-1 controls proteasome-dependent degradation of Claspin during checkpoint recovery. *Curr. Biol.* CB 16, 1950–1955.
- Mansilla, S., Priebe, W., and Portugal, J. (2006). Mitotic catastrophe results in cell death by caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Cell Cycle Georget. Tex* 5, 53–60.
- Mansouri, A., Ridgway, L.D., Korapati, A.L., Zhang, Q., Tian, L., Wang, Y., Siddik, Z.H., Mills, G.B., and Claret, F.X. (2003). Sustained Activation of JNK/p38 MAPK Pathways in Response to Cisplatin Leads to Fas Ligand Induction and Cell Death in Ovarian Carcinoma Cells. *J. Biol. Chem.* 278, 19245–19256.
- Manukyan, A., Ludwig, K., Sanchez-Manchinelly, S., Parsons, S.J., and Stukenberg, P.T. (2015). A complex of p190RhoGAP-A and anillin modulates RhoA-GTP and the cytokinetic furrow in human cells. *J Cell Sci* 128, 50–60.

- Marceau, F., Bawolak, M.-T., Lodge, R., Bouthillier, J., Gagné-Henley, A., Gaudreault, R.C., and Morissette, G. (2012). Cation trapping by cellular acidic compartments: beyond the concept of lysosomotropic drugs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *259*, 1–12.
- Maréchal, A., and Zou, L. (2013). DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*.
- Margolis, R.L., Lohez, O.D., and Andreassen, P.R. (2003). G1 tetraploidy checkpoint and the suppression of tumorigenesis. *J. Cell. Biochem.* *88*, 673–683.
- Marian, C.O., Cho, S.K., McEllin, B.M., Maher, E.A., Hatanpaa, K.J., Madden, C.J., Mickey, B.E., Wright, W.E., Shay, J.W., and Bachoo, R.M. (2010). The telomerase antagonist, imetelstat, efficiently targets glioblastoma tumor-initiating cells leading to decreased proliferation and tumor growth. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 154–163.
- Mariño, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., and Kroemer, G. (2014). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 81–94.
- Martina, J.A., Chen, Y., Gucek, M., and Puertollano, R. (2012). MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* *8*, 903–914.
- Martinez, L.A., Yang, J., Vazquez, E.S., del Carmen Rodriguez-Vargas, M., Olive, M., Hsieh, J.-T., Logothetis, C.J., and Navone, N.M. (2002). p21 modulates threshold of apoptosis induced by DNA-damage and growth factor withdrawal in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* *23*, 1289–1296.
- Marxer, M., Foucar, C.E., Man, W.Y., Chen, Y., Ma, H.T., and Poon, R.Y.C. (2012). Tetraploidization increases sensitivity to Aurora B kinase inhibition. *Cell Cycle Georget. Tex* *11*, 2567–2577.
- Masutomi, K., Yu, E.Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J.L., Metz, G.B., Brooks, M.W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J.A., et al. (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* *114*, 241–253.
- Mathew, R., Kongara, S., Beaudoin, B., Karp, C.M., Bray, K., Degenhardt, K., Chen, G., Jin, S., and White, E. (2007). Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* *21*, 1367–1381.
- Mathew, R., Karp, C., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., et al. (2009). Autophagy Suppresses Tumorigenesis Through Elimination of p62. *Cell* *137*, 1062–1075.
- Mathiassen, S.G., De Zio, D., and Cecconi, F. (2017). Autophagy and the Cell Cycle: A Complex Landscape. *Front. Oncol.* *7*.
- Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N.T., Izumi, T., Noda, T., and Yoshimori, T. (2010). Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J. Cell Biol.* *190*, 511–521.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., and Elledge, S.J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 10389–10394.

- Matt, S., and Hofmann, T.G. (2016). The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 73, 2829–2850.
- Mayo, L.D., Seo, Y.R., Jackson, M.W., Smith, M.L., Rivera Guzman, J., Korgaonkar, C.K., and Donner, D.B. (2005). Phosphorylation of human p53 at serine 46 determines promoter selection and whether apoptosis is attenuated or amplified. *J. Biol. Chem.* 280, 25953–25959.
- McCool, K.W., and Miyamoto, S. (2012). DNA damage-dependent NF- κ B activation: NEMO turns nuclear signaling inside out. *Immunol. Rev.* 246, 311–326.
- Medina, D.L., Di Paola, S., Peluso, I., Armani, A., De Stefani, D., Venditti, R., Montefusco, S., Scotto-Rosato, A., Prezioso, C., Forrester, A., et al. (2015). Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nat. Cell Biol.* 17, 288–299.
- Meyne, J., Ratliff, R.L., and Moyzis, R.K. (1989). Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG) $_n$ among vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7049–7053.
- Michallet, M.-C., Saltel, F., Flacher, M., Revillard, J.-P., and Genestier, L. (2004). Cathepsin-dependent apoptosis triggered by supraoptimal activation of T lymphocytes: a possible mechanism of high dose tolerance. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 5405–5414.
- Michaloglou, C., Vredevelde, L.C.W., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M.A.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* 436, 720–724.
- Mierzwa, B., and Gerlich, D.W. (2014). Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control. *Dev. Cell* 31, 525–538.
- Mindell, J.A. (2012). Lysosomal acidification mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 74, 69–86.
- Mishima, M., Kaitna, S., and Glotzer, M. (2002). Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Dev. Cell* 2, 41–54.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 107–132.
- Mollinari, C., Kleman, J.-P., Jiang, W., Schoehn, G., Hunter, T., and Margolis, R.L. (2002). PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J. Cell Biol.* 157, 1175–1186.
- Morselli, E., Shen, S., Ruckstuhl, C., Bauer, M.A., Mariño, G., Galluzzi, L., Criollo, A., Michaud, M., Maiuri, M.C., Chano, T., et al. (2011). p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17, RB1CC1/FIP200. *Cell Cycle Georget. Tex* 10, 2763–2769.
- Mowers, E.E., Sharifi, M.N., and Macleod, K.F. (2017). Autophagy in cancer metastasis. *Oncogene* 36, 1619–1630.
- 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) $_n$, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 6622–6626.
- Muñoz-Gómez, J.A., Rodríguez-Vargas, J.M., Quiles-Pérez, R., Aguilar-Quesada, R., Martín-Oliva, D., de Murcia, G., Menissier de Murcia, J., Almendros, A., Ruiz de Almodóvar, M., and

- Oliver, F.J. (2009). PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. *Autophagy* 5, 61–74.
- Musacchio, A. (2015). The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics. *Curr. Biol. CB* 25, R1002-1018.
 - Myers, J.S., and Cortez, D. (2006). Rapid Activation of ATR by Ionizing Radiation Requires ATM and Mre11. *J. Biol. Chem.* 281, 9346–9350.
 - Nakagawa, T., Takahashi, M., Ozaki, T., Watanabe Ki, K., Todo, S., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., and Nakagawara, A. (2002). Autoinhibitory regulation of p73 by Delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the Delta Np73 promoter. *Mol. Cell. Biol.* 22, 2575–2585.
 - 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.
 - Napoli, M., and Flores, E.R. (2013). The family that eats together stays together: new p53 family transcriptional targets in autophagy. *Genes Dev.* 27, 971–974.
 - Napolitano, G., and Ballabio, A. (2016). TFEB at a glance. *J. Cell Sci.* 129, 2475–2481.
 - Narita, M., Young, A.R.J., Arakawa, S., Samarajiwa, S.A., Nakashima, T., Yoshida, S., Hong, S., Berry, L.S., Reichelt, S., Ferreira, M., et al. (2011). Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes. *Science* 332, 966–970.
 - 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.
 - Nicolai, S., Rossi, A., Di Daniele, N., Melino, G., Annicchiarico-Petruzzelli, M., and Raschellà, G. (2015). DNA repair and aging: the impact of the p53 family. *Aging* 7, 1050–1065.
 - Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2009). Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 461, 654–658.
 - Nylandsted, J., Gyrd-Hansen, M., Danielewicz, A., Fehrenbacher, N., Lademann, U., Høyer-Hansen, M., Weber, E., Multhoff, G., Rohde, M., and Jäättelä, M. (2004). Heat Shock Protein 70 Promotes Cell Survival by Inhibiting Lysosomal Membrane Permeabilization. *J. Exp. Med.* 200, 425–435.
 - Oberle, C., Huai, J., Reinheckel, T., Tacke, M., Rassner, M., Ekert, P.G., Buellbach, J., and Borner, C. (2010). Lysosomal membrane permeabilization and cathepsin release is a Bax/Bak-dependent, amplifying event of apoptosis in fibroblasts and monocytes. *Cell Death Differ.* 17, 1167–1178.
 - 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.
 - Ohana, R.F., Kirkland, T.A., Woodroffe, C.C., Levin, S., Uyeda, H.T., Otto, P., Hurst, R., Robers, M.B., Zimmerman, K., Encell, L.P., et al. (2015). Deciphering the Cellular Targets of Bioactive Compounds Using a Chloroalkane Capture Tag. *ACS Chem. Biol.* 10, 2316–2324.

- Ohkuma, S., Moriyama, Y., and Takano, T. (1982). Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 2758–2762.
- Ohnmacht, S.A., Marchetti, C., Gunaratnam, M., Besser, R.J., Haider, S.M., Di Vita, G., Lowe, H.L., Mellinas-Gomez, M., Diocou, S., Robson, M., et al. (2015). A G-quadruplex-binding compound showing anti-tumour activity in an in vivo model for pancreatic cancer. *Sci. Rep.* *5*, 11385.
- Ohtani, N., Zebedee, Z., Huot, T.J., Stinson, J.A., Sugimoto, M., Ohashi, Y., Sharrocks, A.D., Peters, G., and Hara, E. (2001). Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature* *409*, 1067–1070.
- Okamoto, K., Bartocci, C., Ouzounov, I., Diedrich, J.K., Yates, J.R., and Denchi, E.L. (2013). A two-step mechanism for TRF2-mediated chromosome-end protection. *Nature* *494*, 502–505.
- Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a001008.
- Orłotti, N.I., Cimino-Reale, G., Borghini, E., Pennati, M., Sissi, C., Perrone, F., Palumbo, M., Daidone, M.G., Folini, M., and Zaffaroni, N. (2012). Autophagy acts as a safeguard mechanism against G-quadruplex ligand-mediated DNA damage. *Autophagy* *8*, 1185–1196.
- Ostenfeld, M.S., Fehrenbacher, N., Høyer-Hansen, M., Thomsen, C., Farkas, T., and Jäättelä, M. (2005). Effective tumor cell death by sigma-2 receptor ligand siramesine involves lysosomal leakage and oxidative stress. *Cancer Res.* *65*, 8975–8983.
- Otto, T., and Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *17*, 93–115.
- Ouchida, A.T., Li, Y., Geng, J., Najafov, A., Ofengeim, D., Sun, X., Yu, Q., and Yuan, J. (2018). Synergistic effect of a novel autophagy inhibitor and Quizartinib enhances cancer cell death. *Cell Death Dis.* *9*, 138.
- Pajic, M., Iyer, J.K., Kersbergen, A., van der Burg, E., Nygren, A.O.H., Jonkers, J., Borst, P., and Rottenberg, S. (2009). Moderate increase in Mdr1a/1b expression causes in vivo resistance to doxorubicin in a mouse model for hereditary breast cancer. *Cancer Res.* *69*, 6396–6404.
- Palmieri, M., Impey, S., Kang, H., di Ronza, A., Pelz, C., Sardiello, M., and Ballabio, A. (2011). Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 3852–3866.
- Panvichian, R., Orth, K., Day, M.L., Day, K.C., Pilat, M.J., and Pienta, K.J. (1998). Paclitaxel-associated multinucleation is permitted by the inhibition of caspase activation: a potential early step in drug resistance. *Cancer Res.* *58*, 4667–4672.
- Paquet, C., Sané, A.-T., Beauchemin, M., and Bertrand, R. (2005). Caspase- and mitochondrial dysfunction-dependent mechanisms of lysosomal leakage and cathepsin B activation in DNA damage-induced apoptosis. *Leukemia* *19*, 784–791.
- Paramasivam, M., Membrino, A., Cogoi, S., Fukuda, H., Nakagama, H., and Xodo, L.E. (2009). Protein hnRNP A1 and its derivative Up1 unfold quadruplex DNA in the human KRAS promoter: implications for transcription. *Nucleic Acids Res.* *37*, 2841–2853.

- Pardee, A.B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *71*, 1286–1290.
- Park, C., Suh, Y., and Cuervo, A.M. (2015). Regulated Degradation of Chk1 by chaperone-mediated autophagy in response to DNA damage. *Nat. Commun.* *6*, 6823.
- Passos, J.F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C.J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., et al. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol. Syst. Biol.* *6*, 347.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* *122*, 927–939.
- Peng, C.Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S., and Piwnica-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* *277*, 1501–1505.
- 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.
- Petersen, N.H.T., Olsen, O.D., Groth-Pedersen, L., Ellegaard, A.-M., Bilgin, M., Redmer, S., Ostenfeld, M.S., Ulanet, D., Dovmark, T.H., Lønborg, A., et al. (2013). Transformation-Associated Changes in Sphingolipid Metabolism Sensitize Cells to Lysosomal Cell Death Induced by Inhibitors of Acid Sphingomyelinase. *Cancer Cell* *24*, 379–393.
- Piao, S., and Amaravadi, R.K. (2016). Targeting the lysosome in cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1371*, 45–54.
- Pike, T., Brownlow, N., Kjaer, S., Carlton, J., and Parker, P.J. (2016). PKCε switches Aurora B specificity to exit the abscission checkpoint. *Nat. Commun.* *7*.
- Piret, B., and Piette, J. (1996). Topoisomerase poisons activate the transcription factor NF-kappaB in ACH-2 and CEM cells. *Nucleic Acids Res.* *24*, 4242–4248.
- Poele, R.H. te, Okorokov, A.L., Jardine, L., Cummings, J., and Joel, S.P. (2002). DNA Damage Is Able to Induce Senescence in Tumor Cells in Vitro and in Vivo. *Cancer Res.* *62*, 1876–1883.
- Pohl, C., and Jentsch, S. (2009). Midbody ring disposal by autophagy is a post-abscission event of cytokinesis. *Nat. Cell Biol.* *11*, 65–70.
- Pribluda, A., Elyada, E., Wiener, Z., Hamza, H., Goldstein, R.E., Biton, M., Burstain, I., Morgenstern, Y., Brachya, G., Billauer, H., et al. (2013). A senescence-inflammatory switch from cancer-inhibitory to cancer-promoting mechanism. *Cancer Cell* *24*, 242–256.
- Proskuryakov, S.Y., and Gabai, V.L. (2010). Mechanisms of tumor cell necrosis. *Curr. Pharm. Des.* *16*, 56–68.
- Puig, P.-E., Guilly, M.-N., Bouchot, A., Droin, N., Cathelin, D., Bouyer, F., Favier, L., Ghiringhelli, F., Kroemer, G., Solary, E., et al. Tumor cells can escape DNA-damaging cisplatin through DNA endoreduplication and reversible polyploidy. *Cell Biol. Int.* *32*, 1031–1043.
- Purvis, J.E., Karhohs, K.W., Mock, C., Batchelor, E., Loewer, A., and Lahav, G. (2012). p53 dynamics control cell fate. *Science* *336*, 1440–1444.

- Qian, Y., and Chen, X. (2013). Senescence Regulation by the p53 Protein Family. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 965, 37–61.
- Qiang, L., Zhao, B., Shah, P., Sample, A., Yang, S., and He, Y.-Y. (2016). Autophagy positively regulates DNA damage recognition by nucleotide excision repair. *Autophagy* 12, 357–368.
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.-L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., et al. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.* 112, 1809–1820.
- Rebbaa, A., Zheng, X., Chou, P.M., and Mirkin, B.L. (2003). Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene* 22, 2805–2811.
- Reinhardt, H.C., Aslanian, A.S., Lees, J.A., and Yaffe, M.B. (2007). p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer Cell* 11, 175–189.
- Rello-Varona, S., Vitale, I., Kepp, O., Senovilla, L., Jemaá, M., Métivier, D., Castedo, M., and Kroemer, G. (2009). Preferential killing of tetraploid tumor cells by targeting the mitotic kinesin Eg5. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 1030–1035.
- Repnik, U., Hafner Česen, M., and Turk, B. (2014). Lysosomal membrane permeabilization in cell death: Concepts and challenges. *Mitochondrion* 19, 49–57.
- Rhodes, D., and Lipps, H.J. (2015). G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res.* 43, 8627–8637.
- 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.
- Riou, J.F., Guittat, L., Mailliet, P., Laoui, A., Renou, E., Petitgenet, O., Mégnin-Chanet, F., Hélène, C., and Mergny, J.L. (2002). Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2672–2677.
- Rizzo, A., Salvati, E., Porru, M., D’Angelo, C., Stevens, M.F., D’Incalci, M., Leonetti, C., Gilson, E., Zupi, G., and Biroccio, A. (2009). Stabilization of quadruplex DNA perturbs telomere replication leading to the activation of an ATR-dependent ATM signaling pathway. *Nucleic Acids Res.* 37, 5353–5364.
- Roberg, K., Kågedal, K., and Ollinger, K. (2002). Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am. J. Pathol.* 161, 89–96.
- Roberson, R.S., Kussick, S.J., Vallieres, E., Chen, S.-Y.J., and Wu, D.Y. (2005). Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res.* 65, 2795–2803.
- Robles, S.J., and Adami, G.R. (1998). Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16, 1113–1123.
- Rocha, G.Z., Dias, M.M., Ropelle, E.R., Osório-Costa, F., Rossato, F.A., Vercesi, A.E., Saad, M.J.A., and Carvalheira, J.B.C. (2011). Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK

activation and antitumoral growth. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *17*, 3993–4005.

- Rodriguez, R., Miller, K.M., Forment, J.V., Bradshaw, C.R., Nikan, M., Britton, S., Oelschlaegel, T., Xhemalce, B., Balasubramanian, S., and Jackson, S.P. (2012). Small molecule-induced DNA damage identifies alternative DNA structures in human genes. *Nat. Chem. Biol.* *8*, 301–310.
- Ronco, C., Martin, A.R., Demange, L., and Benhida, R. (2016). ATM, ATR, CHK1, CHK2 and WEE1 inhibitors in cancer and cancer stem cells †The authors declare no competing interests. *MedChemComm* *8*, 295–319.
- Roos, W.P., and Kaina, B. (2013). DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett.* *332*, 237–248.
- Roos, W.P., Thomas, A.D., and Kaina, B. (2016). DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat. Rev. Cancer* *16*, 20.
- Rossi, A., Deveraux, Q., Turk, B., and Sali, A. (2004). Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. *Biol. Chem.* *385*, 363–372.
- Roumane, A., Berthenet, K., El Fassi, C., and Ichim, G. (2018). Caspase-independent cell death does not elicit a proliferative response in melanoma cancer cells. *BMC Cell Biol.* *19*, 11.
- Rubinstein, A.D., Eisenstein, M., Ber, Y., Bialik, S., and Kimchi, A. (2011). The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* *44*, 698–709.
- Ruhland, M., Coussens, L.M., and Stewart, S. (2016). Senescence and cancer: an evolving inflammatory paradox. *Biochim. Biophys. Acta* *1865*, 14–22.
- Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A., and Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* *15*, 741–750.
- Ryter, S.W., Cloonan, S.M., and Choi, A.M.K. (2013). Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Mol. Cells* *36*, 7–16.
- Sabisz, M., and Skladanowski, A. (2009). Cancer stem cells and escape from drug-induced premature senescence in human lung tumor cells: implications for drug resistance and in vitro drug screening models. *Cell Cycle Georget. Tex* *8*, 3208–3217.
- Saftig, P., Schröder, B., and Blanz, J. (2010). Lysosomal membrane proteins: life between acid and neutral conditions. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 1420–1423.
- Sagona, A.P., and Stenmark, H. (2010). Cytokinesis and cancer. *FEBS Lett.* *584*, 2652–2661.
- Saito, S., Goodarzi, A.A., Higashimoto, Y., Noda, Y., Lees-Miller, S.P., Appella, E., and Anderson, C.W. (2002). ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* *277*, 12491–12494.
- Sakai, W., Swisher, E.M., Karlan, B.Y., Agarwal, M.K., Higgins, J., Friedman, C., Villegas, E., Jacquemont, C., Farrugia, D.J., Couch, F.J., et al. (2008). Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature* *451*, 1116–1120.

- Salvati, E., Leonetti, C., Rizzo, A., Scarsella, M., Mottolose, M., Galati, R., Sperduti, I., Stevens, M.F.G., D’Incalci, M., Blasco, M., et al. (2007). Telomere damage induced by the G-quadruplex ligand RHP4 has an antitumor effect. *J. Clin. Invest.* *117*, 3236–3247.
- Salvati, E., Zizza, P., Rizzo, A., Iachettini, S., Cingolani, C., D’Angelo, C., Porru, M., Randazzo, A., Pagano, B., Novellino, E., et al. (2014). Evidence for G-quadruplex in the promoter of *vegfr-2* and its targeting to inhibit tumor angiogenesis. *Nucleic Acids Res.* *42*, 2945–2957.
- Salvati, E., Rizzo, A., Iachettini, S., Zizza, P., Cingolani, C., D’Angelo, C., Porru, M., Mondello, C., Aiello, A., Farsetti, A., et al. (2015). A basal level of DNA damage and telomere deprotection increases the sensitivity of cancer cells to G-quadruplex interactive compounds. *Nucleic Acids Res.* *43*, 1759–1769.
- Sanli, T., Rashid, A., Liu, C., Harding, S., Bristow, R.G., Cutz, J.-C., Singh, G., Wright, J., and Tsakiridis, T. (2010). Ionizing radiation activates AMP-activated kinase (AMPK): a target for radiosensitization of human cancer cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* *78*, 221–229.
- Sapkota, G.P., Deak, M., Kieloch, A., Morrice, N., Goodarzi, A.A., Smythe, C., Shiloh, Y., Lees-Miller, S.P., and Alessi, D.R. (2002). Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated kinase (ATM)-mediated phosphorylation of LKB1/STK11 at Thr-366. *Biochem. J.* *368*, 507–516.
- Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S., et al. (2009). A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* *325*, 473–477.
- Saurin, A.T., Durgan, J., Cameron, A.J., Faisal, A., Marber, M.S., and Parker, P.J. (2008). The regulated assembly of a PKCepsilon complex controls the completion of cytokinesis. *Nat. Cell Biol.* *10*, 891–901.
- Schaffitzel, C., Berger, I., Postberg, J., Hanes, J., Lipps, H.J., and Plückthun, A. (2001). In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylonychia lemnae* macronuclei. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 8572–8577.
- Schindler, M., Grabski, S., Hoff, E., and Simon, S.M. (1996). Defective pH regulation of acidic compartments in human breast cancer cells (MCF-7) is normalized in adriamycin-resistant cells (MCF-7adr). *Biochemistry* *35*, 2811–2817.
- Schleich, K., Warnken, U., Fricker, N., Oztürk, S., Richter, P., Kammerer, K., Schnölzer, M., Krammer, P.H., and Lavrik, I.N. (2012). Stoichiometry of the CD95 death-inducing signaling complex: experimental and modeling evidence for a death effector domain chain model. *Mol. Cell* *47*, 306–319.
- Schmitt, A.M., Crawley, C.D., Kang, S., Raleigh, D.R., Yu, X., Wahlstrom, J.S., Voce, D.J., Darga, T.E., Weichselbaum, R.R., and Yamini, B. (2011). p50 (NF-κB1) is an effector protein in the cytotoxic response to DNA methylation damage. *Mol. Cell* *44*, 785–796.
- Schosserer, M., Grillari, J., and Breitenbach, M. (2017). The Dual Role of Cellular Senescence in Developing Tumors and Their Response to Cancer Therapy. *Front. Oncol.* *7*.
- Seebacher, N.A., Richardson, D.R., and Jansson, P.J. (2016). A mechanism for overcoming P-glycoprotein-mediated drug resistance: novel combination therapy that releases stored doxorubicin from lysosomes via lysosomal permeabilization using Dp44mT or DpC. *Cell Death Dis.* *7*, e2510.

- Seiler, J.A., Conti, C., Syed, A., Aladjem, M.I., and Pommier, Y. (2007). The intra-S-phase checkpoint affects both DNA replication initiation and elongation: single-cell and -DNA fiber analyses. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 5806–5818.
- Sen, D., and Gilbert, W. (1990). A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA. *Nature* *344*, 410–414.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* *88*, 593–602.
- Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Garcia Arencibia, M., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., et al. (2011). TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* *332*, 1429–1433.
- Sevrioukova, I.F. (2011). Apoptosis-Inducing Factor: Structure, Function, and Redox Regulation. *Antioxid. Redox Signal.* *14*, 2545–2579.
- Shahid, R., Bugaut, A., and Balasubramanian, S. (2010). The BCL-2 5' untranslated region contains an RNA G-quadruplex-forming motif that modulates protein expression. *Biochemistry* *49*, 8300–8306.
- Shaltiel, I.A., Aprelia, M., Saurin, A.T., Chowdhury, D., Kops, G.J.P.L., Voest, E.E., and Medema, R.H. (2014). Distinct phosphatases antagonize the p53 response in different phases of the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 7313–7318.
- Shaltiel, I.A., Krenning, L., Bruinsma, W., and Medema, R.H. (2015). The same, only different – DNA damage checkpoints and their reversal throughout the cell cycle. *J Cell Sci* *128*, 607–620.
- Sharma, S., Zeng, J.-Y., Zhuang, C.-M., Zhou, Y.-Q., Yao, H.-P., Hu, X., Zhang, R., and Wang, M.-H. (2013). Small-molecule inhibitor BMS-777607 induces breast cancer cell polyploidy with increased resistance to cytotoxic chemotherapy agents. *Mol. Cancer Ther.* *12*, 725–736.
- Shaw, R.J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R.L., Witters, L.A., DePinho, R.A., and Cantley, L.C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3329–3335.
- Shay, J.W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *33*, 787–791.
- Shen, H., Perez, R.E., Davaadelger, B., and Maki, C.G. (2013). Two 4N Cell-Cycle Arrests Contribute to Cisplatin-Resistance. *PLoS ONE* *8*.
- Shen, S., Kepp, O., and Kroemer, G. (2012). The end of autophagic cell death? *Autophagy* *8*, 1–3.
- Shimizu, S. (2018). Biological Roles of Alternative Autophagy. *Mol. Cells* *41*, 50–54.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B., and Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat. Cell Biol.* *6*, 1221–1228.

- Shivalingam, A., Izquierdo, M.A., Marois, A.L., Vyšniauskas, A., Suhling, K., Kuimova, M.K., and Vilar, R. (2015). The interactions between a small molecule and G-quadruplexes are visualized by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat. Commun.* 6.
- Shrivastav, M., De Haro, L.P., and Nickoloff, J.A. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* 18, 134–147.
- Siddiqui-Jain, A., Grand, C.L., Bearss, D.J., and Hurley, L.H. (2002). Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11593–11598.
- Simonsson, T., Pecinka, P., and Kubista, M. (1998). DNA tetraplex formation in the control region of c-myc. *Nucleic Acids Res.* 26, 1167–1172.
- Skowyra, M.L., Schlesinger, P.H., Naismith, T.V., and Hanson, P.I. (2018). Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair. *Science* 360.
- Sliwinska, M.A., Mosieniak, G., Wolanin, K., Babik, A., Piwocka, K., Magalska, A., Szczepanowska, J., Fronk, J., and Sikora, E. (2009). Induction of senescence with doxorubicin leads to increased genomic instability of HCT116 cells. *Mech. Ageing Dev.* 130, 24–32.
- Smith, J., Tho, L.M., Xu, N., and Gillespie, D.A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv. Cancer Res.* 108, 73–112.
- Smith, N.M., Labrunie, G., Corry, B., Tran, P.L.T., Norret, M., Djavaheri-Mergny, M., Raston, C.L., and Mergny, J.-L. (2011). Unraveling the relationship between structure and stabilization of triarylpyridines as G-quadruplex binding ligands. *Org. Biomol. Chem.* 9, 6154–6162.
- Smith, P.J., Sykes, H.R., Fox, M.E., and Furlong, I.J. (1992). Subcellular distribution of the anticancer drug mitoxantrone in human and drug-resistant murine cells analyzed by flow cytometry and confocal microscopy and its relationship to the induction of DNA damage. *Cancer Res.* 52, 4000–4008.
- Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M.R., Schnapp, G., and de Lange, T. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1659–1668.
- Song, H., Hollstein, M., and Xu, Y. (2007). p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nat. Cell Biol.* 9, 573–580.
- Sørensen, C.S., Syljuåsen, R.G., Falck, J., Schroeder, T., Rønnstrand, L., Khanna, K.K., Zhou, B.-B., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 3, 247–258.
- Spears, L.D., Tran, A.V., Qin, C.Y., Hobbs, S.B., Liang Burns, C.A., Royer, N.K., Zhang, Z., Ralston, L., and Fisher, J.S. (2016). Chloroquine increases phosphorylation of AMPK and Akt in myotubes. *Heliyon* 2.
- Steigemann, P., Wurzenberger, C., Schmitz, M.H.A., Held, M., Guizetti, J., Maar, S., and Gerlich, D.W. (2009). Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Protects against Tetraploidization. *Cell* 136, 473–484.

- Stiff, T., Walker, S.A., Cersaletti, K., Goodarzi, A.A., Petermann, E., Concannon, P., O'Driscoll, M., and Jeggo, P.A. (2006). ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J.* 25, 5775–5782.
- Stilmann, M., Hinz, M., Arslan, S.C., Zimmer, A., Schreiber, V., and Scheidereit, C. (2009). A nuclear poly(ADP-ribose)-dependent signalosome confers DNA damage-induced IκappaB kinase activation. *Mol. Cell* 36, 365–378.
- Storozhuk, Y., Sanli, T., Hopmans, S.N., Schultz, C., Farrell, T., Cutz, J.-C., Steinberg, G.R., Wright, J., Singh, G., and Tsakiridis, T. (2012). Chronic modulation of AMP-Kinase, Akt and mTOR pathways by ionizing radiation in human lung cancer xenografts. *Radiat. Oncol. Lond. Engl.* 7, 71.
- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell* 123, 1213–1226.
- Su, K.-C., Takaki, T., and Petronczki, M. (2011). Targeting of the RhoGEF Ect2 to the equatorial membrane controls cleavage furrow formation during cytokinesis. *Dev. Cell* 21, 1104–1115.
- Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., et al. (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* 4, e838.
- Sun, G., and Kemble, D.J. (2009). To C or not to C: direct and indirect redox regulation of Src protein tyrosine kinase. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 2353–2355.
- Sun, D., Thompson, B., Cathers, B.E., Salazar, M., Kerwin, S.M., Trent, J.O., Jenkins, T.C., Neidle, S., and Hurley, L.H. (1997). Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J. Med. Chem.* 40, 2113–2116.
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., et al. (2012). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell* 148, 213–227.
- Sundquist, W.I., and Klug, A. (1989). Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* 342, 825–829.
- Swanton, C. (2012). Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res.* 72, 4875–4882.
- Syljuåsen, R.G., Jensen, S., Bartek, J., and Lukas, J. (2006). Adaptation to the ionizing radiation-induced G2 checkpoint occurs in human cells and depends on checkpoint kinase 1 and Polo-like kinase 1 kinases. *Cancer Res.* 66, 10253–10257.
- Tahara, H., Shin-ya, K., Seimiya, H., Yamada, H., Tsuruo, T., and Ide, T. (2006). G-Quadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells. *Oncogene* 25, 1955–1966.
- Tait, S.W.G., and Green, D.R. (2008). Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* 27, 6452–6461.
- Tait, S.W.G., Ichim, G., and Green, D.R. (2014). Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. *J. Cell Sci.* 127, 2135–2144.

- Takahashi, Y., Meyerkord, C.L., Hori, T., Runkle, K., Fox, T.E., Kester, M., Loughran, T.P., and Wang, H.-G. (2011). Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy* 7, 61–73.
- Takai, H., Tominaga, K., Motoyama, N., Minamishima, Y.A., Nagahama, H., Tsukiyama, T., Ikeda, K., Nakayama, K., Nakanishi, M., and Nakayama, K. (2000). Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev.* 14, 1439–1447.
- Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol. CB* 13, 1549–1556.
- Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., and Mizushima, N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* 25, 795–800.
- Tamm, I., Richter, S., Scholz, F., Schmelz, K., Oltersdorf, D., Karawajew, L., Schoch, C., Haferlach, T., Ludwig, W.-D., and Wuchter, C. (2004). XIAP expression correlates with monocytic differentiation in adult de novo AML: impact on prognosis. *Hematol. J. Off. J. Eur. Haematol. Assoc.* 5, 489–495.
- Taniguchi, M., Ogiso, H., Takeuchi, T., Kitatani, K., Umehara, H., and Okazaki, T. (2015). Lysosomal ceramide generated by acid sphingomyelinase triggers cytosolic cathepsin B-mediated degradation of X-linked inhibitor of apoptosis protein in natural killer/T lymphoma cell apoptosis. *Cell Death Dis.* 6, e1717.
- Tassan, J.P., Schultz, S.J., Bartek, J., and Nigg, E.A. (1994). Cell cycle analysis of the activity, subcellular localization, and subunit composition of human CAK (CDK-activating kinase). *J. Cell Biol.* 127, 467–478.
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 231–241.
- Taylor, W.R., DePrimo, S.E., Agarwal, A., Agarwal, M.L., Schönthal, A.H., Katula, K.S., and Stark, G.R. (1999). Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol. Biol. Cell* 10, 3607–3622.
- Thakur, R.K., Kumar, P., Halder, K., Verma, A., Kar, A., Parent, J.-L., Basundra, R., Kumar, A., and Chowdhury, S. (2009). Metastases suppressor NM23-H2 interaction with G-quadruplex DNA within c-MYC promoter nuclease hypersensitive element induces c-MYC expression. *Nucleic Acids Res.* 37, 172–183.
- Todd, A.K., Johnston, M., and Neidle, S. (2005). Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA. *Nucleic Acids Res.* 33, 2901–2907.
- Tooze, S.A. (2013). Current views on the source of the autophagosome membrane. *Essays Biochem.* 55, 29–38.
- Tormos, A.M., Taléns-Visconti, R., Bonora-Centelles, A., Pérez, S., and Sastre, J. (2015). Oxidative stress triggers cytokinesis failure in hepatocytes upon isolation. *Free Radic. Res.* 49, 927–934.
- Toso, A., Revandkar, A., Di Mitri, D., Guccini, I., Proietti, M., Sarti, M., Pinton, S., Zhang, J., Kalathur, M., Civenni, G., et al. (2014). Enhancing chemotherapy efficacy in Pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. *Cell Rep.* 9, 75–89.

- Toulany, M., Lee, K.-J., Fattah, K.R., Lin, Y.-F., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Chen, B.P., Chen, D.J., and Rodemann, H.P. (2012). Akt promotes post-irradiation survival of human tumor cells through initiation, progression, and termination of DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol. Cancer Res. MCR* 10, 945–957.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2000). Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870–874.
- Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., and Nishida, E. (2002). Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep.* 3, 341–348.
- Trapp, S., Rosania, G.R., Horobin, R.W., and Kornhuber, J. (2008). Quantitative Modeling of Selective Lysosomal Targeting for Drug Design. *Eur. Biophys. J. EBJ* 37, 1317–1328.
- Tseng, T.-Y., Wang, Z.-F., Chien, C.-H., and Chang, T.-C. (2013). In-cell optical imaging of exogenous G-quadruplex DNA by fluorogenic ligands. *Nucleic Acids Res.* 41, 10605–10618.
- Turk, B., and Turk, V. (2009). Lysosomes as “Suicide Bags” in Cell Death: Myth or Reality? *J. Biol. Chem.* 284, 21783–21787.
- Tutt, A., Robson, M., Garber, J.E., Domchek, S.M., Audeh, M.W., Weitzel, J.N., Friedlander, M., Arun, B., Loman, N., Schmutzler, R.K., et al. (2010). Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet Lond. Engl.* 376, 235–244.
- Ueda, K., Cornwell, M.M., Gottesman, M.M., Pastan, I., Roninson, I.B., Ling, V., and Riordan, J.R. (1986). The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141, 956–962.
- Uetake, Y., and Sluder, G. (2004). Cell cycle progression after cleavage failure. *J. Cell Biol.* 165, 609–615.
- Ullio, C., Casas, J., Brunk, U.T., Sala, G., Fabriàs, G., Ghidoni, R., Bonelli, G., Baccino, F.M., and Autelli, R. (2012). Sphingosine mediates TNF α -induced lysosomal membrane permeabilization and ensuing programmed cell death in hepatoma cells. *J. Lipid Res.* 53, 1134–1143.
- Urist, M., Tanaka, T., Poyurovsky, M.V., and Prives, C. (2004). p73 induction after DNA damage is regulated by checkpoint kinases Chk1 and Chk2. *Genes Dev.* 18, 3041–3054.
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., and Nebert, D.W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum. Genomics* 3, 281–290.
- Vayssade, M., Haddada, H., Faridoni-Laurens, L., Tourpin, S., Valent, A., Bénard, J., and Ahomadegbe, J.-C. (2005). P73 functionally replaces p53 in Adriamycin-treated, p53-deficient breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 116, 860–869.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36, 131–149.
- Vitale, I., Galluzzi, L., Vivet, S., Nanty, L., Dessen, P., Senovilla, L., Olaussen, K.A., Lazar, V., Prudhomme, M., Golsteyn, R.M., et al. (2007). Inhibition of Chk1 kills tetraploid tumor cells through a p53-dependent pathway. *PLoS One* 2, e1337.

- Vitale, I., Senovilla, L., Jemaà, M., Michaud, M., Galluzzi, L., Kepp, O., Nanty, L., Criollo, A., Rello-Varona, S., Manic, G., et al. (2010). Multipolar mitosis of tetraploid cells: inhibition by p53 and dependency on Mos. *EMBO J.* *29*, 1272–1284.
- Vodermaier, H.C. (2004). APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Curr. Biol. CB* *14*, R787-796.
- Voss, V., Senft, C., Lang, V., Ronellenfitsch, M.W., Steinbach, J.P., Seifert, V., and Kögel, D. (2010). The pan-Bcl-2 inhibitor (-)-gossypol triggers autophagic cell death in malignant glioma. *Mol. Cancer Res. MCR* *8*, 1002–1016.
- van Vugt, M.A., Smits, V.A., Klompaker, R., and Medema, R.H. (2001). Inhibition of Polo-like kinase-1 by DNA damage occurs in an ATM- or ATR-dependent fashion. *J. Biol. Chem.* *276*, 41656–41660.
- van Vugt, M.A.T.M., Gardino, A.K., Linding, R., Ostheimer, G.J., Reinhardt, H.C., Ong, S.-E., Tan, C.S., Miao, H., Keezer, S.M., Li, J., et al. (2010). A mitotic phosphorylation feedback network connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to inactivate the G(2)/M DNA damage checkpoint. *PLoS Biol.* *8*, e1000287.
- Walczak, C.E., Cai, S., and Khodjakov, A. (2010). Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 91–102.
- Wang, F., Gómez-Sintes, R., and Boya, P. (2018). Lysosomal membrane permeabilization and cell death. *Traffic Cph. Den.*
- Wang, W., Mani, A.M., and Wu, Z.-H. (2017). DNA damage-induced nuclear factor-kappa B activation and its roles in cancer progression. *J. Cancer Metastasis Treat.* *3*, 45–59.
- Wang, Y.-S., Chen, J., Cui, F., Wang, H., Wang, S., Hang, W., Zeng, Q., Quan, C.-S., Zhai, Y.-X., Wang, J.-W., et al. (2016). LKB1 is a DNA damage response protein that regulates cellular sensitivity to PARP inhibitors. *Oncotarget* *7*, 73389–73401.
- Wanrooij, P.H., Uhler, J.P., Simonsson, T., Falkenberg, M., and Gustafsson, C.M. (2010). G-quadruplex structures in RNA stimulate mitochondrial transcription termination and primer formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 16072–16077.
- Watanabe, S., Ando, Y., Yasuda, S., Hosoya, H., Watanabe, N., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (2008). mDia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in NIH 3T3 cells. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2328–2338.
- Weber, A.M., and Ryan, A.J. (2015). ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacol. Ther.* *149*, 124–138.
- Weihua, Z., Lin, Q., Ramoth, A.J., Fan, D., and Fidler, I.J. (2011). Formation of solid tumors by a single multinucleated cancer cell. *Cancer* *117*, 4092–4099.
- Wendel, H.-G., De Stanchina, E., Fridman, J.S., Malina, A., Ray, S., Kogan, S., Cordon-Cardo, C., Pelletier, J., and Lowe, S.W. (2004). Survival signalling by Akt and eIF4E in oncogenesis and cancer therapy. *Nature* *428*, 332–337.
- White, E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 401–410.

- Williams, A.B., and Schumacher, B. (2016). p53 in the DNA-Damage-Repair Process. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 6.
- Williamson, J.R., Raghuraman, M.K., and Cech, T.R. (1989). Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. Cell 59, 871–880.
- Windelborn, J.A., and Lipton, P. (2008). Lysosomal release of cathepsins causes ischemic damage in the rat hippocampal slice and depends on NMDA-mediated calcium influx, arachidonic acid metabolism, and free radical production. J. Neurochem. 106, 56–69.
- Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., et al. (2010). Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. Cell Death Dis. 1, e18.
- Wolfe, B.A., Takaki, T., Petronczki, M., and Glotzer, M. (2009). Polo-like kinase 1 directs assembly of the HsCdk-4 RhoGAP/Ect2 RhoGEF complex to initiate cleavage furrow formation. PLoS Biol. 7, e1000110.
- Wong, C., and Stearns, T. (2005). Mammalian cells lack checkpoints for tetraploidy, aberrant centrosome number, and cytokinesis failure. BMC Cell Biol. 6, 6.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C., and Micklem, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature 378, 789–792.
- 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.
- Wu, S.-Y., Lan, S.-H., Wu, S.-R., Chiu, Y.-C., Lin, X.-Z., Su, I.-J., Tsai, T.-F., Yen, C.-J., Lu, T.-H., Liang, F.-W., et al. (2018). Hepatocellular carcinoma-related cyclin D1 is selectively regulated by autophagy degradation system. Hepatol. Baltim. Md 68, 141–154.
- Wu, Z.-H., Shi, Y., Tibbetts, R.S., and Miyamoto, S. (2006). Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. Science 311, 1141–1146.
- Xie, B.-S., Zhao, H.-C., Yao, S.-K., Zhuo, D.-X., Jin, B., Lv, D.-C., Wu, C.-L., Ma, D.-L., Gao, C., Shu, X.-M., et al. (2011). Autophagy inhibition enhances etoposide-induced cell death in human hepatoma G2 cells. Int. J. Mol. Med. 27, 599–606.
- Xie, W., Zhang, L., Jiao, H., Guan, L., Zha, J., Li, X., Wu, M., Wang, Z., Han, J., and You, H. (2015). Chaperone-mediated autophagy prevents apoptosis by degrading BBC3/PUMA. Autophagy 11, 1623–1635.
- Xie, X., White, E.P., and Mehnert, J.M. (2013). Coordinate autophagy and mTOR pathway inhibition enhances cell death in melanoma. PloS One 8, e55096.
- Xin, H., Liu, D., Wan, M., Safari, A., Kim, H., Sun, W., O’Connor, M.S., and Songyang, Z. (2007). TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. Nature 445, 559–562.
- Xu, B., Kim, S.-T., Lim, D.-S., and Kastan, M.B. (2002). Two molecularly distinct G(2)/M checkpoints are induced by ionizing irradiation. Mol. Cell. Biol. 22, 1049–1059.

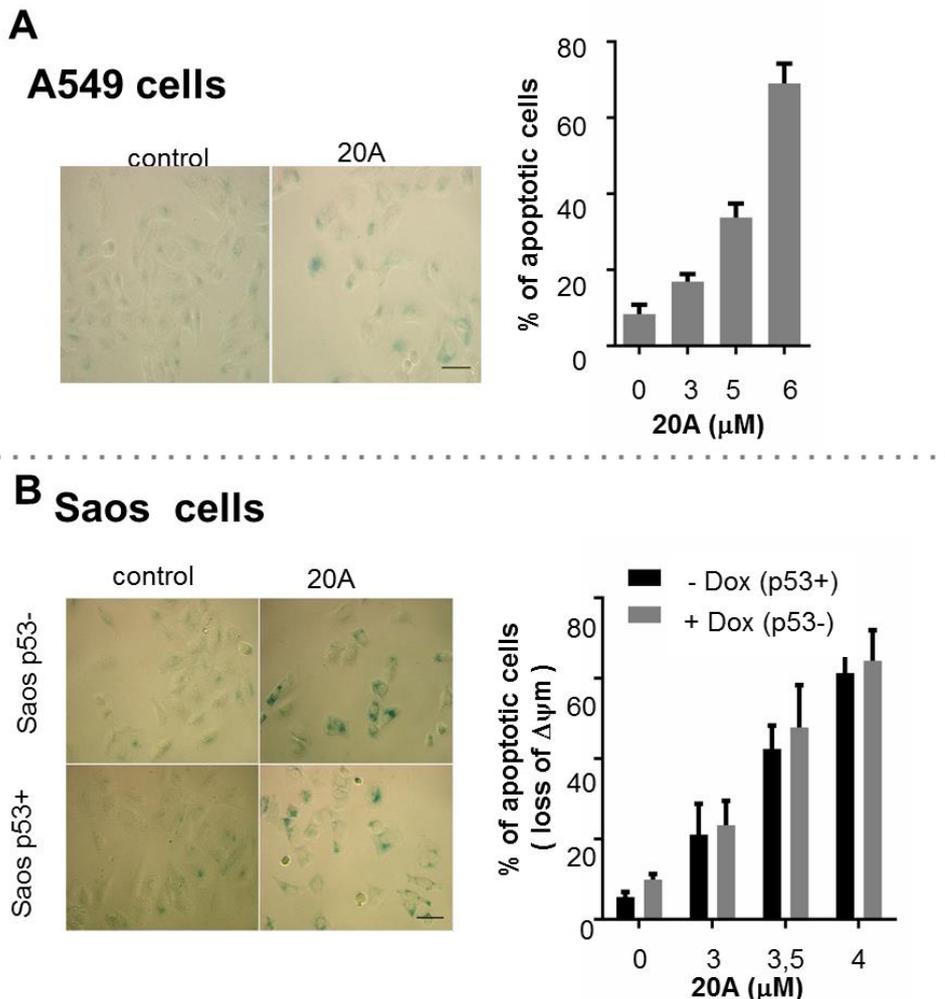
- Xu, Q., Huff, L.P., Fujii, M., and Griendling, K.K. (2017). Redox regulation of the actin cytoskeleton and its role in the vascular system. *Free Radic. Biol. Med.* *109*, 84–107.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. (2007). Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* *445*, 656–660.
- Yamagishi, T., Sahni, S., Sharp, D.M., Arvind, A., Jansson, P.J., and Richardson, D.R. (2013). P-glycoprotein mediates drug resistance via a novel mechanism involving lysosomal sequestration. *J. Biol. Chem.* *288*, 31761–31771.
- Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J.M., Dell'antonio, G., et al. (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev.* *25*, 717–729.
- Ye, J.Z.-S., Donigian, J.R., van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A.N., Chait, B.T., and de Lange, T. (2004). TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J. Biol. Chem.* *279*, 47264–47271.
- Yonemura, S., Hirao-Minakuchi, K., and Nishimura, Y. (2004). Rho localization in cells and tissues. *Exp. Cell Res.* *295*, 300–314.
- Yoon, J.-H., Ahn, S.-G., Lee, B.-H., Jung, S.-H., and Oh, S.-H. (2012). Role of autophagy in chemoresistance: regulation of the ATM-mediated DNA-damage signaling pathway through activation of DNA-PKcs and PARP-1. *Biochem. Pharmacol.* *83*, 747–757.
- Youle, R.J., and Narendra, D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 9–14.
- Young, A.R.J., and Narita, M. (2009). SASP reflects senescence. *EMBO Rep.* *10*, 228–230.
- Young, A.R.J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F.J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., et al. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* *23*, 798–803.
- Young, M.M., Takahashi, Y., Khan, O., Park, S., Hori, T., Yun, J., Sharma, A.K., Amin, S., Hu, C.-D., Zhang, J., et al. (2012). Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)-mediated caspase-8 activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* *287*, 12455–12468.
- Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., and Simon, H.-U. (2006). Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1124–1132.
- Yu, J., and Zhang, L. (2005). The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *331*, 851–858.
- Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z., Freundt, E., Baehrecke, E.H., and Lenardo, M. (2006). Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 4952–4957.
- Yüce, O., Piekny, A., and Glotzer, M. (2005). An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J. Cell Biol.* *170*, 571–582.

- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A.J., and Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 15077–15082.
- Zachos, G., Rainey, M.D., and Gillespie, D.A.F. (2003). Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects. *EMBO J.* *22*, 713–723.
- Zachos, G., Rainey, M.D., and Gillespie, D.A.F. (2005). Chk1-dependent S-M checkpoint delay in vertebrate cells is linked to maintenance of viable replication structures. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 563–574.
- 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.
- Zeng, J.-Y., Sharma, S., Zhou, Y.-Q., Yao, H.-P., Hu, X., Zhang, R., and Wang, M.-H. (2014). Synergistic activities of MET/RON inhibitor BMS-777607 and mTOR inhibitor AZD8055 to polyploid cells derived from pancreatic cancer and cancer stem cells. *Mol. Cancer Ther.* *13*, 37–48.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J., and Korsmeyer, S.J. (1996). Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* *87*, 619–628.
- Zhang, G., Yi, Y.-P., and Zhang, G.-J. (2006). Effects of arachidonic acid on the lysosomal ion permeability and osmotic stability. *J. Bioenerg. Biomembr.* *38*, 75–82.
- Zhang, X., Mar, V., Zhou, W., Harrington, L., and Robinson, M.O. (1999). Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev.* *13*, 2388–2399.
- Zhang, Y., Gao, Y., Zhang, G., Huang, S., Dong, Z., Kong, C., Su, D., Du, J., Zhu, S., Liang, Q., et al. (2011). DNMT3a plays a role in switches between doxorubicin-induced senescence and apoptosis of colorectal cancer cells. *Int. J. Cancer* *128*, 551–561.
- Zhao, R.-X., and Xu, Z.-X. (2014). Targeting the LKB1 Tumor Suppressor. *Curr. Drug Targets* *15*, 32–52.
- Zhitomirsky, B., and Assaraf, Y.G. (2015a). Lysosomal sequestration of hydrophobic weak base chemotherapeutics triggers lysosomal biogenesis and lysosome-dependent cancer multidrug resistance. *Oncotarget* *6*, 1143–1156.
- Zhitomirsky, B., and Assaraf, Y.G. (2015b). The role of cytoplasmic-to-lysosomal pH gradient in hydrophobic weak base drug sequestration in lysosomes. *Cancer Cell Microenviron.* *2*.
- Zhitomirsky, B., and Assaraf, Y.G. (2016). Lysosomes as mediators of drug resistance in cancer. *Drug Resist. Updat.* *24*, 23–33.
- Zhitomirsky, B., Assaraf, Y.G., Zhitomirsky, B., and Assaraf, Y.G. (2017). Lysosomal accumulation of anticancer drugs triggers lysosomal exocytosis. *Oncotarget* *8*, 45117–45132.
- Zhou, W.-J., Deng, R., Zhang, X.-Y., Feng, G.-K., Gu, L.-Q., and Zhu, X.-F. (2009). G-quadruplex ligand SYUIQ-5 induces autophagy by telomere damage and TRF2 delocalization in cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* *8*, 3203–3213.
- Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W., and Chen, X. (1998). The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res.* *58*, 5061–5065.

- Zhuang, X.-Y., and Yao, Y.-G. (2013). Mitochondrial dysfunction and nuclear-mitochondrial shuttling of TERT are involved in cell proliferation arrest induced by G-quadruplex ligands. *FEBS Lett.* *587*, 1656–1662.
- Zimmer, J., Tacconi, E.M.C., Folio, C., Badie, S., Porru, M., Klare, K., Tumiati, M., Markkanen, E., Halder, S., Ryan, A., et al. (2016). Targeting BRCA1 and BRCA2 Deficiencies with G-Quadruplex-Interacting Compounds. *Mol. Cell* *61*, 449–460.
- Zou, L., and Elledge, S.J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* *300*, 1542–1548.
-

Annexes

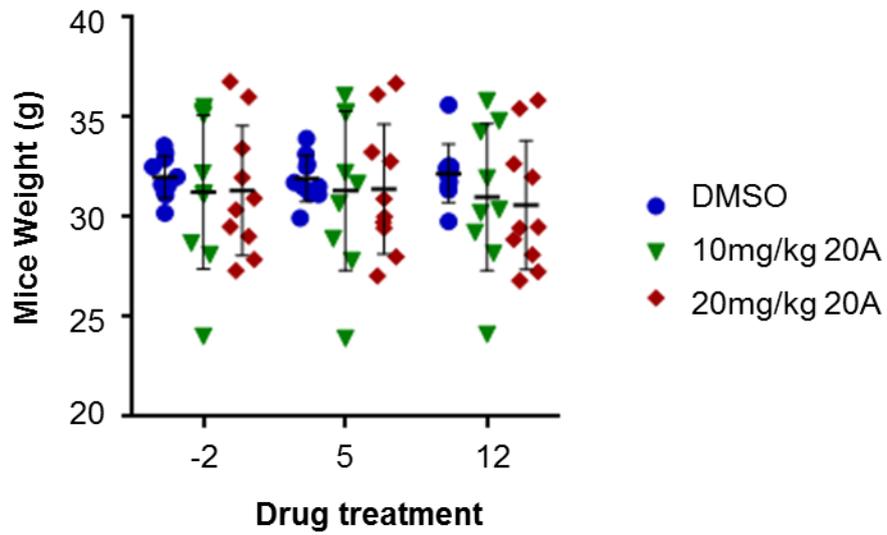
I) Annexes 1: Figures supplémentaires de l'article n°1



Supplementary Figure S1: 20A induces senescence and apoptosis in several cancer cell lines.

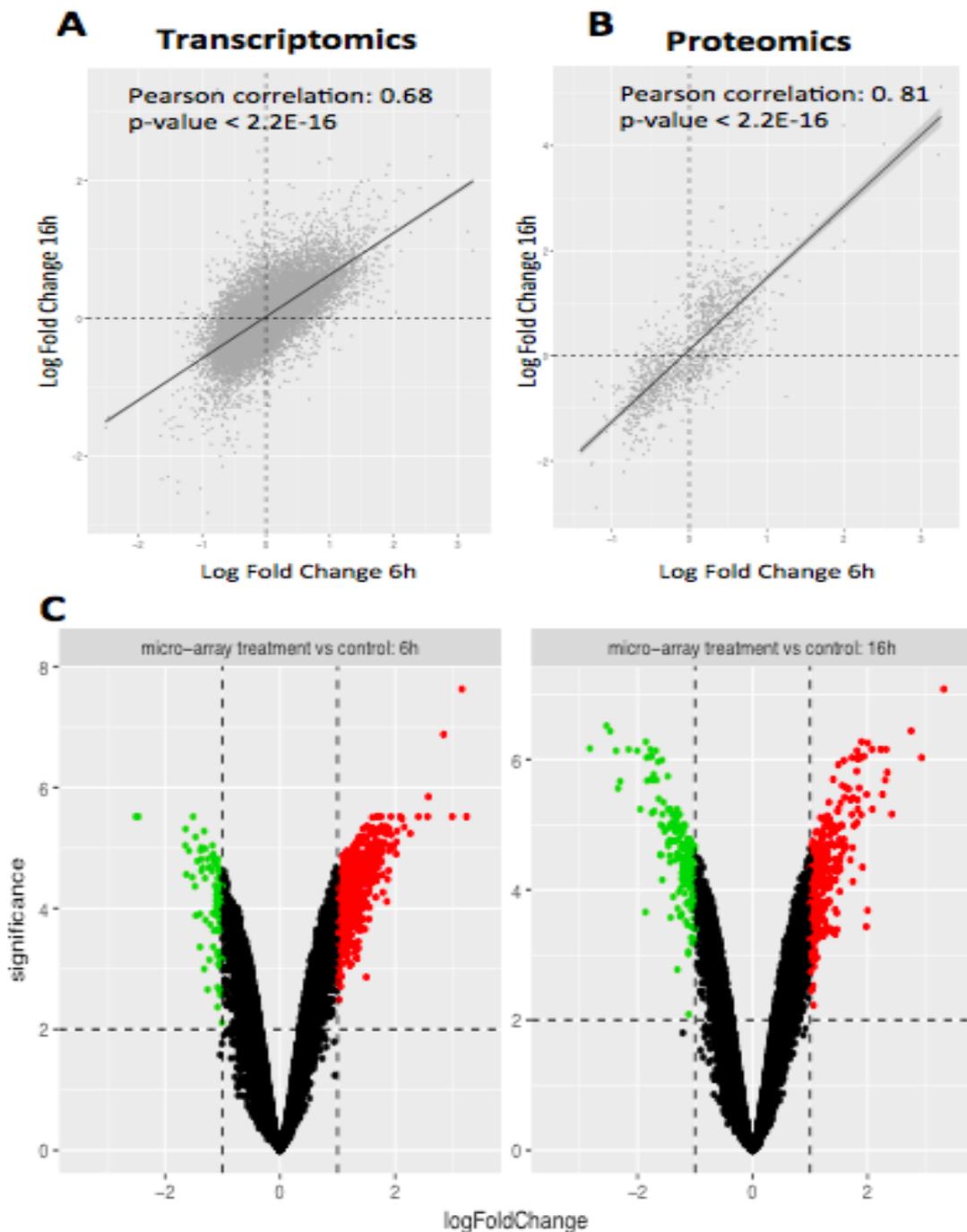
A) *Left panel*, representative β -galactosidase images of A549 cells treated or not with 4 μ M of 20A for 24h (% of β -gal positive cells are 7.4% and 19.7% for control and 20A-treated cells, respectively). *Right panel*, apoptotic cell death was evaluated 24 hours after treatment of A549 cells with the indicated concentration of 20A.

B) Saos-2 (TetOnp53) cells were treated in either the presence or absence doxycycline (0.5 μ g/ml, for 6h) and then treated with 3.5 μ M of 20A for 24h. (In p53- cells, the percentages of β -gal positive cells are 7.9% and 34.2% under control and 20A-treated conditions, respectively. In p53+ cells, the percentages of β -gal positive cells are 3.8% and 31.5% for control and 20A-treated respectively). Right panel, apoptotic cell death was evaluated 24 hours after treatment of Saos p53 null cells (-Dox) and Saos p53+ (+Dox) cells with the indicated concentration of 20A.



Supplementary Figure S2: *in vivo* data

The toxicity of 20A was evaluated by the monitoring the mice weight over time.



Supplementary Figure S3: Global changes in gene or protein expression induced by 20A

Correlation between log fold changes at 6h (x-axis) and 16h (y-axis) in transcriptomic (**A**) and proteomic data (**B**). Panel **C** represents *limma* differential expression results, the x-axis show the log fold changes 20A-treated cells versus control (6h and 16h treatment are presented in left panel and right panel, respectively), the y-axis show the significance of the statistical tests (p-value corrected for multi-testing minus log transformed). Green and Red dots highlight significantly down- and up-regulated genes (absolute log fold change above 1 and significance above 2; *p-value* < 0.01).

20A (6hours)			20A (16hours)		
KEGG NAME	NES	FDR <i>q-val</i>	KEGG NAME	NES	FDR <i>q-val</i>
SYSTEMIC_LUPUS_ERYTHEMATOSUS	-2.650	0.000	STEROID_BIOSYNTHESIS	2.476	0.000
RIBOSOME	2.112	0.003	TERPENOID_BACKBONE_BIOSYNTHESIS	2.304	0.000
TERPENOID_BACKBONE_BIOSYNTH.	2.120	0.007	PROTEIN_EXPORT	2.196	0.000
STEROID_BIOSYNTHESIS	2.007	0.008	SYSTEMIC_LUPUS_ERYTH.	-2.304	0.001
OOCYTE_MEIOSIS	1.905	0.022	PROPANOATE_METABOLISM	2.076	0.001
REGULATION_OF_AUTOPHAGY	1.868	0.029	PYRUVATE_METABOLISM	2.078	0.001
PROTEASOME	1.845	0.032	PATHOGENIC_ESCHERICHIA_COLI_INFECTION	-2.133	0.003
STARCH_AND_SUCROSE_METABOL.	1.797	0.039	ETHER_LIPID_METABOLISM	1.970	0.003
CIRCADIAN_RHYTHM_MAMMAL	1.805	0.043	PPAR_SIGNALING_PATHWAY	1.964	0.003
NITROGEN_METABOLISM	1.767	0.050	VALINE_LEUCINE_AND_ISOLEUCINE_DEGRADATION	1.971	0.003
			MISMATCH_REPAIR	1.850	0.013
			RIBOSOME	1.853	0.014
			GAP_JUNCTION	-1.938	0.021
			OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	1.792	0.022
			OTHER_GLYCAN_DEGRAD.	1.742	0.034
			AMINO_SUGAR_AND_NUCLEOTIDE_SUGAR_METABOLISM	1.698	0.042
			AUTOIMMUNE_THYROID_DISEASE	1.710	0.042
			ALZHEIMERS_DISEASE	1.699	0.044
RIBOSOME	-2.705	0.000	OOCYTE_MEIOSIS	-2.342	0.000
NEUROTROPHIN_SIGNALING_PATH.	-2.188	0.002	OXIDATIVE_PHOSPHORYL.	2.028	0.000
VALINE_LEUCINE_AND_ISOLEUCINE_DEGRADATION	2.173	0.002	HUNTINGTONS_DISEASE	2.054	0.001
FATTY_ACID_METABOLISM	2.070	0.003	PARKINSONS_DISEASE	1.909	0.006
LYSINE_DEGRADATION	2.115	0.003	NEUROTROPHIN_SIGNALING_PATHWAY	-2.159	0.006
CELL_CYCLE	-1.966	0.007	ALZHEIMERS_DISEASE	1.922	0.006
PROTEASOME	-1.966	0.009	RIBOSOME	-2.094	0.008
OOCYTE_MEIOSIS	-1.970	0.011	PROTEASOME	-2.029	0.009
BUTANOATE_METABOLISM	1.859	0.015	CELL_CYCLE	-1.967	0.010
OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	1.893	0.015	UBIQUITIN_MEDIATED_PROTEOLYSIS	-1.984	0.011
ALZHEIMERS_DISEASE	1.876	0.016	LYSOSOME	1.806	0.017
HUNTINGTONS_DISEASE	1.783	0.025	PATHOGENIC_ESCHERICHIA_COLI_INFECTION	-1.809	0.024
LYSOSOME	1.784	0.029	AMINOACYL_TRNA_BIOSYN.	-1.826	0.025
CITRATE_CYCLE_TCA_CYCLE	1.727	0.037	PURINE_METABOLISM	-1.779	0.026
PARKINSONS_DISEASE	1.708	0.038			
TRYPTOPHAN_METABOLISM	1.693	0.038			
ARRHYTHMOGENIC_RIGHT_VENTRICULAR_CARDIOMYOPATHY_ARVC	1.671	0.040			

Table S1: KEGG pathways affected by 20A treatment

This table summarizes the KEGG signaling pathways significantly enriched (FDR *q-value* < 0.05) after 6 or 16 hours treatment with 20A, according to the transcriptome or proteome data sets. NES corresponds to the Normalized Enrichment Score given by GSEA, positive and negative values relate to an up-regulation or a down-regulation of the transcripts or proteins involved in this pathway. The FDR *q-value* represents the adjusted *p-value*.

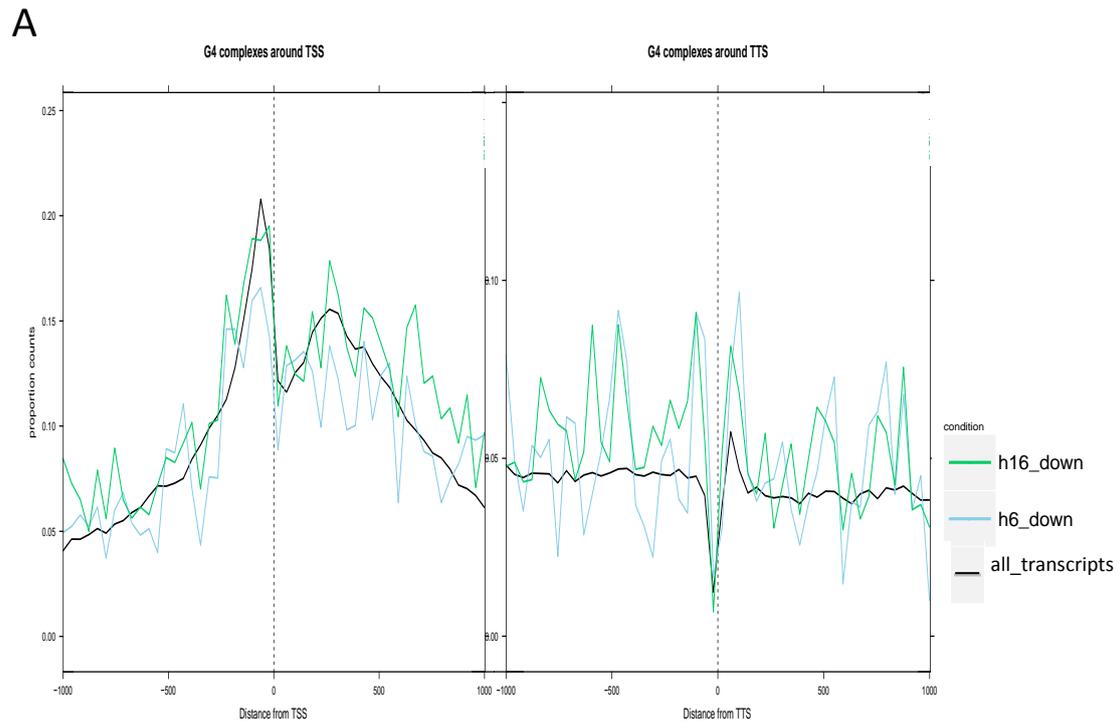
Symbol	Assoc_gene_name	ID	ensembl_transcript_id	logFC_6h	logFC_16h	adj.P.Val_6h	adj.P.Val_16h
ATR	ATR	NM_001184	ENST00000350721	0.119	0.903	0.357	0.000
Chk1	CHEK1	NM_001274	ENST00000534070	0.189	0.429	0.302	0.038
Chk2	CHEK2	NM_001005735	ENST00000382580	0.573	0.691	0.015	0.008
p53	TP53	NM_000546	ENST00000269305	-0.744	-0.196	0.000	0.183
Bax	BAX	NM_138764	ENST00000415969	-0.522	-0.236	0.006	0.164
PUMA	BBC3	NM_014417	ENST00000439096	0.821	0.240	0.000	0.156
Noxa	PMAIP1	NM_021127	ENST00000316660	0.411	-0.718	0.010	0.001
CytC	CYCS	NM_018947	ENST00000305786	0.611	0.417	0.001	0.011
Casp3	CASP3	NM_004346	ENST00000308394	0.763	0.668	0.002	0.005
Casp9	CASP9	NM_001229	ENST00000333868	-0.621	0.082	0.001	0.556
p21	CDKN1A	NM_000389	ENST00000244741	1.710	1.300	0.000	0.000
CycE	CCNE1	NM_001238	ENST00000262643	-0.042	0.159	0.738	0.223
CycD	CCND1	NM_053056	ENST00000227507	0.482	-0.131	0.005	0.379
	CCND3	NM_001760	ENST00000372991	-0.488	-0.832	0.005	0.000
CDK2	CDK2	NM_001798	ENST00000266970	0.003	-0.544	0.983	0.002
CDK4/6	CDK4	NM_000075	ENST00000257904	-0.588	-0.321	0.001	0.040
	CDK6	NM_001259	ENST00000265734	-0.789	-1.196	0.000	0.000
Rb	RB1	NM_000321	ENST00000267163	0.145	0.659	0.386	0.003
	RBL1	NM_002895	ENST00000373664	0.578	0.466	0.016	0.052
	RBL2	NM_005611	ENST00000262133	0.754	0.760	0.012	0.015
E2F	E2F1	NM_005225	ENST00000343380	-0.612	-0.339	0.001	0.026
	E2F4	NM_001950	ENST00000379378	-0.466	-0.241	0.004	0.099
	E2F2	NM_004091	ENST00000361729	-0.509	-0.503	0.007	0.011
	E2F5	NM_001951	ENST00000416274	0.728	0.316	0.000	0.043
	E2F3	NM_001949	ENST00000346618	0.906	0.293	0.000	0.124
Ras	NRAS	NM_002524	ENST00000369535	0.820	0.451	0.000	0.004
	HRAS	NM_005343	ENST00000451590	-0.672	-0.525	0.000	0.003
	KRAS	NM_033360	ENST00000256078	0.738	0.317	0.002	0.111
	RRAS	NM_006270	ENST00000246792	-0.501	0.010	0.002	0.945
	MRAS	NM_012219	ENST00000289104	0.408	0.121	0.007	0.372
	RRAS2	NM_012250	ENST00000256196	0.797	-0.323	0.000	0.063
PI3K	PIK3R1	NM_181523	ENST00000521381	0.175	0.415	0.382	0.062
	PIK3R3	NM_003629	ENST00000262741	1.369	0.934	0.000	0.001
	PIK3R2	NM_005027	ENST00000222254	-0.229	-0.037	0.215	0.861
	PIK3CB	NM_006219	ENST00000289153	0.424	0.321	0.104	0.237
	PIK3CD	NM_005026	ENST00000377346	-0.248	-0.938	0.107	0.000
PTEN	PTEN	NM_000314	ENST00000371953	0.440	0.225	0.032	0.265
AKT	AKT2	NM_001626	ENST00000392038	-0.282	-0.560	0.055	0.003
	AKT1	NM_005163	ENST00000555528	-0.435	-0.357	0.008	0.027
AMPK	PRKAA1	NM_206907	ENST00000354209	0.755	0.474	0.000	0.005

Table S2: Genes listed in Figure 3

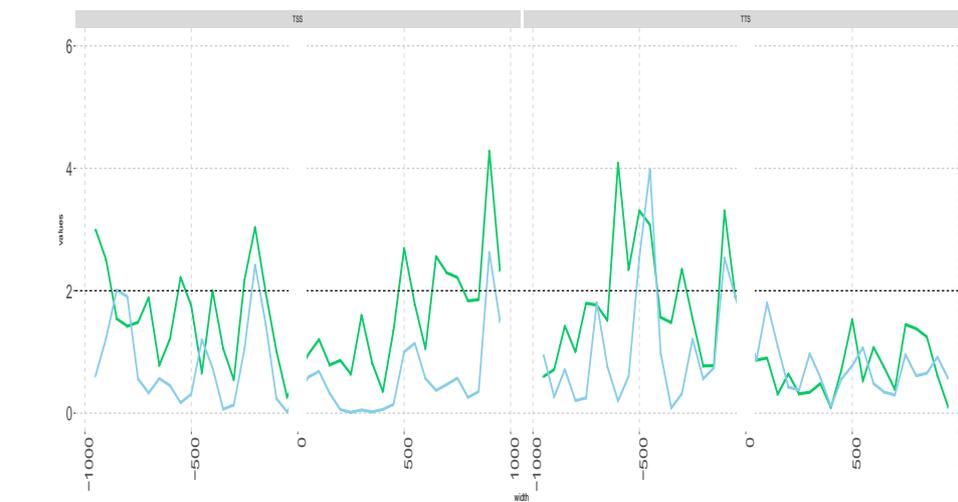
This table lists all gene symbols found in Figure 3, along with associated gene names-in the Pubmed ID and Ensembl transcript ID. LogFC_6 hours and logFC_16 hours rely on the transcript log Fold Change at 6 hours and 16 hours, respectively. *Adj. P.Val_6h* and *adj.P.Val_16h* are the *adjusted p-value* obtained by *limma* (results are considered significant when *p-value* is < 0.05)

LKB1	STK11	NM_000455	ENST00000326873	-0.561	-0.150	0.002	0.299
STRAD	STRADA	NM_153335	ENST00000392950	-0.652	-0.257	0.002	0.142
MO25	CAB39	NM_016289	ENST00000258418	0.604	0.327	0.005	0.097
TSC1/2	TSC1	NM_000368	ENST00000298552	1.069	1.081	0.000	0.000
	TSC2	NM_000548	ENST00000219476	-0.475	-0.156	0.005	0.295
RHEB	RHEB	NM_005614	ENST00000262187	0.907	0.418	0.001	0.047
Deptor	DEPTOR	NM_022783	ENST00000286234	0.252	0.463	0.082	0.008
PRAS40	AKT1S1	NM_032375	ENST00000391835	-0.402	-0.350	0.015	0.035
Raptor	RPTOR	NM_020761	ENST00000306801	-0.304	-0.163	0.043	0.277
mTOR	MTOR	NM_004958	ENST00000361445	0.170	0.080	0.249	0.618
mLST8	MLST8	NM_022372	ENST00000569417	-0.778	-0.448	0.001	0.027
Tel2	TELO2	NM_016111	ENST00000262319	-0.558	-0.573	0.001	0.001
Til	TTL	NM_153712	ENST00000233336	0.058	-0.420	0.629	0.005
ULK1	ULK1	NM_003565	ENST00000321867	0.530	-0.559	0.003	0.003
ATG101	ATG101	NM_021934	ENST00000336854	-0.221	-0.396	0.109	0.014
ATG13	ATG13	NM_014741	ENST00000524625	-0.166	0.078	0.264	0.630
FIP200	RB1CC1	NM_014781	ENST00000025008	-0.281	0.590	0.130	0.009
Beclin1	BECN1	NM_003766	ENST00000361523	0.873	0.306	0.000	0.069
NRBF2	NRBF2	NM_030759	ENST00000277746	0.878	0.083	0.000	0.664
VPS34	PIK3C3	NM_002647	ENST00000262039	1.269	1.421	0.000	0.000
VPS15	PIK3R4	NM_014602	ENST00000356763	0.837	0.565	0.000	0.004
ATG4	ATG4A	NM_052936	ENST00000372232	0.829	0.922	0.001	0.000
	ATG4B	NM_178326	ENST00000405546	-0.484	-0.334	0.003	0.030
	ATG4C	NM_032852	ENST00000317868	-0.101	0.394	0.652	0.099
	ATG4D	NM_032885	ENST00000309469	-0.744	-0.550	0.000	0.004
ATG3	ATG3	NM_022488	ENST00000283290	1.156	0.384	0.000	0.017
ATG5	ATG5	NM_004849	ENST00000369076	0.473	0.358	0.018	0.070
ATG12	ATG12	NM_004707	ENST00000509910	0.487	0.341	0.005	0.039
ATG16	ATG16L1	NM_030803	ENST00000392017	-0.158	-0.106	0.219	0.437
	ATG16L2	NM_033388	ENST00000321297	-0.080	0.729	0.655	0.002
LC3	MAP1LC3B	NM_022818	ENST00000268607	0.880	0.640	0.000	0.001
p62	SQSTM1	NM_003900	ENST00000389805	0.514	0.750	0.002	0.000
NBR1	NBR1	NM_031858	ENST00000422280	1.514	1.303	0.000	0.000
OPTN	OPTN	NM_001008211	ENST00000378748	0.837	1.037	0.000	0.000
TAX1BP1	TAX1BP1	NM_006024	ENST00000396319	-0.195	0.941	0.409	0.003
NDP52	CALCOCO2	NM_005831	ENST00000258947	0.366	0.683	0.008	0.000
Rab7	RAB7A	NM_004637	ENST00000265062	0.249	-0.202	0.035	0.091
Lamp	LAMP2	NM_013995	ENST00000371335	0.696	0.607	0.001	0.005
	LAMP3	NM_014398	ENST00000265598	0.451	0.358	0.013	0.046
	LAMP2	NM_002294	ENST00000200639	0.328	0.789	0.040	0.001
	LAMP1	NM_005561	ENST00000332556	0.104	0.250	0.429	0.083
CTS	CTSD	NM_001909	ENST00000236671	-0.131	0.690	0.312	0.001
	CTSL	NM_001912	ENST00000340342	0.739	1.062	0.002	0.000
	CTSB	NM_147780	ENST00000533455	-0.144	0.100	0.207	0.406

Table S2 (continued): Genes listed in Figure 3



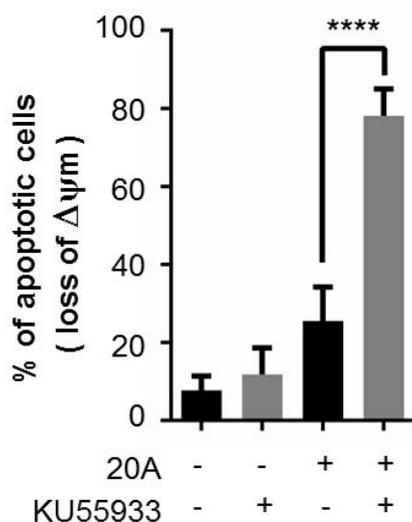
B



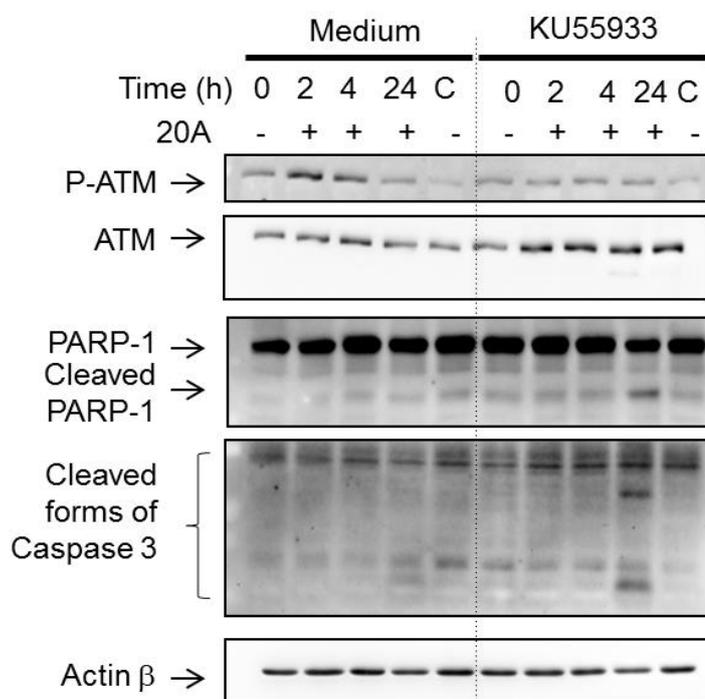
Supplementary Figure S5: Position-dependent G4-bias

G4 sequences around Transcription Start Site (TSS) and Transcription Termination Site (TTS) of down-regulated transcripts after 6h (blue) or 16h of 20A treatment (green). All transcripts are presented in black. **A.** Proportion of transcripts (y-axis) having a G4 complexes at each position around the TSS (left panel) and the TTS (right panel). Negative and positive positions indicate upstream and downstream distances from the TSS and TTS (position 0). **B.** The y-axis represents the results of the enrichment analysis (binomial test *p-value* minus log transformed) in 100 bp sliding windows (50bp step). The dotted lines represent the significance threshold (2 corresponding to *p-value* 0.01). The x-axis corresponds to the same as in **A.** A result at 50 bp corresponds to the result for the window 0-100 bp.

A

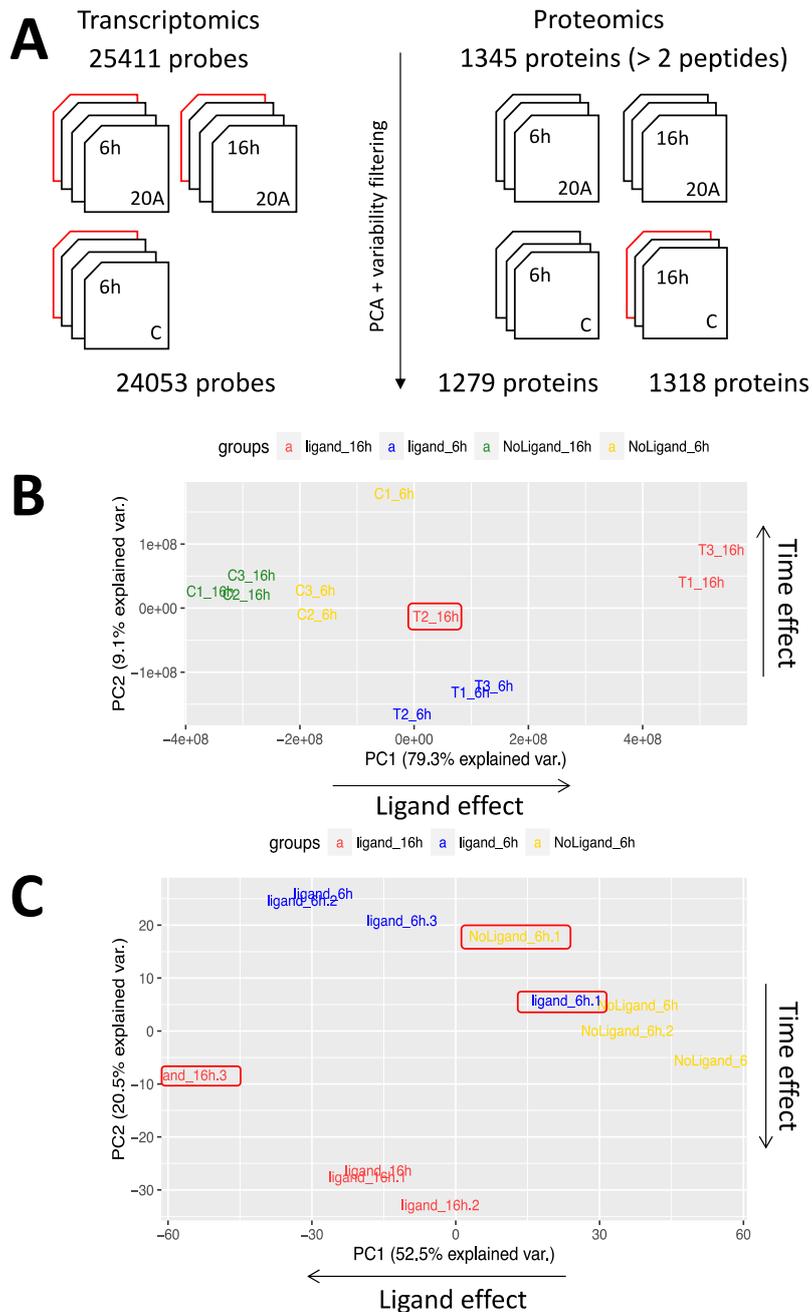


B



Supplementary Figure S6: KU55933 an inhibitor of ATM potentiates 20A-induced apoptosis.

Cells were incubated for 2 hours with KU55933 (10 μM) prior the addition of 6 μM 20A for the indicated time. **A**, apoptotic cell death was scored by measurement of loss of $\Delta\psi_m$. **B**, cellular extracts were prepared and analyzed by western blotting using antibodies directed against phospho-ATM (Ser 1981), ATM and cleaved forms of caspase 3 and PARP-1.



Supplementary Figure S7: Experimental design and Principal Components Analysis

A: schematic representation of the experimental designs for transcriptomic and Proteomic experiments. Each group of overlapping files represent a condition (top left: timing, bottom right: C for control and 20A for the presence of the ligand). It indicates the number of probes and protein before (above) and after (below) the filtering. The red files correspond to filtered samples after the Principal Components Analysis on proteomic (**B**) and transcriptomic (**C**) samples. The x and y axis represent the first and second principal components respectively and their contributions (explained variance). Each group of replicates has the same colour: in red and blue are presented the 20A treated samples at 6h and 16h respectively; in yellow and green the corresponding control samples are shown.

II) Annexes 2: Figures supplémentaires de l'article n°2

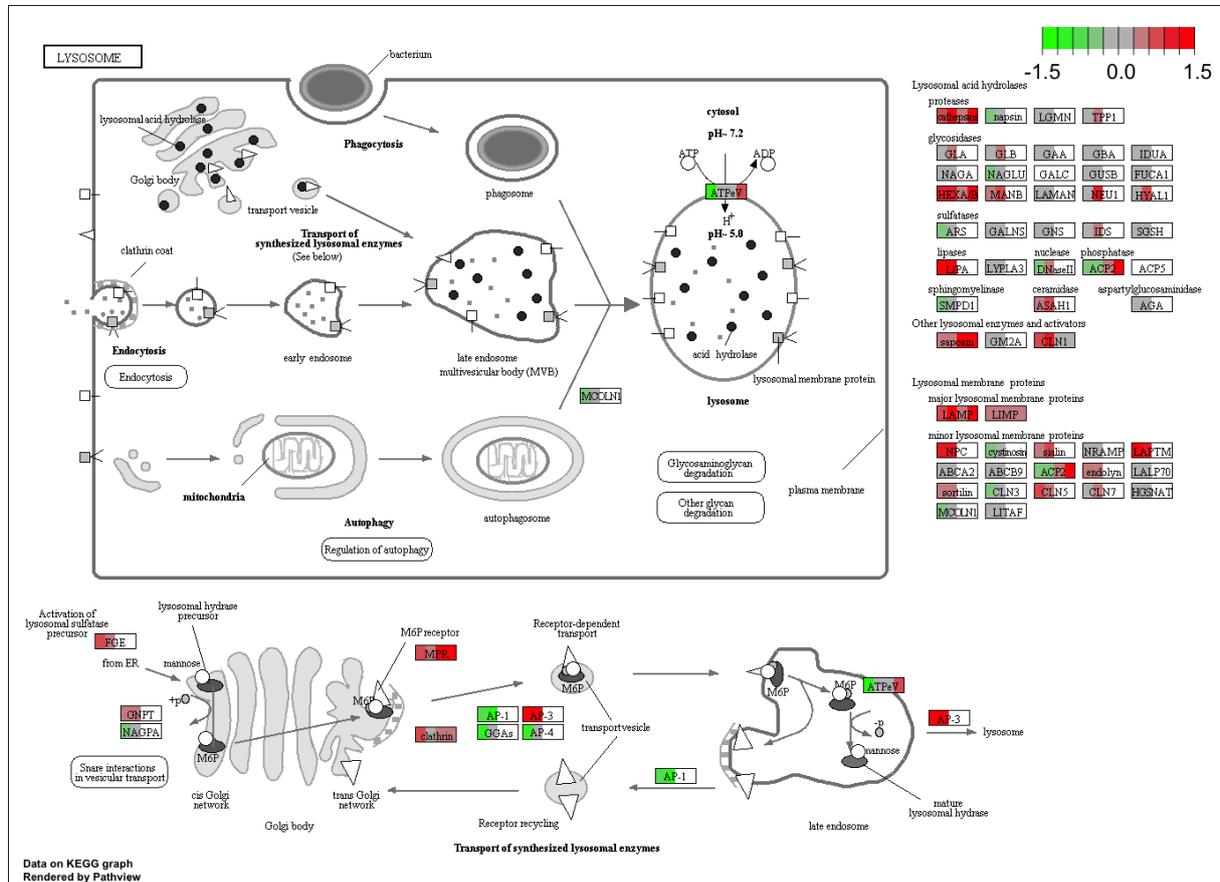


Figure S1: Schematic representation of “Lysosome” pathway from KEGG database.

For each gene, the log Fold Changes (from green, low; to red, high) is represented by a rectangle divided in four panels. The two left panels represent transcriptomic data after 6h (for the most left one), and 16h (for the right one) of treatment with 20A. The two right panels represent proteomic data after 6h (for the left one), and 16h (for the most right one) of treatment with 20A. A white box means that the transcript or the protein was not identified in the experiment.

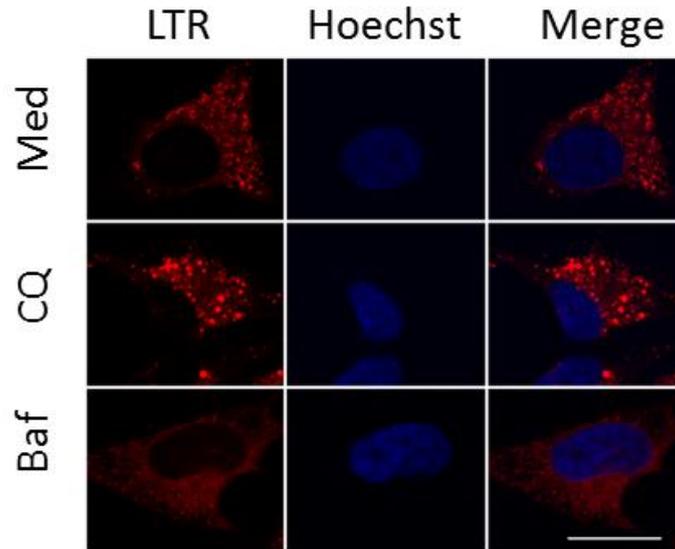


Figure S2: Evaluation of lysosomal pH via Lysotracker Red staining

HeLa cells were stained with Lysotracker Red (LTR) and counterstained with Hoechst to assess changes in the lysosomal pH in cells untreated (Med) or treated with 25 μ M Chloroquine (CQ) or 25 nM Bafilomycin A (Baf) during 6 hours. Representative confocal image are presented, scale bar = 20 μ m.

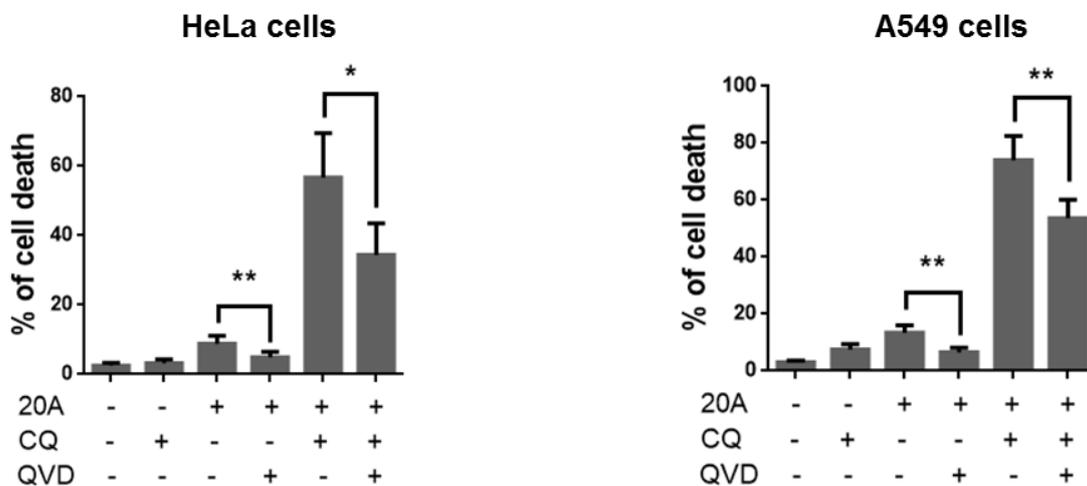


Figure S3: Involvement of apoptosis in cell death induced by combination of 20A with Chloroquine

HeLa (left) and A549 (right) cells were treated with or without 20 μ M QVD-OPH two hours prior to the addition of 20A 5 μ M and 3.5 μ M for HeLa cells and A549 cells, respectively. Where indicated, cells are also exposed to 25 μ M chloroquine for 24h. Cell death was assessed by measurement of the percentage of cells undergoing PI uptake. The data represents the mean \pm SD of 6 values obtained from three independent experiments each performed in duplicate. * *p*-value < 0.05 and ** *p*-value < 0.01 using Mann-Whitney test.

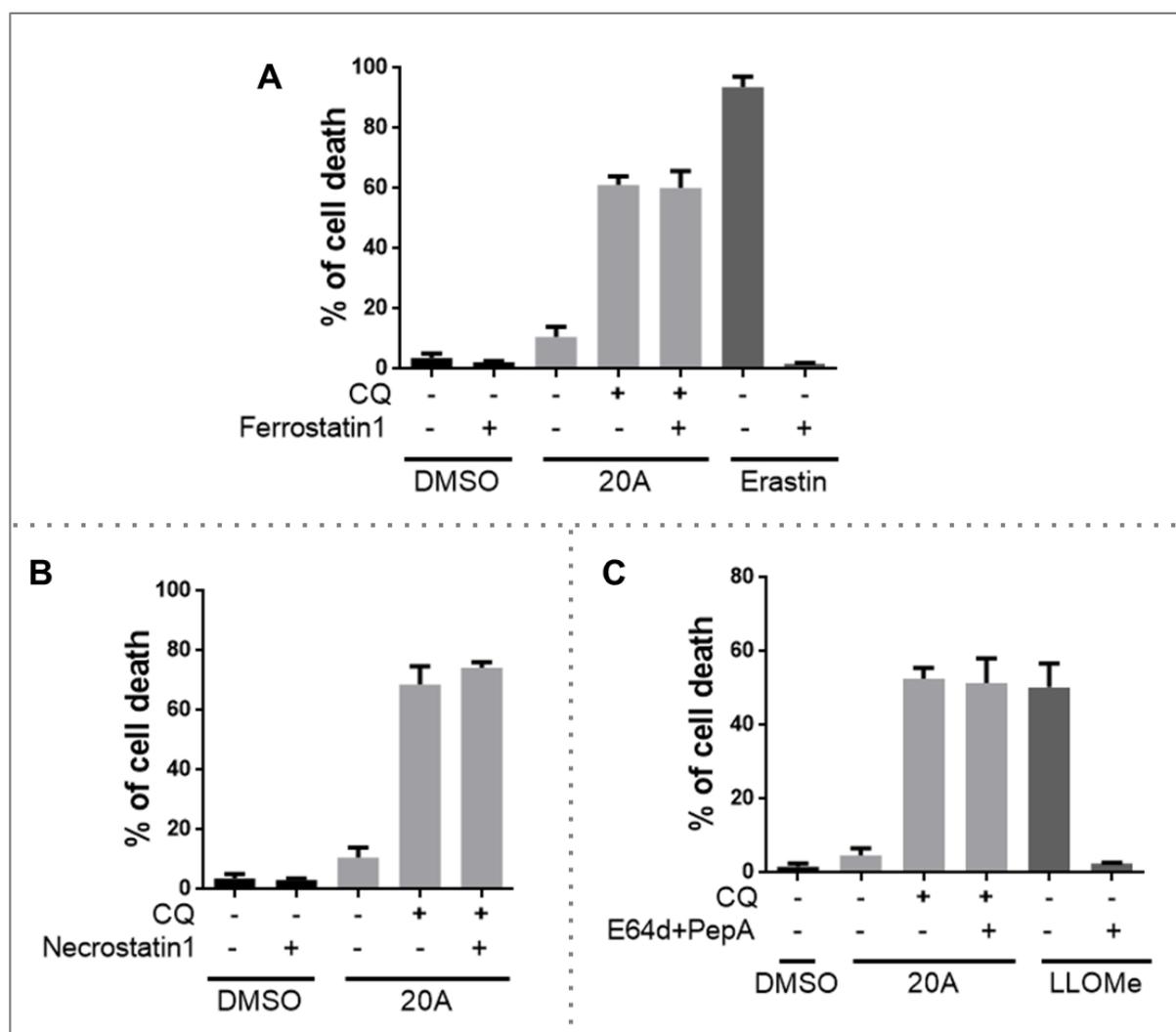


Figure S4: Evaluation of Ferroptosis, Necroptosis and cathepsin activity in cell death induced by the combination of 20A and Chloroquine.

A) A549 cells were treated or not with 5 μ M Ferrostatin 1 two hours prior to the addition of 20A 3.5 μ M, or 10 μ M Erastin. Where indicated, cells are also exposed to 25 μ M chloroquine. Cell death was assessed by measurement of PI uptake. The data represents the mean \pm SD of 3 values obtained from one experiment.

B) A549 cells were treated or not with 60 μ M Necrostatine 1 two hours prior to the addition of 20A 3.5 μ M for 24h. Where indicated, cells are also exposed to 25 μ M chloroquine. Cell death was assessed by measurement of PI uptake. The data represents the mean \pm SD of 3 values obtained from one experiment

C) A549 cells were treated or not with 30 μ M E64d + 30 μ M Pepstatin A two hours prior to the addition of 20A 3.5 μ M, or 4 μ M LLOMe. Where indicated, cells are also exposed to 25 μ M chloroquine. Cell death was assessed by measurement of PI uptake. The data represents the mean \pm SD of 3 values obtained from one experiments.

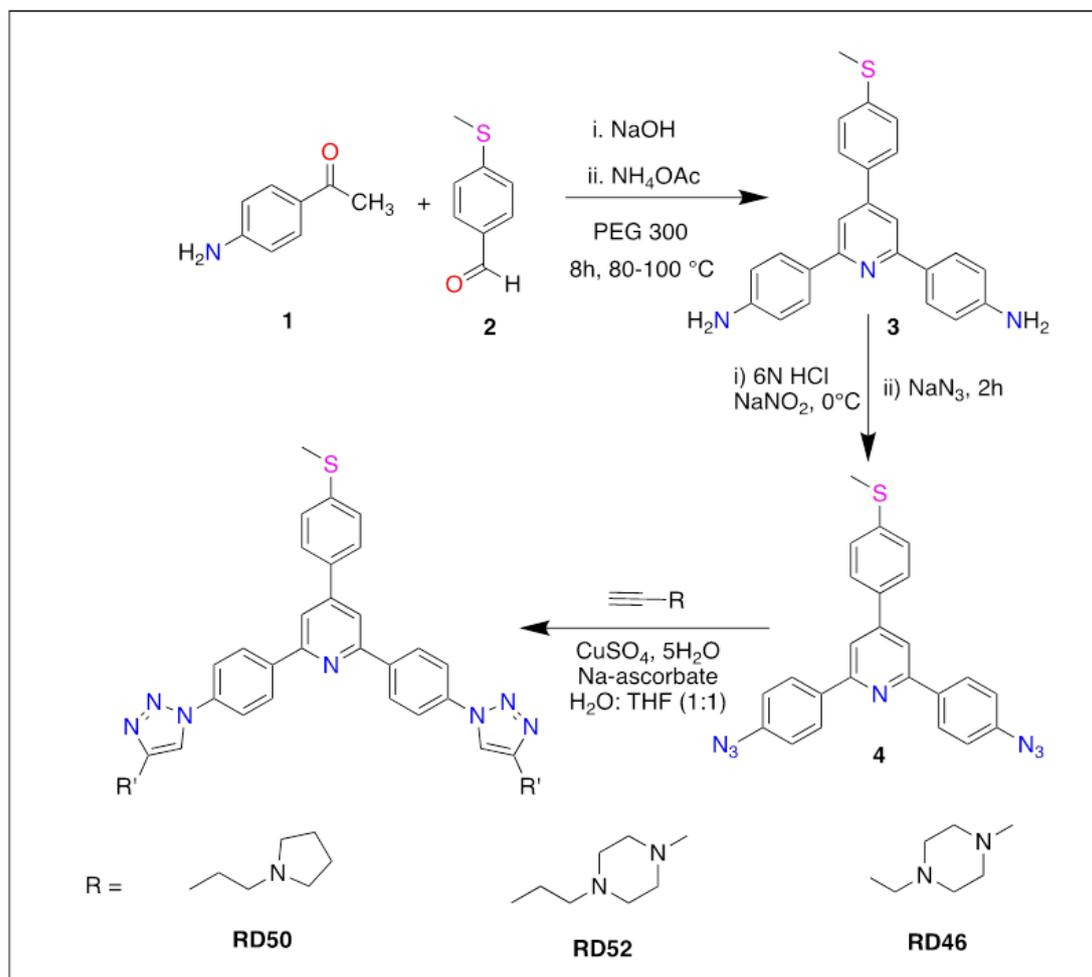


Figure S5: Scheme for synthesis of 20A derivatives

A series of novel bis-triazole 2,4,6-triarylpyridines have been synthesized through three steps procedure (supplementary data 5). The synthetic route involves the base-catalysed condensation of commercially available *p*-aminoacetophenone (**1**) with *p*-thiomethyl benzaldehyde (**2**) in PEG300 resulting the formation of di-amino derivative of 2,4,6-triarylpyridines **3**. The di-amino is then converted to corresponding diazido derivatives (**4**) which is then subjected for copper-catalyzed azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reaction with various amine-terminal alkynes to afford 1,2,3-triazole derivatives.

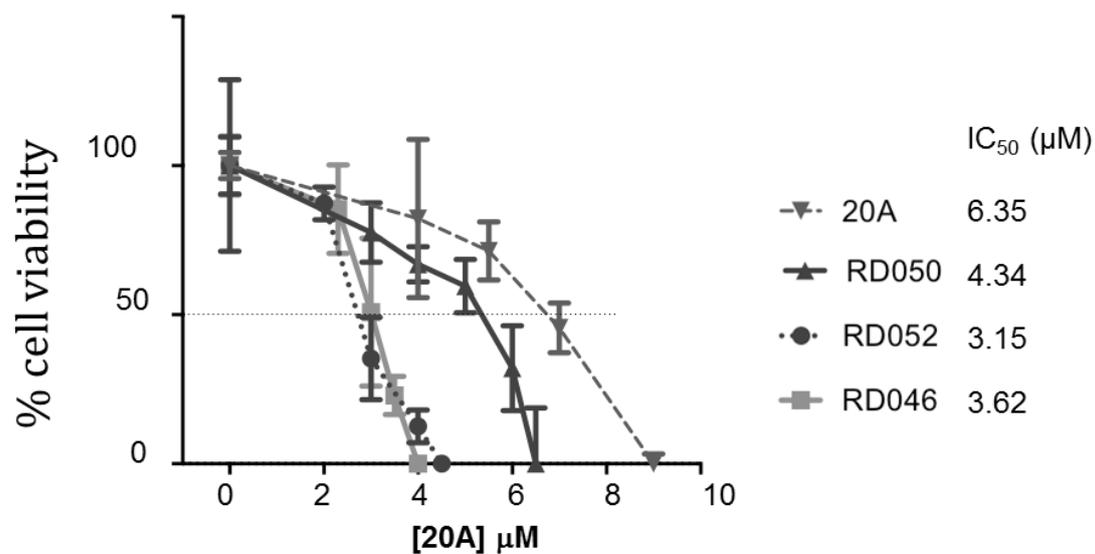


Figure S6: Cell viability assay for determination of 20A derivatives IC₅₀

HeLa cells were treated with concentrations of 20A, RD050, RD052 and RD046 ranging from 1 to 10 μM for 24h. Cell viability was assessed by MTT assay. Plotted are mean ± SD of one representative experiment performed in quadruplicate. IC₅₀ are presented as the mean obtained from three independent experiments.

III) Annexes 3: Liste des publications et communications

Liste des publications

- **Modulation of the ATM/autophagy pathway by a G-quadruplex ligand tips the balance between senescence and apoptosis in cancer cells.**

J. Beauvarlet, P. Ben Sadoun, E. Darbo, G. Labrunie, B. Rousseau, E. Richard, R. Nath Das, G. Robert, J-W. Dupuy, F. Orange, S. Croce, V. Velasco, P. Soubeyran, K. Ryan, JL. Mergny, M. Djavaheiri-Mergny.

Soumis à Nucleic Acid Research (*en révision*).

- **The combination of the triarylpyridine compounds and chloroquine induces lysosomal membrane permeabilization and triggers cell death in cancer cells.**

J. Beauvarlet, E. Richard, R. Nath Das, E. Darbo, P. Soubeyran, J. Guillon, JL. Mergny, M. Djavaheiri-Mergny.

En préparation

Communication orale

J. Beauvarlet, P. Ben Sadoun, E. Darbo, R. Nath Das, M. Bonneu, G. Robert, K. Ryan, JL. Mergny, M. Djavaheiri-Mergny. **Inhibition of autophagy and ATM in cancer cells switches senescence to apoptosis in response to a G-quadruplex ligand to apoptosis.** 7th Scientific Days of the Club Francophone de l'Autophagie, Paris, France, Novembre 2017.

Présentations affichées

J. Beauvarlet, P. Ben Sadoun, G. Labrunie, R. Nath Das, E. Richard, B. Rousseau, E. Darbo, S. Croce, JL. Mergny, M. Djavaheiri-Mergny. **Anti-tumor efficiency of 20A, a novel G-quadruplex ligand, in *in vitro* and *in vivo* cancer models: ATM and autophagy interplay.** 25th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, Amsterdam, Pays-Bas, Juin-Juillet 2018.

J. Beauvarlet, P. Ben Sadoun, G. Labrunie, K. Airiau, K. Ryan, JL. Mergny, M. Djavaheiri-Mergny. **A novel mechanism involved for a G-quadruplex ligand-mediated growth inhibition of cancer cells.** 12th Scientific Days of the Cancéropôle Grand Sud-Ouest, Montpellier, France, Novembre 2016.

J. Beauvarlet, P. Ben Sadoun, G. Labrunie, K. Airiau, K. Ryan, JL. Mergny, M. Djavaheiri-Mergny. **A G-quadruplex ligand induces G2/M phase arrest and cell death in HeLa cells through induction of ROS production, autophagy and DNA damage response.** 7th Scientific Days of the Club Francophone de l'Autophagie, Bordeaux, France, Octobre 2016 (Prix du meilleur poster).

Résumé

Les G-quadruplexes (G4) sont des structures non canoniques des acides nucléiques qui peuvent être formés dans des régions d'ADN ou d'ARN riches en guanines. Les ligands G4 (LG4), sont des molécules capables d'interagir et de stabiliser les structures G4, qui présentent de nombreuses propriétés anti-cancéreuses. Nous avons travaillé avec le LG4 20A, appartenant à la famille des triarylpyridines, qui stabilise efficacement les structures G4 *in vitro*. Les objectifs de ce travail ont été de déterminer les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables des effets anti-prolifératifs du 20A dans des cellules cancéreuses.

Dans cette étude, nous avons montré que le 20A induit un arrêt de la croissance cellulaire de cellules en culture et dans un modèle de xénotransgreffe tumorale, grâce à l'induction de la sénescence et de la mort cellulaire par apoptose. Ces réponses sont associées à l'activation de la voie des réponses aux dommages à l'ADN (DDR) *via* la kinase ATM, qui favorise l'autophagie (un processus catabolique) et la sénescence, tout en protégeant les cellules de l'apoptose.

De plus, nous avons observé que le 20A induit un échec de la cytokinèse, conduisant à l'accumulation de cellules binucléées qui présentent une résistance à la mort cellulaire. De façon inattendue, nous avons trouvé que le 20A s'accumule dans les lysosomes, induisant une augmentation de la taille de ces derniers. La combinaison du 20A et de l'agent lysosmotropique chloroquine, potentialise de façon importante la perméabilisation de la membrane lysosomale (LMP) et la mort cellulaire. En particulier, cette combinaison sensibilise de façon notable ces cellules binucléées à la mort cellulaire.

L'ensemble de ces résultats révèle une relation entre les processus de mort cellulaire et de sénescence induits par le LG4 20A, et les voies de DDR et lysosomales. Ces régulations devraient être prises en considération lors de l'utilisation d'agents antiprolifératifs susceptibles d'interférer avec les fonctions lysosomales.

Mots clés : ligand G-quadruplexe, réponse aux dommages à l'ADN, lysosome, mort cellulaire, sénescence, cancer

Abstract

G-quadruplexes (G4) are unusual nucleic acid structures that can be formed by guanine-rich DNA and RNA. Through their ability to stabilize G4 structures, G4 ligands (G4L) have been described to display potent anticancer properties. Here, we studied the G4L 20A belonging to the triarylpyridine family of compounds that have the ability to efficiently bind to and stabilize G4 structures *in vitro*. The objectives of this work were to determine the molecular and cellular mechanisms responsible for the anti-proliferative effects of 20A in cancer cells.

In this study, we showed that 20A causes cancer cell growth arrest in cell culture and a mice tumour xenograft model, through induction of senescence and apoptotic cell death. These cellular responses are associated with the induction of the DNA damage response pathway (DDR), in particular ATM activation, which promotes the induction of both autophagy (a lysosomal catabolic pathway) and senescence, while protecting cells against apoptosis.

Furthermore, we found that 20A induces failure of cytokinesis which results in the accumulation of binucleated cells that display marked resistance to 20A-induced cell death. Unexpectedly, we found that 20A accumulates in the lysosomal compartment and causes lysosome enlargement. The combination of a lysosmotropic agent, chloroquine, and 20A promotes a significant induction of lysosomal membrane permeabilization (LMP) and a robust cell death. In particular, this combination significantly sensitizes binucleated cells to cell death.

Altogether, our results uncover the relationship of the DDR and lysosomal pathways to cell death and senescence induced by the G4L 20A. Such regulation should also be taken into account when using antiproliferative drugs susceptible to interfere with the lysosomal functions.

Keywords: G-quadruplex ligand, DNA damage response, lysosome, cell death, senescence, cancer