



**HAL**  
open science

# Régulation épigénétique de la télomérase dans un modèle de leucémie aiguë promyélocytaire

Delphine Garsuault

► **To cite this version:**

Delphine Garsuault. Régulation épigénétique de la télomérase dans un modèle de leucémie aiguë promyélocytaire. Cancer. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS133 . tel-04622616

**HAL Id: tel-04622616**

**<https://theses.hal.science/tel-04622616>**

Submitted on 24 Jun 2024

**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.

# Régulation épigénétique de la télomérase dans un modèle de leucémie aiguë promyélocytaire

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à Paris Descartes

École doctorale n°582 : cancérologie –  
biologie - médecine - santé (CBMS)

Spécialité du doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 13 juin 2019, par

**Delphine GARSUAULT**

## Composition du Jury :

Jean-François RIOU Professeur Universités Muséum d'Histoire Naturelle (CNRS UMR 7196 / INSERM U 1154)	Rapporteur
Pierre-Antoine DEFOSSEZ Directeur de recherche CNRS (UMR 7216)	Rapporteur
Fabien GUIDEZ Chargé de recherche de classe normale INSERM (UMRS 1131)	Examineur
François BOUSSIN Directeur de Recherche CEA (UMRE 008 / INSERM U 1274)	Examineur
Joëlle WIELS Directrice de recherche CNRS (UMR 8126)	Présidente
Évelyne SÉGAL BENDIRDJIAN Directrice de recherche CNRS (UMRS 1124)	Directrice de thèse

## RÉSUMÉ

---

La télomérase est présente dans un nombre limité de cellules, telles que la plupart des cellules cancéreuses où son activité est indispensable pour l'immortalisation de ces dernières. C'est pourquoi cette enzyme a été proposée comme cible prometteuse pour des thérapies anticancéreuses. Ainsi, il est d'un intérêt certain d'identifier les mécanismes par lesquels elle est régulée, notamment via sa sous-unité catalytique, hTERT. Les rétinoïdes sont des inducteurs bien connus de la maturation granulocytaire associée à une répression de hTERT dans les blastes de leucémie aiguë promyélocytaire (LAP). Dans une lignée cellulaire LAP, résistant à la maturation induite par les rétinoïdes (NB4-LR1), a précédemment été identifiée une nouvelle voie de répression transcriptionnelle de *hTERT* en absence de différenciation. De plus, mon laboratoire d'accueil a isolé un variant de la lignée NB4-LR1 résistant à cette répression transcriptionnelle de *hTERT*, la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>. Ensemble, ces lignées cellulaires, qui se comportent différemment face à un traitement à l'ATRA, fournissent un outil unique et puissant pour obtenir plus d'informations sur plusieurs problèmes de la régulation de la biologie moléculaire de la télomérase. Dans cette étude, en utilisant plusieurs approches complémentaires (immunoprécipitation de la chromatine combinée à une technique d'analyse à haut débit du positionnement des nucléosomes et de la méthylation de l'ADN et une approche de FISH), j'ai pu obtenir une vue intégrée des événements épigénétiques qui promeuvent la transition du promoteur de *hTERT* d'un état silencieux à un état actif et inversement. Cette information sera cruciale pour le développement de stratégies anticancéreuses ciblant l'expression de *hTERT*.

## ABSTRACT

---

Telomerase is present in a limited number of cells, most of them cancerous where its activity is crucial for their immortalisation. Thus, that enzyme has been proposed as a promising target for anticancer therapies. Therefore, it is of great interest to identify the mechanisms by which it is regulated, notably through its catalytic subunit hTERT. Retinoids are well-known inducers of granulocytic maturation associated with hTERT repression in acute promyelocytic leukemia (APL) blasts. However, in NB4-LR1, a maturation-resistant APL cell line, was previously identified a new pathway of retinoid-induced *hTERT* transcriptional repression independent of differentiation. Furthermore, my host lab reported the isolation of a variant of NB4-LR1 cells resistant to this repression: NB4-LR1<sup>SFD</sup>. These two cell lines, which behave distinctly in response to ATRA treatment, provide a unique and interesting tool to gain further insights into the molecular biology of telomerase regulation. In this thesis project, using several complementary approaches (chromatin immunoprecipitation combined to a high-resolution, single-molecule nucleosome positioning assay and DNA methylation, and a FISH approach) allowed me to shed more light on the integrated epigenetic events that lead to *hTERT* promoter transition from its silent to its active state and vice versa. The information obtained could be crucial for the development of anticancer strategies targeting *hTERT* expression.

## REMERCIEMENTS

---

Cette thèse n'aurait jamais pu avoir lieu sans la confiance qui m'a été accordée par l'école doctorale « Cancérologie, Biologie, Médecine, Santé » et l'université Paris Saclay. Je les remercie pour m'avoir choisie au moment de la distribution des bourses de thèse du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, ce qui m'a permis d'être financée sur presque l'intégralité de ma thèse. Je remercie également l'université Paris Descartes pour m'avoir financée pour quelques mois supplémentaires.

Je souhaite ensuite remercier messieurs Pierre-Antoine Defossez et Jean-François Riou pour avoir accepté d'être mes rapporteurs pour ce travail de thèse. Je remercie également madame Joëlle Wiels pour avoir bien voulu faire partie de mon jury de thèse. Merci aussi à Fabien Guidez et François Boussin pour leur participation à mon comité de suivi et leurs remarques qui m'ont permis d'avancer dans mon projet de thèse. Et je les remercie également d'avoir accepté d'être examinateurs dans mon jury de thèse. Merci à Evelyne Ségal-Bendirdjian de m'avoir accueillie au sein de son unité, l'ex-U 1007, et de m'avoir confié ce sujet de thèse.

Je souhaite en particulier remercier Éric pour ses conseils et sa patience dans sa réponse à mes questions, mon apprentissage des différentes techniques qui m'ont permis de mener à bien ma thèse et pour sa relecture assidue de ce manuscrit. Je le remercie également pour tous ces moments « Hello Kitty » et nos pauses goûter qui me manquent déjà !

Je souhaite également remercier Paul pour nos discussions geek et pour avoir été le tout premier à m'ouvrir la porte du laboratoire. Sache que je suis devenue la dame de la source après ton départ, haha ! Je remercie Nicolas pour nos discussions et les excellents timings pour se mettre à table ! Merci aussi à Jacqueline pour avoir formé avec moi le gang des poissons rouges et pour toutes nos rigolades ! Je remercie également Zherui, Jin et Mickaël pour leurs conseils et leur soutien ! Merci à Patricia pour ses conseils. Un grand merci également à Zeyni, Éliette et Sylvie pour leurs encouragements, leur soutien et l'aide dans l'organisation des repas d'unité !

Merci à Claire pour sa bonne humeur et ses superbes dessins ! Et merci aussi de m'avoir appris le FISH et le clonage. Merci aussi à Joëlle pour m'avoir montré le chemin et pour ses conseils. Merci aussi pour ne pas avoir tenu rigueur de mes sautes d'humeur, avoir mis une super ambiance aux périodes de Noël et m'avoir fait découvrir cette playlist instrumentale des classiques Disney ! Un grand merci également aux deux Audrey, à Ludivine, Éliisa, Laetitia et toute ma meute pour leur soutien et surtout leur compréhension quand j'annulais nos sorties parce que j'étais débordée ou au contraire quand je voulais sortir parce que je voulais faire une pause ! Vous étiez à chaque instant et êtes toujours dans mon cœur ! Je vous adore !

Mes années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans la confrérie de Sauron, donc je remercie chaleureusement Nazgûl et Chacopathe pour nos délires et leur soutien, ainsi que leur relecture de mon manuscrit de thèse ! Je vous aime les filles !! Et merci également à Pascal pour son oreille attentive, son soutien et pour la relecture de ce manuscrit.

Un très grand merci à Marie pour ses conseils en tant que jeune docteure, pour sa relecture, sur-relecture, sur-sur-relecture de ce manuscrit, pour ses blagues et ses chansons qui ont toujours su me remonter le moral quand je me décourageai, et pour tout le reste ! Je n'aurais pas pu y arriver sans ton aide !

Enfin, un petit mot mais un immense merci à ma maman adorée pour m'avoir soutenue et encouragée... et pour tout, en fait !! Plein de gros bisous à toi ma maman que j'aime et que j'adore ! Merci aussi à mon grand-frère d'être venu exprès du Canada pour assister à ma soutenance. Et merci également à mon papa pour ses encouragements.



# TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	i
Abstract.....	i
Remerciements.....	ii
Table des matières.....	iii
Table des annexes.....	vi
Table des figures et tableaux.....	vii
Liste des abréviations.....	ix
Introduction.....	1
<i>Partie 1 : La leucémie aiguë promyélocytaire.....</i>	<i>1</i>
I. Caractéristiques pathologiques.....	1
1. Classification et description.....	1
2. La protéine de fusion PML-RAR $\alpha$ .....	2
II. Traitements.....	5
1. La chimiothérapie.....	5
2. L'acide rétinoïque tout- <i>trans</i> .....	6
3. Le trioxyde d'arsenic.....	7
IV. La lignée NB4, un modèle cellulaire de leucémie aiguë promyélocytaire.....	9
<i>Partie 2 : La régulation de la transcription : modifications épigénétiques et organisation de la chromatine.....</i>	<i>12</i>
I. La méthylation de l'ADN et le positionnement des nucléosomes.....	13
1. La méthylation des cytosines et ses dérivés oxydatifs.....	13
2. Les enzymes catalysant la méthylation et la déméthylation.....	15
i. DNMT1, une méthyltransférase « de maintenance ».....	16
ii. Les méthyltransférases « de novo », DNMT3a et DNMT3b.....	16
iv. La déméthylation de l'ADN.....	18
3. L'assemblage et le positionnement des nucléosomes.....	19
i. L'influence de la chromatine sur le positionnement des nucléosomes.....	20
ii. Influence de la séquence d'ADN sur le positionnement des nucléosomes.....	21
4. Les altérations de la méthylation et des nucléosomes dans les cancers.....	22
i. La méthylation de l'ADN et le positionnement des nucléosomes dans les cancers.....	22
ii. Les molécules ciblant la méthylation de l'ADN.....	23
5. Étude de la méthylation de l'ADN et du positionnement des nucléosomes.....	24
i. Étude de la méthylation de l'ADN.....	24
ii. Analyse du positionnement des nucléosomes.....	26
iii. Observation simultanée de la méthylation de l'ADN et du positionnement des nucléosomes.....	28
II. Les modifications post-traductionnelles des histones.....	29
1. Les marques associées à l'activation de la transcription.....	31
2. Les marques associées à la répression de la transcription.....	33
3. Les enzymes modifiant les histones.....	34
i. Les méthyltransférases et déméthylases d'histones.....	34
ii. Les acétylases et désacétylases d'histones.....	36
iii. Les autres modifications des histones.....	37
4. Interactions entre les différentes modifications des histones.....	38

5. Les marques d'histones dans les cancers .....	39
6. Les épidrogues ciblant les marques d'histones .....	40
7. Mise en évidence des modifications post-traductionnelles des histones .....	41
III. Les ARN non-codants .....	41
1. Les petits ARN non-codants .....	42
2. Les longs ARN non-codants .....	42
3. Les ARN non-codants dans les cancers .....	42
IV. La localisation subnucléaire .....	43
1. Une organisation bien spécifique .....	43
2. L'étude de la localisation nucléaire .....	44
V. Les relations entre les différentes marques épigénétiques .....	45
<i>Partie 3 : Les télomères et la télomérase</i> .....	47
I. Les télomères, protecteurs de l'information génétique .....	47
1. Une structure spécifique des chromosomes linéaires .....	47
2. Les protéines associées aux télomères : le complexe shelterin .....	50
II. La télomérase, un complexe ribonucléoprotéique .....	52
1. La sous-unité catalytique : hTERT .....	54
2. La sous-unité ARN : hTR .....	55
3. Les protéines associées au complexe .....	56
III. La régulation de la télomérase .....	57
1. La régulation de l'enzyme .....	58
2. La régulation de hTR .....	58
3. La régulation de hTERT .....	59
i. Les facteurs de transcription .....	59
a. Les facteurs activateurs .....	60
b. Les facteurs répresseurs .....	61
ii. Les mutations et polymorphismes du gène <i>hTERT</i> .....	62
iii. Les modifications épigénétiques .....	64
a. La méthylation de l'ADN et le positionnement des nucléosomes .....	64
b. Les modifications post-traductionnelles des histones .....	66
c. Les ARN non-codants .....	67
iv. L'environnement subnucléaire du gène <i>hTERT</i> .....	68
v. Les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles .....	69
IV. La télomérase dans le modèle cellulaire NB4 .....	70
Objectif de l'étude .....	74
Matériel et méthodes .....	75
I. Analyse de l'expression ARNm de hTERT .....	75
1. Référence des produits .....	75
2. Protocole de RT-qPCR .....	75
II. Observation de l'environnement subnucléaire du gène <i>hTERT</i> .....	76
1. Références des produits .....	76
2. Protocole de 3D-FISH .....	76
i. Purification et marquage des sondes .....	76
ii. Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence .....	77
III. Étude des modifications post-traductionnelles des histones .....	78

1. Références des produits .....	78
2. Protocole de ChIP-qPCR .....	78
i. Préparation de la chromatine .....	78
ii. Immunoprécipitation de la chromatine .....	79
IV. Analyse de la méthylation et du positionnement des nucléosomes sur le promoteur de <i>hTERT</i> .....	79
1. Références des produits .....	79
2. Protocole de NOMe-seq.....	80
Résultats .....	81
I. Article scientifique .....	81
II. Résultats complémentaires.....	112
1. Étude du positionnement du gène <i>hTERT</i> par rapport aux sites d'hétérochromatine $\alpha$ -satellites. ....	112
2. Analyse de l'environnement subnucléaire du gène <i>hTERT</i> dans la lignée NB4-LR1 à un temps de traitement précoce.....	114
3. Étude de la marque répressive H3K9me3 .....	116
4. Étude de la marque activatrice H3K27Ac.....	117
5. Mise au point et validation du NOMe-seq .....	118
6. Analyse NOMe-seq à un temps précoce du traitement à l'ATRA des cellules NB4-LR1 et NB4-LR1 <sup>SFD</sup> .....	119
Discussion et perspectives.....	122
Bibliographie .....	140
Annexes .....	I

## TABLE DES ANNEXES

---

Annexe 1 : Schéma de l'hématopoïèse (adaptation du travail de A. Rad <sup>cc</sup> ) .....	I
Annexe 2 : Nomenclature des acides aminés .....	II
Annexe 3 : Amorces utilisées pour les différentes techniques .....	III
Annexe 4 : Revue publiée par IntechOpen le 25 octobre 2017 dans le numéro Neuroblastoma : current state and recent updates .....	V
Annexe 5 : Curriculum Vitae .....	XXXVI

## TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Le modèle cellulaire NB4 .....	10
Figure 2 : Un nucléosome .....	12
Figure 3 : Méthylation d'une cytosine .....	14
Figure 4 : Les dérivés oxydatifs de la 5-méthylcytosine.....	15
Figure 5 : Structure de DNMT1 (d'après T. Chen & Li, 2004; Lyko, 2018).....	16
Figure 6 : Structures des DNMT3 (d'après T. Chen & Li, 2004; Lyko, 2018) .....	17
Figure 7 : Les modifications des cytosines (figure adaptée de Klungland & Robertson, 2017) .....	18
Figure 8 : Exemple de positionnement et d'occupation par les nucléosomes (adapté de Lai & Pugh, 2017) .....	20
Figure 9 : Différentes techniques d'analyse du positionnement des nucléosomes (figure simplifiée de Meyer & Liu, 2014).....	27
Figure 10 : Schéma du fonctionnement du NOMe-seq (figure adaptée de Kelly et al., 2012)	29
Figure 11 : Modifications post-traductionnelles des histones (figure inspirée de H. Huang et al., 2014).....	30
Figure 12 : Raccourcissement des télomères et émergence d'une cellule tumorale (inspirée de (Harley & Villeponteau, 1995)) .....	48
Figure 13 : La structure primaire de l'ADN télomérique (figure inspirée de Palm & de Lange, 2008).....	49
Figure 14 : Structures secondaires de l'ADN télomérique : les boucles T et D (figure inspirée de Palm & de Lange, 2008).....	49
Figure 15 : Structure en G-quadruplexe .....	50
Figure 16 : Le complexe shelterin.....	50
Figure 17 : Partie codante du gène hTERT (figure inspirée de Wyatt et al., 2010).....	54
Figure 18 : Structure tertiaire schématique de la protéine hTERT .....	54
Figure 19 : Structure secondaire de l'ARN hTR .....	56
Figure 20 : La télomérase et son interaction avec le complexe shelterin.....	57
Figure 21 : Schéma du promoteur du gène <i>hTERT</i> .....	60
Figure 22 : Distribution des mutations somatiques du gène <i>hTERT</i> dans différents types de cancers (Killela et al., 2013).....	63
Figure 23 : Effet de position des télomères sur de longues distances dans la régulation de <i>hTERT</i> .....	69
Figure 24 : La régulation de <i>hTERT</i> par l'ATRA et l'ATO dans le modèle cellulaire NB4 de LAP .....	71
Figure 25 : Méthylation du promoteur de <i>hTERT</i> dans le modèle NB4 de LAP (Azouz et al., 2010).....	72
Figure 26 : Noyaux de cellules NB4-LR1, microscopie confocale.....	112
Figure 27 : Effet d'un traitement de 7 jours à l'ATRA sur le coefficient de colocalisation des signaux $\alpha$ -satellites et hTERT .....	113
Figure 28 : Analyse de la distance entre le locus du gène <i>hTERT</i> et les régions subtélomériques du chromosome 5p ou la région "intermédiaire" dans la lignée NB4-LR1 après deux jours de traitement à l'ATRA.....	114

Figure 29 : Distribution des signaux séparés et adjacents dans la lignée NB4-LR1 après deux jours de traitement à l'ATRA .....	115
Figure 30 : Distribution de la marque répressive H3K9me3 sur le promoteur et le corps du gène <i>hTERT</i> dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1 <sup>SFD</sup> en absence ou après sept jours de traitement.....	116
Figure 31 : Distribution de la marque d'histone H3K27Ac sur le gène <i>hTERT</i> dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1 <sup>SFD</sup> .....	117
Figure 32 : Validation du NOME-seq sur le gène contrôle <i>HSPA5</i> .....	118
Figure 33 : Analyse NOME-seq de la lignée NB4-LR1 après deux jours de traitement à l'ATRA (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).....	119
Figure 34 : Analyse NOME-seq de la lignée NB4-LR1 <sup>SFD</sup> après deux jours de traitement à l'ATRA (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).....	120
Figure 35 : L'effet TPE-OLD intervient dans la régulation du gène <i>hTERT</i> par l'ATRA dans la lignée NB4-LR1 .....	124
Figure 36 : Le gène <i>hTERT</i> possède un domaine bivalent sur son promoteur dans la lignée NB4-LR1 .....	127
Figure 37 : Effet des traitements sur l'acétylation de l'histone H3 (H3Ac) sur le gène <i>hTERT</i> dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1 <sup>SFD</sup> .....	128
Figure 38 : Effet des traitements réprimant <i>hTERT</i> sur le positionnement des nucléosomes et la méthylation.....	131
Figure 39 : État de méthylation et positionnement des nucléosomes dans la région activatrice du gène <i>hTERT</i> à l'état basal dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1 <sup>SFD</sup> .....	134
Figure 40 : Schéma de régulation du gène <i>hTERT</i> dans la lignée NB4-LR1 après sept jours de traitement à l'ATRA (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) .....	136
Figure 41 : Schéma de régulation du gène <i>hTERT</i> dans la lignée NB4-LR1 <sup>SFD</sup> après sept jours de traitement à l'ATRA (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) et à l'ATO (0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) .....	137
Figure 42 : Schéma de régulation du gène <i>hTERT</i> dans la lignée NB4-LR1 <sup>SFD</sup> après sept jours de traitement à l'ATRA (1 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) ou à l'ATO (0,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) .....	138
Tableau 1 : Liste des différentes translocations chromosomiques pouvant survenir lors de la mise en place de la LAP.....	2
Tableau 2 : Marques d'histones associées à l'activation de la transcription .....	32
Tableau 3 : Marques d'histones associées à la répression de la transcription.....	33
Tableau 4 : Les familles d'acétyltransférases d'histones .....	36

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

---

2-OG : 2-oxoglutarate	ATO : trioxyde d'arsenic
2-OGDD : dioxygénase dépendante du 2-oxoglutarate	ATP : adénosine triphosphate
3C : chromosome conformation capture	ATR : ataxia telangiectasia and Rad3-related
3D-FISH : hybridation <i>in-situ</i> en fluorescence, en trois dimensions	ATRA : acide rétinoïque <i>tout-trans</i>
4C : chromosome conformation capture-on-chip	ATRX : alpha thalassemia mental retardation syndrome
5-aza : 5-azacytidine	BAH : domaine d'homologie adjacent à bromo
5-aza-dC : 5-aza-2'-désoxycytidine ou décitabine	BER : réparation par excision de bases
5caC : 5-carboxylcytosine	bp : paires de bases
5fC : 5-formylcytosine	c-Abl : Abelson tyrosine kinase
5-fC-DP : 5fC DNA pulldown	CBP : CREB-binding protein
5gmC : 5-glycométhylcytosine	CHD : chromodomain-helicase-DNA binding
5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine	ChIP : immunoprécipitation de la chromatine
5mC : 5-méthylcytosine	ChIP-loop : ChIP-combined loop
8-CPT-AMPc : 8-chlorophénylthioadénosine monophosphate cyclique	ChIP-on-chip : ChIP sur puces à ADN
Acétyl-CoA : acétyl-coenzyme A	ChIP-SAGE : ChIP suivi d'une analyse sériée d'expression des gènes
ADD : ATRX – DNMT3 – DNMT3L	ChIP-seq : ChIP suivi d'un séquençage
ADN : acide désoxyribonucléique	CLEVER-seq : chemical-labelling-enabled C-to-T conversion sequencing
ADP : adénosine diphosphate	c-Myc: cloned-myelocytose oncogene
Ago : Argonaute	CN : corps nucléaire
ALT : mécanisme alternatif de maintien des télomères	CR4/CR5 : domaine des régions conservées 4 et 5
AMPc : adénosine monophosphate cyclique	CST : CTC1, STN1 et TEN1
AP1 : activator protein 1	CTCF : facteur de liaison CCCTC
ARN : acide ribonucléique	CTE : extension C-terminale
ARNInc : long ARN non-codant	C-terminal : carboxy-terminal
ARNm : ARN messenger	CXXC : domaine de liaison en doigt de zinc riche en cystéines
ARNnc : ARN non-codant	DBD : domaine de liaison à l'ADN
ARNpol II : polymérase ARN II	DEAF-1 : deformed epidermal autoregulatory factor 1
ATAC-seq : assay for transposase-accessible chromatin using sequencing	DIP : immunoprécipitation de l'ADN
ATM : ataxia telangiectasia mutated	

DMSO : diméthylsulfoxyde  
DNase : désoxyribonucléase  
DNase-seq : deoxyribonuclease I hypersensitive sites sequencing  
DNMT : méthyltransférase de l'ADN  
DOT1L : Disruptor of telomeric silencing 1-like  
DSBH : domaine en hélice  $\beta$  double brin  
EED : embryonic ectoderm development  
ERK1/2 : extracellular signal-regulated kinases 1/2  
Ets : E-twenty-six  
EZH : enhancer of zeste homolog  
FAB : classification France, Amérique, Grande-Bretagne  
FAIRE-seq : formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements followed by sequencing  
FDA : Food and drug administration  
FISH : l'hybridation *in situ* en fluorescence  
GABP: GA binding protein  
GAR : domaine riche en glycines et arginines  
GAR1: glycine arginine rich protein 1  
GCN5 : general control nonderepressible 5  
GNAT : GCN5-related N-acetyltransferase  
HAT : acétyltransférase d'histones  
HBO1 : histone acetyltransferase bound to ORC  
HDAC : désacétylase d'histones  
HDM : déméthylase d'histones  
Hi-C : chromosome conformation capture followed by sequencing  
HIF-1 : hypoxia inducible factor 1  
HKMT : méthyltransférase de lysines d'histones  
HMT : méthyltransférase des histones  
HOTAIR : HOX transcript antisense RNA  
HOX : homeobox gene  
HP1 : protéine d'hétérochromatine 1  
hTERT : human telomerase reverse transcriptase  
INO80 : inositol requiring 80  
ISWI : imitation switch  
LAM : leucémie aiguë myéloïde  
LAM-M3 : sous-type M3 de la leucémie aiguë myéloïde  
LAP : leucémie aiguë promyélocytaire  
LBD : domaine de liaison au ligand  
LSD1 : déméthylase spécifique de lysine 1  
MAB-seq : M.SssI methylase-assisted bisulfite sequencing  
Mad1 : Max dimerization protein 1  
Max : Myc-associated factor X  
MBD : domaine de liaison aux groupements méthyles  
miARN : micro ARN  
MLL : mixed-lineage leukemia  
MNase : micrococcal nuclease  
MNase-seq : micrococcal nuclease digestion followed by sequencing  
MOF : males absent on the first  
MORF : MOZ-related factor  
MOZ : monocytic leukemic zinc finger  
MYND : myeloid, Nervy, and DEAF-1  
MYST : MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60  
MZF2 : myeloid specific zinc finger protéin 2  
NAD : dinucléotide d'adénine nicotinamide  
NCOA : nuclear receptor coactivator  
N-CoR : corépresseur nucléaire  
NES : séquence d'export nucléaire  
NF- $\kappa$ B : nuclear factor kappa-B  
NHP2: ribonucleoprotein homolog 2  
NLS : séquence signal de localisation nucléaire  
NOMe-seq : nucleosome occupancy and methylome sequencing  
NOP10: nucleolar protein 10  
RXR $\alpha$  : récepteur alpha à l'acide rétinoïque X

hTR : human telomerase RNA	SAM : S-adénosyl-méthionine
nt : nucléotide	SANT : Swi3, Ada2, N-Cor et TFIIB
N-terminal : amino-terminal	SCR : coactivateurs des récepteurs stéroïdes
OB : oligonucleotide/oligosaccharide binding	Seal : selective chemical labelling
pCAF : p300/CBP-associated factor	SET : suppressor of variegation, enhancer of zeste and trithorax
PCR : polymerase chain reaction	siARN : petit ARN interférant
PEV : position effect variegation	SIM : motif d'interaction avec SUMO
piARN : petit ARN non-codant interagissant avec les protéines PIWI	SIRT : silent mating type information regulation two, ou sirtuine
PIWI : P-element induced wimpy	SIT : site d'initiation de la transcription
PLZF : protéine de leucémie promyélocytaire en doigt de zinc	SMRT : silencing mediator for RXR and RAR
PML : protéine de leucémie myéloïde	SMYD : SET and MYND domain-containing proteins
POT1 : protection of telomeres 1	Sono-seq : sonication of crosslinked chromatin sequencing
PPAR $\alpha$ : peroxisome proliferator-activated receptor alpha	Sp1 : specificity protein 1
PRC1/2 : Polycomb repressor complex 1/2	SUMO : small ubiquitin-like modifier
PRDM : positive regulatory domain-containing	SUV39 : suppressor of position-effect variegation 39
PRMT : méthyltransférase des arginines des protéines	SUZ12 : suppressor of zeste 12
PTOP : POT1 and TIN2 organizing protein	SWI/SNF : switch/sucrose-non-fermenting
PWWP : proline – tryptophane - tryptophane – proline	TAB-seq : TET-assisted bisulfite sequencing
qPCR : PCR quantitative	TAD : domaines topologiquement associés
RAP1 : repressor/activator protein 1	TAPAS : hTERT antisense promoter-associated
RAR $\alpha$ : récepteur alpha à l'acide rétinoïque	TBP : TATA-box binding protein
RARE : retinoic acid responsive element	TCAB1 : telomerase Cajal body protein 1
RCT : domaine de liaison C-terminal	TDG : glycosylase de thymine d'ADN
RDN : région déplétée en nucléosomes	TEN : domaine N-terminal essentiel
RFT : domaine de ciblage des fourches de réplication	TERRA : telomeric repeat-containing RNA
RING : really interesting new gene	TET : ten-eleven translocation
RNA-seq : séquençage de l'ARN	TIN2 : TRF1-interacting nuclear factor 2
RPA : protéine de réplication A	Tip60 : HIV tat-interacting protein 60
RT : transcription inverse	TPE : effet de position des télomères
RT-qPCR : transcription inverse suivie d'une	TRF1/2 : telomere repeat-binding factor1/2
	TRFH : domaine d'homologie TRF

PCR quantitative

TPE-OLD : effet de position des télomères sur de  
longues distances

TPP1 : TIN2-POT1 interacting protein 1

TRBD : domaine de liaison à l'ARN hTR

TSA : trichostatine A

WT1 : Wilm's tumor 1

Xist : X-inactive-specific transcript

# INTRODUCTION

---

## Partie 1 : La leucémie aiguë promyélocytaire

### I. Caractéristiques pathologiques

#### 1. Classification et description

La leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) est une leucémie rare, décrite pour la première fois comme un sous-type de leucémie aiguë myéloïde (LAM) en 1957. Elle présente des caractéristiques biologiques et pathologiques très particulières. Dans la classification France, Amérique, Grande-Bretagne (FAB), elle est notée LAM M3 et représente 10 à 15 % de l'ensemble des LAM (Adams & Nassiri, 2015; Breccia & Lo Coco, 2014; Douer, 2003; Junmin Li et al., 2014). La leucémie aiguë promyélocytaire était autrefois considérée comme le sous-type le plus fatal des leucémies myéloïdes à cause de morts précoces dès le début du traitement d'induction dues à des hémorragies, notamment cérébrales, ou encore de graves infections. Cette leucémie est à présent la seule à être presque totalement soignée, avec un taux de guérison supérieur à 95 % (de Thé, Pandolfi, & Chen, 2017; Goldman, 1974; Lo-Coco & Ammatuna, 2006; Ryan, 2018; Tallman, 2014; H.-H. Zhu, Qin, & Huang, 2014).

Ce sous-type de leucémie aiguë myéloïde se distingue des autres notamment par la distribution de l'âge des patients atteints. En effet, contrairement aux autres LAM qui se déclarent principalement chez les personnes âgées, la leucémie aiguë promyélocytaire touche majoritairement les jeunes patients (augmentation de l'incidence entre 20 et 30 ans puis stabilisation jusqu'à 60 ans) et épargne les personnes les plus âgées (diminution de l'incidence après 60 ans) (Ryan, 2018; Tallman, 2014). De plus, de nombreuses études ont montré que, contrairement à la majorité des autres types de tumeurs malignes, l'établissement de la LAP se fait principalement, si ce n'est exclusivement, par la mise en place d'un réarrangement chromosomique impliquant le chromosome 17 dont nous parlerons ultérieurement (Ablain et al., 2014; G. Q. Chen et al., 1996; de Thé et al., 2017; Guidez et al., 1998; Jeanne et al., 2010; Tang et al., 2013).

La leucémie aiguë promyélocytaire, comme les autres leucémies myéloïdes, est caractérisée par le blocage de l'une des voies de l'hématopoïèse. La différenciation des promyélocytes en granulocytes neutrophiles est interrompue, entraînant l'accumulation des promyélocytes dans le sang et la moelle osseuse. Un schéma de l'hématopoïèse en **annexe 1** permet de visualiser ce blocage. Ce blocage et cette accumulation de promyélocytes conduisent ainsi à une cytopénie, un déséquilibre dans la distribution des cellules matures hématopoïétiques dans le sang (Dyck et al., 1994; Goldman, 1974; Ryan, 2018). Certains patients présentent également une augmentation de leur numération de leucocytes, ce qui est considéré comme un mauvais pronostic et doit être pris en compte dans l'établissement des traitements qui peuvent empirer cet état comme nous le verrons plus loin (Coombs, Tavakkoli, & Tallman, 2015; Ryan, 2018; Tallman, 2014).

Il existe deux formes de leucémies aiguës promyélocytaire, toutes deux marquées par des promyélocytes anormaux, plus larges que les blastes sains (Ryan, 2018). La forme la plus classique, dite hypergranulaire, est caractérisée par des promyélocytes possédant un cytoplasme densément granulé, de nombreux corps d'Auer qui se regroupent en « fagots » et une membrane nucléaire souvent réniforme ou bilobée. Cette forme est souvent associée à une leucopénie, c'est-à-dire un nombre réduit de leucocytes circulant dans le sang. La deuxième forme de LAP, dite microgranulaire, se définit par un nombre élevé de leucocytes, un cytoplasme contenant peu ou pas de granulations et une membrane nucléaire bilobée (Adams & Nassiri, 2015; McCulloch, Brown, & Iland, 2017; Ryan, 2018).

## 2. La protéine de fusion PML-RAR $\alpha$

La leucémie aiguë promyélocytaire est caractérisée par une translocation chromosomique unique, la translocation t(15 ; 17) (q24.1 ; q21.2). Cette translocation, identifiée en 1977 et se retrouvant chez plus de 95 % des patients LAP (Ohnishi, 2007), se situe entre le locus du gène codant la protéine de leucémie promyélocytaire (PML) sur le chromosome 15 et le locus du gène du récepteur  $\alpha$  à l'acide rétinoïque (RAR $\alpha$ ) sur le chromosome 17 (Dyck et al., 1994; Lo-Coco & Ammatuna, 2006; Ohnishi, 2007).

Il existe quelques rares cas, moins de 5 %, de patients LAP ne possédant pas cette translocation particulière mais d'autres types de translocations. Tous les réarrangements chromosomiques mis en évidence concernent le locus du gène RAR $\alpha$ . Ceux-ci entraînent la formation d'autres protéines de fusion comme par exemple PLZF-RAR $\alpha$  qui est la fusion de la protéine de leucémie promyélocytaire en doigt de zinc (PLZF) avec le récepteur RAR $\alpha$ . Le **tableau 1** récapitule toutes les translocations connues à ce jour, les protéines de fusion associées et la fréquence de ces translocations chez les patients LAP (Adams & Nassiri, 2015; Okazuka et al., 2007; A. Tomita, Kiyoi, & Naoe, 2013).

Translocation	Protéine de fusion	Fréquence de la translocation
t(15 ; 17) (q24 ; q21)	PML-RAR $\alpha$	95 %
t(11 ; 17) (q23 ; q21)	PLZF RAR $\alpha$	0,8 %
t(5 ; 17) (q35 ; q21)	NPM-RAR $\alpha$	Rare
t(11 ; 17) (q13 ; q21)	NUMA-RAR $\alpha$	Rare
t(17 ; 17) (q11 ; q21)	STAT5B-RAR $\alpha$	Rare
t(17 ; 17) (q12 ; q21)	PRKAR1a-RAR $\alpha$	Rare
t(X ; 17) (p11 ; q21)	BCOR-RAR $\alpha$	Rare
t(4 ; 17) (q12 ; q21)	FIP1L1-RAR $\alpha$	Rare

Tableau 1 : Liste des différentes translocations chromosomiques pouvant survenir lors de la mise en place de la LAP

La protéine PML, identifiée pour la première fois dans le cadre de la translocation particulière de la LAP, intervient dans plusieurs phénomènes cellulaires tels l'apoptose, la sénescence, la réponse aux dommages à l'ADN ou encore le maintien des cellules souches hématopoïétiques. PML est considérée comme un suppresseur de tumeur notamment grâce à son rôle dans l'activation de p53. La protéine PML possède plusieurs domaines essentiels à sa fonction : le motif d'interaction avec SUMO (SIM), les boîtes B et le domaine « *really interesting new gene* » (RING) (Chang et al., 2018; Lallemand-Breitenbach & de Thé, 2018). PML forme des corps nucléaires (CN), qui s'assemblent en complexe, pour exercer ses différentes actions (Chang et al., 2018; G. Jin, Gao, & Lin, 2014; Marchesini et al., 2016; Tang et al., 2013). Les CN PML sont formés d'une « carapace » constituée de plusieurs protéines PML, et de quelques protéines non apparentées qui composent le cœur. Il a été dénombré plus de 150 protéines avec des actions différentes pouvant se trouver au cœur de ces corps nucléaires PML, et ces protéines déterminent la fonction des CN PML (Chang et al., 2018; Lallemand-Breitenbach & de Thé, 2018).

Le gène *PML* codant la protéine PML est constitué de 9 exons, et contient une séquence signal de localisation nucléaire (NLS) dans son exon 6 ainsi qu'une séquence d'export nucléaire (NES) dans l'exon 9. Ces deux sites particuliers permettent à la protéine, selon l'épissage, de se situer soit exclusivement dans le noyau, soit exclusivement dans le cytoplasme. La protéine PML se trouve sous sept isoformes dont cinq contiennent exclusivement la séquence NLS les localisant donc dans le noyau, une ne contient ni NLS ni NES et est localisée dans le cytoplasme et la dernière isoforme possède à la fois la séquence NLS et la séquence NES, lui permettant d'être localisée à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau. Ces localisations variées ont un rôle dans les différentes fonctions jouées par la protéine dans la cellule puisqu'elles permettent de déterminer les protéines avec lesquelles PML interagit. Il a été observé une préférence de localisation dans le noyau où la SUMOylation, une modification épigénétique de la protéine, peut avoir lieu et les corps nucléaires se former (Chang et al., 2018; G. Jin et al., 2014).

Le récepteur RAR $\alpha$ , quant à lui, est impliqué dans l'hématopoïèse normale et joue un rôle majeur dans la différenciation des progéniteurs myéloïdes. Il appartient à la famille des facteurs de transcription dépendant d'un ligand et est une isoforme de RAR, qui en possède trois différentes. Le partenaire de RAR $\alpha$ , le récepteur  $\alpha$  à l'acide rétinoïque (RXR $\alpha$ ), appartient également à cette famille et est une des trois isoformes de RXR. Ces deux récepteurs forment un complexe hétérodimérique et reconnaissent les éléments de réponse à l'acide rétinoïque (RARE) présents sur leurs gènes cibles. RAR $\alpha$  possède deux domaines importants pour interagir avec son ligand, l'acide rétinoïque tout-*trans* (ATRA), et ses gènes cibles : le domaine de liaison au ligand (LBD) et le domaine de liaison à l'ADN (DBD) (Minucci & Ozato, 1996; Orfali, McKenna, Cahill, Gudas, & Mongan, 2014; A. Tomita et al., 2013).

En absence de ligand, le complexe RAR $\alpha$  - RXR $\alpha$  réprime les gènes sur lesquels il se fixe en recrutant des désacétylases d'histones (HDAC) par l'intermédiaire de deux complexes corépresseurs : le corépresseur nucléaire (N-CoR) qui interagit avec un motif boîte CoR présent sur RAR $\alpha$ , et le cofacteur « *silencing mediator for RXR and RAR* » (SMRT).

L'interaction avec l'ATRA permet au complexe RAR $\alpha$ -RXR $\alpha$  de se défaire des complexes corépresseurs par un changement de conformation et de recruter le complexe médiateur ou encore des coactivateurs tels des acétyltransférases de lysine d'histones, ce qui favorise la transcription des gènes cibles (Adams & Nassiri, 2015; Grignani et al., 1998; Minucci & Ozato, 1996; Orfali et al., 2014; Petrie, Zelent, & Waxman, 2009). En particulier, il a été montré que RAR $\alpha$  a un rôle dans l'hématopoïèse. Il est en effet présent dans l'ensemble des cellules hématopoïétiques et son interaction avec l'ATRA promeut la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques et des cellules de la voie granulocytaire (Orfali et al., 2014; Purton et al., 2006).

La translocation t(15 ; 17) (q24.1 ; q21.2) entraîne la formation d'une protéine de fusion : PML-RAR $\alpha$ . Le gène *PML* contenant plusieurs points de cassure, trois précisément, cette translocation peut donner naissance à différents transcrits PML-RAR $\alpha$ . Selon le transcrit, la séquence NLS ou la séquence NES de la protéine PML peuvent ne pas être présentes et ainsi changer la localisation cellulaire de la protéine de fusion. En revanche, toutes les isoformes de la protéine contiennent les domaines DBD et LBD du récepteur RAR $\alpha$  et sont donc capables de répondre aux acides rétinoïques et de se lier aux motifs RARE (Dyck et al., 1994; Orfali et al., 2014; A. Tomita et al., 2013).

La protéine de fusion PML-RAR $\alpha$  a une action de dominant négatif sur les protéines PML et RAR $\alpha$ , perturbant ou inhibant leurs fonctions normales (Marchesini et al., 2016). Par exemple, PML-RAR $\alpha$  agit en hétérodimère et séquestre le partenaire normal de RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$ . La liaison du complexe hétérodimérique sur les gènes impliqués dans la différenciation hématopoïétique bloque leur transcription et empêche ainsi la maturation des blastes en granulocytes neutrophiles (Kamimura, Miyamoto, Harada, & Akashi, 2011; McCulloch et al., 2017). En effet, il a été montré que PML-RAR $\alpha$  inhibe la transcription de PU.1, l'un des facteurs transcriptionnels principaux dans la différenciation des lignées myéloïdes (Lo-Coco & Hasan, 2014). Cette répression est réalisée grâce au recrutement de HDAC, de méthyltransférases de lysines d'histones (HKMT) et de méthyltransférases de l'ADN (DNMT) qui interagissent avec la protéine de fusion via les complexes corépresseurs naturels de RAR $\alpha$ . Ces complexes corépresseurs, N-CoR et SMRT, présentent une affinité plus élevée pour la protéine de fusion que pour le récepteur RAR $\alpha$  normal. Ainsi, leur recrutement sur PML-RAR $\alpha$  est favorisé et la protéine de fusion réprime alors le gène codant RAR $\alpha$  (Elbahesh, Patel, & Tabbara, 2014; Grignani et al., 1998; Orfali et al., 2014).

Une autre action de PML-RAR $\alpha$  est d'empêcher le bon fonctionnement de PML en perturbant la formation des corps nucléaires de PML. En effet, la protéine de fusion forme des hétérodimères avec la protéine PML et cette interaction entraîne la formation de microparticules au lieu de corps nucléaires normaux (Ablain et al., 2014; Chang et al., 2018; Dyck et al., 1994). Cet obstacle à la formation des corps nucléaires altère donc les fonctions normales de PML et accélère le développement des clones leucémiques en intervenant au niveau de la voie d'activation de p53, un suppresseur de tumeur, et en favorisant également l'instabilité génomique (Chang et al., 2018; Marchesini et al., 2016).

## II. Traitements

Avant d'atteindre le taux de guérison actuel (plus de 95 % de guérison complète) pour la LAP, plusieurs traitements ont été utilisés en clinique pour essayer d'éradiquer cette leucémie autrefois fatale. Aujourd'hui, les morts précoces, dues à des complications hémorragiques se développant lors du premier mois de traitement d'induction sont la principale cause de mortalité des patients LAP. Ces complications sont le plus souvent dues à des infections ou des syndromes associés à la différenciation massive (Adams & Nassiri, 2015; Breccia & Lo Coco, 2014; Junmin Li et al., 2014; Tallman, 2014; Watts & Tallman, 2014). Plusieurs facteurs de risque sont à prendre en compte dans le choix du traitement d'induction, qui a pour but de restaurer une hématopoïèse normale. Il en va de même pour celui de consolidation, qui doit permettre d'atteindre une rémission complète moléculaire testée par des tests PCR spécifiques de PML-RAR $\alpha$  devant être négatifs. Le traitement d'entretien, qui est nécessaire pour s'assurer de la rémission complète, nécessite aussi un ajustement selon le patient. Ces facteurs de risque sont notamment la numération leucocytaire au moment du diagnostic et pendant le traitement d'induction. En effet, les patients présentant une numération de leucocytes élevée, ci-après nommés patients à haut risque, sont plus sujets aux morts précoces et aux rechutes et doivent donc être traités de façon adaptée (Coombs et al., 2015; Junmin Li et al., 2014).

### 1. La chimiothérapie

Historiquement, les antimétabolites, seuls ou en combinaison avec des stéroïdes, ont constitué le premier traitement utilisé chez les patients atteints de LAP. Ce traitement présentant très peu d'efficacité, la quasi-totalité des patients mourait extrêmement rapidement, en moins d'un mois, notamment des suites de complications hémorragiques (Coombs et al., 2015; Elbahesh et al., 2014).

Au début des années 1970, la chimiothérapie cytotoxique, notamment les anthracyclines utilisées dans les autres types de leucémies myéloïdes, a remplacé les traitements précédents suite aux résultats d'une étude démontrant la sensibilité notable des cellules LAP à ce type de traitement. De plus, l'utilisation en clinique de ces anthracyclines a permis une augmentation des taux de rémission allant jusqu'à 80 %. Cette rémission durait tout au plus une vingtaine de mois et seuls 35 % à 40 % des patients survivaient après cinq ans. L'effet de ce traitement s'est avéré être dépendant de la dose utilisée avec de meilleurs taux de rémission pour des doses plus élevées (Coombs et al., 2015; Elbahesh et al., 2014; Goldman, 1974; McCulloch et al., 2017; Z.-Y. Wang & Chen, 2008).

Malgré les résultats prometteurs obtenus avec ce traitement, des rechutes pour la moitié des patients ainsi que des morts précoces, dans les premières semaines de traitement, étaient encore observées. En effet, les chimiothérapies utilisées aggravaient fréquemment les syndromes hémorragiques (Kamimura et al., 2011; Junmin Li et al., 2014; Z.-Y. Wang & Chen, 2008; Watts & Tallman, 2014). Des essais de combinaisons de plusieurs anthracyclines ont été réalisés mais sans amélioration significative pour les patients puisque les résultats étaient similaires à ceux obtenus pour les différentes anthracyclines utilisées seules (Coombs

et al., 2015). Ce n'est que vers la fin des années 1980 qu'un autre type de traitement, bien plus efficace, a été utilisé en clinique.

## 2. L'acide rétinoïque tout-*trans*

La découverte des thérapies différenciatrices dans les leucémies, et plus particulièrement des effets de l'acide rétinoïque tout-*trans* en 1985, a permis d'améliorer le nombre de patients LAP en rémission puisque celui-ci a atteint presque 80 %. Cependant, ce traitement seul n'empêche pas les rechutes ayant lieu dans 30 % des cas puisqu'une utilisation continue de l'ATRA entraîne le développement d'une résistance et une diminution de sa concentration dans le sang, due à une dégradation de plus en plus rapide (Coombs et al., 2015; M. E. Huang et al., 1988; Petrie et al., 2009; Z.-Y. Wang & Chen, 2008; Watts & Tallman, 2014).

L'ATRA est un dérivé de la vitamine A présent dans l'ensemble des cellules à des concentrations physiologiques faibles ( $0,01 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). En tant que ligand naturel du récepteur  $\text{RAR}\alpha$ , l'ATRA constitue un traitement de choix pour la LAP et présente une efficacité non négligeable pour la majorité des patients. La concentration physiologique de l'ATRA ne permet pas de contrer l'effet dominant négatif de la protéine de fusion PML- $\text{RAR}\alpha$  mais l'utilisation en clinique d'une dose plus élevée ( $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) d'ATRA y parvient (Guidez et al., 1998; Ohnishi, 2007; A. Tomita et al., 2013). Ceci n'est pas dû à une diminution de l'affinité de PML- $\text{RAR}\alpha$  pour l'ATRA puisque ce paramètre reste inchangé entre le récepteur normal et la protéine de fusion. À concentration pharmacologique, l'ATRA induit une séparation de PML- $\text{RAR}\alpha$  avec les complexes corépresseurs N-Cor et SMRT et entraîne le recrutement de coactivateurs mais les mécanismes exacts mis en jeu sont encore sujets à débat (Orfali et al., 2014; A. Tomita et al., 2013; Z.-Y. Wang & Chen, 2008). Ceci permet ainsi le retour de la différenciation des promyélocytes en granulocytes matures. De plus, l'ATRA est également impliqué par une voie distincte de la précédente dans la dégradation de PML- $\text{RAR}\alpha$  par le protéasome (Kamimura et al., 2011; Lo-Coco & Hasan, 2014; McCulloch et al., 2017; Z.-Y. Wang & Chen, 2008). Cette dégradation de la protéine de fusion entraîne la reformation de corps nucléaires PML par la disparition de l'effet dominant négatif de PML- $\text{RAR}\alpha$  et la réactivation de la voie de signalisation de p53, impliquée dans la rémission de la LAP (de Thé et al., 2017).

En revanche, le traitement à l'ATRA présente des effets secondaires alarmants, notamment le « syndrome de l'ATRA » ou « syndrome de différenciation » qui se développe chez 25 % des patients (Elbahesh et al., 2014; Kamimura et al., 2011; Ryan, 2018). Il s'observe dès les premiers jours suivant l'initiation du traitement et est plus susceptible de se déclarer chez les patients à haut risque. Ce syndrome, associé à une augmentation de la numération de leucocytes, entraîne la survenue de fièvre, d'infiltrations pulmonaires, une détresse respiratoire, de l'hypoxie, de l'hypotension et un épanchement péricardique (Elbahesh et al., 2014; McCulloch et al., 2017; Ryan, 2018). Le syndrome de différenciation, s'il est traité dès les premiers symptômes, peut être contré en utilisant des glucocorticoïdes. Il est fatal et ne répond plus à aucun traitement si le patient atteint le stade de la détresse respiratoire. Il est donc essentiel de suivre le patient lors de l'induction du traitement (Elbahesh et al., 2014; McCulloch et al., 2017; Ryan, 2018).

La combinaison de l'acide rétinoïque tout-*trans* avec la chimiothérapie a été l'une des premières combinaisons efficaces mises en place dans le traitement de la leucémie aiguë promyélocytaire. Cette combinaison permet notamment de diminuer fortement le taux d'incidence du syndrome de différenciation, ne touchant alors plus que 5 % des patients (Kamimura et al., 2011; Ryan, 2018; Z.-Y. Wang & Chen, 2008; Watts & Tallman, 2014). Le groupe européen de leucémie aiguë promyélocytaire, après une étude randomisée, a été le premier à montrer de meilleurs résultats pour cette combinaison de traitements réalisée en simultanée par rapport à la même combinaison utilisée de façon séquentielle en commençant par l'ATRA puis en continuant avec la chimiothérapie (Coombs et al., 2015; Kamimura et al., 2011; Powell, 2013). De plus, cette combinaison d'anthracyclines et d'ATRA a permis de diminuer le taux de rechutes après deux ans, celui-ci ne dépassant pas les 10 % à 15 % (Coombs et al., 2015; McCulloch et al., 2017). Les anthracyclines combinées à l'ATRA ont permis d'améliorer le taux de rémission complète des patients jusqu'à plus de 90 % avec une survie sans maladie après 6 ans de plus de 85 %. Ces résultats ne concernent cependant que les patients non à haut risque (Coombs et al., 2015; Elbahesh et al., 2014; Z.-Y. Wang & Chen, 2008). Des traitements de consolidation et d'entretien sont obligatoires avec cette combinaison et consistent le plus souvent en quelques mois de chimiothérapie pour la consolidation et une nouvelle combinaison d'ATRA et de chimiothérapie à faible dose pour l'entretien (Junmin Li et al., 2014; McCulloch et al., 2017; Z.-Y. Wang & Chen, 2008). Afin de diminuer le nombre de rechutes et les résistances observées avec cette combinaison de traitements, une autre molécule a été testée au début des années 1990.

### 3. Le trioxyde d'arsenic

Un peu moins de dix ans après la mise en application de l'ATRA dans le traitement de la LAP, le trioxyde d'arsenic (ATO) a été remis au goût du jour. En effet, cette molécule utilisée depuis les temps anciens – Hippocrate lui-même mentionnait ses effets bénéfiques dans le traitement d'ulcères de la peau – et abandonnée pour sa toxicité à haute dose dans des traitements de fièvres et de leucémies myéloïdes chroniques au début du vingtième siècle, a finalement été réutilisée en clinique au début des années 1970 suite à l'identification de ses propriétés anticancéreuses (Elbahesh et al., 2014; McCulloch et al., 2017; Z.-Y. Wang & Chen, 2008).

Plusieurs études dans les années 1990 ont démontré l'efficacité de l'ATO tout d'abord chez des patients LAP en rechute puis chez des patients nouvellement diagnostiqués. Le traitement à l'ATO seul permettait une rémission complète des patients avec des niveaux similaires à ceux de la combinaison ATRA et anthracyclines, soit un taux supérieur à 70 %. L'observation d'une rémission moléculaire de plus de 70 % après rémission complète dans le cas de la LAP a suffi à convaincre les scientifiques et médecins d'utiliser l'ATO dans les régimes de traitement contre la LAP (Kamimura et al., 2011; Junmin Li et al., 2014; A. Tomita et al., 2013; Z.-Y. Wang & Chen, 2008). Il a été montré que le trioxyde d'arsenic présente des effets dépendants de la dose utilisée. En effet, une faible concentration (0,25 à 0,50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) sur une longue durée promeut la différenciation des cellules leucémiques alors qu'une concentration élevée (1 à 2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) favorise leur entrée en apoptose (Orfali et al., 2014; A. Tomita et al., 2013; Z.-Y. Wang & Chen, 2008).

Le trioxyde d'arsenic cible la protéine PML ainsi que la protéine de fusion PML-RAR $\alpha$ . Le traitement à l'ATO entraîne la phosphorylation de la région N-terminale de PML par les kinases « *extracellular signal-regulated kinases 1/2* » (ERK1/2). Cette phosphorylation entraîne une relocalisation nucléaire de la protéine PML auparavant séquestrée dans le cytoplasme, ce qui favorise la reformation de corps nucléaires PML – et ainsi la réactivation de la voie de signalisation p53 qui mène à la sénescence cellulaire – mais aussi la SUMOylation de la protéine PML. Cette modification post-traductionnelle favorise l'interaction de PML avec le protéasome et ainsi sa dégradation (Chang et al., 2018; Jeanne et al., 2010; Lallemand-Breitenbach & de Thé, 2018). De plus, l'ATO est capable d'interagir directement avec PML-RAR $\alpha$  sur le domaine boîte B2 de la moitié PML. Cette interaction entraîne une oxydation de la protéine par la génération d'espèces oxygénées réactives, PML est ensuite SUMOylée, ce qui induit la fixation d'une ubiquitine-ligase sur le domaine RING de PML et ainsi la poly-ubiquitination, une autre modification post-traductionnelle, de la protéine. Ces modifications post-traductionnelles activent la reconnaissance de PML-RAR $\alpha$  par le protéasome, qui la dégrade (McCulloch et al., 2017; A. Tomita et al., 2013).

Cependant, comme l'ATRA, le trioxyde d'arsenic présente des effets secondaires. Ceux-ci sont principalement : une leucocytose – caractérisée par une augmentation de la numération des leucocytes et constituant donc un risque à prendre en compte pour la suite du traitement –, un syndrome de différenciation similaire à celui obtenu avec l'ATRA, des changements anormaux de l'électrocardiogramme et en particulier une augmentation des intervalles QT et des apparitions de torsades de pointe, ainsi qu'une toxicité hépatique (Elbahesh et al., 2014; Junmin Li et al., 2014; McCulloch et al., 2017).

Depuis la découverte de cet agent, les régimes de traitement de la leucémie aiguë promyélocytaire ont été adaptés pour l'inclure. En effet, la combinaison de l'ATRA et de l'ATO, ciblant de façon complémentaire la protéine de fusion PML-RAR $\alpha$  caractérisant la maladie, permet de dégrader de façon synergique l'ensemble des cellules initiant la leucémie et donc une guérison complète dans plus de 90 % des cas non à haut risque (Coombs et al., 2015; Junmin Li et al., 2014; McCulloch et al., 2017; Ryan, 2018). De plus, le fait de combiner l'arsenic à l'ATRA diminue les effets secondaires observés. Pour les patients à haut risque, avec donc une numération leucocytaire élevée au moment du diagnostic, les régimes utilisés font appel à une combinaison d'ATRA et d'ATO associée à du gemtuzumab, un anticorps monoclonal dirigé contre CD33 couplé à un agent cytotoxique (Junmin Li et al., 2014; McCulloch et al., 2017; Ryan, 2018).

Malgré ces avancées dans le traitement de la LAP, les résultats très prometteurs obtenus restent spécifiques à cette pathologie et il existe des cas de résistances jusqu'ici non élucidés. C'est pourquoi il est crucial d'étudier les mécanismes mis en jeu pour pouvoir les appliquer à d'autres types de cancers.

## IV. La lignée NB4, un modèle cellulaire de leucémie aiguë promyélocytaire

Afin de réaliser ce projet de recherche doctorale, j'ai utilisé un modèle cellulaire de leucémie aiguë promyélocytaire : la lignée NB4 et ses deux variants NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup>.

La lignée NB4 a été établie à partir de cellules de moelle osseuse d'une patiente en rechute de leucémie aiguë promyélocytaire après plusieurs semaines de culture. La patiente avait été traitée par chimiothérapie lors de l'émergence de la maladie. La lignée NB4 est hypo tétraploïde pour la plupart de ses chromosomes, présente la translocation t(15 ; 17) (q24.1 ; q21.2) spécifique de la LAP et ainsi exprime la protéine de fusion PML-RAR $\alpha$  (Benoit, Roussel, Pendino, Ségal-Bendirdjian, & Lanotte, 2001; Lanotte et al., 1991; Roussel & Lanotte, 2001).

La lignée NB4 possède des marqueurs de cellules myéloïdes mais aussi de cellules lymphoïdes. Les cellules présentent une morphologie de blastes myéloïdes mais une absence de granulation dans leur cytoplasme, contrairement aux cellules leucémiques de forme hypergranulaire observées chez les patients. La lignée NB4 est donc probablement issue d'une LAP de forme hypogranulaire (Lanotte et al., 1991).

Les cellules NB4 répondent aux doses pharmacologiques de l'ATRA (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) et à son effet différenciant. En effet, dès deux jours de traitement, les cellules NB4 ne prolifèrent plus et présentent une morphologie différente avec une modification des marqueurs de surface et une tendance à l'adhésion sur les parois des flacons de culture (**figure 1**). Après quatre jours de traitement à l'ATRA, les cellules NB4 deviennent polynucléées. Ces différentes caractéristiques sont celles des granulocytes neutrophiles, le dernier stade de différenciation des promyélocytes, indiquant que les cellules NB4 sont bien dérivées de promyélocytes, ou en tout cas de cellules à destin myéloïde (Lanotte et al., 1991; Roussel & Lanotte, 2001).

Cette lignée, sensible à la différenciation en granulocytes induite par l'ATRA, possède deux variants NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup> qui, quant à eux, sont résistants à l'effet différenciant de cet acide rétinoïque.

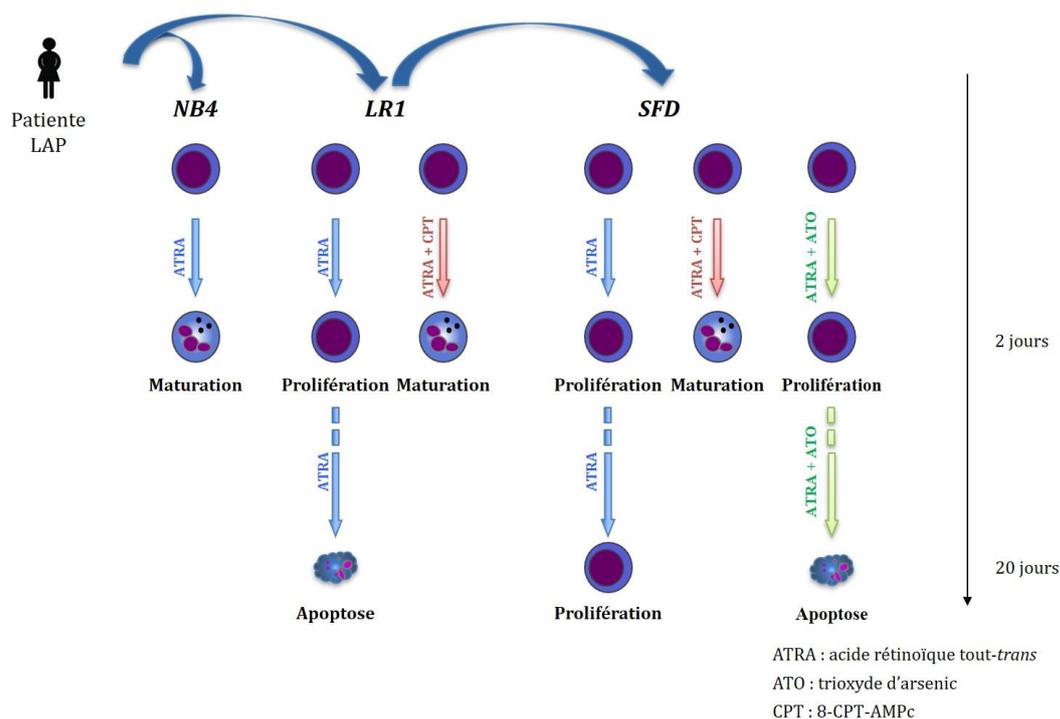
La lignée NB4-LR1, tout comme la lignée NB4, a été isolée à partir de cellules de moelle osseuse de la même patiente atteinte de leucémie aiguë promyélocytaire. Elle possède, elle aussi, la translocation t(15 ; 17) (q24.1 ; q21.2) et la protéine de fusion PML-RAR $\alpha$ . De plus, cette lignée est, elle aussi, hypotétraploïde (Duprez et al., 1992; Roussel & Lanotte, 2001). Les cellules NB4-LR1 ont été isolées des NB4 car elles résistaient à l'effet différenciant de l'ATRA (Duprez et al., 1992; Ruchaud et al., 1994).

Malgré leur insensibilité à la différenciation induite par l'ATRA, les cellules de la lignée NB4-LR1 peuvent entamer une maturation en granulocytes en combinant un analogue de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc), le 8-chlorophénylthioadénosine monophosphate cyclique (8-CPT-AMPc), à l'ATRA (Q. Liu, Nguyen, Døskeland, & Ségal-Bendirdjian, 2015; Roussel & Lanotte, 2001; Ruchaud et al., 1994). De plus, un traitement prolongé, de plus de 20 jours, avec l'acide rétinoïque tout-*trans* entraîne l'entrée en apoptose

des cellules NB4-LR1 (**figure 1**) (El Hajj et al., 2018; F. Pendino, Sahraoui, Lanotte, & Ségal-Bendirdjian, 2002).

La lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> a émergé à partir de la lignée NB4-LR1 sous traitement prolongé à l'ATRA. En effet, lors d'un traitement de longue durée, de façon peu fréquente il arrive qu'une partie des cellules NB4-LR1 résiste à la mort cellulaire induite par l'ATRA. Cette nouvelle lignée a été baptisée NB4-LR1<sup>SFD</sup> avec SFD pour « *saved from death* ». Comme les deux lignées précédentes, la NB4-LR1<sup>SFD</sup> possède la translocation t(15 ; 17) ( q24.1 ; q21.2) spécifique de la LAP et la protéine de fusion associée. Elle est également hypotétraploïde (F. Pendino et al., 2002).

Comme pour la lignée NB4-LR1, l'ajout de 8-CPT-AMPC au traitement à l'ATRA permet de restaurer la différenciation des cellules de la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> en granulocytes neutrophiles avec les premières modifications morphologiques et de marqueurs de surface dès les premiers jours de traitement (Q. Liu et al., 2015; F. Pendino et al., 2002). De plus, en traitant de façon prolongée les cellules NB4-LR1<sup>SFD</sup> avec une combinaison d'ATRA et d'ATO, les traitements appliqués dans le cas de la LAP, on observe une entrée en apoptose de ces cellules (**figure 1**) (Tarkanyi et al., 2005).



**Figure 1 : Le modèle cellulaire NB4**

Les lignées NB4 et NB4-LR1 ont été isolées à partir d'un échantillon de moelle osseuse d'une patiente atteinte de leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) en rechute. La lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> a émergé à partir de la lignée NB4-LR1 sous traitement prolongé à l'acide rétinoïque tout-trans (ATRA) en contrant la mort cellulaire induite par l'ATRA dans la NB4-LR1.

Ce modèle cellulaire est composé de trois lignées apparentées, portant toutes la translocation t(15 ; 17) ( q24.1 ; q21.2) et la protéine de fusion PML-RAR $\alpha$ . Malgré cela, elles répondent très différemment au traitement à l'ATRA, et la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> nécessite l'utilisation d'une combinaison d'ATRA et d'ATO pour arrêter sa prolifération. Ainsi, ce modèle

constitue un outil précieux pour étudier les mécanismes mis en jeu lors des traitements ATRA, ATO et leur combinaison et pouvoir ainsi étendre ces mécanismes à d'autres pathologies cancéreuses.

Comme la majorité des cancers, la leucémie aiguë promyélocytaire est sujette à des modifications de la régulation normale de l'expression de ses gènes. Ces modifications peuvent être d'ordre génétique mais aussi épigénétique comme nous allons en discuter ci-après.

## Partie 2 : La régulation de la transcription : modifications épigénétiques et organisation de la chromatine

Le génome des eucaryotes se présente sous forme de chromatine, un complexe polymère composé d'acide désoxyribonucléique – l'ADN – et de protéines liées à celui-ci – majoritairement les histones (H1, H2A, H2B, H3 et H4) mais également des facteurs de transcription ainsi que des ARN non-codants (Bertin & Mangelot, 2008; Kornberg, 1974; Schuebel, Gitik, Domschke, & Goldman, 2016). Cette chromatine est compactée et organisée de façon à former les chromosomes. Les nucléosomes constituent l'unité fondamentale de compaction de la chromatine. En effet, autour de chacun de ces octamères d'histones composés d'un tétramère (H3 - H4)<sub>2</sub> encadré par deux dimères (H2A - H2B) s'enroulent environ 147 paires de bases (bp) d'ADN comme le montre la **figure 2**. Chaque nucléosome est séparé du suivant par de l'ADN lié à l'histone H1, dit de liaison, sur une longueur allant de 10 bp à 70 bp environ (Bertin & Mangelot, 2008; Das, Tyler, & Churchill, 2010; Kornberg, 1974; Shachar & Misteli, 2017; Struhl & Segal, 2013; Turner, 2007). La chromatine existe sous deux formes distinctes : l'euchromatine, spécifique des régions codantes de l'ADN, qui correspond à une chromatine décondensée et facilitant la transcription des gènes, et l'hétérochromatine, plus condensée et bloquant la transcription. Cette hétérochromatine peut, elle aussi, être divisée en deux groupes : l'hétérochromatine constitutive, située aux extrémités des chromosomes (les télomères) ou en leur centre (les centromères) et caractérisée par des séquences répétitives et majoritairement non-codantes, et l'hétérochromatine facultative, que l'on retrouve dans les régions codantes où la transcription des gènes est bloquée (Dillon, 2004; Janssen, Colmenares, & Karpen, 2018; Mello, 1983).

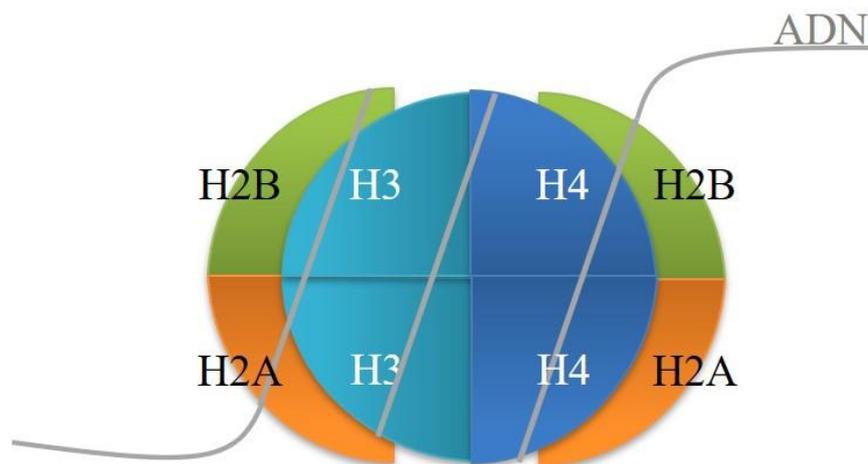


Figure 2 : Un nucléosome

Deux dimères d'histones H3 - H4 se lient puis deux dimères d'histones H2A - H2B viennent s'y associer pour former un nucléosome, autour duquel s'enroulent 147 paires de bases d'ADN.

La séquence d'ADN peut être modifiée par des mutations, des délétions, des fusions et autres altérations génétiques menant à des variations dans la régulation de l'expression des gènes. Ces modifications sont catégorisées sous le nom de génétique. Il existe également des altérations, dites épigénétiques, qui entraînent elles aussi un changement dans l'expression

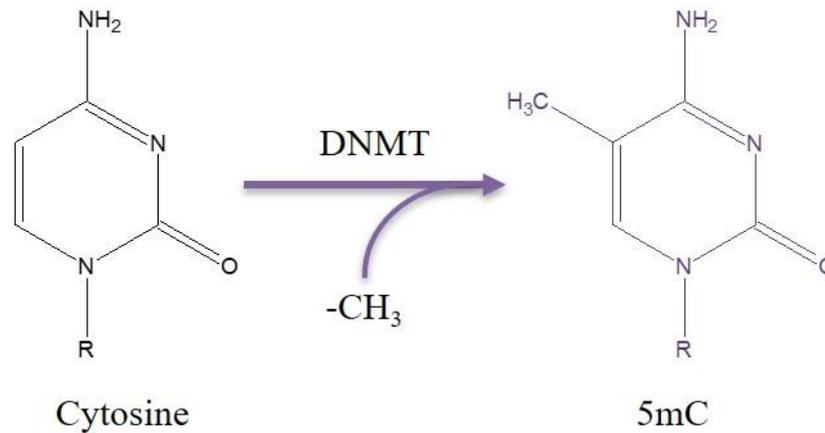
des gènes mais sans modifier la séquence ADN. On définit l'épigénétique comme suit : « un changement dans la fonction des gènes sans modification de la séquence d'ADN sous-jacente et intervenant de manière héritable et réversible » (Furuya, Ikura, & Ikura, 2019; Nicoglou & Merlin, 2017; Schuebel et al., 2016; Sims, Nishioka, & Reinberg, 2003). Bien que l'on connaisse la notion d'épigénétique depuis les années 1940 – Waddington est le premier à avoir utilisé le terme d'épigénétique en 1942 – on ne connaît pas encore toute l'étendue des actions et des effets des modifications épigénétiques sur les différents phénomènes cellulaires tels la différenciation, la tumorigenèse ou encore la régulation de l'expression des gènes (Deans & Maggert, 2015; Nicoglou & Merlin, 2017). Ces modifications peuvent jouer sur la structure de la chromatine et sur l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription et aux polymérases catalysant cette transcription (Bernstein, Meissner, & Lander, 2007; Corella & Ordovas, 2017; T. Jenuwein & Allis, 2001; Z. Wang, Schones, & Zhao, 2009).

On peut distinguer quatre types de modifications épigénétiques : la méthylation de l'ADN, le positionnement des nucléosomes, les modifications post-traductionnelles des queues des histones et l'action des ARN non-codants (Baylin & Jones, 2016; B. Huang, Jiang, & Zhang, 2014; Nebbioso, Tambaro, Dell'Aversana, & Altucci, 2018). De plus, l'organisation de la chromatine, c'est-à-dire le positionnement des chromosomes dans le noyau mais également des gènes sur les chromosomes, joue aussi un rôle dans la régulation de la transcription (Acemel, Maeso, & Gómez-Skarmeta, 2017; Dekker & Mirny, 2016; Dixon et al., 2012).

## I. La méthylation de l'ADN et le positionnement des nucléosomes

### 1. La méthylation des cytosines et ses dérivés oxydatifs

Chez les mammifères, la méthylation de l'ADN se retrouve presque exclusivement au niveau des cytosines (C) en contexte CpG, même si une méthylation dans d'autres contextes tels CpHpG ou CpHpH (avec H = A, C ou T) a été observée dans des embryons de souris à des stades précoces et quelques cellules souches embryonnaires humaines (Bernstein et al., 2007; Lister et al., 2009; Ramsahoye et al., 2000; Woodcock, Crowther, & Diver, 1987). Je ne m'intéresserai ici qu'à la méthylation en contexte CpG, qui est la plus répandue chez les mammifères. Cette méthylation consiste en l'ajout d'un groupement méthyle sur le carbone 5 de la cytosine qui devient alors une 5-méthylcytosine (5mC) (**figure 3**). On estime que la plupart des dinucléotides CpG du génome humain adulte est méthylée, notamment dans les régions non-codantes (Jones, 2012; Laisné, Gupta, Kirsh, Pradhan, & Defossez, 2018; Yin et al., 2017).



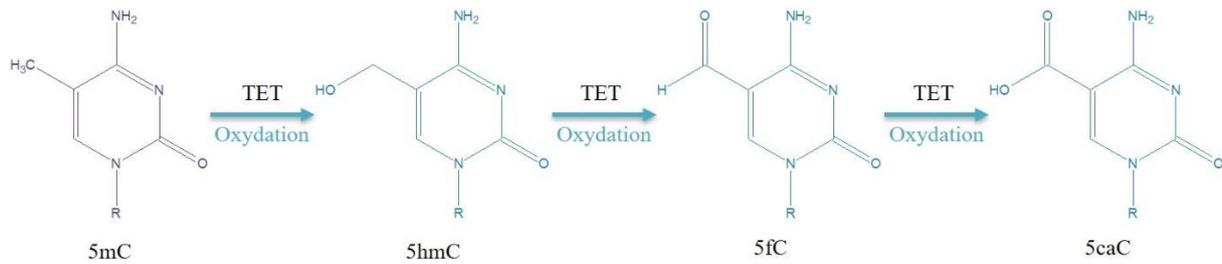
**Figure 3 : Méthylation d'une cytosine**

La cytosine est méthylée par ajout d'un groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>) sur le carbone en position 5 de son cycle pyrimidique. Cet ajout est effectué par une méthyltransférase de l'ADN (DNMT). La cytosine devient alors une 5-méthylcytosine (5mC).

Bien que le nombre total de dinucléotides CpG dans le génome humain soit restreint, il existe des régions riches en CpG, nommées îlots CpG. Ces îlots sont présents dans les promoteurs de 60 % des gènes, mais également dans d'autres régions du génome non caractérisées (Bernstein et al., 2007; Sarda & Hannenhalli, 2018). Ces îlots CpG sont rarement méthylés, notamment ceux présents dans les régions promotrices (Jones, 2012). En effet, la méthylation de ces sites est souvent corrélée à une répression de leurs gènes. Cette répression peut s'effectuer de façon directe, en empêchant la fixation de facteurs de transcription sensibles à la méthylation, ou de façon indirecte en promouvant le recrutement de protéines remodelant la chromatine qui agiront ensuite sur celle-ci pour lui donner une conformation répressive (Irvine, Lin, & Hsieh, 2002; Schuebel et al., 2016; Vaissière, Sawan, & Herceg, 2008).

Contrairement à celle présente dans leurs régions promotrices, la méthylation dans les régions codantes des gènes est le plus souvent associée à une transcription active. Il a d'ailleurs été proposé que la méthylation réprime l'initiation de la transcription mais favorise la phase d'élongation. De plus, cette modification épigénétique est très localisée et n'exerce une influence qu'au niveau du site de méthylation sans s'étendre aux régions adjacentes (Irvine et al., 2002; B. Jin et al., 2012; Jones, 2012).

Il existe des dérivés oxydatifs de la 5mC obtenus par oxydation de cette dernière par les enzymes « *ten-eleven translocation* » (TET) de la famille des dioxygénases dépendantes du 2-oxoglutarate (2-OGDD) (Ito et al., 2011; Koivunen & Laukka, 2018). Ces dérivés sont au nombre de trois et sont, par degré d'oxydation croissant : la 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), la 5-formylcytosine (5fC) et la 5-carboxylcytosine (5caC) (figure 4) (Ito et al., 2011; Koivunen & Laukka, 2018; Schübeler, 2015).



**Figure 4 : Les dérivés oxydatifs de la 5-méthylcytosine**

La 5mC peut être oxydée en trois dérivés oxydatifs par les enzymes de la famille « ten-eleven translocation » (TET). Par degré d'oxydation croissant, ces dérivés sont : la 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC), la 5-formylcytosine (5fC) et la 5-carboxylcytosine (5caC).

Les rôles dans la cellule de ces dérivés oxydatifs sont encore méconnus mais plusieurs études suggèrent qu'ils sont des intermédiaires lors de la déméthylation des cytosines de l'ADN (Ito et al., 2011; L. Li, Gao, Wu, Cheng, & Yip, 2019; Schübeler, 2015). La 5hmC est enrichie dans les régions activatrices et les régions codantes des gènes, supposant ainsi un rôle dans la transcription (Pastor et al., 2011; Stroud, Feng, Morey Kinney, Pradhan, & Jacobsen, 2011). Ce dérivé de cytosine a été corrélé à une répression de la transcription lorsqu'il est situé aux alentours du site d'initiation de la transcription des gènes (L. Li et al., 2019). Dans les neurones, il a été montré que la 5hmC est corrélée à l'activation de la transcription (Klungland & Robertson, 2017; Perera et al., 2015). Contrairement aux deux autres dérivés oxydatifs des 5mC, les hydroxyméthylcytosines sont une modification stable de la cytosine (Klungland & Robertson, 2017). Ces dérivés oxydatifs ont été trouvés dans tous types de cellules humaines, en particulier dans les cellules embryonnaires et les cellules des différents tissus cérébraux, et leur quantité semble augmenter avec l'âge (Ito et al., 2011; Spruijt et al., 2013; Wagner et al., 2015).

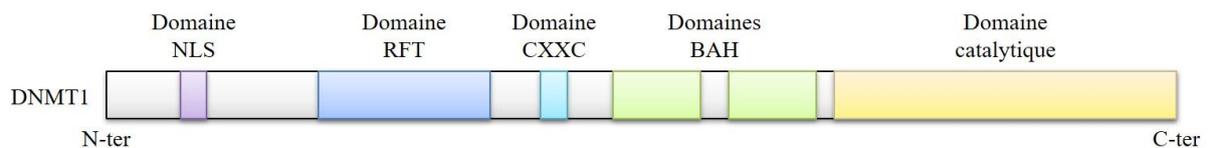
## 2. Les enzymes catalysant la méthylation et la déméthylation

Les enzymes catalysant la méthylation des cytosines sont des méthyltransférases de l'ADN (DNMT) et sont au nombre de quatre : DNMT1, DNMT3a, DNMT3b et DNMT3L (Laisné et al., 2018; Lyko, 2018; W. Zhang & Xu, 2017). Il existe également une cinquième enzyme appartenant à cette famille, DNMT2, mais celle-ci méthyle préférentiellement l'ARN, et ne sera donc pas décrite plus en détails ici (Jeltsch et al., 2017; Kaiser et al., 2017). DNMT1, DNMT3a et DNMT3b présentent une structure commune avec un domaine régulateur en position amino-terminale leur permettant de reconnaître l'ADN et un site catalytique positionné en extrémité carboxy-terminale. DNMT3L est un peu différente des trois premières enzymes puisqu'elle ne possède pas de site catalytique fonctionnel. DNMT1, DNMT3a et DNMT3b méthylent l'ADN en transférant un groupement méthyle (-CH<sub>3</sub>) d'un donneur de -CH<sub>3</sub>, la S-adénosyl-méthionine (SAM), sur la cytosine cible en contexte CpG. Les groupements CpG étant symétriques sur les deux brins de l'ADN, il a été observé une symétrie de la méthylation sur ceux-ci (T. Chen & Li, 2004; Lyko, 2018; W. Zhang & Xu, 2017).

## i. DNMT1, une méthyltransférase « de maintenance »

DNMT1 est considérée comme une méthyltransférase « de maintenance » du fait de sa préférence pour l'ADN hémi-méthylé. Elle est très abondante au niveau des fourches de réplication de l'ADN, où elle se fixe sur l'ADN en cours de réplication et reproduit le schéma de méthylation de l'ADN parent sur le brin néoformé. DNMT1 se retrouve de façon ubiquitaire dans les cellules somatiques embryonnaires et adultes et est principalement exprimée dans les cellules en prolifération, notamment lors de la phase S de réplication (T. Chen & Li, 2004; Jones & Liang, 2009; Lyko, 2018). De plus, il a été proposé que DNMT1 est capable d'exercer une fonction de correction de ses erreurs puisqu'elle peut méthyler l'ADN même bien après le passage de la fourche de réplication (Jones & Liang, 2009).

L'extrémité N-terminale de DNMT1 contient plusieurs domaines essentiels à son activité de méthyltransférase de l'ADN : un domaine NLS permettant sa localisation dans le noyau, un domaine de ciblage des fourches de réplication (RFT), un domaine de liaison en doigt de zinc riche en cystéines (CXXC) permettant à l'enzyme de se lier à de l'ADN non méthylé, et deux domaines d'homologie adjacents à bromo (BAH) dont le rôle est encore méconnu mais qui semblent intervenir dans les interactions protéine – protéine (**figure 5**) (T. Chen & Li, 2004; Lyko, 2018).



**Figure 5 : Structure de DNMT1 (d'après T. Chen & Li, 2004; Lyko, 2018)**

La méthyltransférase d'ADN 1 (DNMT1) est composée de cinq domaines différents permettant son bon fonctionnement. Dans la région N-terminale (N-ter) se trouvent les domaines de localisation dans le noyau (NLS), de ciblage des fourches de réplication (RFT) ainsi qu'un domaine riche en cystéines (CXXC). En amont du domaine catalytique, situé en position C-terminale (C-ter) se trouvent deux domaines d'homologie adjacents à bromo (BAH).

## ii. Les méthyltransférases « de novo », DNMT3a et DNMT3b

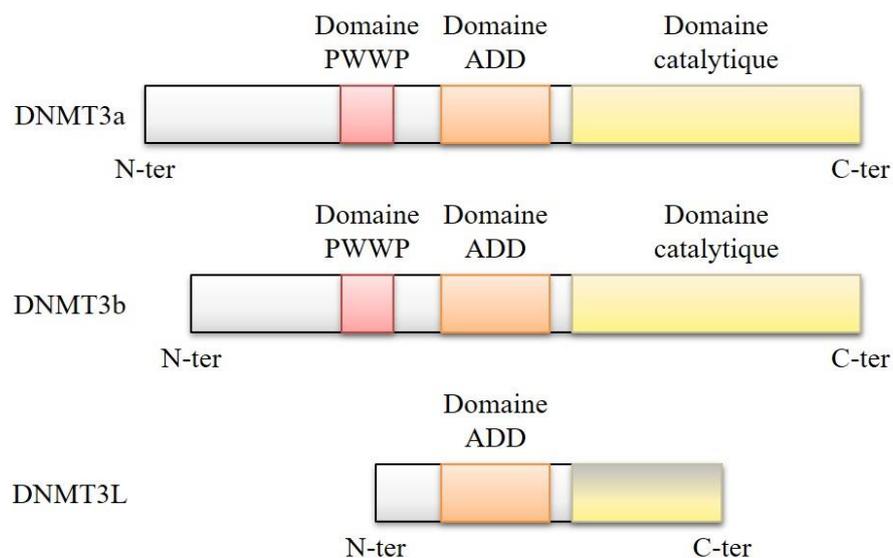
DNMT3a et DNMT3b, couramment appelées « enzymes *de novo* » à cause de leur capacité à créer des sites méthylés sans nécessité d'un ADN hémi-méthylé, sont particulièrement abondantes dans les cellules embryonnaires et les cellules germinales en développement. Plusieurs études ont proposé qu'elles possèdent également un rôle dans l'entretien de la méthylation, notamment en méthylant des sites que DNMT1 aurait « oubliés » (Jones & Liang, 2009; Lyko, 2018). Leur expression est fortement diminuée dans les cellules somatiques après la naissance. Bien qu'elles soient codées par le même gène, *DNMT3*, ces enzymes présentent quelques variations dans leur structure et leur fonction (T. Chen & Li, 2004; Lyko, 2018; W. Zhang & Xu, 2017).

La région N-terminale des deux enzymes contient un motif proline – tryptophane – tryptophane – proline (PWWP), et un domaine riche en cystéines noté domaine ATRX – DNMT3 – DNMT3L (ADD) car il est conservé entre ces trois protéines (**figure 6**). Le domaine PWWP permet l'interaction de DNMT3a et DNMT3b avec des méthyltransférases

de lysines d’histone (HKMT) et le domaine ADD permet l’interaction des DNMT3 avec des répresseurs transcriptionnels, dont une désacétylase d’histone (T. Chen & Li, 2004; Lyko, 2018).

DNMT3a est plus abondante en fin de développement embryonnaire et à la naissance où elle méthyle un petit nombre de gènes pour déterminer les profils de méthylation spécifiques des tissus. Il a également été trouvé un rôle d’entretien pour cette enzyme. DNMT3b, quant à elle, est principalement exprimée au début de la phase embryonnaire où elle met en place les profils de méthylation d’une grande partie du génome (W. Zhang & Xu, 2017).

Contrairement aux trois enzymes précédentes, DNMT3L ne possède pas de site catalytique complet et donc pas d’activité de méthyltransférase. Elle possède cependant un domaine ADD similaire aux deux autres DNMT3 mais ne contient pas le domaine PWWP (**figure 6**). Elle est essentielle pour une bonne méthylation de l’ADN. En effet, bien qu’incapable de se lier à l’ADN, elle interagit directement avec DNMT3a et DNMT3b pour améliorer leur activité méthyltransférase. Notamment, il a été montré qu’elle forme un hétérotétramère avec DNMT3a et entraîne ainsi un changement de conformation de cette dernière, facilitant son activité méthyltransférase (Lyko, 2018; Suetake, Shinozaki, Miyagawa, Takeshima, & Tajima, 2004; W. Zhang & Xu, 2017).



**Figure 6 : Structures des DNMT3 (d’après T. Chen & Li, 2004; Lyko, 2018)**

Les enzymes DNMT3a et DNMT3b possèdent les mêmes domaines mais la seconde est un peu plus courte que la première. Le domaine le plus proche de l’extrémité N-terminale est un motif proline – tryptophane – tryptophane – proline (PWWP). Il est suivi d’un domaine ATRX – DNMT3 – DNMT3L (ADD) puis du domaine catalytique. L’enzyme DNMT3L n’a en commun avec les deux précédentes que le domaine ADD. De plus, son domaine catalytique est tronqué et non fonctionnel.

#### iv. La déméthylation de l'ADN

Il n'existe pas, à proprement parler, de méthylases de l'ADN mais la déméthylation des cytosines est tout de même observée chez les mammifères. Il existe une déméthylation passive, qui consiste en un remplacement de la cytosine méthylée par une cytosine non modifiée lors de la réplication de l'ADN et qui est intimement liée à une absence d'entretien de la méthylation par les DNMT, et une déméthylation active, qui peut se faire grâce à des enzymes particulières, des dioxygénases (He et al., 2011; Koivunen & Laukka, 2018; Wu & Zhang, 2017). Une étude a également émis l'hypothèse que les DNMT seraient capables de déméthylar l'ADN en absence de SAM (van der Wijst et al., 2015).

La famille d'enzymes TET, composée de trois membres : TET1, TET2 et TET3, intervient dans la déméthylation active des cytosines en les oxydant en hydroxyméthylcytosines puis en formylcytosines et enfin en carboxylcytosines. Une fois ce stade d'oxydation atteint, les 5caC peuvent être transformées en cytosines non modifiées par excision de la 5caC par la glycosylase de thymine d'ADN (TDG), ce qui crée un site de cassure alors réparé par une enzyme de réparation par excision de bases (BER) par l'ajout d'une cytosine non modifiée. Ce processus peut également avoir lieu au niveau des 5fC mais plus rarement (figure 7) (Bochtler, Kolano, & Xu, 2017; He et al., 2011; Koivunen & Laukka, 2018; Wu & Zhang, 2017).

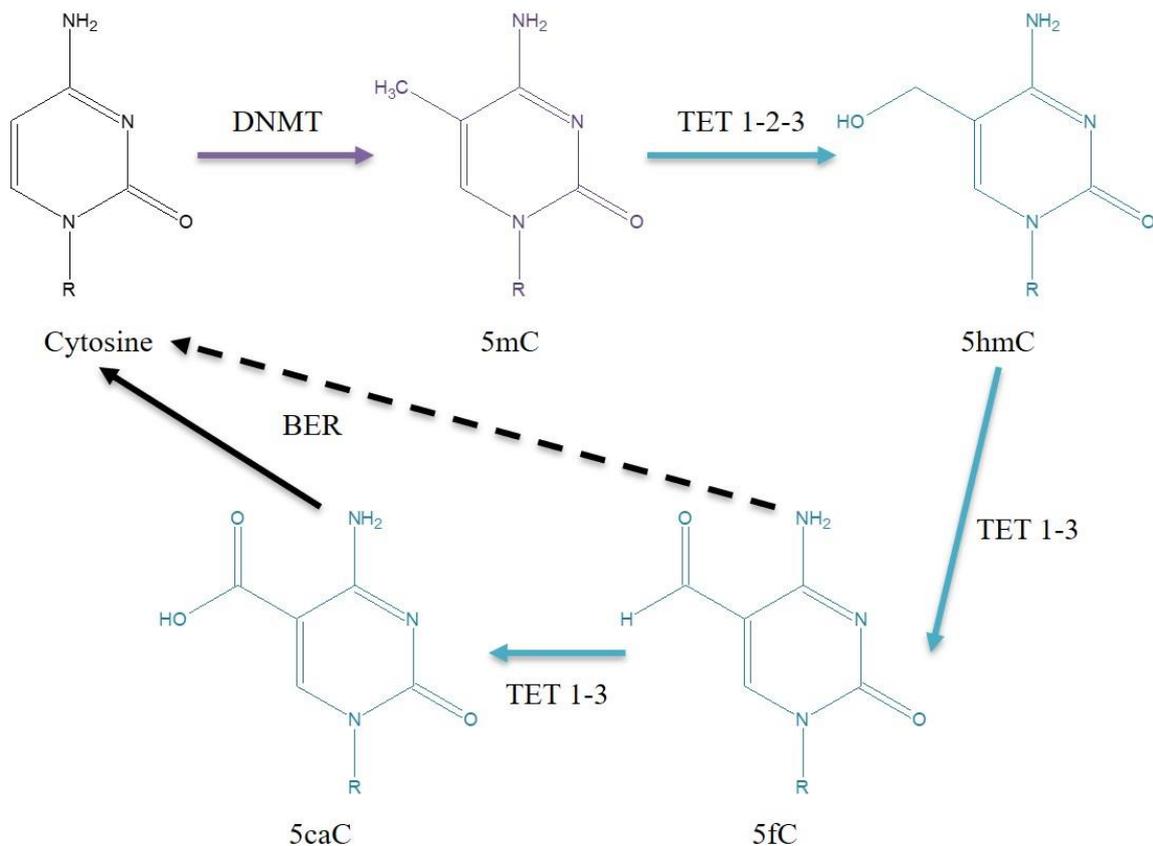


Figure 7 : Les modifications des cytosines (figure adaptée de Klungland & Robertson, 2017)

La cytosine peut être méthyliée par les DNMT, puis oxydée par les enzymes de la famille TET. Le retour à une cytosine non modifiée se fait par le processus de réparation par excision de base (BER) au niveau des 5caC et, rarement, des 5fC.

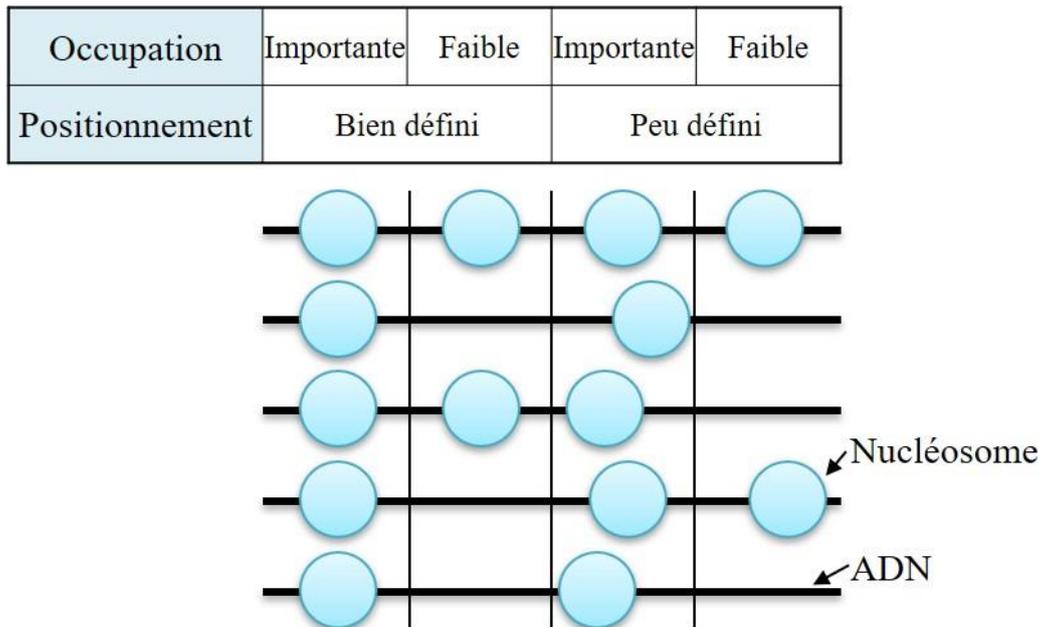
Les trois membres de la famille TET possèdent en position C-terminale un site catalytique commun constitué d'un domaine en hélice  $\beta$  double brin (DSBH) et d'une région riche en cystéines. Le domaine DSBH est celui permettant la liaison et l'oxydation des cytosines et la région riche en cystéines possède un rôle de stabilisation de l'enzyme lors de la réaction d'oxydation. L'extrémité N-terminale des enzymes TET1 et TET3 est similaire, avec un domaine de liaison à l'ADN CXXC, mais ce domaine est absent de TET2 (Koivunen & Laukka, 2018; Wu & Zhang, 2017). Cette particularité semble jouer un rôle dans sa préférence de substrat, les 5mC, tandis que les autres TET sont capables d'oxyder les cytosines méthylées comme les 5hmC et les 5fC (Ito et al., 2011; Wu & Zhang, 2017).

La méthylation et la déméthylation de l'ADN jouent un rôle dans la transcription des gènes en permettant de la réguler de façon ciblée. Comme évoqué précédemment, la méthylation peut avoir deux effets sur cette transcription : un effet direct en empêchant ou favorisant la liaison de certains facteurs de transcription, et un effet indirect en promouvant le recrutement de protéines remodelant la chromatine, et en particulier les nucléosomes.

### 3. L'assemblage et le positionnement des nucléosomes

Les nucléosomes formant l'unité de base de la compaction de la chromatine, il semble évident qu'ils doivent être particulièrement mobiles pour permettre la décondensation et la compaction de la chromatine selon les besoins de la cellule et son état, mais également stables pour maintenir le niveau de compaction exigé. Le positionnement des nucléosomes traduit l'accessibilité, ou plutôt l'inaccessibilité, de l'ADN enroulé autour d'eux. En effet, la plupart des facteurs de transcription et autres protéines se liant à l'ADN ne peuvent pas accéder à celui-ci s'il est protégé par un nucléosome (De Koning, Corpet, Haber, & Almouzni, 2007; Gunjan, Paik, & Verreault, 2005; B. Li, Carey, & Workman, 2007; Lövkvist, Sneppen, & Haerter, 2017).

Les histones étant particulièrement riches en acides aminés chargés positivement, notamment les résidus lysine et arginine, ils sont capables de se fixer sur l'ADN, chargé négativement, avec une forte affinité (Bertin & Mangelot, 2008). On peut alors distinguer les notions de positionnement des nucléosomes, faisant référence à leur position précise sur un locus donné et pouvant être bien ou peu défini, et d'occupation par les nucléosomes, définissant pour une population donnée, à un instant donné, le pourcentage de nucléosomes positionnés à un endroit précis, et qui peut être caractérisé d'important ou faible (**figure 8**) (Lai & Pugh, 2017; Struhl & Segal, 2013). La répartition des nucléosomes sur le génome est dépendante de plusieurs aspects : l'état de la chromatine, la séquence d'ADN sous-jacente, l'état de méthylation de l'ADN et les facteurs remodelant la chromatine (Lay et al., 2015; Pandiyan et al., 2013).



**Figure 8 : Exemple de positionnement et d'occupation par les nucléosomes (adapté de Lai & Pugh, 2017)**  
 La figure présente différents motifs d'occupation et de positionnement par les nucléosomes sur une population de cellules lambda. Chaque ligne correspond au motif pour une cellule. Ici sont ainsi représentés les motifs hypothétiques de cinq cellules différentes. Le tableau supérieur définit le degré d'occupation par les nucléosomes ainsi que leur positionnement sur des régions précises de l'ADN (notées par les traits verticaux).

### i. L'influence de la chromatine sur le positionnement des nucléosomes

Il a été observé que les nucléosomes sont nombreux, rapprochés et fixes dans les régions d'hétérochromatine et les régions peu actives alors qu'ils sont plus éparés et plus mobiles dans les régions les plus transcrites (Dillon, 2004; Hesson et al., 2014; Struhl & Segal, 2013). La polymérase ARN II (ARNpol II), responsable de la transcription de la plupart des gènes, ne peut initier la transcription que lorsque le site d'initiation de la transcription (SIT) des gènes est déplété en nucléosomes, lui permettant alors de se fixer à l'ADN. Il a ainsi été observé que les SIT des gènes transcrits possèdent une région déplétée en nucléosomes (RDN) alors que les gènes réprimés voient leur SIT masqué par un nucléosome (Han et al., 2011; Lai & Pugh, 2017; Lövkvist et al., 2017). Une fois la transcription initiée, il est nécessaire de déplacer les nucléosomes présents tout au long du gène pour la phase d'élongation et les replacer après le passage de la fourche de réplication afin d'éviter la fixation de facteurs qui ne devraient pas être présents. Ces déplacements, désassemblages et réassemblages sont guidés et réalisés par les chaperons d'histones, des protéines spécialisées dans le traitement des histones, et par des facteurs remodelant la chromatine (Das et al., 2010; De Koning et al., 2007; Lai & Pugh, 2017; Lorch, LaPointe, & Kornberg, 1987; Tyagi, Imam, Verma, & Patel, 2016).

Les facteurs remodelant la chromatine sont des complexes protéiques dépendant de l'ATP. En effet, ils utilisent l'énergie dégagée par l'hydrolyse de l'ATP pour déstabiliser les liaisons entre les histones et l'ADN et ainsi permettre le déplacement ou le désassemblage des nucléosomes (Lai & Pugh, 2017; Struhl & Segal, 2013; Tyagi et al., 2016). Ces facteurs appartiennent à quatre familles de protéines : la famille « *switch/sucrose-non-fermenting* »

(SWI/SNF), la famille « *imitation switch* » (ISWI), la famille « *chromodomain-helicase-DNA binding* » (CHD) et la famille « *inositol requiring 80* » (INO80). Les membres de ces quatre familles possèdent un domaine ATPase de la famille de SNF2. Cependant, chacune possède un domaine exclusif, adjacent au domaine catalytique ATPase, qui permet de définir leur famille d'appartenance. Ces remodeleurs de chromatine ont des rôles variés dans la régulation de la transcription. Les membres de la famille SWI/SNF ont été majoritairement corrélés à une régulation de la transcription avec un rôle dans l'ouverture et la fermeture de la chromatine aussi bien dans les régions promotrices que dans les corps des gènes. Ces deux rôles dépendraient des conditions physiologiques, comme le stress par exemple. Les membres de la famille ISWI ont un rôle majeur dans l'espacement des nucléosomes et facilitent l'assemblage de nouveaux nucléosomes, promouvant ainsi la répression des gènes en diminuant l'accessibilité. Les membres de la famille INO80 sont les seuls à pouvoir se lier directement aux fourches de réplication et favorisent le désassemblage des nucléosomes juste en amont de celle-ci pour assurer une bonne réplication de l'ADN. Ils ont également un rôle dans la transcription en favorisant le remplacement des histones H2A des nucléosomes par leur variant H2AZ (Bertin & Mangelot, 2008; Lai & Pugh, 2017; Naftelberg, Schor, Ast, & Kornblihtt, 2015; Tyagi et al., 2016). Il a été démontré que les nucléosomes comprenant le variant d'histone H2AZ au lieu de l'histone H2A sont antagonistes de la méthylation de l'ADN et se trouvent sur des régions non méthylées (P. Chen et al., 2013; Edwards et al., 2010; Zemach, McDaniel, Silva, & Zilberman, 2010; Zilberman, Coleman-Derr, Ballinger, & Henikoff, 2008). Enfin, les membres de la famille CHD ont été associés à des désacétylations d'histones au niveau des régions promotrices, modifications associées à la répression des gènes comme nous le verrons un peu plus loin. Ces membres présentent également un rôle antagoniste au premier puisqu'ils sont associés à une activation de la transcription par un remodelage de la chromatine au niveau des régions activatrices ou « *enhancer* » (Bertin & Mangelot, 2008; Lai & Pugh, 2017; Naftelberg et al., 2015; Tyagi et al., 2016).

En plus des facteurs remodelant la chromatine, un facteur de transcription particulier, le facteur de liaison CCCTC (CTCF), est connu pour influencer le positionnement des nucléosomes. Tout comme les nucléosomes sont déplétés au niveau des régions promotrices des gènes actifs, plusieurs études ont montré qu'ils sont également absents des régions régulatrices activatrices et des régions où CTCF est fixé (Collings & Anderson, 2017; Oomen, Hansen, Liu, Darzacq, & Dekker, 2019; Taberlay, Statham, Kelly, Clark, & Jones, 2014). Une étude très récente a montré que les sites liés par CTCF sont encadrés par des nucléosomes et qu'une fois le facteur de transcription détaché, les nucléosomes sont déplacés pour rendre cette région inaccessible (Oomen et al., 2019).

## ii. Influence de la séquence d'ADN sur le positionnement des nucléosomes

La séquence d'ADN joue également un rôle dans le positionnement des nucléosomes car, d'un point de vue physique, pour pouvoir s'enrouler autour des nucléosomes, l'ADN doit être souple. Cette souplesse est obtenue par les motifs de paires de bases qui composent l'ADN. En effet, les liaisons adénine-thymine (A-T) étant moins fortes que les liaisons cytosine-guanine (C-G), les séquences riches en A et en T se plient plus facilement pour s'enrouler

autour du nucléosome. Les nucléosomes sont alors préférentiellement positionnés de telle sorte que les histones soient au contact de ces séquences et que les autres régions, plus pauvres en A et en T, soient orientées vers l'extérieur du nucléosome (Lai & Pugh, 2017; Struhl & Segal, 2013).

L'état de méthylation de l'ADN est également lié au positionnement des nucléosomes. En effet, plusieurs études ont montré que ces deux phénomènes s'influencent mutuellement (Chodavarapu et al., 2010; Han et al., 2011; Huff & Zilberman, 2014; Kelly et al., 2012; Lay et al., 2015; Schrader, Gross, Thalhammer, & Längst, 2015). Cette relation est encore sujette à débat, différentes études montrant que les nucléosomes se forment de façon préférentielle sur de l'ADN méthylé et d'autres affirmant qu'il s'agit de l'inverse, mais tout le monde s'accorde sur le fait qu'elle existe. Une occupation importante par les nucléosomes est corrélée à la répression d'un gène, notamment si ces nucléosomes sont situés au niveau du site d'initiation de la transcription des gènes. De même, une hyperméthylation de cette région est généralement corrélée à une répression. Des études soutiennent l'hypothèse que le positionnement des nucléosomes précède la méthylation de la zone concernée (Hesson et al., 2014; Kelly et al., 2012; Lay et al., 2015; Schrader et al., 2015). Une étude plus récente propose que la densité des sites CpG méthylables constitue le point clef dans la détermination du degré de méthylation de la région étudiée et que le positionnement des nucléosomes n'intervient que peu sur cet état de méthylation (Lövkvist et al., 2017). La question de la relation entre ces deux marques épigénétiques reste donc ouverte.

Ces différentes observations sur la méthylation de l'ADN et le positionnement des nucléosomes sont valables pour les cellules normales. Plusieurs altérations de ces deux marques ont été décrites dans les cancers. Différentes études ont émis l'hypothèse que ces modifications sont une conséquence des cancers, qui sont favorisés par l'accumulation de mutations (Baylin & Jones, 2016; Kumar, Nilednu, Kumar, & Sharma, 2017). D'autres études supportent l'idée que les modifications épigénétiques peuvent contribuer à la mise en place des cancers, en l'absence de mutations (Baylin & Jones, 2016; Dawson, 2017; Flavahan, Gaskell, & Bernstein, 2017). D'autres enfin mettent en avant une coopération entre ces deux mécanismes de régulation (Jones & Baylin, 2007; Mulero-Navarro & Esteller, 2008; Nebbioso et al., 2018).

## 4. Les altérations de la méthylation et des nucléosomes dans les cancers

### i. La méthylation de l'ADN et le positionnement des nucléosomes dans les cancers

Une altération de la méthylation de l'ADN est impliquée dans la tumorigenèse. En effet, il a été observé que les cellules tumorales présentent, contrairement aux cellules normales, une hypométhylation globale de la chromatine ainsi qu'une hyperméthylation de certains îlots CpG situés dans les régions promotrices. L'hypométhylation globale de l'ADN pourrait contribuer à l'instabilité génomique et contribuer à la réactivation de gènes normalement réprimés, favorisant ainsi la tumorigenèse. L'hyperméthylation touche de façon préférentielle

les gènes suppresseurs de tumeur, réprimant ainsi leur transcription et favorisant le développement des cellules cancéreuses. Il est cependant à noter que cette hyperméthylation pourrait aussi favoriser la transcription de certains gènes si elle se situe dans leur corps de gène (Baylin & Jones, 2016; Biswas & Rao, 2017; Di Croce et al., 2002; Herman & Baylin, 2003; Mulero-Navarro & Esteller, 2008). Cette altération de la méthylation physiologique est due à une dérégulation des DNMT et des enzymes TET. Plusieurs études ont montré que ces enzymes étaient couramment mutées ou réprimées de façon épigénétique dans de nombreux cancers, dont les leucémies myéloïdes (Baylin & Jones, 2016; Furuya et al., 2019). De plus, l'hypothèse a été émise que certains oncogènes, comme la protéine de fusion PML-RAR $\alpha$  dans le cas de la LAP par exemple, seraient capables de recruter des DNMT pour hyperméthyliser certains gènes suppresseurs de tumeur et favoriser le développement des tumeurs (Di Croce et al., 2002).

Plus récemment, une altération dans le positionnement des nucléosomes dans les cellules tumorales a été observée. Par exemple, il a été observé que, dans des modèles de cancers du sein, le positionnement des nucléosomes est modifié et certains sont déplacés sur des régions régulatrices, en association avec une hyperméthylation de ces régions, entraînant ainsi une répression des gènes régulés par ces régions (Taberlay et al., 2014). Dans de nombreux cancers sont inactivées les enzymes remodelant la chromatine, perturbant ainsi la bonne dynamique des nucléosomes et la gestion de la compaction et de la décondensation de la chromatine. Par exemple, les enzymes SWI/SNF sont mutées dans de nombreux cancers (Dawson, 2017; Nebbioso et al., 2018; Tyagi et al., 2016). Plusieurs études ont également montré que l'altération du positionnement des nucléosomes serait une étape précoce dans l'extinction de certains gènes lors de la tumorigenèse et que la méthylation interviendrait après pour stabiliser cet état réprimé (Hesson et al., 2014; You et al., 2011).

## ii. Les molécules ciblant la méthylation de l'ADN

Il existe des molécules ciblant certaines modifications épigénétiques, ou plus précisément les enzymes responsables de leur mise en place ou de leur lecture. Ces molécules sont nommées des épidroques (Mai & Altucci, 2009; Mazzone, Zwergel, Mai, & Valente, 2017). Celles ciblant la méthylation de l'ADN, et donc les DNMT, se divisent en deux catégories : les analogues de nucléosides, comme la 5-aza-2'-désoxycytidine (5-aza-dC ou décitabine) ou encore la 5-azacytidine (5-aza), qui s'incorporent directement dans l'ADN et séquestrent les DNMT, qui ne peuvent alors plus exercer leur fonction de méthyltransférases, entraînant ainsi la déméthylation de l'ADN au fur et à mesure des divisions cellulaires ; et les molécules qui ne sont pas des analogues de nucléosides, comme la procainamide ou le genistein, qui se fixent sur le site catalytique des DNMT et empêchent ainsi leur action (Agrawal, Das, Vyas, & Hajdúch, 2018; Erdmann, Halby, Fahy, & Arimondo, 2015; Mulero-Navarro & Esteller, 2008). Les analogues de nucléosides sont déjà utilisés dans des leucémies mais elles présentent une toxicité élevée du fait de leur incorporation dans l'ADN et de leur instabilité dans les milieux liquides. Les deux types de molécules présentent également peu de spécificité, à l'exception des molécules non-analogues les plus récentes (Agrawal et al., 2018; Dawson, 2017; Erdmann et al., 2015; Jones, Issa, & Baylin, 2016; Mulero-Navarro & Esteller, 2008).

Il est à noter que le mécanisme d'action de ces deux types de molécules est encore méconnu et, au-delà de leur effet déméthylant, peu de choses sont sues sur leurs autres actions. De plus, leur utilisation pour leurs propriétés antitumorales ne se limite pour l'instant qu'aux leucémies puisqu'elles n'ont pas encore pu être appliquées dans le traitement de tumeurs solides (Dawson, 2017; Erdmann et al., 2015; Herman & Baylin, 2003; Jones et al., 2016, 2016; Mulero-Navarro & Esteller, 2008). Plusieurs études ont montré que la déméthylation passive engendrée par l'action de la décitabine est également associée à un nouvel assemblage des nucléosomes sur certains gènes réexprimés ou réprimés dans les cellules tumorales. Ce réassemblage entraîne ainsi leur répression ou leur réactivation selon le positionnement initial des nucléosomes sur ces gènes (Hesson et al., 2013; Yang et al., 2012).

## 5. Étude de la méthylation de l'ADN et du positionnement des nucléosomes

Afin d'analyser l'implication de ces marques épigénétiques dans la régulation de l'expression des gènes et leur évolution lors de phénomènes cellulaires tels que la différenciation ou la tumorigenèse, plusieurs techniques ont été mises au point.

### i. Étude de la méthylation de l'ADN

La technique la plus robuste pour quantifier la méthylation de l'ADN est le séquençage bisulfite (BS). Cette technique peut être utilisée sur l'ensemble du génome (WGBS) mais cela peut amener à des pertes d'ADN (Stephen J. Clark, Lee, Smallwood, Kelsey, & Reik, 2016; Kelsey, Stegle, & Reik, 2017; Lister et al., 2009; Mallona, Díez-Villanueva, & Peinado, 2014; Schwartzman & Tanay, 2015). Le BS consiste en un traitement chimique au bisulfite de l'ADN, qui convertit en uracile (U) les cytosines non méthylées ainsi que les 5fC et 5caC. Les 5mC et 5hmC, quant à elles, ne sont pas affectées par le traitement et ne sont ainsi pas converties. Au cours du séquençage, les bases converties en uraciles sont lues comme des thymines, les cytosines non méthylées ainsi que les 5fC et les 5caC, épargnées par la conversion, sont lues comme des cytosines. Un alignement avec une séquence de référence précisant les sites CpG potentiellement méthylables permet de déterminer l'état de méthylation de l'ADN. Il est cependant impossible avec cette technique de distinguer les cytosines méthylées des cytosines hydroxyméthylées et les cytosines non modifiées de leurs autres dérivés oxydatifs (Schwartzman & Tanay, 2015; Wen & Tang, 2018).

Plusieurs techniques dérivées du séquençage bisulfite ont été mises au point pour analyser la méthylation de l'ADN. L'une d'entre elles est la « *methylation-specific polymerase chain reaction* » (MSP ou MS-PCR). Cette méthode ne permet cependant pas de voir au nucléotide près les cytosines méthylées mais seulement de déterminer si une région d'intérêt est complètement méthylée, partiellement méthylée ou déméthylée (Lizardi, Yan, & Wajapeyee, 2017). Le « *reduced representation bisulfite sequencing* » (RRBS), quant à lui, consiste à fragmenter l'ADN par digestion par l'enzyme de restriction MspI, insensible à l'état de méthylation de l'ADN, avant de réaliser la conversion au bisulfite puis le séquençage. Ceci permet d'obtenir des résultats précis de méthylation sur des régions de tailles variables du génome. En effet, les dinucléotides CpG étant distribués sur l'ensemble de l'ADN, chaque

fragment, quelle que soit sa taille, en possède au moins un. Ce point constitue cependant un désavantage pour cette technique car il est difficile de déterminer de façon précise les fragments obtenus après digestion (Schwartzman & Tanay, 2015; Wen & Tang, 2018). Une autre méthode d'analyse de la méthylation de l'ADN adaptée du séquençage bisulfite est le « *post-bisulfite adaptor tagging* » (PBAT). Celle-ci consiste à faire une conversion au bisulfite puis à réaliser une ligation de l'ADN modifié avec des adaptateurs. Il s'agit ainsi de réaliser un WGBS en inversant l'ordre des étapes de ligation et de conversion. Deux problèmes du PBAT sont d'entraîner une amplification préférentielle de certains sites par rapport à d'autres et de ne marquer avec les adaptateurs que les régions méthylées (ou non méthylées), menant ainsi à des erreurs ou une absence de données dans les profils de méthylation de l'ADN. Plusieurs méthodes ont été dérivées du PBAT en ajoutant des étapes de tri par « *fluorescence-activated cell sorting* » (FACS) ou encore de combinaison d'adaptateurs (Miura, Enomoto, Dairiki, & Ito, 2012; Schwartzman & Tanay, 2015; Wen & Tang, 2018). Tout comme le séquençage bisulfite simple, ces méthodes ne permettent pas de discriminer les différents dérivés de cytosines.

Il existe d'autres méthodes permettant l'analyse des profils de méthylation de l'ADN et ne se basant pas sur le séquençage bisulfite. Par exemple, l'utilisation d'enzymes de restriction sensibles à la méthylation permet de fragmenter l'ADN au niveau de ses sites méthylés puis, après amplification par PCR et séquençage, de déterminer les régions concernées du génome. Cependant, cette méthode dépend beaucoup du degré de méthylation de l'ADN et peut donc présenter des variations dans la qualité des données obtenues. Elle est en revanche très intéressante pour analyser la méthylation des séquences répétées, plus difficiles d'accès pour les techniques précédentes (Stephen J. Clark et al., 2016; Schwartzman & Tanay, 2015). Enfin, l'analyse de la méthylation de l'ADN peut se faire par immunoprécipitation à l'aide d'anticorps dirigés contre les cytosines méthylées de l'ADN (MeDIP). Les techniques basées sur ce principe nécessitent une grande quantité d'ADN par rapport aux méthodes précédemment citées. Les échantillons immunoprécipités peuvent ensuite être analysés sur des puces à ADN ou par PCR. Une adaptation combinant ces techniques avec un séquençage haut-débit permettrait d'obtenir des données plus précises, à la base près, comme les techniques basées sur le séquençage bisulfite (Stephen J. Clark et al., 2016; Lizardi et al., 2017).

De nouvelles techniques, dont certaines basées sur des prétraitements chimiques ou enzymatiques avant l'étape de conversion au bisulfite et le séquençage, ont été mises au point afin de discriminer les différents types de cytosines modifiées et en particulier les dérivés oxydatifs des méthylcytosines. On peut séparer ces nouvelles techniques en deux catégories : celles basées sur le séquençage bisulfite et celles reposant sur un enrichissement de la modification à observer (Stephen J. Clark et al., 2016; Wu & Zhang, 2017).

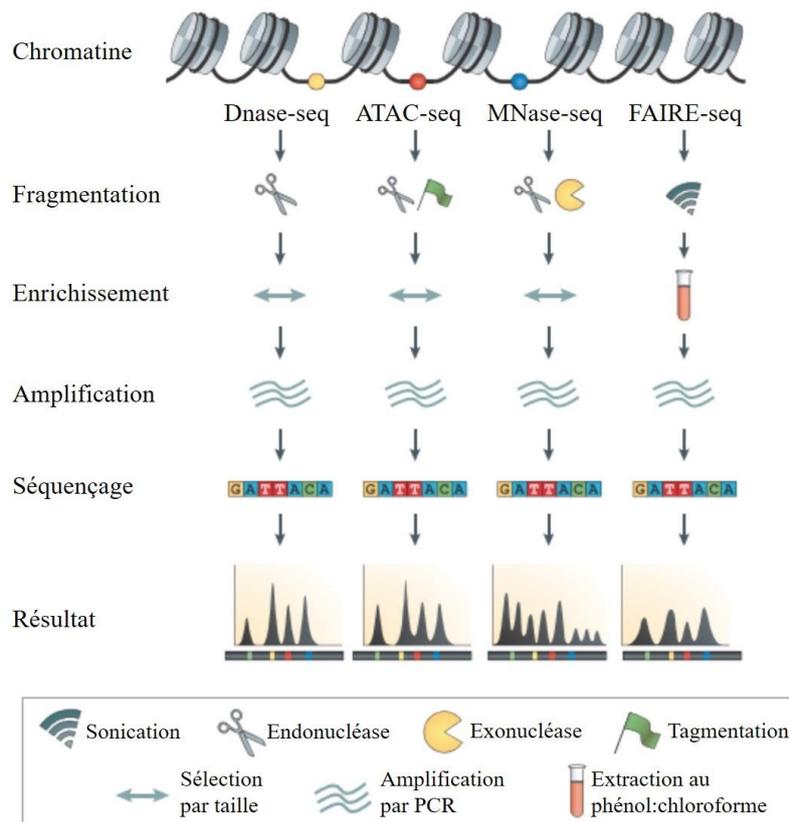
Dans la première catégorie, les méthodes consistent pour la plupart en une première étape de transformation chimique des cytosines d'intérêt qui seront ensuite altérées de façon différente de la normale par la conversion au bisulfite. Par exemple, le « *TET-assisted bisulfite sequencing* » (TAB-seq), permettant de déterminer la répartition des 5hmC, consiste en une glycosylation des 5-hydroxyméthylcytosines en 5-glycométhylcytosines (5gmC) suivie par

une oxydation de l'ensemble des cytosines méthylées et de leurs dérivés par les enzymes TET. La glycosylation protège les 5mC de l'oxydation. Ainsi, après conversion au bisulfite puis séquençage, seules les 5hmC initiales apparaissent comme des cytosines, tous les autres dérivés de cytosines ainsi que les cytosines non méthylées apparaissent comme des thymines (Stephen J. Clark et al., 2016). Dans cette même catégorie se retrouvent d'autres méthodes telles le « *M.SssI methylase-assisted bisulfite sequencing* » (MAB-seq), qui permet de méthyler les cytosines non modifiées grâce à une méthyltransférase CpG, M.SssI, afin de les distinguer des 5fC et 5caC qui seront les seules lues comme des thymines après conversion au bisulfite et séquençage. Cette méthode ne permet cependant pas de faire la différence entre les deux formes oxydées. Une version modifiée de cette méthode, le caMAB-seq, permet, par l'ajout d'une première transformation des 5fC en 5hmC, de n'observer que les 5caC. La méthode de « *chemical-labelling-enabled C-to-T conversion sequencing* » (CLEVER-seq) est, quant à elle, spécifique des 5fC. De plus en plus de techniques voient le jour pour différencier ces différents dérivés de cytosines en adaptant le séquençage au bisulfite et sont décrites plus en détails dans différentes revues (Stephen J. Clark et al., 2016; Wen & Tang, 2018; Wu & Zhang, 2017).

Dans la seconde catégorie de méthodes, qui font appel à un enrichissement des résidus d'intérêt, les cytosines sont préalablement marquées par des composés facilement repérables comme la biotine par exemple. Le « *selective chemical labelling* » (Seal) qui permet d'observer les 5hmC ou les 5fC, est l'une de ces techniques. La 5hmC ou la 5fC est marquée avec de la biotine puis enrichie. Cette méthode permet de repérer la présence d'une modification mais pas sa position précise sur la séquence. Il en va de même pour les techniques de « *5fC DNA pulldown* » (5fC-DP) et d'immunoprécipitation de l'ADN (DIP), utilisant pour la dernière des anticorps directement dirigés contre les dérivés de cytosine. Cette deuxième catégorie permet donc d'avérer la présence des modifications mais pas de les localiser de façon précise, ce qui rend ces techniques moins précises que celles de la catégorie précédente (Stephen J. Clark et al., 2016; Wen & Tang, 2018; Wu & Zhang, 2017).

## ii. Analyse du positionnement des nucléosomes

Contrairement aux méthodes directes d'analyse de la méthylation de l'ADN, les techniques pour étudier le positionnement des nucléosomes sont indirectes et se basent sur le principe que l'ADN enroulé autour des nucléosomes est inaccessible à des enzymes le modifiant. Ainsi, l'accessibilité de ces enzymes, déterminée par leur action sur l'ADN, permet de déterminer si les régions observées sont riches ou au contraire pauvres en nucléosomes. Toutes les techniques utilisées sont suivies d'un séquençage à haut-débit pour mettre en place des bibliothèques et analyser de grandes quantités de données à la fois. On peut différencier deux types de techniques pour l'analyse du positionnement des nucléosomes : celles faisant appel à des enzymes de digestion non spécifiques, qui clivent l'ADN là où il est accessible, et celles basées sur la sonication de la chromatine pour déterminer les régions accessibles (**figure 9**) (Stephen J. Clark et al., 2016; Jessen et al., 2004; Meyer & Liu, 2014; Wen & Tang, 2018).



**Figure 9 : Différentes techniques d'analyse du positionnement des nucléosomes (figure simplifiée de Meyer & Liu, 2014)**

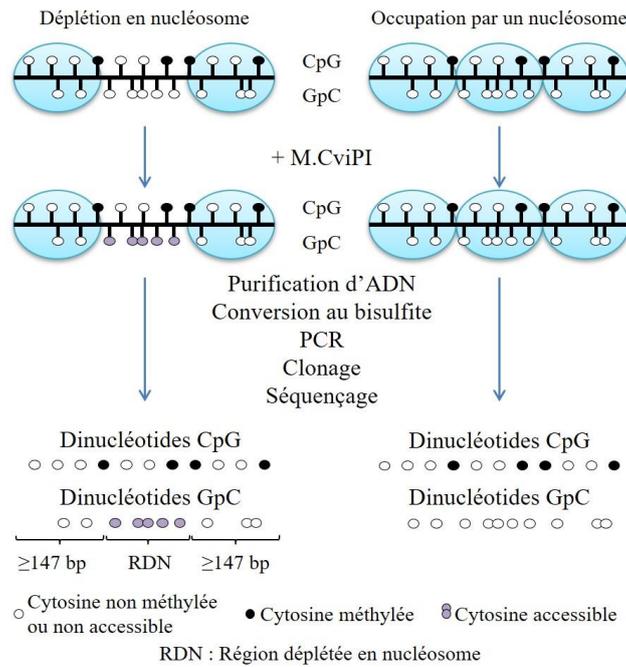
Le « micrococcal nuclease digestion followed by sequencing » (MNase-seq) permet de séquencer les régions protégées par des nucléosomes. Les trois autres techniques – « deoxyribonuclease I hypersensitive sites sequencing » (DNase-seq), « assay for transposase-accessible chromatin using sequencing » (ATAC-seq) et « formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements followed by sequencing » (FAIRE-seq) – permettent le séquençage de régions accessibles.

Dans la première catégorie, on retrouve notamment le « *micrococcal nuclease digestion followed by sequencing* » (MNase-seq), qui permet le séquençage des régions protégées par les nucléosomes. En effet, la MNase est une enzyme clivant l'ADN lorsqu'il est accessible et digérant celui-ci jusqu'à atteindre un obstacle. Les fragments d'ADN restant sont donc ceux qui n'ont pas été digérés et donc protégés par des nucléosomes au moment de l'action de l'enzyme. Les techniques de « *deoxyribonuclease I hypersensitive sites sequencing* » (DNase-seq) et « *assay for transposase-accessible chromatin using sequencing* » (ATAC-seq) permettent, quant à elles, de séquencer les régions accessibles du génome. Ces trois méthodes manquent cependant de précision puisqu'elles se basent sur des enzymes qui clivent (pour la DNaseI et la MNase) ou transposent des éléments (pour la transposase Tn5 de l'ATAC-seq) sur l'ADN de façon non spécifique, sans affinité particulière (Stephen J. Clark et al., 2016; Meyer & Liu, 2014; Wen & Tang, 2018; Zentner & Henikoff, 2014). Une autre méthode similaire, la « *methylation-sensitive single-molecule analysis of chromatin structure* », faisant appel à une méthyltransférase CpG, la M.SssI, permet de visualiser les nucléosomes sur des régions non méthylées du génome. Sur des régions méthylées cependant, cette technique est inutilisable puisque l'action de l'enzyme utilisée ne peut être observée que dans des régions initialement non méthylées (Miranda, Kelly, Bouazoune, & Jones, 2010).

La seconde catégorie de techniques permettant d'étudier le positionnement des nucléosomes, basée sur des réactions de sonication, nécessite de fixer les cellules au préalable pour réaliser des pontages covalents entre l'ADN et les protéines qui y sont liées. Deux techniques correspondent à cette catégorie : le « *sonication of crosslinked chromatin sequencing* » (sono-seq) et le « *formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements followed by sequencing* » (FAIRE-seq). Pour cette dernière méthode, les cellules sont fixées avec du formaldéhyde puis la chromatine est soniquée uniquement là où elle n'est pas accessible. L'ADN est ensuite purifié par phénol : chloroforme avant d'être amplifié par PCR puis séquencé. Ceci permet d'observer les différents fragments déplétés en nucléosomes au moment de la sonication (Stephen J. Clark et al., 2016; Meyer & Liu, 2014; Zentner & Henikoff, 2014).

### iii. Observation simultanée de la méthylation de l'ADN et du positionnement des nucléosomes

Le « *nucleosome occupancy and methylome sequencing* » (NOMe-seq), est une technique qui a été mise au point dans le laboratoire de Peter A. Jones en 2012 (Kelly et al., 2012). Elle permet d'analyser simultanément, sur un même brin d'ADN, la méthylation endogène ainsi que le positionnement des nucléosomes, qui est déduit de l'étude de l'accessibilité de l'ADN à une méthyltransférase GpC, la M.CviPI. En effet, lorsqu'une portion de chromatine est dépourvue de nucléosomes, et donc accessible, M.CviPI méthyle les cytosines situées en contexte GpC (**Figure 10**). Cette enzyme peut rarement, avec moins de 5 % d'erreur, méthyle des cytosines en contexte CpG et fausser ainsi le profil de méthylation endogène, c'est pourquoi il est essentiel d'adapter ses conditions d'utilisation au modèle d'étude afin d'obtenir une action optimale tout en limitant les risques d'erreur. Après conversion au bisulfite, transformant les cytosines non méthylées en uraciles puis, après amplification par PCR classique, en thymines, clonage et séquençage, nous pouvons observer sur une même séquence la méthylation endogène (cytosines en contexte CpG) et l'accessibilité de la chromatine (cytosines en contexte GpC). Cette technique permet ainsi de lier directement ces deux paramètres épigénétiques qui, comme évoqué précédemment, sont interconnectés, et ce de façon moins biaisée que les techniques précédemment citées faisant appel à la fragmentation de la chromatine (Kelly et al., 2012; Miranda et al., 2010; Rhie, Schreiner, & Farnham, 2018).



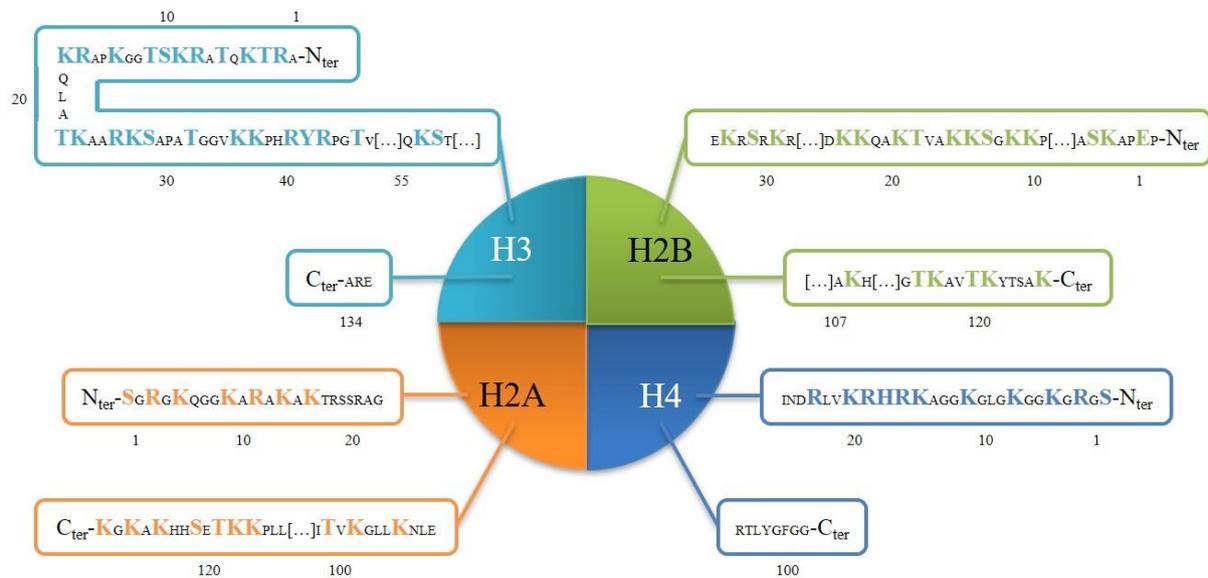
**Figure 10 : Schéma du fonctionnement du NOME-seq (figure adaptée de Kelly et al., 2012)**

Cette technique permet d'observer à la fois la méthylation endogène et le positionnement des nucléosomes sur une même molécule d'ADN en combinant l'action d'une méthyltransférase GpC (M.CviPI) et une conversion au bisulfite suivie d'un séquençage haut-débit.

En plus de la méthylation et du positionnement des nucléosomes, il existe d'autres modifications épigénétiques. Notamment, les modifications post-traductionnelles des histones, ces protéines formant les nucléosomes.

## II. Les modifications post-traductionnelles des histones

Les modifications post-traductionnelles des histones, aussi appelées « marques d'histones », sont nombreuses et variées. On en dénombre plus d'une dizaine différentes dont notamment la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination ou encore la SUMOylation. Elles peuvent advenir sur chacun des quatre composants du cœur d'histones : l'histone H2A, l'histone H2B, l'histone H3 et l'histone H4, le plus souvent au niveau de leurs extrémités amino-terminale (N-terminale) et carboxy-terminale (C-terminale) qui se prolongent à l'extérieur de la partie globulaire du nucléosome, mais également plus rarement dans leur domaine globulaire, ainsi que sur l'histone H1 (Audia & Campbell, 2016; Kouzarides, 2007; Lawrence, Dujat, & Schneider, 2016; Sims et al., 2003; Y. Zhao & Garcia, 2015). Les modifications advenant sur l'histone H1 ne sont encore que peu connues, de même que leurs éventuelles fonctions. La **figure 11**, inspirée de la publication de Huang et al de 2014 (H. Huang, Sabari, Garcia, Allis, & Zhao, 2014), récapitule les différentes positions connues pouvant être modifiées sur les queues des histones. Les lettres correspondent aux acides aminés composant les queues amino-terminales et carboxy-terminales des histones, selon la nomenclature internationale disponible en **annexe 2**.



**Figure 11 : Modifications post-traductionnelles des histones (figure inspirée de H. Huang et al., 2014)**

Chaque histone d'un nucléosome est susceptible d'être modifiée sur un résidu d'acide aminé et plus particulièrement sur l'une de ses queues N-terminale (N-ter) ou C-terminale (C-ter) dépassant du nucléosome et étant ainsi plus accessibles. Est représentée ici une partie des acides aminés constituant les queues des quatre histones H2A, H2B, H3 et H4. Les chiffres correspondent à la numérotation des acides aminés, le numéro 1 se trouvant à l'extrémité N-terminale. Les résidus colorés sont ceux pouvant être modifiés. La nomenclature utilisée pour les acides aminés est disponible en annexe 2. Exemple de quelques acides aminés clés : K : lysine, R : arginine, S : sérine, T : thréonine.

Ces modifications post-traductionnelles présentent des fonctions dans différents processus cellulaires telles la mitose, la réponse aux dommages de l'ADN, l'empreinte parentale ou encore la régulation de la transcription des gènes. Cette dernière fonction, à laquelle nous allons nous intéresser plus en détails, peut se faire de façon répressive ou activatrice selon l'histone concernée, l'acide aminé modifié, le type de modification et le degré de modification (Kouzarides, 2007; Y. Zhao & Garcia, 2015).

Les histones sont modifiées sur des résidus d'acides aminés particuliers selon la marque mise en place. La méthylation des histones peut avoir lieu sur les résidus lysine (K) et plus rarement sur les résidus arginine (R). Ces deux types de méthylation présentent une certaine complexité et, surtout, plusieurs subtilités d'effet du fait qu'elles peuvent être simples – monométhylation – ou multiples – diméthylation et triméthylation pour les résidus lysine, diméthylation asymétrique ou symétrique pour les résidus arginine (Thomas Jenuwein, 2006; Sims et al., 2003; Vakoc, Sachdeva, Wang, & Blobel, 2006; Wesche, Kühn, Kessler, Salton, & Wolf, 2017).

L'acétylation se fait exclusivement sur les résidus lysine. Elle est strictement corrélée à l'activation des gènes et une désacétylation entraîne la répression de la transcription (Biswas & Rao, 2017; Trisciuglio, Di Martile, & Del Bufalo, 2018; Vu, Luciani, & Nimer, 2013).

La phosphorylation a lieu au niveau des résidus sérine (S), tyrosine (Y) et thréonine (T) et peut-être corrélée avec une activation ou une répression de la transcription selon le contexte cellulaire étudié (Audia & Campbell, 2016; Bertin & Mangenot, 2008; Biswas & Rao, 2017; Sawicka & Seiser, 2012; Y. Zhao & Garcia, 2015).

L'ubiquitination et la SUMOylation ont lieu sur les résidus lysine. Il a été observé, jusqu'à présent, une corrélation entre la SUMOylation et la répression de la transcription. L'ubiquitination, quant à elle, peut être associée à la répression ou l'activation de la transcription selon le résidu lysine modifié (Shiio & Eisenman, 2003; Y. Zhao & Garcia, 2015).

Il existe d'autres types de modifications moins connues telles que la mono-ADP-ribosylation, la biotinylation, la formylation ou encore la malonylation mais celles-ci sont moins étudiées et leur(s) rôle(s) reste(nt) encore très flou(s) (Audia & Campbell, 2016; Stricker, Köferle, & Beck, 2017; Y. Zhao & Garcia, 2015).

## 1. Les marques associées à l'activation de la transcription

Une partie des modifications post-traductionnelles des histones permet l'activation de la transcription. Cette activation peut se faire au niveau de l'initiation de la transcription, les marques épigénétiques se concentrant alors particulièrement aux alentours du site d'initiation de la transcription. Les modifications des histones peuvent aussi favoriser l'élongation de la transcription et se concentrent alors dans le corps des gènes transcrits. Enfin, certaines de ces modifications peuvent activer la transcription depuis les régions activatrices, ou « *enhancer* », situées à une certaine distance du SIT (Heintzman et al., 2007; Sharifi-Zarchi et al., 2017; Z. Wang et al., 2009).

Le **tableau 2** présente différentes marques d'histones activatrices de la transcription.

Type de modification	Histone concernée	Acide aminé modifié
<b>Acétylation</b>	H2A	Lysine 5 (K5)
		Lysine 5 (K5)
	H2B	Lysines 11 et 12 (K11/12)
		Lysines 15 et 16 (K15/16)
		Lysine 20 (K20)
		Lysine 14 (K14)
	H3	Lysine 18 (K18)
		Lysine 23 (K23)
		Lysine 27 (K27)
		Lysine 36 (K36)
		Lysine 5 (K5)
		Lysine 8 (K8)
	H4	Lysine 12 (K12)
		Lysine 16 (K16)
Arginine 2 (R2)		
Lysine 4 (K4)		
<b>Méthylation</b>	H3	Arginine 17 (R17)
		Lysine 36 (K36)
		Arginine 42 (R42)
		Lysine 79 (K79)
		H4
	<b>Phosphorylation</b>	H3
Tyrosine 41 (Y41)		
<b>Ubiquitination</b>	H2B	Lysines 120 et 125 (K120/125)

Tableau 2 : Marques d'histones associées à l'activation de la transcription

Parmi les modifications associées à l'activation de la transcription, on peut notamment s'intéresser à la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) qui est présente au niveau des régions régulatrices (promoteur et « *enhancer* ») ainsi que dans le corps du gène. Plusieurs études ont montré que les trois degrés de méthylation de H3K4 ne se répartissent pas de manière identique. En effet, H3K4me3 se retrouve particulièrement aux alentours du site d'initiation de la transcription alors que H3K4me1 et H3K4me2 sont réparties dans le corps du gène. On note aussi une forte présence de H3K4me1 dans les régions activatrices alors que la marque H3K4me2 est absente et la marque H3K4me3 est peu représentée (Heintzman et al., 2007; Sharifi-Zarchi et al., 2017; Soares et al., 2017; Z. Wang et al., 2009).

L'acétylation des histones, sur n'importe quel résidu lysine, est une marque épigénétique associée à la transcription. Ceci s'explique par le fait que l'acétylation neutralise la charge positive du résidu lysine, affaiblissant la liaison histone-ADN et entraînant ainsi l'ouverture de la chromatine. L'ADN devient alors plus accessible aux facteurs de transcription et surtout au complexe de transcription de l'ARNpol II qui peut ainsi initier la transcription. Cette marque épigénétique se retrouve aussi bien au niveau des régions promotrices qu'activatrices et également dans le corps des gènes (Audia & Campbell, 2016; Biswas & Rao, 2017).

## 2. Les marques associées à la répression de la transcription

Tout comme certaines modifications post-traductionnelles des histones sont associées à l'activation de la transcription, d'autres sont associées à sa répression. Celle-ci peut être transitoire, et associée à l'hétérochromatine facultative, ou sur le long-terme, elle est alors associée à l'hétérochromatine constitutive, que l'on trouve notamment au niveau des centromères, des régions péri-centromériques et des télomères. Le **tableau 3** présente différentes marques d'histones liées à la répression de la transcription des gènes.

Type de modification	Histone concernée	Acide aminé modifié
<b>Méthylation</b>	H3	Arginine 8 (R8)
		Lysine 9 (K9)
		Lysine 27 (K27)
		Lysine 56 (K56)
		Lysine 79 (K79)
	H4	Arginine 3 (R3)
		Lysine 20 (K20)
<b>SUMOylation</b>	H4	Lysine 59 (K59)
<b>Ubiquitination</b>	H2A	Lysine 119 (K119)

Tableau 3 : Marques d'histones associées à la répression de la transcription

La méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me) est associée à l'hétérochromatine constitutive. Les trois niveaux de méthylation de cette lysine sont associés à la répression

mais il a été montré que H3K9me1 et H3K9me2 pouvaient se trouver dans des régions d'euchromatine. H3K9me3 est reconnue par la protéine d'hétérochromatine 1 (HP1) qui se fixe sur les nucléosomes possédant cette marque grâce à son domaine bromo. HP1 recrute ensuite les méthyltransférases responsables de la mise en place de H3K9me3, qui méthylent alors les nucléosomes voisins. Ceci permet de répandre l'hétérochromatine constitutive (Biswas & Rao, 2017; Richards & Elgin, 2002; Völkel & Angrand, 2007).

La marque H3K27me3 est spécifique de l'hétérochromatine dite facultative et est présente sur les promoteurs des gènes réprimés par les complexes protéiques du groupe Polycomb. Tout comme la marque H3K9me3, elle peut être répandue sur les nucléosomes voisins par les protéines du groupe Polycomb (Arcipowski, Martinez, & Ntziachristos, 2016; Audia & Campbell, 2016; Koubi, Chabannon, & Duprez, 2017; Völkel & Angrand, 2007).

### 3. Les enzymes modifiant les histones

#### i. Les méthyltransférases et déméthylases d'histones

La méthylation des résidus lysine et arginine des queues des histones est catalysée par les méthyltransférases des histones (HMT). Celles-ci se divisent en deux familles : les méthyltransférases des arginines des protéines (PRMT) et les méthyltransférases des lysines (HKMT), elles-mêmes réparties en deux groupes : les protéines avec domaine de liaison SET et celle sans domaine de liaison SET, où SET signifie : « *suppressor of variegation, enhancer of zeste and trithorax* ». Ces différentes enzymes sont spécifiques de certains résidus d'acides aminés donnés. Tout comme les DNMT, les méthyltransférases des histones méthylent leur acide aminé cible en transférant un groupe méthyle depuis leur substrat, le SAM. La méthylation des résidus arginine est principalement corrélée à une activation de la transcription alors que la méthylation des résidus lysine peut jouer un rôle activateur ou répresseur (Bannister & Kouzarides, 2011; Biswas & Rao, 2017; DesJarlais & Tummino, 2016; Völkel & Angrand, 2007).

Les PRMT sont au nombre de onze et sont réparties en trois groupes d'enzymes : les enzymes de type I, pouvant monométyler ou diméthyle de façon asymétrique les résidus arginine, les enzymes de type II, pouvant monométyler ou diméthyle de façon symétrique les résidus arginine, et les enzymes de type III, ne pouvant que monométyler leurs résidus cibles (Jahan & Davie, 2015; Wesche et al., 2017).

Les HKMT sont mieux connues que les PRMT et leurs rôles dans les différents phénomènes cellulaires sont plus étudiés que pour les enzymes précédemment citées. Le groupe des enzymes contenant un domaine SET est composé de sept familles d'enzymes : SET1, SET2, « *suppressor of position-effect variegation 39* » (SUV39), « *enhancer of zeste homolog* » (EZH), « *SET and MYND domain-containing proteins* » (SMYD), « *positive regulatory domain-containing* » PRDM, et une famille plus hétérogène classée sous le nom d'autres protéines contenant un domaine SET. Le groupe ne contenant pas de domaine SET n'est composé que d'un seul membre : « *disruptor of telomeric silencing 1-like* » DOT1L (DesJarlais & Tummino, 2016; Völkel & Angrand, 2007). Ces différentes enzymes sont hautement spécifiques et ne peuvent méthyler que certains résidus lysine. Par exemple,

l'enzyme DOT1L ne peut méthyler que la lysine 79 de l'histone H3 (H3K79). EZH1 et EZH2, de la famille EZH, s'associent à deux autres protéines, « *embryonic ectoderm development* » (EED) et « *suppressor of zeste 12* » (SUZ12) pour former le complexe répresseur 2 (PRC2) du groupe Polycomb et ainsi mono-, di- ou trimétyler de façon spécifique la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me<sub>1/2/3</sub>). De plus, la protéine EED possédant un domaine de liaison à H3K27me<sub>3</sub>, une fois cette marque déposée sur un nucléosome elle peut recruter le complexe PRC2 qui se retrouve alors à proximité d'un autre nucléosome et peut le méthyler à son tour sur le même résidu d'acide aminé. Cette double capacité permet au complexe PRC2 d'étendre la répression de la transcription entraînée par H3K27me<sub>3</sub> (Audia & Campbell, 2016; DesJarlais & Tummino, 2016; Koubi et al., 2017; Völkel & Angrand, 2007; Vu et al., 2013). De la même manière, les enzymes de la famille SUV39 catalysent principalement la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9), spécifique de l'hétérochromatine constitutive et la famille des enzymes « *mixed-lineage leukemia* » (MLL), des HKMT avec domaine SET, sont spécifiques de la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4) associée à l'activation de la transcription (Arcipowski et al., 2016; Audia & Campbell, 2016; Vu et al., 2013).

La méthylation des histones était autrefois considérée comme irréversible mais, au début des années 2000 ont été découvertes des déméthylases d'histones (HDM) qui ont donc permis de montrer le caractère réversible de cette modification. Jusqu'à très récemment, aucune déméthylase spécifique des résidus arginine n'avait été observée dans les cellules et l'on pensait ainsi que le processus de déméthylation de ces résidus se faisait par une conversion de l'arginine en citrulline par déimination. Depuis une dizaine d'années cependant, plusieurs laboratoires ont démontré l'existence d'une telle enzyme, une protéine du groupe Jumonji : JMJD6. Elle est jusqu'à présent la seule déméthylase d'arginine identifiée (Bannister & Kouzarides, 2011; Wesche et al., 2017).

Les déméthylases de résidus lysine sont en revanche mieux connues. La première à avoir été découverte a été nommée déméthylase spécifique de lysine 1 (LSD1). Cette enzyme est souvent trouvée associée à d'autres protéines pour former un complexe répresseur capable de démétyler de façon spécifique les marques H3K4me<sub>1</sub> et H3K4me<sub>2</sub>, mais pas H3K4me<sub>3</sub>. En s'associant en un autre complexe, la spécificité de l'enzyme passe de H3K4 à H3K9, la faisant ainsi devenir un co-activateur. Les autres déméthylases d'histones possèdent un domaine jumonji, absent de LSD1, et présentent une forte spécificité de substrat, chacune ne pouvant démétyler que certains résidus lysine. Contrairement à LSD1, les autres déméthylases d'histones sont capables de démétyler les résidus triméthylés par une réaction dépendante du fer ou du 2-oxoglutarate (Arcipowski et al., 2016; Audia & Campbell, 2016; Bannister & Kouzarides, 2011; Biswas & Rao, 2017; DesJarlais & Tummino, 2016).

## ii. Les acétylases et désacétylases d'histones

L'acétylation des histones consiste en l'ajout d'un groupement acétyle (-COCH<sub>3</sub>) sur un résidu lysine à partir d'une molécule d'acétyl-coenzyme A (Acétyl-CoA) et est le résultat d'un équilibre entre l'action d'acétyltransférases d'histones (HAT) et de désacétylases d'histones (HDAC). Ces deux groupes d'enzymes font souvent partie de complexes modifiant la chromatine et leur activité est donc liée à celle du complexe auquel elles appartiennent. Contrairement aux méthyltransférases et acétylases d'histones, les désacétylases ne sont pas spécifiques d'un résidu lysine particulier mais peuvent agir sur différentes lysines des queues des histones (Audia & Campbell, 2016; Y. Li & Seto, 2016; Seto & Yoshida, 2014; Trisciuglio et al., 2018; K. Zhang & Dent, 2005).

Les acétyltransférases d'histones sont constituées de deux groupes distincts, notamment par leur structure et leur localisation au sein de la cellule : les HAT de type A, qui sont localisées dans le noyau, et les HAT de type B, localisées dans le cytoplasme. Le **tableau 4** récapitule les membres principaux de ces deux groupes (Bannister & Kouzarides, 2011; Biswas & Rao, 2017; Trisciuglio et al., 2018). Ces enzymes acétylent les résidus lysine des histones mais également de protéines non-histones comme p53 ou « *cloned-myelocytose oncogene* » (c-Myc) par exemple (Audia & Campbell, 2016; Trisciuglio et al., 2018; Vu et al., 2013).

HAT de type A	
Famille p300/CBP	P300 « <i>CREB-binding protein</i> » (CBP)
Famille GNAT « <i>GCN5-related N-acetyltransferase</i> »	« <i>general control nonderepressible 5</i> » (GCN5) « <i>p300/CBP-associated factor</i> » (pCAF)
Famille MYST « <i>Moz, Ybf2/Sas3, Sas2, Tip60</i> »	« <i>monocytic leukemic zinc finger</i> » (MOZ) « <i>HIV tat-interacting protein 60</i> » (Tip60) « <i>males absent on the first</i> » (MOF) « <i>MOZ-related factor</i> » (MORF) « <i>histone acetyltransferase bound to ORC</i> » (HBO1)
Famille NCOA-related HAT « <i>nuclear receptor coactivator</i> »	Coactivateurs des récepteurs stéroïdes (SCR)
Famille des facteurs de transcription liés aux HAT	Facteurs associés à « <i>TATA-box binding protein</i> » (TBP)
HAT de type B	
Acétyltransférases d'histones de type B	HAT1 HAT4

Tableau 4 : Les familles d'acétyltransférases d'histones

Les désacétylases d'histones, quant à elles, sont séparées en quatre classes : les classes I, II et IV dépendantes de l'ion zinc  $Zn^{2+}$  et la classe III dépendante de la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD). Les enzymes de la classe I sont exprimées dans le noyau de l'ensemble des cellules. Celles de la classe IV sont également exprimées dans le noyau, mais de façon spécifique des tissus, notamment dans les cellules cérébrales et les testicules, ainsi que dans plusieurs cancers. Les enzymes de la classe II sont localisées dans le cytosol et les enzymes de la classe III sont localisées à différents endroits de la cellule (mitochondrie, noyau, cytosol) (Audia & Campbell, 2016; DesJarlais & Tummino, 2016; Seto & Yoshida, 2014; Vu et al., 2013; Yoon & Eom, 2016). Les HDAC de classe I sont au nombre de quatre (HDAC1, HDAC2, HDAC3 et HDAC8) et sont localisées dans le noyau, la classe II est composée de six membres (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 et HDAC10) et se retrouvent dans le cytosol, la classe IV ne contient qu'un seul membre (HDAC11) localisé dans le noyau et la classe III est composée de sept membres (les sirtuines) aux localisations diverses : SIRT1 et SIRT2 se trouvent dans le noyau et le cytosol, SIRT3 dans le noyau et les mitochondries, SIRT4 et SIRT5 sont localisées dans les mitochondries, SIRT6 dans le noyau et enfin SIRT7 se trouve dans le nucléole (Seto & Yoshida, 2014).

### iii. Les autres modifications des histones

La phosphorylation des histones consiste en l'ajout d'un groupe phosphate sur un résidu sérine, thréonine ou tyrosine depuis une source d'adénosine triphosphate (ATP). La phosphorylation est réalisée par les kinases et la déphosphorylation par les phosphatases. Le groupement phosphate étant chargé négativement, cette modification entraîne une diminution de la charge positive du nucléosome, et favorise ainsi la décompaction de la chromatine, à l'instar de l'acétylation des lysines. La phosphorylation des histones est une modification très transitoire qui est rapidement retirée par les phosphatases (Bannister & Kouzarides, 2011; Biswas & Rao, 2017; DesJarlais & Tummino, 2016).

Deux autres modifications des histones liées l'une à l'autre sont l'ubiquitination et la SUMOylation. Ces modifications consistent respectivement en l'ajout d'une protéine d'ubiquitine ou de petites protéines parentes de l'ubiquitine, les protéines « *small ubiquitin-like modifier* » (SUMO), sur un résidu lysine. Jusqu'à présent, l'ubiquitination a principalement été observée au niveau des histones H2A et H2B. Il semblerait que l'ubiquitination de l'histone H2A soit associée à la répression de la transcription alors que cette modification sur l'histone H2B serait associée à l'activation de la transcription. Les enzymes responsables de la mise en place de ces marques épigénétiques sont multiples. Il s'agit de modifications post-traductionnelles réalisées en trois étapes similaires : la maturation de la protéine à ajouter, son activation puis sa liaison au résidu lysine cible. Ces modifications peuvent ensuite être retirées par des enzymes de dés-ubiquitination et des protéases spécifiques de SUMO (Biswas & Rao, 2017; Cole, Clifton-Bligh, & Marsh, 2015; DesJarlais & Tummino, 2016).

Les autres modifications des histones sont moins connues mais on peut noter qu'il a été observé une activité mono-ADP-ribosyltransférase, consistant en l'ajout d'un ADP-ribose sur

les résidus lysine, pour les désacétylases de la famille des sirtuines (Audia & Campbell, 2016; Bannister & Kouzarides, 2011; Biswas & Rao, 2017).

#### 4. Interactions entre les différentes modifications des histones

Les différentes modifications précédemment citées peuvent interagir de façon coopérative ou antagoniste pour permettre une régulation plus fine de la transcription. Par exemple, l'acétylation et la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 sont en compétition puisque situées sur un même résidu lysine. Une déméthylation favorise l'acétylation de cette lysine et une désacétylation favorise la méthylation. De plus, la marque H3K9Ac est corrélée à une activation de la transcription alors que la marque H3K9me3 est associée à la répression. Une même compétition existe pour la lysine 27 de l'histone H3, qui peut elle-aussi être méthylée et associée à la répression de la transcription ou acétylée et favoriser l'activation (Guanchao Jiang, Yang, Sanchez, & Ehrlich, 2004; Taberlay et al., 2011).

La triméthylation de H3K4, marque associée à l'activation de la transcription et localisée notamment au niveau des SIT des gènes, nécessite la coopération d'une ubiquitine ligase qui ubiquitine l'histone H2B en position 120 (H2BK120ub1). En effet, plusieurs études ont montré que cette étape d'ubiquitination précède le dépôt de la marque H3K4me3 et qu'elle est indispensable pour cette méthylation. En plus d'être associée à H2BK119ub1, H3K4me3 co-localise avec l'acétylation des résidus lysine en position N-terminale de l'histone H3 afin de promouvoir la transcription (Biswas & Rao, 2017; Gates et al., 2017; Kouzarides, 2007).

De manière similaire, le complexe PRC1 reconnaît la marque H3K27me3 et, grâce à sa sous-unité E3 ayant une activité d'ubiquitine ligase, ubiquitine la lysine 119 de l'histone H2A, qui contribue également à la répression de la transcription. La marque H2AK119ub1 déposée par PRC1 recrute et stimule l'activité de PRC2, responsable de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3, ce qui permet d'étendre l'hétérochromatine facultative aux nucléosomes adjacents. Une transcription active réprime l'activité du complexe PRC2 et bloque ainsi la mise en place de la marque H3K27me3 sur les promoteurs transcrits (DesJarlais & Tummino, 2016; Koubi et al., 2017; Kouzarides, 2007; Nichol, Dupéré-Richer, Ezponda, Licht, & Miller, 2016; Wiles & Selker, 2017).

Un dernier exemple d'interaction entre différentes modifications post-traductionnelles des histones est l'existence de domaines bivalents, présentant à la fois la marque activatrice H3K4me3 et la marque répressive H3K27me3. Ces domaines ont été observés dans les cellules souches embryonnaires, notamment au niveau des promoteurs des gènes impliqués dans la différenciation et spécifiques des tissus. En effet, une fois la cellule différenciée, ces gènes ne présentent plus qu'une seule des deux marques, selon s'ils sont actifs ou réprimés (Azura et al., 2006; Bernstein et al., 2006; Taberlay et al., 2011; Wiles & Selker, 2017).

## 5. Les marques d'histones dans les cancers

Tout comme la méthylation de l'ADN et le positionnement des nucléosomes sont altérés dans les cancers, les modifications des histones sont également différentes par rapport aux cellules somatiques normales. Comme évoqué précédemment, de nombreux gènes sont éteints ou au contraire réexprimés de façon aberrante dans les cancers. Bien que ces altérations de la régulation de ces gènes puissent être dues à des mutations, la plupart sont associées à des mécanismes épigénétiques. En effet, plusieurs études ont montré que les enzymes catalysant les modifications post-traductionnelles des histones sont surexprimées ou réprimées dans une majorité de cancers (Furuya et al., 2019; Y. Li & Seto, 2016; Nebbioso et al., 2018; Seto & Yoshida, 2014; Yoon & Eom, 2016).

Les acétyltransférases et désacétylases d'histones, notamment, sont très couramment dérégulées dans les cancers, dont les leucémies. Cette dérégulation de leur expression est souvent due à des mutations dans les gènes codant ces enzymes (Y. Li & Seto, 2016). Par exemple, il a été retrouvé plusieurs mutations dans des HAT telles p300 ou encore CBP dans différents cancers, menant à leur répression et donc à une hypoacétylation de gènes suppresseurs de tumeurs comme p53 par exemple, favorisant le développement des cellules tumorales (Audia & Campbell, 2016; Biswas & Rao, 2017). Les HDAC sont souvent surexprimées et contribuent à la mise en place des phénotypes tumoraux en favorisant la prolifération ou encore en bloquant la différenciation des cellules (Yoon & Eom, 2016). Par exemple, le récepteur RAR $\alpha$  interagit, en absence de ligand, avec des HDAC, devenant ainsi un répresseur de différents gènes impliqués notamment dans la différenciation des cellules hématopoïétiques. En présence de son ligand, l'ATRA, le récepteur se détache des HDAC et interagit alors avec des HAT pour activer ses gènes cibles. Dans le cas de la LAP, la protéine de fusion PML-RAR $\alpha$  ne répond plus à des doses physiologiques d'ATRA, devenant ainsi un répresseur constitutif de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation des promyélocytes, et ce par l'intermédiaire des désacétylases d'histones. Ceci montre un recrutement aberrant de désacétylases d'histones dans le contexte de la LAP, qui intervient dans le blocage des cellules au stade promyélocyte et contribue ainsi au phénotype leucémique (Cress & Seto, 2000; Orfali et al., 2014).

De même, plusieurs méthyltransférases et déméthylases d'histones sont surexprimées dans les cancers. Les protéines du groupe Polycomb catalysant la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 font partie de ces enzymes surexprimées (Arcipowski et al., 2016; Nichol et al., 2016; Pan, Hsu, Chen, & Hung, 2018; Wiles & Selker, 2017; Yen et al., 2016; K. Zhang & Dent, 2005). Une étude récente a également associé un taux élevé de marque H3K4me3 avec une meilleure survie de patients atteints de cancers du pancréas, du côlon, de l'œsophage ou du poumon (S. Li, Shen, & Chen, 2018). Enfin, les régions contenant de hauts niveaux de la marque H3K9me3, en dehors des régions d'hétérochromatine constitutive, sont plus sujettes à être mutées dans les cancers d'après plusieurs analyses prédictives. De plus, les gènes réprimés dans les cancers présentent, pour une grande partie, cette marque, normalement typique des régions d'hétérochromatine constitutive, démontrant ainsi une répression à long-terme de ces gènes (Fahrner & Baylin, 2003; Janssen et al., 2018).

## 6. Les épidrogues ciblant les marques d'histones

Les modifications post-traductionnelles des histones jouant un rôle majeur dans la tumorigenèse, de plus en plus de laboratoires mettent au point des épidrogues ciblant ces marques épigénétiques afin de restaurer l'expression normale des gènes transcrits ou réprimés de façon aberrante dans les cellules tumorales (Y. Li & Seto, 2016; Trisciuglio et al., 2018; Vu et al., 2013; Yen et al., 2016; Yoon & Eom, 2016). Par exemple, différents inhibiteurs de désacétylases d'histones ont été approuvés par la « *Food and drug administration* » (FDA) dans les traitements de pathologies cancéreuses. On retrouve notamment la trichostatine A (TSA), un antibiotique qui cible les HDAC de classe I et de classe II. Les sirtuines sont en revanche insensibles à cette molécule (Mai & Altucci, 2009), ou encore le vorinostat, validé par la FDA pour le traitement de lymphomes des cellules T périphériques (Jones et al., 2016; Y. Li & Seto, 2016). Cependant, ces inhibiteurs de HDAC présentent une efficacité limitée lorsqu'ils sont utilisés seuls, manquant de spécificité quant à leurs cibles. Combinés à d'autres traitements, ils permettent d'accroître l'action antitumorale du traitement associé (Jones et al., 2016; Mazzone et al., 2017; Yoon & Eom, 2016).

L'étude du rôle des acétyltransférases d'histones dans les cancers est plus récente que celle des désacétylases d'histones. Différents inhibiteurs naturels de ces enzymes ont été découverts, comme le curcumin par exemple, mais peu d'épidrogues ont été mises au point. Les quelques-unes existant ont montré moins d'efficacité que les inhibiteurs de HDAC et les recherches sur le sujet n'ont donc pas été très suivies (Audia & Campbell, 2016; Mai & Altucci, 2009; Trisciuglio et al., 2018). Cependant, une étude récente sur des modèles de leucémies aiguës myéloïdes a montré le rôle majeur des HAT dans la mise en place de phénotypes leucémiques dans des modèles murins (Giotopoulos et al., 2016; Trisciuglio et al., 2018). Le laboratoire du Dr. Huntly, qui a réalisé l'étude en question, a pu montrer dans un modèle murin que les acétyltransférases p300 et CBP ont un rôle clef dans la mise en place d'un phénotype de leucémie aiguë myéloïde et dans son maintien sur le long terme. Une inhibition de ces enzymes dans des modèles *in vitro* de leucémies aiguës myéloïdes humaines favorise l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire des cellules leucémiques. Ainsi, ce laboratoire a mis en évidence une cible thérapeutique potentielle dans le cas des leucémies aiguës myéloïdes (Giotopoulos et al., 2016). Ces résultats prometteurs pourraient permettre de développer de nouvelles épidrogues utilisables dans des traitements en pathologies cancéreuses.

Des inhibiteurs des méthyltransférases d'histones ont également été développés. Ces inhibiteurs ciblent des enzymes précises, méthylant, déméthylant ou interagissant avec les marques d'histones comme par exemple des inhibiteurs de EZH2, l'enzyme déposant la marque répressive H3K27me3, ou encore SUV39, déposant la marque H3K9me3. Des inhibiteurs des déméthylases d'histones ont également été développés, comme un inhibiteur de l'enzyme LSD1, responsable de la déméthylation des lysines 4 et 9 de l'histone H3 (H3K4 et H3K9). Ces inhibiteurs ont été développés très récemment et ne sont pas encore approuvés par la FDA dans des traitements mais les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* sont prometteurs (Jones et al., 2016; Mai & Altucci, 2009). De plus, des inhibiteurs ciblant de façon plus globale les HMT et les HDM sont en cours de développement. De tels inhibiteurs pourraient

ainsi intervenir sur plusieurs marques d'histones à la fois (Audia & Campbell, 2016; Benedetti, Conte, Iside, & Altucci, 2015).

## 7. Mise en évidence des modifications post-traductionnelles des histones

La méthode principale et la plus ancienne d'étude des modifications post-traductionnelles des histones est l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Cette technique nécessite une première étape de fixation des cellules au cours de laquelle la liaison entre l'ADN et les protéines qui y sont fixées est stabilisée grâce à des pontages covalents. La chromatine est ensuite soniquée pour obtenir des fragments de taille réduite puis immunoprécipitée avec des anticorps spécifiques de la protéine ou de la marque d'histone à étudier. Une analyse par PCR quantitative (qPCR) permet ensuite d'identifier la région d'ADN liée aux protéines ou marques d'histones d'intérêt. Cette technique a également été adaptée à une analyse de l'ensemble du génome grâce à des puces à ADN (ChIP-on-chip), par analyse via séquençage (ChIP-seq), ou encore par une analyse sériée d'expression des gènes (ChIP-SAGE) (Barski et al., 2007; Schwartzman & Tanay, 2015).

Le ChIP présente cependant certaines limitations, principalement la spécificité de l'anticorps. En effet, si la marque d'histone à étudier est peu représentée ou si l'anticorps a un défaut d'affinité pour celle-ci, les résultats obtenus peuvent être faussés. De même, la sonication de la chromatine peut biaiser les résultats si elle est insuffisante – fragments trop longs – ou trop importante – fragments de taille inférieure à un nucléosome (Barski et al., 2007; Meyer & Liu, 2014; Schwartzman & Tanay, 2015).

## III. Les ARN non-codants

Les avancées dans les nouvelles techniques et technologies, en particulier de séquençage, ont permis de constater que, malgré le fait qu'il soit composé d'une majorité de régions non-codantes, la plus grande partie de l'ADN est en fait transcrite. Les ARN non-codants (ARNnc) sont transcrits à partir de séquences non-codantes de l'ADN et ne sont pas traduits en protéines. Jusqu'à présent, la plupart de ces ARN particuliers a été associée à la répression transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des gènes en agissant directement au niveau de ceux-ci ou sur leurs ARN messagers (ARNm) par une voie définie comme voie d'interférence des ARN. Tout comme les ARN codants, les ARNnc peuvent être quantifiés par transcription inverse suivie d'une PCR quantitative (RT-qPCR), caractérisés par séquençage (RNA-seq) ou analysés par des puces à ADN (microarrays). Ils peuvent également être prédits par analyse informatique (Hüttenhofer & Vogel, 2006; Romano, Veneziano, Acunzo, & Croce, 2017). On distingue plusieurs types de ces ARN : les petits ARN non-codants et les longs ARN non-codants (Fressigné & Simard, 2018; Joh, Palmieri, Hill, & Motamedi, 2014; Patil, Zhou, & Rana, 2014; Zaratiegui, Irvine, & Martienssen, 2007; Zhong, Zhang, Xiong, & Zhang, 2016).

## 1. Les petits ARN non-codants

Les petits ARN non-codants sont caractérisés par une taille comprise entre une dizaine et une trentaine de nucléotides. Ils peuvent être regroupés en trois grandes familles : les micro ARN (miARN), les petits ARN interférants (siARN) et les petits ARN non-codants interagissant avec les protéines PIWI (piARN), ces derniers ne seront pas traités au cours de ce mémoire car aucun rôle ne leur a été trouvé dans la régulation de la transcription (Fressigné & Simard, 2018; Joh et al., 2014; Patil et al., 2014).

Les miARN sont obtenus par deux clivages successifs d'ARN plus grands, en forme d'épingles à cheveux et donc double-brin, par deux RNases III : Drosha et Dicer. Ces miARN sont constitués de la partie guide de l'ARN double-brin initial et sont associés aux protéines de la famille Argonaute (Ago) avec lesquelles ils forment un complexe répresseur dégradant les ARNm cibles ou inhibant leur traduction dans le cytoplasme (Biswas & Rao, 2017; Fressigné & Simard, 2018; Joh et al., 2014; Patil et al., 2014; Romano et al., 2017).

Les petits ARN interférants sont le produit de la dégradation d'ARN double-brin pouvant venir d'une source exogène ou endogène. Ils ont une taille comprise entre 20 et 25 nucléotides et, comme les miARN, sont obtenus grâce à l'action de l'enzyme Dicer. Ils correspondent à la partie guide de l'ARN double-brin initial. Les siARN agissent en se liant par complémentarité de base à leurs ARN cibles. Les siARN ont besoin d'une complémentarité parfaite avec leur cible pour agir en induisant la dégradation des ARNm cibles ou bien recruter des complexes remodelant la chromatine sur la séquence complémentaire (Fressigné & Simard, 2018; Joh et al., 2014; Patil et al., 2014).

## 2. Les longs ARN non-codants

Les longs ARN non-codants (ARNlnc) sont définis comme des ARN de plus de 200 nucléotides pour lesquels aucune protéine n'a été détectée ni prédite. Le tout premier ARN de ce type à avoir été découvert est l'ARN H19. Les gènes des ARNlnc sont similaires aux gènes codant des protéines par leur longueur, leur profil de modifications des histones, leurs mécanismes de transcription et leur mécanisme d'épissage. Ils sont en revanche différents sur divers aspects comme la quasi absence de conservation de leur séquence entre les différentes espèces (Joh et al., 2014; Mercer & Mattick, 2013). Une grande partie des ARNlnc régule l'expression des gènes situés à proximité du locus de leur propre gène ou qui leur sont semblables et ce, de deux façons : par contact direct, donc en *cis*, ou à distance, donc en *trans*. Ils sont associés à la chromatine et peuvent interagir avec les protéines remodelant cette dernière (Joh et al., 2014; Mercer & Mattick, 2013; Patil et al., 2014).

## 3. Les ARN non-codants dans les cancers

Tout comme les modifications épigénétiques décrites précédemment, les ARN non-codants se trouvent également altérés dans les cancers. Leur expression peut être réprimée ou au contraire suractivée selon les cancers et les ARN concernés mais il a été constaté une dérégulation de l'expression de ces ARNnc dans la plupart, si ce n'est dans la totalité, des cancers (Anastasiadou, Jacob, & Slack, 2018; Biswas & Rao, 2017; Nebbioso et al., 2018; Yu

et al., 2018; Zeng et al., 2014, 2015). Par exemple, dans la leucémie aiguë promyélocytaire, plusieurs études ont montré une dérégulation d'ARNnc impliqués dans la différenciation des progéniteurs myéloïdes, dans la formation des corps nucléaires PML ou encore dans la prolifération des cellules (Yu et al., 2018; Zeng et al., 2014, 2015).

De plus, les ARN non-codants peuvent servir de biomarqueurs pour différents types de cancers et également être utilisés dans des thérapies géniques. En effet, comme évoqué précédemment, les ARNnc sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires, notamment la prolifération ou encore la différenciation, et sont souvent associés à une répression des gènes. Comme l'expression de plusieurs gènes suppresseurs de tumeur est inhibée dans les cancers, l'utilisation d'ARN non-codants pour lever cette répression se présente comme un choix intéressant. Cependant, plusieurs effets secondaires ont été observés en utilisant des ARNnc comme thérapies géniques. Il est donc essentiel d'améliorer les connaissances sur les mécanismes et les modes d'action de ces ARN particuliers (Zeng et al., 2015; Zhong et al., 2016). Les ARNnc pouvant agir en *cis* ou en *trans*, la localisation de leurs gènes sur les chromosomes ainsi que de leurs cibles au sein du noyau est importante. Cette localisation particulière joue également un rôle dans la régulation des gènes.

## IV. La localisation subnucléaire

### 1. Une organisation bien spécifique

Les chromosomes ne sont pas éparpillés dans le noyau de façon aléatoire. Au contraire chacun d'entre eux occupe un petit espace dénommé territoire chromosomique. La répartition des chromosomes dans ces territoires semble aléatoire mais il a été observé que les chromosomes riches en hétérochromatine, peu transcrits, ont tendance à se concentrer à la périphérie du noyau tandis que les chromosomes portant des gènes activement transcrits se trouvent plutôt au centre du noyau. Il a d'ailleurs été montré que les gènes actifs sont rapprochés d'un centre de transcription, où colocalisent plusieurs gènes transcrits, et que ce n'est donc probablement pas l'ARNpol II qui est dynamiquement déplacée d'un gène à un autre mais la séquence à transcrire qui se déplace (Bickmore, 2013; Dekker & Mirny, 2016; Osborne et al., 2004).

De même, l'emplacement des gènes sur les chromosomes ne semble pas complètement aléatoire puisqu'il a été observé l'existence de domaines topologiquement associés (TAD) qui favorisent les interactions entre éléments du génome présents dans ces domaines tout en limitant les interactions entre domaines différents, même voisins. Ces TAD recouvrent un nombre restreint de gènes, de 1 à 10 par domaine, et de régions activatrices. Il a été suggéré que les régions activatrices d'un TAD peuvent agir sur l'ensemble des gènes de ce domaine sans préférence particulière. Les TAD sont séparés les uns des autres par des régions frontières, où se concentrent des éléments barrières, et principalement le facteur de transcription CTCF (Acemel et al., 2017; Carelli, Sharma, & Ahringer, 2017; Dekker & Mirny, 2016; Dixon et al., 2012; Shachar & Misteli, 2017; X.-T. Wang, Dong, Zhang, & Peng, 2015).

Cette protéine à onze doigts de zinc est connue pour moduler la structure chromatinienne en favorisant la formation de boucles entre deux sites CTCF distants en interagissant avec la cohésine (Oomen et al., 2019; J. Wang, Lawry, Cohen, & Jia, 2014). Cependant, les deux facteurs interagissant doivent se trouver dans une conformation bien particulière pour permettre la mise en place de cette boucle. En effet, il a été montré par plusieurs études que les deux protéines CTCF doivent être orientées de façon convergente. De plus, CTCF a également un rôle insulateur puisque ce facteur est capable de bloquer les interactions entre deux régions distantes de l'ADN, comme une région activatrice et le promoteur d'un gène par exemple (Acemel et al., 2017; Carelli et al., 2017; Dekker & Mirny, 2016; Oomen et al., 2019).

En plus de la division des chromosomes en domaines topologiquement associés, un autre facteur joue sur l'expression des gènes et il s'agit de leur position par rapport aux régions d'hétérochromatine constitutive. En effet, il existe un effet nommé « *position effect variegation* » (PEV) découvert chez la drosophile dans les années 30 : ce phénomène est caractérisé par une régulation de l'expression par les régions centromériques des régions voisines. Plus précisément cela entraîne une répression des gènes situés dans les régions touchées. Le laboratoire de Muller, ayant découvert ce phénomène, a montré que le locus d'un gène habituellement exprimé avait été transloqué à proximité des régions d'hétérochromatine après mutation, entraînant ainsi sa répression, contrairement au gène non muté situé loin des régions d'hétérochromatine (Dillon, 2004; Guillemin & Francastel, 2010; Jost, Bertulat, & Cardoso, 2012; Richards & Elgin, 2002).

Ce phénomène a ensuite été observé dans d'autres régions d'hétérochromatine constitutive, les télomères, et a été nommé effet de position des télomères (TPE). De la même manière que pour le PEV, les télomères peuvent jouer un rôle répressif sur les gènes situés à proximité. Enfin, plus récemment, un laboratoire a pu observer que cet effet de répression pouvait également être détecté sur des loci de gènes situés à quelques mégabases des télomères. Ce nouveau phénomène a ainsi été nommé effet de position des télomères sur de longues distances (TPE-OLD). L'hypothèse émise par le laboratoire est que les télomères forment une boucle afin de se retrouver à proximité des gènes à réguler (W. Kim et al., 2016; W. Kim & Shay, 2018; Robin et al., 2014).

## 2. L'étude de la localisation nucléaire

L'étude spatiale de la localisation nucléaire des chromosomes et des gènes se fait grâce à différentes techniques de microscopie. La plus ancienne de ces techniques est l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) qui permet d'observer la position relative d'une ou plusieurs cibles par rapport au noyau ou entre elles. Cette technique repose sur le marquage en fluorescence de gènes, protéines ou ARN après fixation et perméabilisation de la cellule et du noyau. Les images obtenues après capture au microscope permettent d'observer les positions relatives des différentes molécules marquées dans un même plan. Le développement des appareils de microscopie permet à présent d'observer en trois dimensions les cellules préparées par FISH, ce qui a donné naissance au FISH en trois-dimensions (3D-FISH). Cette

technique permet de visualiser les interactions au sein du noyau mais est limitée en nombre de cellules observées (Bickmore, 2013; Chaumeil, Micsinai, & Skok, 2013).

Une autre technique d'analyse de la conformation nucléaire est la méthode de « *chromosome conformation capture* » (3C) permettant de déterminer les distances entre différents segments de chromatine. Cette technique repose sur une fixation des cellules puis digestion par une enzyme et ligation des fragments afin de pouvoir les amplifier par PCR. Le 3C permet donc d'obtenir des distances mais pas de les visualiser dans la cellule ni le noyau (Bickmore, 2013; Schwartzman & Tanay, 2015; Wen & Tang, 2018).

De nombreuses techniques ont été mises au point en combinant la méthode de 3C à d'autres techniques. Par exemple, on retrouve le « *chromosome conformation capture-on-chip* » (4C) qui est une combinaison du 3C avec un microarray, ou encore le « *ChIP-combined loop* » (ChIP-loop) qui est une association du 3C avec du ChIP. Plus récemment, une technique combinant le 3C avec du séquençage à haut débit (Hi-C) a été mise au point. Cette technique permet d'obtenir des résultats de haute résolution, sur de grandes portions de chromosomes et sur un grand nombre de cellules mais, tout comme les précédentes, elle ne permet pas de visualiser au sein du noyau les interactions observées (Bickmore, 2013; Hu, Deng, Qin, & Liu, 2013; Lieberman-Aiden et al., 2009; Schwartzman & Tanay, 2015; Wen & Tang, 2018).

## V. Les relations entre les différentes marques épigénétiques

Les marques épigénétiques citées ci-dessus ont, seules, un impact sur l'expression des gènes dans la cellule mais il est à présent acquis que ces modifications interagissent pour permettre une régulation particulièrement subtile et précise de l'expression des gènes, ceci de façon spécifique des différents tissus et types de cellules. Par exemple, il paraît naturel que l'acétylation des histones, diminuant l'affinité entre l'ADN et le nucléosome, intervient sur l'accessibilité de l'ADN et le positionnement des nucléosomes. Ainsi, une désacétylation des histones d'un nucléosome stabilise son positionnement sur l'ADN (DesJarlais & Tummino, 2016; Richards & Elgin, 2002). De plus, il a été montré que de nombreuses HDAC possèdent un domaine de liaison aux groupements méthyles (MBD) et peuvent donc directement interagir avec des régions d'ADN méthylé. Elles ciblent alors les nucléosomes à désacétyler, favorisant ainsi la compaction de la chromatine dans les régions fortement méthylées et entraînant donc la répression des gènes sous-jacents (DesJarlais & Tummino, 2016). Enfin, il existe une communication entre les HDAC et les méthyltransférases d'histone, notamment les protéines du groupe Polycomb. Il a été montré que ces protéines étaient régulées par un long ARN non-codant, HOTAIR. Ainsi, il existe bel et bien une collaboration entre les différentes marques épigénétiques pour réguler la transcription des gènes (DesJarlais & Tummino, 2016; Furuya et al., 2019; Richards & Elgin, 2002; Tsai et al., 2010).

Un exemple précis de cette collaboration est l'inactivation du chromosome X chez les femelles mammifères, qui fait intervenir le long ARN non-codant « *X-inactive-specific transcript* » (Xist), la désacétylase d'histone HDAC3, le complexe PRC2 catalysant la méthylation de H3K27 et l'abolition de la compartimentation en TAD due à l'inhibition de la

liaison de la cohésine sur les sites inactivés (Grewal & Moazed, 2003; Robert Finestra & Gribnau, 2017).

Un dernier exemple est l'effet TPE réprimant l'expression des gènes situés à proximité des télomères. Comme dit plus haut, cette répression est due à la proximité de l'hétérochromatine des télomères avec le locus du gène à réguler. Plus précisément, il s'agit en fait d'une expansion de l'hétérochromatine constitutive à ces gènes cibles, et particulièrement de la propagation de la marque H3K9me3. Cette propagation est réalisée par la coopération des méthyltransférases d'histones de la famille SUV39, catalysant la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3, et de la protéine HP1, capable de reconnaître cette marque et de recruter les enzymes précédemment citées. En effet, comme évoqué précédemment, HP1 peut reconnaître et se fixer sur les nucléosomes possédant la marque H3K9me3 grâce à son domaine de liaison bromo et recruter SUV39H2, une enzyme catalysant la triméthylation de H3K9 et possédant elle-aussi un domaine bromo. Ces deux protéines se recrutent donc mutuellement et forment ainsi une boucle pour propager la marque H3K9me3 aux nucléosomes voisins. Le phénomène TPE-OLD agit de la même manière après rapprochement des télomères et des gènes cibles (Carelli et al., 2017; Decottignies, 2014; W. Kim et al., 2016; Ottaviani, Gilson, & Magdinier, 2008; Robin et al., 2014; J. Wang et al., 2014).

Ce phénomène fait intervenir les télomères, une structure très particulière spécifique des chromosomes linéaires à laquelle je vais à présent m'intéresser, de même qu'à l'enzyme qui permet leur maintien, la télomérase.

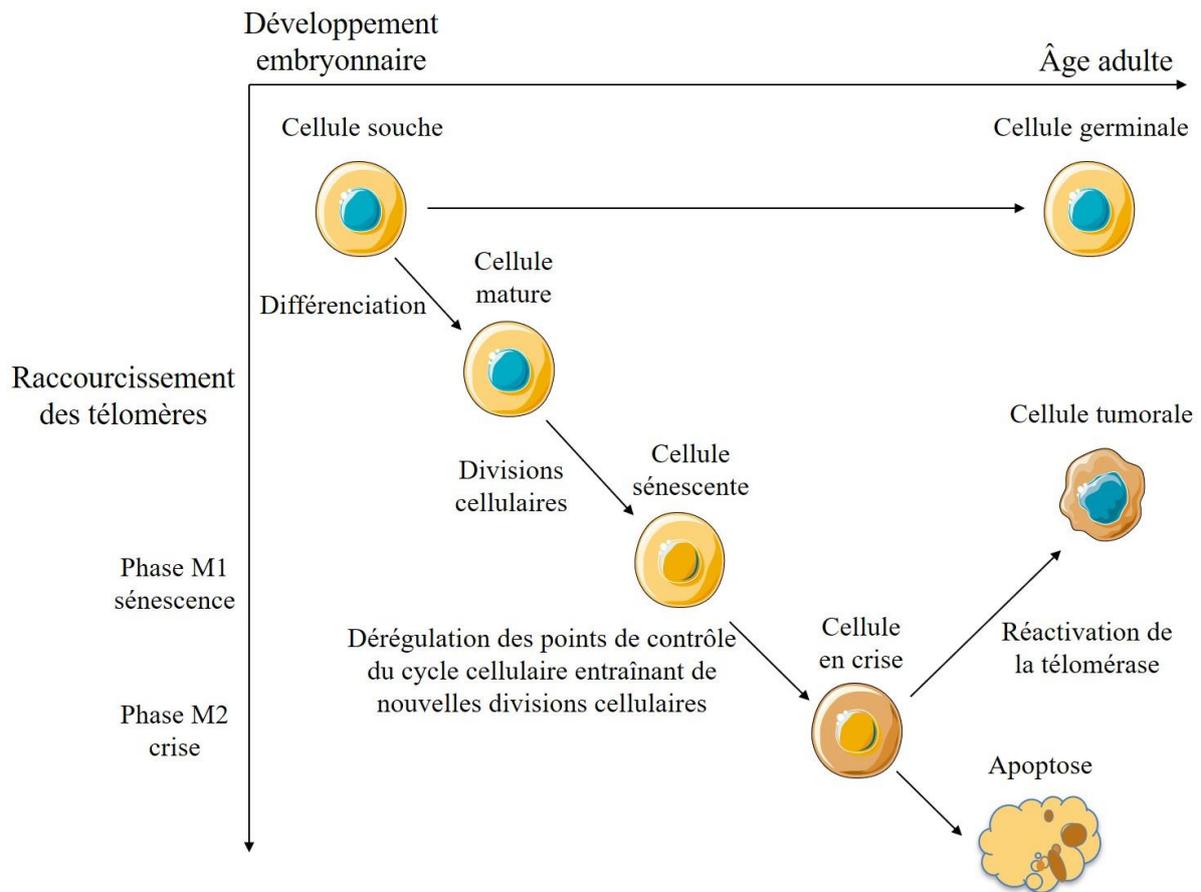
## Partie 3 : Les télomères et la télomérase

### I. Les télomères, protecteurs de l'information génétique

#### 1. Une structure spécifique des chromosomes linéaires

Les télomères constituent une coiffe située à l'extrémité des chromosomes linéaires. Ces structures nucléoprotéiques ont pour rôle la protection des extrémités des chromosomes et donc de l'information génétique qu'ils contiennent en empêchant que les extrémités soient reconnues comme des cassures double-brin et donc pris en charge par les systèmes de réparation d'ADN de la cellule. Les télomères raccourcissent au cours des cycles de divisions cellulaires successifs du fait que les polymérase d'ADN ne peuvent pas répliquer intégralement les extrémités des chromosomes. Ce phénomène est appelé problème de répllication des extrémités (Cleal, Norris, & Baird, 2018; Levy, Allsopp, Futcher, Greider, & Harley, 1992; Soudet, Jolivet, & Teixeira, 2014; Wellinger, 2014). Le raccourcissement des télomères entraîne l'entrée en sénescence de la cellule lorsqu'ils atteignent une longueur limite. Les télomères de chaque chromosome ne sont pas nécessairement de taille égale à la naissance et leur érosion peut être plus ou moins rapide, ainsi, le plus court des télomères d'une cellule est celui qui déclenche l'entrée en sénescence (Blackburn, 1991; Bodnar et al., 1998; T. de Lange, 1994; Jafri, Ansari, Alqahtani, & Shay, 2016; McEachern, Krauskopf, & Blackburn, 2000; Shay & Wright, 2019; Strahl & Blackburn, 1996).

Certaines cellules arrivent à contourner cette entrée en sénescence grâce à une altération ou une mutation dans les points de contrôles du cycle cellulaire et continuent ainsi à se diviser. Leurs télomères ne cessent alors de raccourcir jusqu'à atteindre un deuxième stade d'arrêt de la prolifération : la crise. Cette phase est caractérisée par une forte instabilité génomique et un taux élevé de fusions « extrémité-extrémité » entre les chromosomes menant normalement les cellules à l'apoptose. Extrêmement rarement, une cellule peut échapper à l'apoptose en mettant en place un mécanisme de maintien des télomères, pour les rallonger ou stopper leur raccourcissement et sortir de la crise. C'est l'une des premières étapes de l'immortalisation des cellules et une phase cruciale de la carcinogenèse (**figure 12**) (T. de Lange, 1994; Hanahan & Weinberg, 2000; Harley & Villeponteau, 1995; Shay, 2016; Shay & Wright, 2019; Wyatt, West, & Beattie, 2010).



**Figure 12 : Raccourcissement des télomères et émergence d'une cellule tumorale (inspirée de (Harley & Villeponteau, 1995))**

Les télomères raccourcissent au cours des divisions cellulaires jusqu'à atteindre une taille limite entraînant le déclenchement de la signalisation des dommages à l'ADN et l'entrée en sénescence des cellules. Quelques rares cellules arrivent à contourner ce stade d'arrêt prolifératif grâce à une dérégulation des points de contrôle du cycle cellulaire. Ces cellules continuent alors à se diviser, leur télomère raccourcissant toujours, jusqu'à atteindre un deuxième stade d'arrêt de la prolifération : la crise. Cette étape est caractérisée par un équilibre entre la prolifération et l'apoptose et est particulièrement favorable à l'instabilité génomique. Finalement, la majorité des cellules entre en apoptose après cette phase mais, parfois, une acquiert un mécanisme pour rallonger les télomères (par réactivation de la télomérase dans plus de 90 % des cas) et peut sortir de la crise. Elle devient alors immortelle et ceci est une étape précoce et cruciale de la carcinogenèse.

Chez les vertébrés, les télomères sont composés de motifs répétés double-brin 5'-TTAGGG-3' sur le brin de l'extrémité 3', qui s'étendent sur dix à quinze kilobases chez l'homme, à la naissance, ainsi que d'une extension simple brin de cinquante à deux-cents nucléotides en position 3'. Le brin sens, avec l'extension, est nommé brin G car il est très riche en guanines du fait de la séquence répétée. De la même manière, le brin anti sens est nommé brin C car riche en cytosines (**figure 13**) (Blackburn, 1991; Palm & de Lange, 2008). Ces répétitions riches en G peuvent être transcrites en un ARNlnc : TERRA. Les télomères constituent une région d'hétérochromatine riche en marque H3K9me3 et sont liés par la protéine d'hétérochromatine 1 (HP1). De plus, les régions subtélomériques sont fortement méthylées (Azzalin, Reichenbach, Khoraiuli, Giulotto, & Lingner, 2007; Schoeftner & Blasco, 2010; Vera, Canela, Fraga, Esteller, & Blasco, 2008).

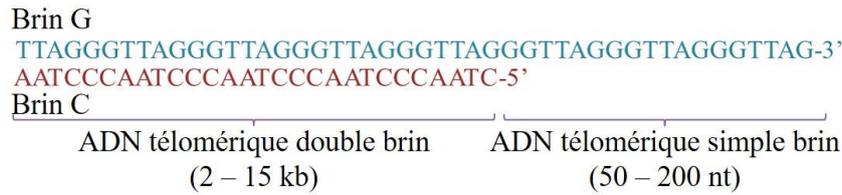


Figure 13 : La structure primaire de l'ADN télomérique (figure inspirée de Palm & de Lange, 2008)

Le brin sens est riche en guanines du fait de la séquence ADN des télomères « TTAGGG » et est ainsi nommé brin G, tandis que le brin antisens est nommé brin C puisque riche en cytosines. Le brin G forme une extension simple-brin.

La structure particulière des télomères peut être assimilée à une cassure de l'ADN par la cellule et, en l'absence d'une protection adéquate, ceux-ci sont repérés par les protéines signalant les dommages à l'ADN « *ataxia telangiectasia mutated* » (ATM) et « *ataxia telangiectasia and Rad3-related* » (ATR). Ces deux kinases déclenchent la réponse aux dommages à l'ADN en phosphorylant des protéines clefs qui recrutent ensuite la machinerie de réparation. Elles sont également impliquées dans l'arrêt de la prolifération. Il est donc essentiel pour les télomères de ne pas être reconnus par ces deux protéines afin de ne pas mettre en péril leur intégrité (Griffith et al., 1999; Palm & de Lange, 2008).

Une façon de se protéger de cette reconnaissance est la formation de structures secondaires : les boucles T (« *T-loops* »), pour télomères, et les boucles D (« *D-loops* »), pour déplacement. L'extrémité 3' simple-brin se replie sur elle-même et envahit une région en amont, double-brin, des télomères, formant ainsi la boucle T. L'extrémité s'associe au brin C, déplaçant le brin G qui forme alors la boucle D (figure 14). Ainsi protégé, le télomère n'est pas reconnu par les protéines de la signalisation ATR de dommages à l'ADN, repérant l'ADN simple brin (Griffith et al., 1999; Palm & de Lange, 2008).

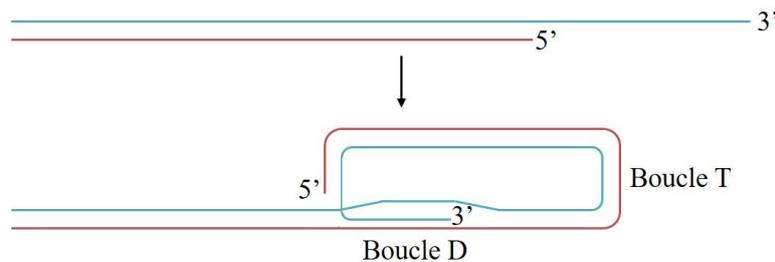
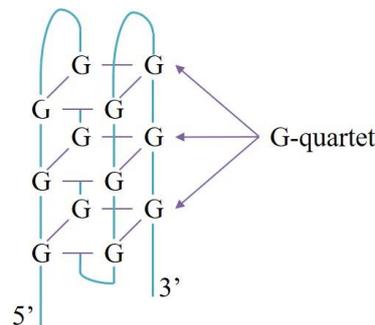


Figure 14 : Structures secondaires de l'ADN télomérique : les boucles T et D (figure inspirée de Palm & de Lange, 2008)

L'extension simple brin se replie sur lui-même à l'aide de son interaction avec les protéines associées aux télomères et envahit une région télomérique double-brin en amont, formant ainsi une boucle T, pour télomères. Cet envahissement entraîne le déplacement du brin G complémentaire, ce qui forme la boucle D, pour déplacement.

Les télomères, possédant un brin riche en guanines, peuvent également former des structures appelées G-quartet, qui s'associent ensuite pour former des G-quadruplexes (G4). La structure G-quartet nécessite la présence de quatre guanines proches, dans un même plan. Celles-ci s'associent alors par des liaisons de Hoogsteen, spécifiques des bases puriques (guanine et adénine), et forment ainsi le G-quartet. La structure en G-quadruplexe est un assemblage de

plusieurs G-quartet qui organise l'ADN en quatre brins (**figure 15**) (Blackburn, 1991; Lu, Zhang, Liu, Songyang, & Wan, 2013).



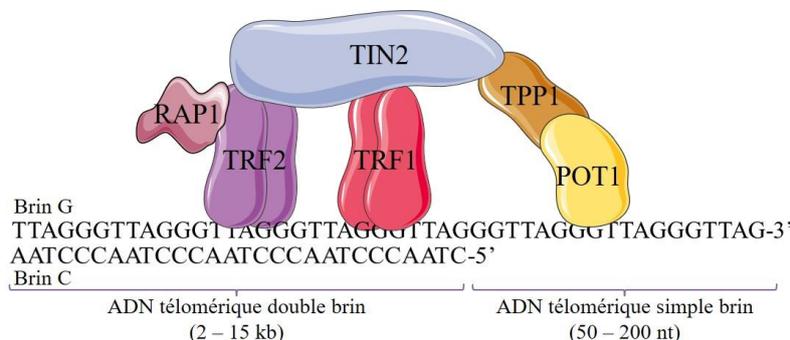
**Figure 15 : Structure en G-quadruplexe**

Trois G-quartets, formés par quatre guanines reliées par des liaisons de Hoogsteen, s'associent pour former un G-quadruplexe.

Les structures en G-quadruplexe se forment de façon spontanée mais ce n'est pas le cas des boucles T et D. De plus, il est nécessaire de défaire ces boucles pour permettre le passage de la fourche de réplication. Ainsi, plusieurs protéines sont associées aux télomères pour assurer leur protection, leur organisation tridimensionnelle et leur bon fonctionnement (Titia de Lange, 2018; McEachern et al., 2000; Palm & de Lange, 2008; Shay & Wright, 2019).

## 2. Les protéines associées aux télomères : le complexe shelterin

Le complexe shelterin est constitué de six protéines spécialisées qui se lient et interagissent avec les télomères. Elles se divisent en deux groupes. Trois se fixent directement sur les répétitions télomériques – « *telomere repeat-binding factor 1 et 2* » (TRF1 et TRF2) et « *protection of telomeres 1* » (POT1). Les trois autres protéines interagissent avec les précédentes pour permettre la mise en place et le bon fonctionnement du complexe shelterin – « *TIN2-POT1 interacting protein 1* » (TPP1), « *repressor/activator protein 1* » (RAP1) et « *TRF1-interacting nuclear factor 2* » (TIN2) (**figure 16**) (Y. Chen, 2018; Titia de Lange, 2018; Palm & de Lange, 2008; Shay & Wright, 2019).



**Figure 16 : Le complexe shelterin**

La protéine « protection of telomeres 1 » (POT1) se fixe sur le surplomb simple-brin des télomères et est liée par la protéine « TIN2-POT1 interacting protein 1 » (TPP1), elle-même associée à « TRF1-interacting nuclear factor 2 » (TIN2). TIN2 relie les deux protéines précédentes aux homodimères de « telomere repeat-binding factor 1 et 2 » (TRF1 et TRF2) se liant aux séquences double-brin de l'ADN télomérique. « repressor/activator protein 1 » (RAP1) se lie à TRF2 pour compléter le complexe shelterin.

Les protéines TRF1 et TRF2, organisées en homodimères, reconnaissent l'ADN double-brin des télomères et se fixent sur les répétitions 5'-TTAGGG-3'. Ces deux protéines présentent une structure en partie commune : un domaine d'homologie TRF (TRFH) ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN SANT/Myb en position C-terminale, avec SANT désignant les facteurs suivants : Swi3, Ada2, N-Cor et TFIIB. Ce domaine possède une affinité élevée pour la séquence 5'-YTAGGGTTR-3', avec Y = C ou T et R = A ou G. Le domaine TRFH de ces protéines leur permet de former des homodimères, qui se fixeront ensuite sur l'ADN. Le reste de leur structure est spécifique à chacune de ces deux protéines. TRF1 possède une extrémité N-terminale composée d'acides aminés acides, alors que TRF2 contient un domaine riche en glycines et arginines, qui sont des acides aminés basiques, le domaine GAR (Y. Chen, 2018; Titia de Lange, 2018; Griffith et al., 1999; Lu et al., 2013; McEachern et al., 2000; Palm & de Lange, 2008).

TRF1 régule négativement la longueur des télomères par un mécanisme de comptage mais facilite également la réplication efficace de l'ADN télomérique. TRF2, quant à elle, a un rôle de protection des télomères contre la reconnaissance comme cassure double brin en supprimant le mécanisme de réponse aux dommages à l'ADN réalisé par la voie de signalisation ATM. TRF2 est également requise pour la formation des boucles T formées par les télomères. En effet, le domaine TRFH de TRF2 permet à la protéine d'enrouler une centaine de paires de bases d'ADN télomérique autour d'elle (Y. Chen, 2018; Titia de Lange, 2018; Griffith et al., 1999; Lu et al., 2013; Martínez & Blasco, 2011; McEachern et al., 2000; Palm & de Lange, 2008).

La protéine RAP1 interagit directement avec TRF2 et c'est cette interaction qui permet sa localisation au niveau des télomères. Cette protéine ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN. RAP1 interagit avec TRF2 par son domaine de liaison C-terminal (RCT). Cette interaction favorise la reconnaissance spécifique de l'ADN double brin des télomères par TRF2 ainsi que l'inhibition de la voie de recombinaison homologue de réparation des dommages à l'ADN (Blackburn, 1991; Y. Chen, 2018; Titia de Lange, 2018; Lu et al., 2013; McEachern et al., 2000; Palm & de Lange, 2008).

La protéine TIN2 possède un domaine semblable à TRFH en position N-terminale qui lui permet de se lier à TRF2 et TPP1, ainsi qu'un motif de liaison à TRF1 à son extrémité C-terminale. TIN2 lie ainsi ensemble tous les éléments du complexe shelterin. De plus, TIN2 stabilise la liaison de TRF1 et TRF2 avec l'ADN télomérique et recrute TPP1 aux télomères (Y. Chen, 2018; Titia de Lange, 2018; Lu et al., 2013; McEachern et al., 2000; Palm & de Lange, 2008).

La protéine POT1 reconnaît l'extension simple brin en position 3' par l'intermédiaire de son domaine de liaison « *oligonucleotide/oligosaccharide binding* » (OB), possédant une forte affinité pour la séquence simple brin 5'-TAGGGTTAG-3'. POT1 est recrutée aux télomères par la protéine TPP1. Cette interaction permet également de réprimer la réponse aux dommages à l'ADN médiée par ATR en empêchant le recrutement de la protéine de réplication A (RPA). De plus, POT1 est rattachée au reste du complexe shelterin via son interaction avec TPP1 qui sert d'intermédiaire entre TIN2 et POT1. TPP1 possède trois

domaines de liaison lui permettant d'interagir avec trois protéines différentes : un domaine C-terminal d'interaction avec TIN2, un domaine central d'interaction avec POT1 et un domaine OB en position N-terminale, qui lui permet d'interagir avec la télomérase (Y. Chen, 2018; Titia de Lange, 2018; Lu et al., 2013; Palm & de Lange, 2008; Schmidt & Cech, 2015).

## II. La télomérase, un complexe ribonucléoprotéique

La télomérase est une enzyme ribonucléoprotéique dont le rôle principal est d'allonger les télomères au fil des cycles cellulaires en y ajoutant des répétitions 5'-TTAGGG-3' chez l'homme et les autres mammifères. Cette action permet de limiter le raccourcissement des extrémités des chromosomes. La télomérase est active dans les cellules souches, les cellules germinales et les cellules des tissus à fort potentiel réplicatif. En revanche, chez l'homme, elle est réprimée dans les autres cellules somatiques adultes (Bodnar et al., 1998; Cifuentes-Rojas & Shippen, 2012; Y.-S. Cong, Wright, & Shay, 2002; N. W. Kim et al., 1994; Schmidt & Cech, 2015; Shay & Wright, 2019; Y. Wang & Feigon, 2017; Wright, Piatyszek, Rainey, Byrd, & Shay, 1996).

Cette enzyme est réactivée et surexprimée dans plus de 90 % des cancers, les autres cancers contournent les stades de sénescence et d'apoptose par un mécanisme indépendant de la télomérase : le maintien alternatif des télomères (ALT) (Atkinson, Hoare, Glasspool, & Keith, 2005; Bollmann, 2008; Okamoto & Seimiya, 2019). La télomérase possède un rôle clef dans l'immortalisation des cellules et dans la progression tumorale. En effet, les cellules tumorales positives pour la télomérase possèdent des télomères extrêmement courts, d'une taille intermédiaire entre celle suffisante pour déclencher l'entrée en sénescence des cellules normales et celle des cellules en phase de crise. Ainsi, la réactivation de la télomérase est sûrement une étape précoce de la tumorigenèse, rendant les cellules immortelles et leur permettant ainsi de se diviser sans limite et d'accumuler les mutations qui favoriseront l'émergence des clones tumoraux (Dudognon et al., 2004; Meyerson et al., 1997). De plus, il a été montré un rôle de la télomérase dans l'inhibition de l'apoptose et la promotion de la prolifération cellulaire, ce qui ajoute un avantage supplémentaire aux cellules tumorales (Bollmann, 2008; Dudognon et al., 2004; Khattar et al., 2016; Martínez & Blasco, 2011; J. Zhou, Ding, Wang, & Cong, 2014).

Du fait de sa surexpression dans les cellules tumorales, la télomérase constitue une cible thérapeutique de choix pour le développement de traitements anti-cancéreux. De nombreux inhibiteurs de la télomérase et des télomères ont été développés mais présentent, pour la majorité d'entre eux, une faible efficacité (Guittat et al., 2004; Sprouse, Steding, & Herbert, 2012). De plus, bien que la télomérase soit inactive dans la plupart des cellules somatiques adultes, elle est exprimée dans certaines cellules à haut potentiel prolifératif. Ainsi, des traitements la ciblant peuvent présenter de graves effets secondaires sur ces cellules. De même, les inhibiteurs des télomères, et particulièrement des G-quadruplexes, peuvent mener à une toxicité élevée dans l'ensemble des cellules puisque ces structures sont présentes dans tout l'organisme, où elles protègent les extrémités des chromosomes linéaires. Pour ces raisons, les inhibiteurs de la télomérase développés jusqu'à présent sont associés à une

toxicité à long terme et ceux ciblant les télomères sont associés à une toxicité à court terme (Guittat et al., 2004; Sprouse et al., 2012).

De plus, les traitements ciblant la télomérase présentent un point faible particulièrement important : ils nécessitent plusieurs divisions cellulaires, et donc un temps certain, pour montrer leurs effets par rapport au raccourcissement des télomères des cellules ciblées. Ainsi, un traitement ciblant uniquement cette enzyme n'est pas toujours utilisable pour des cas de cancers à un stade avancé. Cependant l'association d'un traitement anti-télomérase avec une chimiothérapie peut favoriser la mort des cellules cancéreuses (Gomez, Armando, Cerrudo, Ghiringhelli, & Gomez, 2016; Jafri et al., 2016; Sprouse et al., 2012). La télomérase possédant cependant des rôles indépendants des télomères, des traitements la ciblant pourraient avoir des effets antiprolifératifs ou favoriser l'apoptose des cellules tumorales (F. Pendino et al., 2006; Stewart et al., 2002). Il est donc essentiel d'étudier cette enzyme pour développer des traitements présentant une meilleure efficacité et une toxicité moindre.

La télomérase est constituée d'au moins deux sous-unités – une sous-unité catalytique et une matrice ARN pour l'allongement des télomères – nécessaires à son activité minimale *in vitro*. Des protéines d'assemblage sont également associées à la télomérase pour assurer son bon assemblage et son bon fonctionnement *in vivo* (Cohen et al., 2007; Lingner et al., 1997; Venteicher, Meng, Mason, Veenstra, & Artandi, 2008). De plus, comme dit précédemment, le complexe shelterin et le complexe télomérase interagissent pour assurer la protection et le maintien des télomères (Jafri et al., 2016; Okamoto & Seimiya, 2019; Palm & de Lange, 2008).

L'association d'une sous-unité catalytique et d'un ARN matrice spécifique des répétitions télomériques font de la télomérase une transcriptase inverse hautement spécialisée. Cette holoenzyme agit de façon processive chez l'homme, c'est-à-dire qu'elle peut ajouter plusieurs répétitions télomériques avant de se dissocier de l'ADN et ceci requiert une certaine souplesse de la protéine qui doit subir plusieurs réarrangements pour réaliser cette activité de processivité d'addition de répétitions (Podlevsky & Chen, 2012; Schmidt & Cech, 2015; Y. Wang & Feigon, 2017). L'allongement des télomères par la télomérase se déroule en trois étapes, toutes pendant la phase S de réplication ou de synthèse d'ADN du cycle cellulaire. La première est la liaison à l'ADN et le bon positionnement de l'enzyme, favorisés par la protéine TPP1 du complexe shelterin qui recrute la télomérase au niveau des télomères et la positionne correctement. La seconde étape est l'action enzymatique et donc l'allongement des télomères par complémentarité de la matrice ARN avec le brin G, formant ainsi un hybride ADN/ARN. Enfin, la troisième et dernière étape est la translocation de l'enzyme sur le brin et son déplacement jusqu'à l'extrémité 3' de la matrice ADN pour réhybrider l'ARN et continuer l'élongation. L'arrêt de l'élongation se fait grâce à l'interaction de l'enzyme avec un complexe CST constitué des protéines CTC1, STN1 et TEN1. Ce complexe dissocie la télomérase des télomères et achève ainsi leur élongation (Parks & Stone, 2017; K. Tomita, 2018; Y. Wang & Feigon, 2017).

La télomérase étant composée de deux sous-unités différentes ainsi que de protéines servant notamment à son bon assemblage, je vais à présent m'intéresser à ces trois composants de l'enzyme.

## 1. La sous-unité catalytique : hTERT

Dans les cellules normales adultes humaines, la sous unité transcriptase inverse de la télomérase (hTERT) constitue le facteur limitant l'activité de l'enzyme. En effet, hTERT n'est exprimée que dans les cellules souches, les cellules germinales et les cellules à fort potentiel prolifératif et corrèle fortement avec l'activité de l'enzyme alors que la composante ARN de l'enzyme est présente dans toutes les cellules adultes. hTERT est également surexprimée dans les cancers réactivant la télomérase (Bernardes de Jesus & Blasco, 2013; Y. S. Cong, Wen, & Bacchetti, 1999).

La protéine hTERT comporte quatre domaines essentiels à son bon fonctionnement. L'extrémité N-terminale est composée de deux domaines : le domaine N-terminal essentiel (TEN) qui constitue le point d'ancrage de l'enzyme sur la protéine TPP1 du complexe shelterin, et possède une affinité de liaison pour l'ADN simple brin, et le domaine de liaison à l'ARN (TRBD) qui permet l'interaction entre hTERT et la sous-unité ARN de la télomérase. Ces deux domaines sont reliés par une région dite « linker ». Le domaine possédant l'activité de transcription inverse (RT) est situé juste après le domaine TRBD et interagit avec la sous-unité ARN de la télomérase. Ce domaine est constitué de sept motifs RT assurant l'activité de l'enzyme. Le rôle de l'extension C-terminale (CTE) est encore obscur mais ce domaine présenterait une fonction de stabilisation de l'hybride ARN/ADN formé lors de l'élongation des télomères par la télomérase (figures 17) (Hukezalie & Wong, 2013; Wyatt et al., 2010).



Figure 17 : Partie codante du gène hTERT (figure inspirée de Wyatt et al., 2010)

Le gène hTERT est composé de quatre domaines principaux et d'une région de liaison « linker ». Les domaines TEN et TRBD sont les domaines de liaison de hTERT à TPP1 et hTR respectivement. Le domaine RT possède l'activité catalytique de la protéine et le domaine CTE est important pour la formation de la structure tri-dimensionnelle de la protéine. La numérotation correspond aux acides aminés constituant la protéine, qui en compte 1132 au total.

Des études ont montré que le domaine CTE peut interagir avec l'extrémité N-terminale de hTERT pour former une structure en anneau (figure 18) (Hukezalie & Wong, 2013; Wyatt et al., 2010).

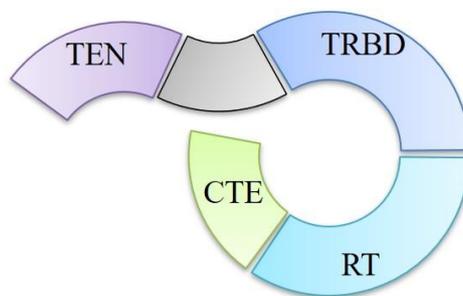


Figure 18 : Structure tertiaire schématique de la protéine hTERT

La protéine hTERT possède une structure tri-dimensionnelle en anneau.

## 2. La sous-unité ARN : hTR

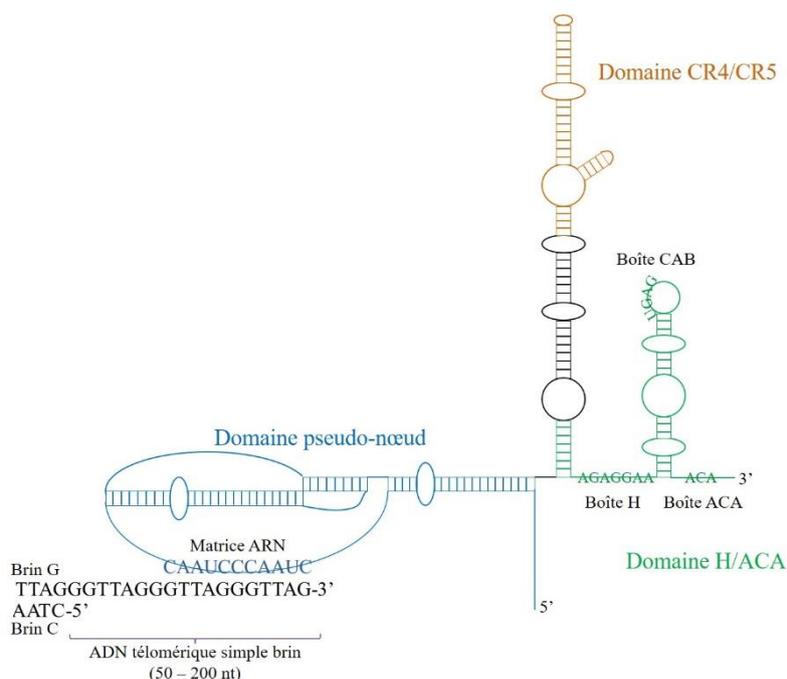
La télomérase n'a pas besoin de faire appel à une amorce ARN pour allonger les télomères car elle possède déjà une matrice ARN jouant ce rôle : l'ARN de la télomérase (hTR). Contrairement à hTERT, hTR est exprimé de façon ubiquitaire dans l'ensemble des cellules humaines (Avilion et al., 1996; Feng et al., 1995; Musgrove, Jansson, & Stone, 2018; Podlevsky & Chen, 2012; Shippen-Lentz & Blackburn, 1990; Wyatt et al., 2010).

L'ARN hTR mature est composé de 451 nucléotides et n'a pas de queue poly-adénylée (poly(A)). Cette sous-unité de la télomérase est composée de trois domaines nécessaires à son bon fonctionnement : le domaine H/ACA où se trouvent plusieurs sites de liaison aux protéines associées à la télomérase, le domaine CR4/CR5 qui est le lieu d'interaction avec la sous-unité protéique hTERT, et le domaine pseudo-nœud (**figure 19**) (Chan, Wang, & Feigon, 2017; Feng et al., 1995; MacNeil, Bensoussan, & Autexier, 2016; Musgrove et al., 2018; Y. Wang & Feigon, 2017; Wyatt et al., 2010).

Le domaine pseudo-nœud constitue l'extrémité 5' de hTR. Il contient la matrice ARN permettant à la télomérase d'ajouter des répétitions aux télomères, un élément « frontière » pour la matrice et un pseudo-nœud qui est attaché à l'extrémité 3' de la matrice par une région simple-brin (Chan et al., 2017; Musgrove et al., 2018; Wyatt et al., 2010). Il a été montré une corrélation directe entre l'activité de la télomérase et la stabilité de ce domaine, qui est essentiel au bon fonctionnement de l'enzyme. Cette stabilité est obtenue principalement grâce à une structure tertiaire particulière entre les différents éléments de ce domaine pseudo-nœud (Chan et al., 2017; Musgrove et al., 2018).

La matrice ARN, composée de la séquence 5'-CAAUCCCAAUC-3', s'hybride avec environ deux répétitions télomériques 5'-TTAGGG-3'. Elle permet ainsi à la sous-unité catalytique de l'enzyme d'ajouter plusieurs répétitions à la suite. Les éléments frontières possèdent une affinité élevée pour le domaine TRBD de la protéine hTERT et permettent ainsi le fonctionnement correct du complexe enzymatique en empêchant un traitement aberrant de la matrice ARN et le traitement de nucléotides extérieurs à celle-ci (Chan et al., 2017; Feng et al., 1995; Wyatt et al., 2010).

Le domaine des régions conservées 4 et 5 (CR4/CR5) est un domaine formant une hélice où se fixe la protéine hTERT lorsque le complexe enzymatique de la télomérase est assemblé (Chan et al., 2017; Musgrove et al., 2018; Y. Wang & Feigon, 2017; Wyatt et al., 2010).



**Figure 19 : Structure secondaire de l'ARN hTR**

hTR possède trois domaines importants pour sa fonction : le domaine pseudo-nœud contenant la matrice ARN nécessaire à l'addition de répétitions télomériques par la télomérase, les domaines CR4/CR5 et H/ACA permettant respectivement la liaison à la sous-unité catalytique hTERT et aux protéines associées au complexe.

Le domaine contenant les motifs de liaison nommés boîte H et boîte ACA (domaine H/ACA), constitue l'extrémité 3' de l'ARN hTR. Il s'agit d'un domaine similaire à ceux retrouvés dans les ARN spécifiques des petits corps de Cajal. Il possède également, en plus des deux motifs précédemment cités, une boîte CAB, motif de liaison de facteurs de transport dans les corps de Cajal. Ces différents motifs permettent à des protéines de s'associer à hTR et, ainsi, à la télomérase (Chan et al., 2017; Cohen et al., 2007; Hukezalie & Wong, 2013; Schmidt & Cech, 2015).

### 3. Les protéines associées au complexe

Les protéines associées à la télomérase sont au nombre de sept. Cinq interagissent avec la sous-unité hTR, dont quatre font partie de la famille des protéines H/ACA et se lient au domaine du même nom, les deux autres interagissent avec les deux sous-unités de la télomérase. Ces protéines sont essentielles pour la biogenèse de la télomérase et l'assemblage correct de ses deux sous-unités principales hTR et hTERT (Chan et al., 2017; Hukezalie & Wong, 2013; Schmidt & Cech, 2015; Wyatt et al., 2010).

Les protéines du groupe H/ACA sont la dyskérine, la protéine nucléaire 10 (NOP10), la protéine « *ribonucleoprotein homolog 2* » (NHP2), et la protéine « *glycine arginine rich protein 1* » (GAR1) (Hukezalie & Wong, 2013; Podlevsky & Chen, 2012). La protéine « *telomerase Cajal body protein 1* » (TCAB1) est celle qui cible la télomérase dans les corps de Cajal où elle est assemblée puis stockée en dehors de la phase S, pendant laquelle l'enzyme est active. TCAB1 se fixe sur la boîte CAB de hTR. Il semblerait que cette protéine ne reste pas fixée sur l'enzyme une fois celle-ci assemblée et opérationnelle (Hukezalie &



Cong et al., 2002; Deville, Hillion, & Ségal-Bendirdjian, 2009; MacNeil et al., 2016; Wojtyla, Gladych, & Rubis, 2011).

## 1. La régulation de l'enzyme

Pour pouvoir allonger les télomères, la télomérase doit y être recrutée et s'y lier. Cette interaction n'a lieu qu'en phase S du cycle cellulaire, seule phase où hTERT et hTR colocalisent dans les corps de Cajal (Wojtyla et al., 2011). C'est dans ces corps nucléaires que la télomérase est assemblée grâce aux protéines associées au complexe. La délétion de ces protéines empêche l'assemblage correct de l'enzyme et donc son activité. De plus, une partie des corps de Cajal est localisée aux télomères lors de la phase S, permettant ainsi à la télomérase d'être proche de son substrat. Cependant, la télomérase peut être séquestrée dans le nucléole, où elle ne peut être au contact des télomères, et est ainsi régulée négativement (Cifuentes-Rojas & Shippen, 2012; Deville et al., 2009; Wojtyla et al., 2011).

Une fois à proximité des télomères, l'enzyme doit encore y être recrutée. Ceci est réalisé par la protéine du complexe shelterin TPP1. Si cette interaction est rompue, l'activité de la télomérase est inhibée (MacNeil et al., 2016; Wojtyla et al., 2011). Un autre facteur régulant l'activité de la télomérase est la protéine POT1. En effet, bien que son partenaire, TPP1, ait un effet activateur sur la télomérase, POT1 a un rôle de répresseur. Ce membre du complexe shelterin est capable de se fixer à l'extrémité de l'extension simple-brin des télomères et d'y recruter le complexe CST, qui bloque l'activité de la télomérase et l'oblige à se dissocier des télomères (MacNeil et al., 2016). Enfin, les protéines TRF1 et TRF2 du complexe shelterin peuvent également réguler l'activité de la télomérase en formant les boucles T et D qui lui empêchent l'accès aux télomères. Il a été montré que leur surexpression dans des cellules positives pour la télomérase réprimait l'activité de celle-ci (Y.-S. Cong et al., 2002; Okamoto & Seimiya, 2019; Wojtyla et al., 2011). De plus, la télomérase semble avoir une préférence pour les télomères courts, moins riches en complexe shelterin et moins sujets à former des boucles T (Cifuentes-Rojas & Shippen, 2012; Y.-S. Cong et al., 2002; MacNeil et al., 2016; Okamoto & Seimiya, 2019).

## 2. La régulation de hTR

La sous-unité ARN de la télomérase, hTR, possède une demi-vie de plusieurs jours dans les cellules, contrairement à l'enzyme complète qui est dégradée au bout de quelques heures, comme la protéine hTERT. Ainsi, il a longtemps été supposé que la régulation de hTR n'intervenait pas dans la régulation de l'enzyme (Guilleret, Yan, Guillou, et al., 2002). On sait à présent que le contraire est vrai même si l'impact sur l'activité de l'holoenzyme est moindre par rapport à la régulation de hTERT. Cette sous-unité ARN peut être régulée par différents mécanismes. Tout d'abord au niveau du gène *hTR* mais aussi par des modifications post-transcriptionnelles directement au niveau de l'ARN formé. Le gène *hTR*, situé sur le bras long du chromosome 3 (3q26.3), possède plusieurs sites de liaison pour des facteurs de transcription et diverses études ont montré que son expression est régulée positivement par la fixation des facteurs « *specificity protein 1* » (Sp1) et « *hypoxia inducible factor 1* » (HIF-1)

alors qu'elle est réprimée par la fixation de Sp3 (Cifuentes-Rojas & Shippen, 2012; Guilleret, Yan, Guillou, et al., 2002).

En plus de cette régulation transcriptionnelle, le gène *hTR* est soumis à une régulation épigénétique. Premièrement, il possède un îlot CpG pouvant être méthylé. Il a été montré une corrélation entre une hyperméthylation de ce gène et une expression très faible, voire nulle dans les lignées cellulaires négatives pour la télomérase. En revanche, le gène *hTR* est majoritairement hypométhylé dans les lignées où il est transcrit et une variation dans son expression ne corrèle pas nécessairement avec une variation de son profil de méthylation, supposant ainsi que cette modification épigénétique a plutôt un rôle dans le maintien de l'état silencieux du gène et non dans sa répression (Gaspar et al., 2018; Guilleret, Yan, Guillou, et al., 2002).

Ensuite, il a été montré que l'expression du gène *hTR* corrèle avec une acétylation des histones H3 et H4 et, de la même manière, qu'une désacétylation au niveau du promoteur de ce gène réprime son expression (Atkinson et al., 2005; Cifuentes-Rojas & Shippen, 2012). Enfin, la sous-unité hTR est également régulée par des modifications post-transcriptionnelles. En effet, en tant qu'ARN transcrit par la polymérase d'ARN II, hTR nécessite une maturation après sa transcription. Celle-ci est régulée par sa liaison avec la dyskérine, qui bloque le clivage de l'ARN lorsque la taille requise est atteinte (MacNeil et al., 2016).

### 3. La régulation de hTERT

La sous-unité hTERT étant le facteur limitant l'activité de la télomérase, sa régulation est intimement liée à celle de l'enzyme. Cette régulation peut se dérouler à plusieurs niveaux : du gène à la protéine finale (Cifuentes-Rojas & Shippen, 2012; MacNeil et al., 2016; Meyerson et al., 1997).

#### i. Les facteurs de transcription

Le gène *hTERT* situé sur le bras court du chromosome 5, en position 5p15.33 à environ 2 Mb des télomères, est composé de seize exons et quinze introns et s'étend sur 42 kb. Ce gène est bidirectionnel et peut donc être transcrit dans les deux sens (Malhotra, Freeberg, Winans, Taylor, & Beemon, 2017; Stéphanie Renaud, Bosman, & Benhattar, 2003). Le promoteur de ce gène contient de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription. Plusieurs études ont montré que ces facteurs ont un rôle important dans la régulation de l'expression de *hTERT*, aussi bien de façon positive que négative (**figure 21**) (Akincilar, Unal, & Tergaonkar, 2016; Y. S. Cong et al., 1999; Y.-S. Cong et al., 2002; Daniel, Peek, & Tollefsbol, 2012; Hajj et al., 2017; Hsieh et al., 2017). Je vais évoquer ci-après les facteurs les plus connus.

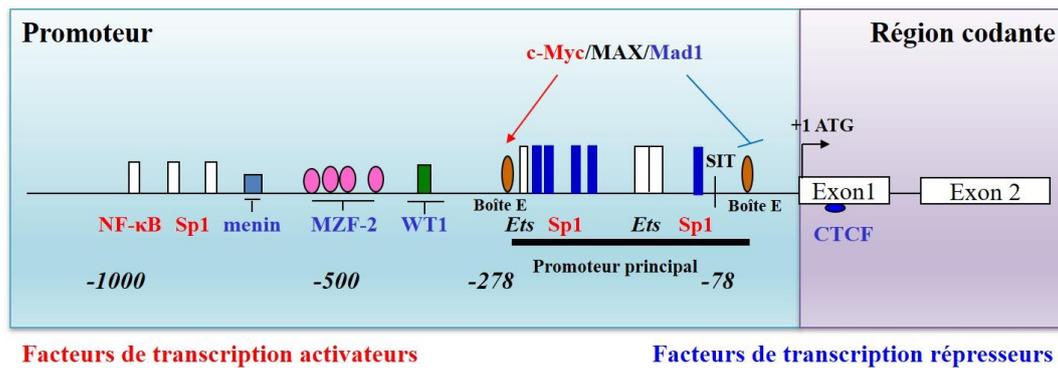


Figure 21 : Schéma du promoteur du gène *hTERT*

Le promoteur du gène *hTERT* présente un certain nombre de sites de fixation pour des facteurs de transcription répresseurs (indiqués en bleu) et activateurs (indiqués en rouge). La partie encadrée en bleu est le promoteur du gène et la partie en violet est le début de la région codante, avec les deux premiers exons du gène *hTERT*.

### a. Les facteurs activateurs

Le promoteur du gène *hTERT* ne possède pas les séquences usuelles de fixation de l'ARNpol II qui sont les boîtes TATA et CAAT (Y.-S. Cong et al., 2002). En revanche, cinq boîtes GC (5'-GGGCGG-3') sont situées aux alentours du SIT et ces sites sont importants pour la transcription des gènes ne contenant pas les motifs précédents. Ces motifs constituent des sites de liaison du facteur Sp1, connu pour interagir avec des protéines se liant aux boîtes TATA, qui favorise la transcription du gène *hTERT*. Plusieurs études ont montré que des mutations dans ces sites particuliers abolissent la transcription de *hTERT*, démontrant ainsi leur importance dans la régulation de ce gène (Cifuentes-Rojas & Shippen, 2012; Y.-S. Cong et al., 2002; MacNeil et al., 2016). Cependant, Sp1 étant exprimé dans l'ensemble des cellules, y compris celles n'exprimant pas *hTERT*, sa fixation sur le promoteur de ce gène n'est pas suffisante pour activer sa transcription. En revanche, il a été démontré qu'il peut coopérer avec plusieurs autres facteurs et en particulier avec un oncogène, c-Myc, pour réguler positivement la transcription du gène *hTERT* (Cifuentes-Rojas & Shippen, 2012; Y.-S. Cong et al., 2002; Daniel et al., 2012; Deville et al., 2009; MacNeil et al., 2016; Okamoto & Seimiya, 2019).

Le facteur c-Myc est un activateur important de l'expression de *hTERT*. Ce facteur possède deux sites de liaison dans le promoteur du gène *hTERT*, des « *enhancer boxes* » (E-boxes) (5'-CACGTG-3'), situés à 165 bp en amont et 45 bp en aval du SIT, et qui encadrent les sites de liaison du facteur Sp1 avec lequel c-Myc collabore pour activer l'expression de *hTERT* (Y.-S. Cong et al., 2002; Kyo, Takakura, Fujiwara, & Inoue, 2008). Cet oncogène impliqué dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules normales est surexprimé dans la plupart des cancers. Son affinité pour les E-boxes est plus importante lorsqu'il forme un hétérodimère avec la protéine « *Myc-associated factor X* » (Max) (Cifuentes-Rojas & Shippen, 2012; Y.-S. Cong et al., 2002; Hajj et al., 2017; Kyo et al., 2008).

Il existe d'autres facteurs de transcription activant l'expression de *hTERT*, dont les protéines de la famille « *E-twenty-six* » (Ets), ou encore « *nuclear factor kappa-B* » (NF-κB) qui ont été décrits dans la littérature (Akincilar et al., 2016; Daniel et al., 2012; Kyo et al., 2008; Ramlee, Wang, Toh, & Li, 2016).

## b. Les facteurs répresseurs

La protéine Max peut se lier avec c-Myc pour activer la transcription du gène *hTERT* mais peut également former un hétérodimère avec le facteur « *Max dimerization protein 1* » (Mad1) de façon compétitive et se fixer sur les motifs E-Boxes pour réprimer l'expression de ce gène. Il a été observé que le complexe Mad1/Max est présent sur le promoteur de *hTERT* dans les cellules normales sans activité de la télomérase et que ce complexe est remplacé par c-Myc/Max dans les cellules tumorales, confirmant ainsi le caractère compétitif de la liaison de ces deux facteurs antagonistes sur les E-Boxes du promoteur du gène *hTERT* (Y.-S. Cong et al., 2002; Daniel et al., 2012; Deville et al., 2009; Ramlee et al., 2016; F. Zhang, Cheng, Wang, & Zhu, 2016).

Dans les cellules souches embryonnaires ainsi que les cellules tumorales, la télomérase est active pour permettre la prolifération constante de ces cellules. Son activité est cependant inhibée lors de la différenciation et est ainsi indétectable dans les cellules différenciées (S. Wang, Hu, & Zhu, 2010; Xu et al., 2001). Les cellules leucémiques HL60, pouvant entrer en différenciation par un traitement au diméthylsulfoxyde (DMSO) ou un traitement à l'ATRA, ont été utilisées dans plusieurs études pour analyser la répression du gène *hTERT* lors de la différenciation. Ces études ont pu démontrer que, lors de la différenciation de ces cellules HL60, l'occupation des E-Boxes change sur le promoteur de *hTERT*. En effet, le complexe c-Myc/Max initialement présent et permettant l'activation du gène *hTERT* est remplacé par son antagoniste Mad1/Max. La diminution de l'expression ARNm de c-Myc, analysée par RT-PCR, se fait de façon progressive alors que l'augmentation de celle de Mad1 est très rapide, dans les premières 24 heures de différenciation des cellules. Cependant, l'expression de Mad1 recommence à diminuer en fin de différenciation, supposant ainsi que l'échange de ces deux facteurs n'est pas seul responsable de l'inhibition de l'expression de *hTERT* ni de son maintien à un état réprimé dans les cellules différenciées (Y. S. Cong & Bacchetti, 2000; Y.-S. Cong et al., 2002; Kyo et al., 2008; S. Wang et al., 2010; Xu et al., 2001).

La protéine « *Wilm's tumor 1* » (WT1) réprime l'expression de *hTERT* directement en se fixant sur son promoteur, environ 300 bp en amont du SIT, et indirectement en réprimant l'expression de c-Myc, dont le gène possède un site de fixation pour ce facteur. Le facteur WT1 n'est exprimé que dans certains tissus et exerce donc une régulation spécifique des tissus sur *hTERT*. Il a été montré qu'une surexpression de cette protéine entraîne une forte répression de l'expression de *hTERT* (Cifuentes-Rojas & Shippen, 2012; Y.-S. Cong et al., 2002; Daniel et al., 2012; Kyo et al., 2008).

La protéine p53, un suppresseur de tumeur très connu impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, peut également réprimer l'expression de *hTERT* mais cette action est favorisée par un autre facteur : Sp1. En effet, p53 possède deux sites de liaison sur le promoteur de *hTERT* mais ne peut s'y fixer qu'avec l'aide de Sp1, qui se retrouve donc à jouer un rôle de répresseur dans ce contexte précis. Il est à noter que cette protéine est dérégulée dans la plupart des cancers par une répression de son gène, dès un stade précoce de la carcinogenèse (Y.-S. Cong et al., 2002; Daniel et al., 2012; Deville et al., 2009)

La protéine CTCF est impliquée dans l'arrangement de la chromatine, comme je l'ai évoqué dans la partie précédente, mais possède également un rôle dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes. Cette protéine intervient dans la régulation de *hTERT* à deux niveaux : tout d'abord de façon directe en se fixant notamment sur le premier exon de *hTERT* et en régulant négativement sa transcription, mais aussi de façon indirecte en se fixant en amont du promoteur de *hTERT*, dans une région activatrice située à environ 5,0 kb du site d'initiation de la transcription, où elle joue un rôle d'insulateur en bloquant l'effet activateur de cette région (Eldholm, Haugen, & Zienolddiny, 2014; S. Renaud et al., 2007; Stéphanie Renaud, Loukinov, Bosman, Lobanenkova, & Benhattar, 2005). Plusieurs études ont montré que le facteur CTCF est fixé sur le premier exon du gène *hTERT* dans les cellules négatives pour la télomérase mais qu'il est absent dans les cellules présentant une activité de l'enzyme. Son effet répresseur est lié à sa capacité de remodelage de la chromatine (Daniel et al., 2012; Okamoto & Seimiya, 2019; S. Renaud et al., 2007; Stéphanie Renaud et al., 2003, 2005).

Il y a d'autres répresseurs pouvant interagir avec ce gène, dont les facteurs « *myeloid specific zinc finger protein 2* » (MZF2) et « *activator protein 1* » (AP1), décrits dans la littérature (Cifuentes-Rojas & Shippen, 2012; Daniel et al., 2012; Ramlee et al., 2016; F. Zhang et al., 2016; Yao Zhang et al., 2015).

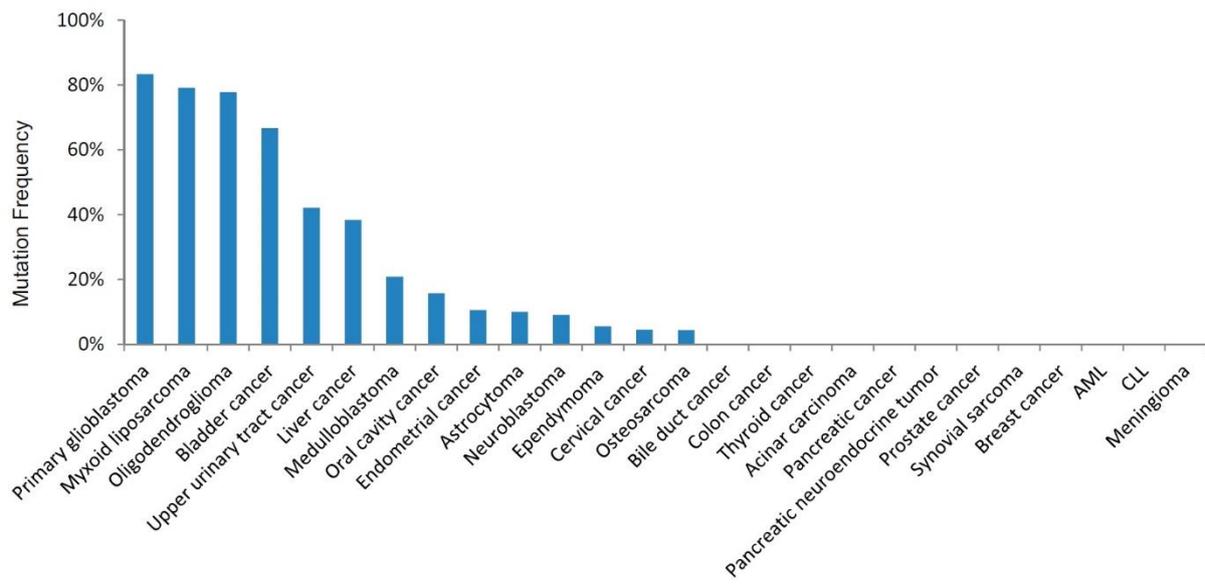
## ii. Les mutations et polymorphismes du gène *hTERT*

Plusieurs mutations somatiques dans le promoteur et la région codante du gène *hTERT* ont été observées dans divers types de cancers (**figure 22**). Elles sont cependant absentes des cellules normales. En particulier, deux mutations dans le promoteur de *hTERT* sont récurrentes dans les cancers : la mutation C228T, à 124 bp en amont du SIT, et la mutation C250T, à 146 bp en amont du SIT (Killela et al., 2013; Ramlee et al., 2016). Ces modifications interviennent de façon mono-allélique et il a été montré que l'allèle muté est actif et présente des marques épigénétiques associées à l'activation de l'expression alors que l'allèle non muté est inactif et présente des marques épigénétiques associées à la répression (Barthel et al., 2017; Leão et al., 2018; F. Zhang et al., 2016).

Ces deux mutations, caractérisées par le remplacement d'une cytosine par une thymine, entraînent la formation de nouveaux sites de liaison pour les facteurs de la famille Ets, 5'GGAA-3' sur le brin complémentaire, et notamment pour la protéine « *GA-binding protein  $\alpha$*  » (GABP $\alpha$ ). Cette fixation induit une surexpression du gène *hTERT* (Bernardes de Jesus & Blasco, 2013; Heidenreich & Kumar, 2017; Vinagre et al., 2013). Plusieurs études ont pu observer que, malgré cette régulation positive du gène, les télomères des cellules présentant les mutations sont courts. Ainsi, l'hypothèse a été faite que ces mutations sont précoces et constituent un mécanisme en deux étapes : une contribution au maintien des télomères les plus courts pour empêcher l'apoptose des cellules, ce qui favorise ensuite l'accumulation d'autres mutations qui contribuent à la tumorigenèse. Bien qu'elles soient présentes dans différents types de cancers, ces mutations ne le sont pas dans tous (Barthel et al., 2017; Killela et al., 2013; Ramlee et al., 2016; Vinagre et al., 2013). Il semblerait qu'elles surviennent de façon préférentielle dans les cellules tumorales issues de tissus à faible taux de

renouvellement (Chiba et al., 2015; Heidenreich & Kumar, 2017; Killela et al., 2013; Ramlee et al., 2016; Vinagre et al., 2013).

La **figure 22** issue de la publication de Killela et al., 2013 présente une distribution de ces mutations dans différents types de cancers. On peut constater que ces modifications sont absentes de cancers particulièrement fréquents comme les cancers du sein ou encore les cancers du côlon. De plus, elles sont absentes des leucémies aiguës myéloïdes, dont fait partie la leucémie aiguë promyélocytaire, mon modèle d'étude pour ce travail de thèse.



**Figure 22 : Distribution des mutations somatiques du gène *hTERT* dans différents types de cancers (Killela et al., 2013)**

Ce graphe tiré de la publication de Killela *et al* de 2013 présente la fréquence des mutations du gène *hTERT* dans différents types de cancers. On note qu'elles sont très fréquentes dans les glioblastomes primaires ou encore les cancers de la vessie mais absentes de cancers très répandus comme les cancers du côlon ou du sein. On peut également noter que ces mutations somatiques sont absentes des leucémies aiguës myéloïdes (AML) dont fait partie la leucémie aiguë promyélocytaire.

En plus de ces mutations somatiques, le promoteur de *hTERT* présente plusieurs polymorphismes dont certains ont été associés à des risques plus élevés de cancers, notamment du poumon (Pande et al., 2011; Yue Zhang et al., 2014), de la thyroïde (Ge et al., 2016), de l'œsophage et du pharynx (Yang Zhang et al., 2011; L. Zhou et al., 2016) ou encore du pancréas (M. Zhang et al., 2016). D'autres polymorphismes ont également été associés à un risque plus élevé de diabète (Montesanto et al., 2018). D'autres, particulièrement ceux présents dans les introns du gène *hTERT*, ont été associés à une diminution du risque de cancers de l'ovaire et du sein et à une répression de l'activité de *hTERT* (Beesley et al., 2011). Dans la leucémie aiguë promyélocytaire, deux polymorphismes notamment ont été trouvés, dans les exons 2 et 15 du gène *hTERT* avec une fréquence peu élevée (inférieure à 5 %) (Baljevic et al., 2016).

Le locus du gène *hTERT* est également sujet à des réarrangements chromosomiques et plus particulièrement à des amplifications. En effet, plusieurs études ont montré que le chromosome 5, sur lequel est situé le gène *hTERT*, existe en plus de deux copies dans de

nombreuses cellules tumorales, sans discrimination de type cellulaire ou de tissu affecté (Barthel et al., 2017; Cao, Bryan, & Reddel, 2008; Leão et al., 2018; A. Zhang et al., 2000). Dans une étude s'intéressant aux altérations du gène *hTERT* dans différentes pathologies cancéreuses, il a été montré que le locus de ce gène est amplifié dans environ 4 % des cancers analysés (Barthel et al., 2017). De même, ce locus est sujet à des réarrangements chromosomiques entraînant un repositionnement du gène *hTERT* à proximité de régions activatrices, favorisant ainsi sa transcription (Y.-S. Cong et al., 2002; Leão et al., 2018; Ramlee et al., 2016; Ropio, Merlio, Soares, & Chevret, 2016; F. Zhang et al., 2016).

### iii. Les modifications épigénétiques

En plus de l'action directe des facteurs de transcription sur le gène *hTERT* et des modifications touchant son locus, de nombreux mécanismes épigénétiques contribuent à la régulation de celui-ci. Dans les cellules normales réprimant ce gène, celui-ci se situe dans une région d'hétérochromatine facultative dont les nucléosomes sont constitués d'histones hypoacétylés, ce qui contribue à son extinction. Le profil épigénétique de *hTERT* est considérablement différent dans les cellules souches et les cellules tumorales exprimant ce gène mais les mécanismes amenant à ces modifications de profil sont encore méconnus (Kyo et al., 2008; Lewis & Tollefsbol, 2016; Ramlee et al., 2016; Ropio et al., 2016; X. Zhao et al., 2016).

#### a. La méthylation de l'ADN et le positionnement des nucléosomes

Le promoteur du gène *hTERT* est particulièrement riche en guanines et cytosines, il fait partie des promoteurs contenant un îlot CpG et est ainsi susceptible d'être régulé par la méthylation de l'ADN (Devereux et al., 1999; Wick, Zubov, & Hagen, 1999). Cependant, les résultats obtenus dans les différentes études réalisées sont assez contradictoires entre eux et avec ce que l'on pourrait attendre de la méthylation d'un gène. En effet, il se trouve qu'une grande partie des cellules et lignées cancéreuses analysées exprimant *hTERT* est hyperméthylée sur son promoteur alors que la plupart des cellules somatiques et lignées réprimant ce gène le montre hypométhylé (Dessain, Yu, Reddel, Beijersbergen, & Weinberg, 2000; Guilleret & Benhattar, 2003; Guilleret, Yan, Grange, et al., 2002). Toutefois, certaines études semblent montrer le contraire (Shin, Kang, Dicterow, & Park, 2003). D'autres ne trouvent aucune corrélation particulière entre l'expression du gène et son état de méthylation (Devereux et al., 1999; J. Zhu, Zhao, & Wang, 2010).

Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette méthylation aberrante spécifique de ce gène. La première est que chaque équipe a utilisé une méthode d'analyse différente, avec des critères différents, des conditions d'analyses et des régions du gène différentes, n'obtenant ainsi qu'une partie des informations sur ce locus (Kyo et al., 2008; S. Lee, Borah, & Bahrami, 2017; Ropio et al., 2016; Zinn, Pruitt, Eguchi, Baylin, & Herman, 2007). La seconde est que cette méthylation aberrante serait en fait un moyen pour les cellules d'empêcher, ou au contraire de favoriser, la liaison de facteurs de transcription activateurs ou répresseurs. Par exemple, il est connu que le facteur CTCF est sensible à la méthylation et qu'il perd toute affinité pour son site de liaison si celui-ci est méthylé ou si les CpG proches le sont. Une étude récente a montré que, pour le gène *hTERT*, cette inhibition était due à la formation d'un

G-quadruplexe au niveau du site de liaison de CTCF favorisé par la méthylation de cette région du premier exon (P.-T. Li et al., 2017). Les facteurs c-Myc et WT1 sont également sensibles à la méthylation, ainsi celle-ci peut être activatrice ou répressive selon le contexte étudié (Choi et al., 2010; Leão et al., 2018; S. Renaud et al., 2007). La dernière hypothèse est que la méthylation n'interviendrait pas directement dans la régulation de l'expression de *hTERT* mais assurerait son état « actif » ou « inactif » une fois ce dernier établi et donc qu'il n'y aurait pas de corrélation précise entre le profil de méthylation et l'expression du gène (Dessain et al., 2000; Lewis & Tollefsbol, 2016; Ramlee et al., 2016). Toutes ces études s'accordent néanmoins sur un point : pour que le gène *hTERT* soit transcrit, il doit conserver une région hypométhylée s'étendant d'environ 200 bp en amont à 100 bp en aval du site d'initiation de la transcription afin de permettre à l'ARN polymérase II de s'y fixer et d'entamer la transcription (Avin et al., 2019; Choi et al., 2010; D. D. Lee et al., 2019; X. Zhao et al., 2016).

Dans les cancers présentant des mutations sur le promoteur du gène *hTERT*, il a été montré que l'allèle muté et l'allèle non muté sont différents d'un point de vue épigénétique. En effet, les mutations entraînent une surexpression de l'un des allèles alors que l'autre est éteint. Ceci se caractérise notamment par une différence dans les profils de méthylation sur ces deux allèles (Eckersley-Maslin & Spector, 2014; Stern et al., 2017). Il a été montré que l'allèle muté, et actif, est hypométhylé sur le promoteur du gène *hTERT* alors que l'allèle sauvage, et réprimé, est hyperméthylé, en particulier au niveau du site d'initiation de la transcription (Stern et al., 2017).

Une sous-régulation de l'expression de DNMT1 dans une lignée de cancer du côlon (HCT116) où le promoteur de *hTERT* est fortement méthylé, entraîne une répression du gène en déméthylant spécifiquement la région de fixation de CTCF, qui peut alors interagir avec *hTERT*. Ces résultats ont été retrouvés dans une lignée de cancer du sein, MCF7, mais pas dans des lignées de cancer cervical, HeLa, ni d'ovaire, SK-OV3. L'étude a montré que ces lignées étaient initialement moins méthylées sur le promoteur de *hTERT* que les deux répondant au traitement, supposant ainsi que ce phénomène est probablement spécifique du degré de méthylation basal du promoteur de *hTERT* (Choi et al., 2010).

Un traitement avec un agent déméthylant, la décitabine, dans différentes lignées cellulaires exprimant *hTERT* a permis d'obtenir un résultat similaire, avec une diminution de la méthylation du gène *hTERT* et ainsi une fixation du facteur réprimant CTCF sur le premier exon (Guilleret & Benhattar, 2003; S. Renaud et al., 2007). Cependant, cet effet semble dépendant d'autres critères puisqu'un traitement à la décitabine dans des cellules normales ou avec un phénotype ALT n'exprimant pas *hTERT* a au contraire entraîné une réexpression du gène (Atkinson et al., 2005). Ces résultats semblent soutenir l'hypothèse d'un rôle indirect de la méthylation du gène *hTERT* qui régulerait la fixation des facteurs de transcription ou l'action de protéines remodelant la chromatine plutôt que directement l'expression du gène (Avin, Umbricht, & Zeiger, 2016; Grandjenette et al., 2014; Z.-X. Zhang et al., 2014).

Dans les cellules normales somatiques où le gène *hTERT* est réprimé, il se trouve dans un locus d'hétérochromatine fortement compactée (S. Wang & Zhu, 2004). Ceci se caractérise

par un fort degré d'occupation par les nucléosomes. En revanche, dans les cellules souches et les cellules cancéreuses où il est exprimé, le gène *hTERT* possède une région déplétée en nucléosomes juste en amont du site d'initiation de la transcription, permettant la liaison et l'action de l'ARNpol II. On sait que la différenciation des cellules induit l'inhibition de l'activité de la télomérase, notamment en réprimant le gène *hTERT*, mais les mécanismes mis en jeu sont encore méconnus. Une étude a montré dans une lignée cellulaire de leucémie, HL60, que la première étape de répression de *hTERT* lors de la différenciation consiste en un rapprochement des nucléosomes et donc une fermeture de la région précédemment déplétée dans le promoteur du gène (S. Wang et al., 2010). Il semblerait que, lors d'une réactivation du gène *hTERT*, l'un des facteurs limitant soit la capacité des protéines remodelant la chromatine à créer une région déplétée en nucléosomes au niveau du SIT de *hTERT* (MacNeil et al., 2016; Szutorisz et al., 2003; S. Wang et al., 2010).

Il a également été montré dans une étude que les cellules positives pour la télomérase présentent une région déplétée en nucléosomes dans le deuxième intron du gène *hTERT*. Cette région a été déterminée par digestion par la DNase I, et constitue ainsi une région hypersensible à cette enzyme. L'étude de cette région dans les cellules où le gène *hTERT* est réprimé a montré qu'elle n'est pas accessible à l'enzyme de digestion et est donc protégée par des nucléosomes. Cet exemple montre à nouveau l'importance du positionnement des nucléosomes, et donc de l'accessibilité de l'ADN, dans la régulation du gène *hTERT* dans les cellules le réprimant (Szutorisz et al., 2003).

### b. Les modifications post-traductionnelles des histones

Les marques d'histones jouent un rôle essentiel dans la régulation de la transcription du gène *hTERT*. En effet, le profil de distribution de ces modifications est très différent entre les cellules normales où le gène est réprimé et les cellules cancéreuses où il est réactivé. Le gène *hTERT* se trouvant dans une région d'hétérochromatine dans les cellules somatiques adultes où il est réprimé, son promoteur est caractérisé par la présence de modifications post-traductionnelles des histones associées à ce type de chromatine. Dans ces cellules, le promoteur de *hTERT* présente une hypoacétylation de ses histones H3 et H4, ainsi qu'une forte présence des marques d'hétérochromatine H3K9me3 et H3K27me3 et une absence de la marque activatrice H3K4me3 (Y. S. Cong & Bacchetti, 2000; S. Wang & Zhu, 2004; F. Zhang et al., 2016).

Dans les cellules souches embryonnaires ainsi que les cellules tumorales, le promoteur de *hTERT* est caractérisé par des histones H3 et H4 acétylés ainsi que la présence de la marque activatrice H3K4me3 (Atkinson et al., 2005; Lewis & Tollefsbol, 2016). Comme évoqué précédemment, la différenciation des cellules entraîne l'inhibition de l'activité de l'enzyme. Plusieurs études se basant sur le modèle des lignées leucémiques HL60, où il est possible d'induire une différenciation, ont ainsi pu déterminer les différents facteurs entrant en jeu dans la répression de la télomérase lors de ce processus cellulaire. Notamment, il a été montré une désacétylation progressive des histones H3 et H4 ainsi qu'une disparition de la marque activatrice H3K4me3 sur le promoteur de *hTERT*. En parallèle, une augmentation progressive de la présence de la marque répressive H3K27me3 a été observée sur le promoteur du gène

*hTERT* lors de la différenciation des cellules HL60. Cependant, les études en question ont mis en évidence le fait que l'activité de la télomérase et l'expression ARNm de *hTERT* diminuent plus rapidement que ne se modifient les marques épigénétiques, supposant ainsi une coopération avec d'autres mécanismes de répression (Y. S. Cong & Bacchetti, 2000; L. Liu, Saldanha, Pate, Andrews, & Tollefsbol, 2004; S. Wang et al., 2010).

Pour compléter les études précédentes, d'autres laboratoires ont étudié l'effet d'un inhibiteur de désacétylases d'histones, la TSA, sur l'expression du gène *hTERT*, et notamment sur les modifications des histones, dans des cellules normales négatives pour la télomérase, dans des HL60 différenciées et dans des cellules tumorales (Y. S. Cong & Bacchetti, 2000; Lewis & Tollefsbol, 2016; F. Zhang et al., 2016). Ces équipes ont pu démontrer que la TSA entraîne la réactivation de l'expression de *hTERT* dans les cellules normales et les cellules HL60 différenciées, supposant ainsi un rôle important des HDAC dans la répression du gène *hTERT*. Les différentes équipes ont observé une induction de l'acétylation des histones H3 et H4 par la TSA dans ces cellules (Y. S. Cong & Bacchetti, 2000; Y.-S. Cong et al., 2002; Takakura et al., 2001; Xu et al., 2001). L'effet du traitement sur les cellules tumorales entraîne une répression du gène *hTERT* et une étude en particulier a montré que cette répression pouvait être due à une sous-régulation de la DNMT1 par la TSA (Choi et al., 2010).

Ces deux résultats ont été analysés en parallèle de ceux présentés précédemment concernant les facteurs de transcription c-Myc et Mad1. En effet, ces deux facteurs de transcription interagissent avec des enzymes pouvant modifier les histones. Plus précisément, il a été montré que c-Myc est capable de recruter un complexe co-activateur possédant une activité d'acétyltransférase d'histones pour favoriser l'expression de *hTERT* et que Mad1 peut s'associer à des désacétylases d'histones pour la réprimer (Y.-S. Cong et al., 2002; Kyo et al., 2008; F. Zhang et al., 2016). Un autre facteur a été associé à la régulation de *hTERT* par les HAT et les HDAC : Sp1. Il a été montré que ce facteur peut interagir avec p300, une HAT, mais également avec HDAC1 selon le contexte cellulaire, notamment (Y. S. Cong & Bacchetti, 2000; Y.-S. Cong et al., 2002; F. Zhang et al., 2016).

Les mutations conduisant à la surexpression du gène *hTERT* dans certains cancers sont associées à des profils épigénétiques différents entre l'allèle muté et l'allèle non muté. Il a notamment été montré que l'allèle muté, qui surexprime *hTERT*, est caractérisé par une abondance des marques activatrices H3K4me2 et H3K4me3. L'allèle non muté, quant à lui, est riche en marques répressives H3K9me3 et H3K27me3 (Heidenreich & Kumar, 2017; Ramlee et al., 2016; Stern et al., 2017; Stern, Theodorescu, Vogelstein, Papadopoulos, & Cech, 2015). Ceci démontre une coopération des différents facteurs impliqués dans la régulation du gène *hTERT* dans les cancers.

### c. Les ARN non-codants

En plus des modifications épigénétiques citées précédemment, il a été observé récemment une implication de différents ARN non-codants dans la régulation du gène *hTERT* (Lewis & Tollefsbol, 2016; Ropio et al., 2016). En particulier, de multiples micro ARN ont été impliqués dans la régulation du gène *hTERT* comme par exemple miR-196b et miR-512,

intervenant dans la prolifération cellulaire, ou encore miR-296, dans l'angiogenèse. Leur surexpression entraîne une répression du gène *hTERT* dans divers modèles de cancers, comme les cancers du sein ou les carcinomes du cou (Dinami et al., 2017; Jun Li, Lei, Xu, & Tao, 2015).

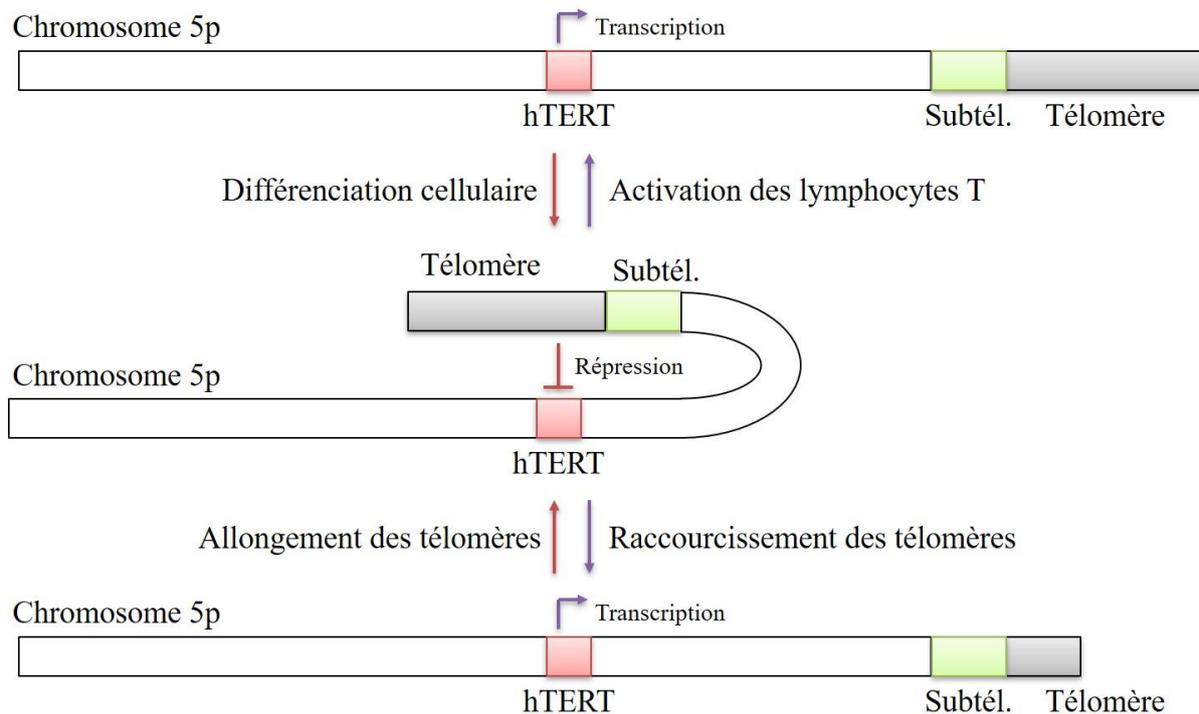
Des études récentes ont également montré l'implication de longs ARN non-codants dans la régulation du gène *hTERT* (El Hajj et al., 2018; Lewis & Tollefsbol, 2016; Malhotra et al., 2017). En particulier, la découverte de l'ARNlnc antisens associé au promoteur de *hTERT* (TAPAS), a permis de confirmer que ce promoteur est bidirectionnel et peut s'auto-réguler. En effet, il existe une corrélation inverse entre l'expression de *hTERT* et de TAPAS dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses. Une surexpression de l'ARN TAPAS induit une répression de l'expression du gène *hTERT* et l'inverse est également vrai. Le mécanisme mis en jeu est cependant encore obscur (Malhotra et al., 2017). Un autre ARNlnc, H19, a été corrélé à une régulation de l'expression de *hTERT* dans mon laboratoire d'accueil (El Hajj et al., 2018).

#### iv. L'environnement subnucléaire du gène *hTERT*

En plus des éléments transcriptionnels et épigénétiques régulant le gène *hTERT*, il a été montré que l'environnement subnucléaire, et en particulier sa position sur le chromosome, joue un rôle dans la régulation de ce gène dans des conditions données. L'effet TPE-OLD, ou effet de position des télomères sur de longues distances, a été associé à une régulation du gène *hTERT* dans des lignées cellulaires HL60 ainsi que des fibroblastes normaux. Le laboratoire de Jerry W. Shay ayant mis en évidence ce phénomène a émis l'hypothèse que les télomères se replient pour se retrouver à proximité des gènes à réguler et exercer ainsi leur effet répresseur de la même manière que lors d'un TPE classique (W. Kim et al., 2016; W. Kim & Shay, 2018; Shay & Wright, 2019).

Plus précisément, le laboratoire ayant étudié ce phénomène a pu observer que, dans des fibroblastes normaux jeunes, où *hTERT* est réprimé, les télomères forment une boucle pour se retrouver à proximité du gène *hTERT* et contribuer à sa répression (W. Kim et al., 2016; W. Kim & Shay, 2018). Cette boucle se défait lors du vieillissement des cellules, réalisé *in vitro*, et permet ainsi une répression moins forte du gène *hTERT*, qui peut alors être réactivé par d'autres mécanismes précédemment décrits. Ce phénomène est dû à un raccourcissement des télomères, qui ne peuvent ainsi plus former la boucle de répression (**figure 23, partie inférieure**). En effet, lorsque les télomères sont courts, l'équipe de Jerry W. Shay a montré qu'au moins un allèle de *hTERT* est séparé des télomères et que cet allèle permet la réactivation de la télomérase dans les cellules (W. Kim et al., 2016). Une autre observation faite par ce laboratoire est la capacité des télomères à former à nouveau cette boucle dans des cellules HL60 après différenciation par traitement au DMSO. Cette nouvelle boucle est formée sans tenir compte de la taille des télomères, présentant ainsi un autre mécanisme de mise en place de ce phénomène de répression du gène *hTERT*. Enfin, l'équipe de Jerry W. Shay a également montré que l'activation de lymphocytes T, réprimant *hTERT* et présentant une colocalisation du gène et des régions d'hétérochromatine des télomères, entraîne une réactivation de la télomérase et une séparation des deux locus, à nouveau sans changement

dans la taille des télomères (**figure 23, partie supérieure**) (W. Kim & Shay, 2018; Shay & Wright, 2019).



**Figure 23 : Effet de position des télomères sur de longues distances dans la régulation de *hTERT***

Dans les cellules réprimant *hTERT*, les télomères du bras court du chromosome 5 (chromosome 5p) où est situé le gène *hTERT* forment une boucle pour se retrouver à proximité de ce gène et réprimer son expression (schéma central). La réexpression du gène est associée à une ouverture de cette boucle (schémas du haut et du bas). Subtel. : région subtélomérique.

Le laboratoire de Jerry W. Shay a proposé une implication de TRF2 dans la mise en place de cette boucle (W. Kim et al., 2016). En effet, il a été montré que cette sous-unité du complexe shelterin était capable d'interagir avec des régions extra-télomériques, et notamment des G-quadruplexes (Hussain et al., 2017).

Ces observations apportent une information supplémentaire sur les mécanismes de régulation du gène *hTERT* qui sont donc multiples et interconnectés. La sous-unité catalytique de la télomérase peut également être sujette à des modifications de son ARN messager ou de la protéine finale.

## v. Les modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles

L'épissage alternatif de l'ARN messager *hTERT* donne naissance à plusieurs variants, dont une vingtaine a été décrite jusqu'à présent (Ludlow, Slusher, & Sayed, 2019; Okamoto & Seimiya, 2019). À l'exception de la forme complète de *hTERT*, aucun des variants décrits ne présente d'activité catalytique (Akincilar et al., 2016; Avin et al., 2016; Y.-S. Cong et al., 2002; Okamoto & Seimiya, 2019). Les différents variants d'épissage de *hTERT* sont obtenus par délétions partielles ou complètes d'exons ou insertions de séquences dans les introns

(Deville et al., 2009; Wick et al., 1999; Wojtyla et al., 2011). Les délétions peuvent advenir dans trois régions particulières situées entre les exons 4 et 13, codant le domaine RT de la sous-unité hTERT : la région alpha ( $\alpha$ ), qui s'étend de l'exon 5 à l'exon 9, la région bêta ( $\beta$ ), qui se situe entre les exons 7 et 8, et la région gamma ( $\gamma$ ), s'étendant de l'exon 11 à l'exon 12 (Ludlow et al., 2019; Okamoto & Seimiya, 2019). Quatre variants sont très fréquents et ont été retrouvés dans différentes cellules normales, en phase de « pré-crise » et dans des cellules avec un phénotype ALT. Certains ont également été avérés dans différents cancers (Ludlow et al., 2018; Wojtyla et al., 2011; Wong, Wright, & Shay, 2014). Le variant le plus courant dans les lignées cancéreuses est obtenu par délétion de la région  $\beta$  et est noté variant  $\beta$ -. Il est cependant distribué de façon plus éparse dans les cellules de patients, selon le tissu d'origine. La majorité de ces variants  $\beta$ - est dégradée par la machinerie de reconnaissance des ARNm non-sens du fait de la présence d'un codon stop prématuré dans l'exon 10 du gène *hTERT* (Avin et al., 2016; Ludlow et al., 2019; Wong et al., 2013, 2014). Les autres variants les plus fréquents sont le variant  $\alpha$ -, caractérisé par une délétion dans la région  $\alpha$ , le variant  $\gamma$ -, avec délétion de la région  $\gamma$ , et le variant  $\alpha$ - $\beta$ -, cumulant les délétions dans les régions  $\alpha$  et  $\beta$  (Ludlow et al., 2018; Sayed et al., 2019). La plupart des variants de hTERT, à l'exception de la forme complète et du variant  $\beta$ -, ont été caractérisés comme dominants négatifs contribuant à la répression du gène *hTERT* (Akincilar et al., 2016; Avin et al., 2016; Ludlow et al., 2019).

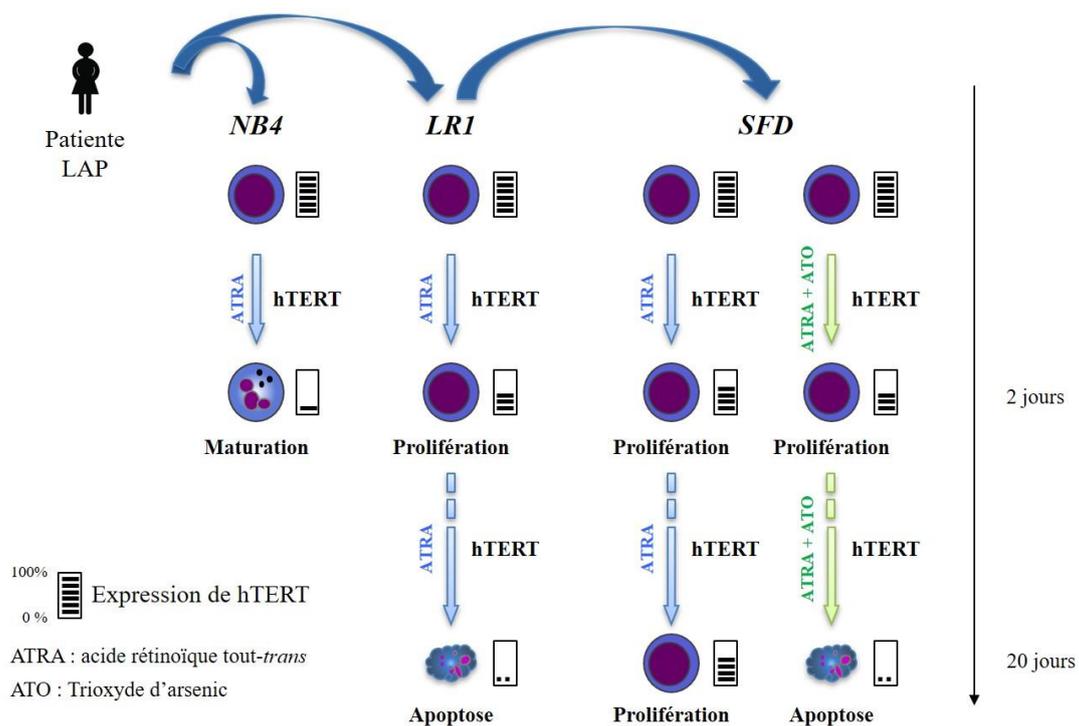
Une observation a été faite dans plusieurs cellules ne présentant aucune activité de la télomérase : elles peuvent tout de même exprimer *hTERT* et contenir la protéine. Ainsi, il a été déduit de cette observation que la protéine hTERT pouvait être sujette à des modifications post-traductionnelles (Cifuentes-Rojas & Shippen, 2012). La modification la plus observée est la phosphorylation de cette protéine. Celle-ci peut être associée à une régulation positive ou à une régulation négative de l'activité selon le résidu où elle est réalisée. En effet, plusieurs kinases ont été associées à ces phosphorylations et elles ne possèdent pas les mêmes résidus cibles. Deux kinases en particulier ont été intensément étudiées : la kinase Akt, qui phosphoryle les résidus sérine et thréonine, et la kinase « *Abelson tyrosine kinase* » (c-Abl), qui phosphoryle les résidus tyrosine. La phosphorylation catalysée par Akt est associée à un transport de la protéine du cytosol vers le noyau, où elle pourra être assemblée avec la sous-unité hTR et ainsi permettre l'activation de l'enzyme. La phosphorylation induite par c-Abl, le plus souvent après des radiations ionisantes, en revanche, est corrélée à une inhibition de l'activité de la télomérase (Cifuentes-Rojas & Shippen, 2012; Deville et al., 2009; MacNeil et al., 2016; Okamoto & Seimiya, 2019; Wojtyla et al., 2011).

#### IV. La télomérase dans le modèle cellulaire NB4

Ma thèse a été réalisée sur le modèle NB4 de leucémie aiguë promyélocytaire présenté en partie I de cette introduction. Ce projet de recherche doctorale s'inscrit à la suite de travaux précédents de l'équipe, qui a étudié depuis plusieurs années les effets des traitements ATRA, ATO et de la combinaison des deux sur ces lignées et sur la régulation de la télomérase. Comme je l'ai évoqué précédemment, l'ATRA sur la lignée NB4 induit une maturation des cellules dès deux jours de traitement à une dose de  $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . Celle-ci est associée à une

inhibition de l'expression de *hTERT* et de l'activité de la télomérase. En effet, la différenciation est couplée à une répression de la télomérase par différents mécanismes génétiques et épigénétiques comme je l'ai décrit dans la partie précédente (F. Pendino et al., 2001, 2002; Tarkanyi et al., 2005).

Mon laboratoire d'accueil a également souhaité étudier l'effet de l'ATRA sur l'expression du gène *hTERT* en l'absence de différenciation et a pour cela étudié les deux variants de la lignée NB4, tous deux résistants à la maturation induite par l'ATRA : les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup>. L'équipe a pu observer que le traitement à l'ATRA de 1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  sur une durée plus longue, d'au moins sept jours, sur la lignée NB4-LR1 entraîne une répression de l'expression du gène *hTERT*, induisant ainsi un arrêt de l'activité de la télomérase et un raccourcissement des télomères, menant ainsi les cellules à l'apoptose. La lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>, quant à elle, résiste en partie à cet effet répresseur puisqu'après une première phase de baisse de l'expression de *hTERT*, celle-ci est ensuite stabilisée dans les cellules. Un traitement au trioxyde d'arsenic, donne les mêmes résultats sur cette lignée mais la combinaison des deux molécules permet de retrouver un effet similaire à celui obtenu dans la NB4-LR1, c'est-à-dire une abolition de l'expression de *hTERT* menant à l'apoptose dépendante du raccourcissement des télomères (**figure 24**) (F. Pendino et al., 2001, 2002; Frédéric Pendino et al., 2003; Tarkanyi et al., 2005).

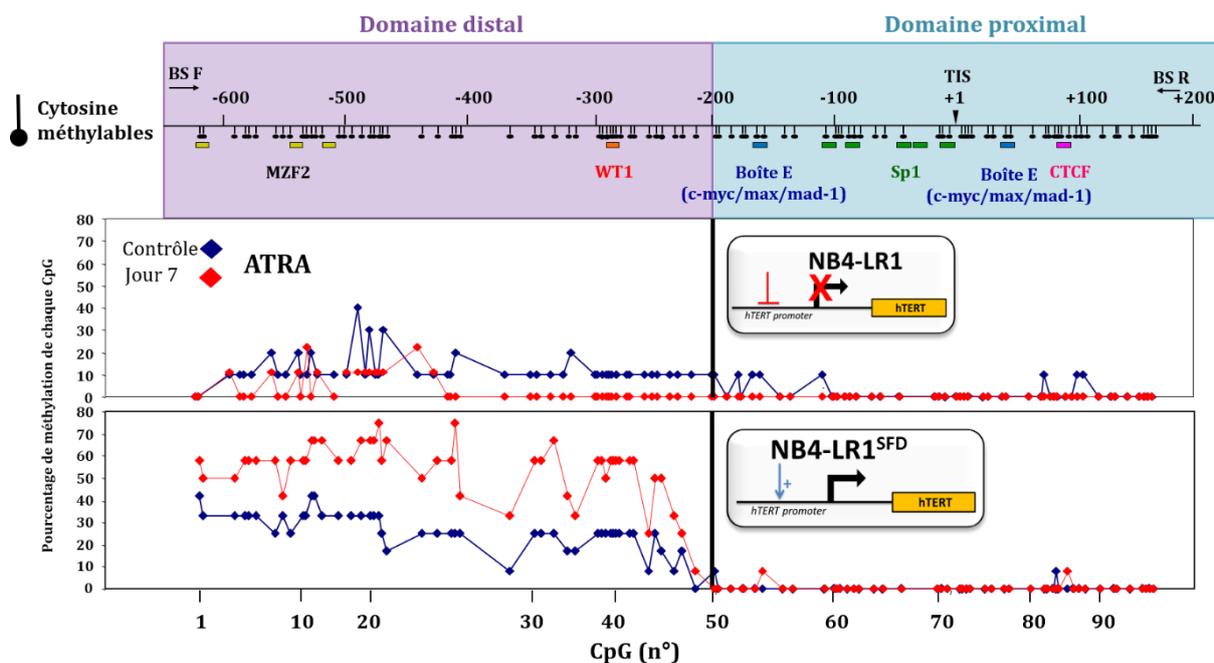


**Figure 24 : La régulation de *hTERT* par l'ATRA et l'ATO dans le modèle cellulaire NB4 de LAP**

La lignée NB4, sensible à la maturation induite par l'ATRA, entre en différenciation dès les premiers temps du traitement, ce qui est associé à une répression de l'expression de *hTERT*. Le gène est totalement éteint après deux jours de traitement dans cette lignée. La lignée NB4-LR1 n'entre pas en différenciation mais un traitement prolongé à l'ATRA réprime l'expression de *hTERT* et entraîne ainsi l'apoptose des cellules, dépendante des télomères. La lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> ne répond que partiellement au traitement à l'ATRA puisque celui-ci entraîne une première baisse de l'expression de *hTERT* qui est ensuite contrée, permettant ainsi l'expression continue du gène. Le traitement combiné à l'ATRA et à l'ATO, en revanche, permet de réprimer l'expression de *hTERT* et ainsi de favoriser l'apoptose des cellules.

Afin de mieux connaître les facteurs impliqués dans ces réponses aux traitements utilisés, l'équipe a étudié les mécanismes mis en jeu dans cette régulation du gène *hTERT* par l'ATRA, l'ATO et la combinaison des deux. Comme pour d'autres modèles de cancers, l'équipe a pu montrer que la répression de *hTERT* était associée à des différences de liaison dans les facteurs de transcription. En effet, l'ATRA induit un remplacement de c-Myc par Mad1 sur les E-Boxes. En revanche, l'ATRA n'a eu aucun effet significatif sur la liaison du facteur CTCF, supposant qu'il n'intervient pas dans le mécanisme de régulation de *hTERT* par l'ATRA dans ce modèle cellulaire (Azouz et al., 2010).

En ce qui concerne le profil de méthylation du gène *hTERT*, mon équipe d'accueil a démontré que deux régions se distinguent dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup> sur le promoteur de *hTERT* : une région distale, caractérisée par une méthylation partielle et quelques sites de fixation de facteurs de transcription, et une région proximale incluant le site d'initiation de la transcription, presque totalement déméthylée et contenant la plupart des sites de fixation de facteurs régulant l'expression de *hTERT*. Le traitement à l'ATRA influe sur le profil de méthylation de la région distale mais aucunement sur celui de la région proximale (**figure 25**). L'équipe a alors montré que la méthylation pourrait bloquer la fixation du facteur répresseur WT1 dans la région distale du gène et ainsi favoriser l'expression de *hTERT* (Azouz et al., 2010).



**Figure 25 : Méthylation du promoteur de *hTERT* dans le modèle NB4 de LAP (Azouz et al., 2010)**

Le cadre supérieur montre un schéma du promoteur de *hTERT* avec le positionnement des différentes cytosines en contexte CpG (représentées par des cercles noirs). Les graphiques inférieurs présentent les profils de méthylation du gène *hTERT* dans la lignée NB4-LR1 (graphique supérieur) et dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> (graphique inférieur) à l'état basal (courbe bleue) et après sept jours de traitement à l'ATRA (courbe rouge). On note que deux régions se distinguent à l'état basal : un domaine proximal déméthylé et un domaine distal partiellement méthylé. Le traitement à l'ATRA induit une répression du gène *hTERT* dans la lignée NB4-LR1 mais influe peu sur le profil de méthylation. Dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>, le gène *hTERT* reste exprimé malgré le traitement et on note une augmentation de la méthylation dans le domaine distal.

Les profils sont cependant assez similaires entre les deux lignées et n'expliquent donc pas à eux seuls la différence de réponse observée par rapport au traitement à l'ATRA. De plus, ce traitement entraîne une désacétylation des histones H3 et H4 sur le promoteur de *hTERT* dans ces lignées. Il est cependant à noter qu'un retrait du traitement abolit son effet et conduit à la réexpression du gène *hTERT* et à la réactivation de la télomérase (Azouz et al., 2010; F. Pendino et al., 2001).

Plus récemment, une autre recherche doctorale réalisée au sein du laboratoire a mis en évidence une corrélation inverse entre l'expression de l'ARNlnc H19 et celle de *hTERT*. Cette corrélation a été analysée dans différents contextes dans la lignée NB4-LR1. Tout d'abord, cette étude a montré que l'ATRA induit une surexpression de H19 dans la lignée NB4-LR1 et une diminution dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>. Une observation similaire est faite dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> après traitement combiné d'ATRA et d'ATO, sous lequel l'expression de *hTERT* est complètement inhibée. Ensuite, en induisant de façon artificielle la surexpression de H19, il a été montré que celle-ci était associée à une répression de l'activité de la télomérase mais pas nécessairement à une variation de l'expression de *hTERT* dans les cellules. Enfin, l'équipe a pu observer que l'ARNlnc H19 avait un impact sur la liaison entre hTR et hTERT et que sa surexpression diminuait la liaison des deux sous-unités. Les mécanismes intervenant ici n'ont cependant pas encore été complètement élucidés (El Hajj et al., 2018).

## OBJECTIF DE L'ÉTUDE

---

La télomérase, une enzyme ribonucléoprotéique impliquée dans l'allongement des télomères, est active dans les cellules souches possédant un fort taux prolifératif mais est inactive et absente de la plupart des cellules somatiques adultes. Cette enzyme particulière est cependant réactivée dans une grande majorité des cancers à un stade précoce permettant leur immortalisation et favorisant l'oncogenèse. Les mécanismes impliqués dans cette réactivation ont été étudiés mais restent encore obscurs puisque plusieurs types de régulation entrent en jeu. En effet, la régulation du gène *hTERT*, codant la sous-unité protéique de la télomérase, est probablement le facteur majeur impliqué dans cette réactivation de l'enzyme mais se déroule de façon extrêmement complexe.

Plusieurs études ont montré l'impact des facteurs de transcription, d'autres ont étudié la méthylation de l'ADN, d'autres encore la contribution des modifications post-traductionnelles des histones ou la localisation subnucléaire du gène dans sa régulation. Mais rares sont les études ayant comparé ces différents effecteurs dans des conditions similaires ou sur un même modèle.

L'objectif de mon projet de thèse est d'étudier, dans un modèle de leucémie aiguë promyélocytaire, les mécanismes épigénétiques de régulation du gène *hTERT* à l'état basal et suite à un traitement de sept jours à l'ATRA, à l'ATO ou par une combinaison de ces deux molécules. Cette étude permet de lier plusieurs marques épigénétiques et leur action sur l'expression du gène *hTERT* afin de déterminer quels facteurs épigénétiques interviennent et dans quelles conditions ils peuvent être prépondérants dans la régulation de ce gène. Dans mon modèle d'étude, je tenterai de mettre en évidence des relations entre ces différentes marques. Les informations obtenues de cette étude pourront peut-être permettre de mettre en place un profil type d'activation du gène *hTERT* et l'étendre à d'autres cancers afin de déterminer avec précision quelles actions pourraient être entreprises pour empêcher la réactivation aberrante de la télomérase dans ces pathologies.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

Pour mener à bien mon projet de thèse, j'ai fait appel à plusieurs techniques me permettant d'étudier divers aspects de la régulation du gène *hTERT* dans les modèles cellulaires de LAP : NB4, NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup>. J'ai commencé par étudier l'expression ARNm de *hTERT* par la technique de RT-qPCR, puis j'ai observé la localisation du gène *hTERT* au sein du chromosome 5 grâce à la technique de 3D-FISH. J'ai ensuite étudié les modifications post-traductionnelles des histones sur la région codante et le promoteur de mon gène d'intérêt grâce à la technique de ChIP-qPCR. Enfin, je me suis intéressée à la méthylation du gène ainsi qu'au positionnement des nucléosomes sur son promoteur grâce à la technique du NOME-seq.

J'ai choisi ces techniques plutôt que d'autres car elles me paraissaient les plus appropriées pour mon étude. Le 3D-FISH, par exemple, me permet de visualiser les signaux d'intérêt sans endommager la structure globale du noyau. Le NOME-seq est l'unique technique permettant d'observer de façon simultanée la méthylation de l'ADN et le positionnement des nucléosomes sur une même molécule d'ADN, ce qui la rend donc particulièrement intéressante. Enfin, le ChIP-qPCR est la technique la plus robuste pour étudier les modifications des histones et permet de quantifier leur présence sur l'ensemble du gène *hTERT*.

### I. Analyse de l'expression ARNm de *hTERT*

#### 1. Référence des produits

TRIzol : Invitrogen

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit : # 04 897 030 001, Roche Diagnostics

LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green Kit : #03 753 186 001, Roche Diagnostics

LightCycler 2.0 : # 03 531 414 001, Roche Diagnostics

Amorces utilisées : voir **annexe 3**

#### 2. Protocole de RT-qPCR

L'ARN d'environ 3 millions de cellules est extrait en utilisant du TRIzol, selon les instructions du fabricant. La concentration et la qualité sont ensuite déterminées grâce à un spectrophotomètre, le nanodrop, par étude de l'absorbance à 260 nm et des rapports de l'absorbance à 260 nm sur les absorbances à 280 nm et 230 nm. 1 µg d'ARN est ensuite soumis à une réaction de transcription inverse (RT) grâce au kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis selon les instructions du fabricant, en utilisant comme amorces des oligo(dT).

Les ADN complémentaires obtenus sont ensuite analysés par PCR quantitative (qPCR), dont le mix de réaction est préparé avec le kit Light Cycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR

Green, et la réaction est faite dans un Light Cycler 2.0. Les niveaux d'expression de hTERT sont ensuite normalisés sur les niveaux d'expression de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) puis analysés sous GraphPad Prism.

## II. Observation de l'environnement subnucléaire du gène *hTERT*

### 1. Références des produits

Kit QIAGEN Maxi : 12165, QIAGEN

Kit Vysis Nick Translation : 07J00-001, Abbott

Paraformaldéhyde 32 % : #15714, Electron Microscopy Sciences

Triton X-100 : #T8787, Sigma

Formamide : #47671, Sigma

Lames superfrost plus : 5069M, Thermo Scientific

Neobrite : NB12-0001, NeoBiotech

Microscope confocal LSM 710 : Carl Zeiss

BAC utilisés pour purifier les sondes :

- ◆ hTERT : RP11-117B23, Bioscience
- ◆ Région subtélomérique du bras court du chromosome 5 : RP11-44H14, Bioscience
- ◆ Gènes TPPP, CEP72 : RP11-846K3, Bioscience
- ◆ Régions  $\alpha$ -satellites : P82h

Marqueurs fluorescents :

- ◆ dUTP Orange 552 : ENZ-42842, Abbott
- ◆ dUTP Green 496 : ENZ-42831L, Abbott
- ◆ Hoechst 33342

### 2. Protocole de 3D-FISH

#### i. Purification et marquage des sondes

Les BAC contenant les plasmides des sondes sont amplifiés sur milieu LB-agar additionné d'antibiotique (chloramphénicol pour les BAC de la librairie RP11) sur la nuit à 37 °C. Le lendemain matin, une partie des colonies est amplifiée pendant 10 heures à 37 °C sous agitation dans 3 mL de milieu LB liquide additionné d'antibiotique puis mise en culture sur la nuit à 37 °C sous agitation dans 200 mL de milieu LB liquide additionné d'antibiotique.

Les bactéries sont récupérées par centrifugation de 15 min à 4 000 g à 4 °C puis le culot est resuspendu dans le tampon P1 contenant de la RNase (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) avant d'être lysé avec le

tampon de lyse (tampon P2) 5 minutes à température ambiante. La lyse est arrêtée avec un tampon de neutralisation (tampon P3) et une incubation de 20 minutes sur glace. Le surnageant est récupéré après centrifugation de 15 min à 4 000 g à 4 °C et déposé sur colonne préalablement équilibrée (tampon QBT). Après passage de l'ensemble du surnageant à travers la colonne par gravité, la résine de la colonne, liant l'ADN, est rincée deux fois (tampon QC). L'ADN est ensuite élué avec le tampon d'éluion (tampon QF).

Le plasmide présent dans l'éluat est précipité sur la nuit à -20 °C avec 0,7 volume d'isopropanol puis récupéré par centrifugation de 60 minutes à 4 °C à 4 000 g. Le culot ainsi obtenu est lavé deux fois dans de l'éthanol 70 % puis séché 10 minutes à température ambiante avant d'être resuspendu dans un volume adéquat d'eau. Le plasmide purifié est ensuite quantifié au Nanodrop.

Les plasmides sont marqués par la méthode de déplacement de brèche (Nick Translation) permettant d'insérer des désoxynucléotides fluorescents au sein de la séquence d'intérêt pour obtenir des sondes marquées. Cette méthode est réalisée via le kit Vysis (Abbott) selon les instructions du fabricant. Rapidement, 1 µg de plasmide est mélangé à des dUTP fluorescents (vert : SpectrumGreen, orange : SpectrumOrange), des dTTP et des dNTP en présence d'une enzyme de Nick Translation. Le mélange est incubé la nuit à 15 °C puis chauffé 10 minutes à 70 °C avant d'être refroidi dans la glace.

Les plasmides ainsi marqués sont ensuite précipités avec 10 µg d'ADN Cot1 et de l'acétate de sodium à 0,3 mol.L<sup>-1</sup> final puis lavés trois fois dans de l'éthanol 100 %. Les sondes sont ensuite récupérées par centrifugation de 45 min à 12 000 g à 4 °C, puis lavées à l'éthanol 75 % et séchées 30 minutes à 37 °C avant d'être resuspendues dans du tampon d'hybridation (SSC 2X, dextran-sulfate 10 %, formamide 50 %).

## ii. Hybridation *in situ* en fluorescence

Le protocole que j'ai utilisé est adapté de celui publié par le laboratoire de Julie Chaumeil en 2013 (Chaumeil et al., 2013). Il se déroule comme suit : environ 2 millions de cellules sont fixées par de la paraformaldéhyde à 2 % pendant 10 minutes à température ambiante puis récupérées par centrifugation de 5 minutes à 200 g à 4 °C. Les cellules sont resuspendues dans du PBS 1X puis étalées sur lames. Après séchage des cellules sur les lames, celles-ci sont lavées trois fois dans du PBS 1X avant d'être perméabilisées 10 minutes sur glace par du PBS 1X – triton 0,5 %. Après trois nouveaux lavages dans du PBS 1X, les cellules sur lames sont déshydratées dans de l'éthanol à concentrations croissantes (70 %, 85 %, 100 %) pendant 2 minutes pour chaque, puis traitées par de la RNase A (100 µg.mL<sup>-1</sup> final) pendant 1 heure à 37 °C (Neobrite).

Les cellules sur lames sont ensuite lavées trois fois dans du SSC 2X puis perméabilisées de nouveau dans du chlorure d'hydrogène à 0,1 M – triton 0,7 %. Après trois lavages dans du SSC 2X, les cellules sur lames sont dénaturées dans du formamide 50% - SSC 2X pendant 30 minutes à 80 °C (Neobrite). Les sondes marquées sont ajoutées sur les lames et codénaturées avec les cellules 5 minutes à 75 °C (Neobrite). L'hybridation a lieu sur la nuit à 37 °C (Neobrite).

Les cellules sur lames sont lavées trois fois dans du SSC 2X – formamide 50 % puis à nouveau trois fois dans du SSC 2X, une fois dans du SSC 0,5X et une dernière fois dans du PBS 1X avant d'être incubées 15 minutes à l'obscurité, à température ambiante, avec du Hoechst 33342. Après trois derniers lavages dans du PBS 1X, les cellules sont montées entre lame et lamelle avec du möwiol.

Les lames sont observées au microscope confocal le lendemain. Les images sont acquises avec le logiciel Zeiss puis traitées avec le logiciel ImageJ. L'étude de la distance entre les signaux est réalisée avec le plugin JacoP (Bolte & Cordelières, 2006) puis le logiciel Microsoft Excel. Les résultats sont ensuite mis en forme sous GraphPad Prism, où les analyses statistiques sont effectuées.

### III. Étude des modifications post-traductionnelles des histones

#### 1. Références des produits

Paraformaldéhyde 32 % : #15714, Electron Microscopy Sciences

Kit EZ Magna ChIP A : #17-408, Millipore

Sonicateur Diagénode Bioruptor Pico

Kit Nucleospin Gel and PCR clean-up (250 rxns) : 740609.250, Macherey-Nagel

Kit LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green : #03 753 186 001, Roche Diagnostics

LightCycler 2.0

Amorces utilisées : voir **annexe 3**

#### 2. Protocole de ChIP-qPCR

##### i. Préparation de la chromatine

Environ 10 millions de cellules sont prélevées puis fixées dans 1 % de paraformaldéhyde pendant 8 minutes à température ambiante sous agitation. La réaction est stoppée par ajout de Glycine à 0,1 M final et incubation de 8 minutes à température ambiante sous agitation.

Les cellules sont récupérées par centrifugation de 5 minutes à 200 g à 4 °C puis lavées deux fois dans du PBS 1 X froid avant d'être incubées sur glace pendant 15 minutes dans un tampon de lyse (Cell lysis buffer) fourni dans le kit. Les noyaux ainsi obtenus sont récupérés par centrifugation de 5 minutes à 800 g à 4 °C puis lysés à leur tour par un second tampon du kit (Nuclear lysis buffer) contenant du SDS 0,1 %.

La chromatine ainsi obtenue est ensuite fragmentée par sonication (sonicateur Diagénode Bioruptor Pico : 6 cycles de 1 minute : 30 secondes ON et 30 secondes OFF, à 4 °C) puis centrifugée 10 minutes à 12 000 g à 4 °C pour supprimer les débris. La fragmentation est vérifiée sur une fraction de la chromatine après purification d'une partie de l'ADN puis migration sur gel d'agarose.

## ii. Immunoprécipitation de la chromatine

Un volume de 20  $\mu\text{L}$  de billes magnétiques couplées à la protéine A/G (kit) sont incubées avec 4  $\mu\text{g}$  d'anticorps pendant 1 h 20 sur glace. Les billes sont ensuite lavées trois fois dans du PBS 1 X-Tween 20 0,1 % (la récupération des billes se fait par aimantation et le surnageant de lavage est écarté par aspiration) puis reprises dans 450  $\mu\text{L}$  de tampon de dilution (Dilution buffer, kit). 50  $\mu\text{L}$  de la chromatine préalablement préparée (équivalent à environ 1 million de cellules) sont ajoutés aux billes et l'ensemble est incubé sur la nuit, sous agitation modérée, à 4 °C.

Les billes sont ensuite lavées quatre fois avec des tampons de lavage successifs pour casser les liaisons non-spécifiques avant d'être incubées 2 heures dans un tampon d'élution additionné de protéinase K (10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  final). Le mélange billes-chromatine immunoprécipitée est ensuite chauffé 10 minutes à 95 °C puis refroidi à température ambiante pendant 5 à 10 minutes. Les billes sont aimantées pour pouvoir prélever le surnageant qui est ensuite purifié sur colonne grâce au kit de Macherey-Nagel, Gel and PCR Clean-up.

Les produits obtenus sont analysés par qPCR avec le kit LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green, avec un LightCycler 2.0. Les résultats obtenus sont ensuite traités avec le logiciel Microsoft Excel avant d'être mis en forme sous GraphPad Prism.

## IV. Analyse de la méthylation et du positionnement des nucléosomes sur le promoteur de *hTERT*

### 1. Références des produits

M.CviPI, GpC méthyltransférase (contenant le tampon GC et le S-adenosyl-méthionine [SAM]) : M0227L, New England Biolabs

Kit EZ DNA Méthylation : ZD5001, Zymo Research

Maxima hot start Taq polymerase (500 u) : EP0602, Thermo Scientific

dNTP Mix, 10 mM (1 000  $\mu\text{L}$ ) : U151B, Proméga

Kit Nucleospin Gel and PCR clean-up (250 rxns) : 740609.250, Macherey-Nagel

pGEM-T easy vector system I : A1360, Proméga

Bactéries compétentes JM109 (5\*200  $\mu\text{L}$ ) : L2001, Proméga

X-Gal : V3941, Proméga

GoTaq G2 hot start polymerase : M7405, Proméga

Kit Nucleospin plasmid (250 rxns) : 740588.250, Macherey-Nagel

Amorces utilisées : voir **annexe 3**

## 2. Protocole de NOMe-seq

Environ 2 millions de cellules sont récupérées puis centrifugées 5 minutes à 250 g. Après un lavage au PBS 1X, les cellules sont incubées 10 minutes sur glace dans un tampon hypotonique (Nuclei buffer : 10 mM Tris [pH=7,4], 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA et Protease Inhibitor Cocktail) additionné de détergent (1 % IPEGAL CA-630) pour en extraire les noyaux. Ceux-ci sont récupérés par centrifugation de 5 min à 2 500 g.

Après un lavage dans le même tampon hypotonique sans détergent, 75 unités de méthyltransférase M.CviPI sont ajoutées pour méthyler artificiellement les cytosines accessibles en contexte GpC. Les noyaux sont incubés 15 minutes à 37 °C puis un boost de 75 unités de M.CviPI est ajouté avant d'incuber à nouveau les noyaux dans les mêmes conditions. La réaction est arrêtée par l'ajout de 2 volumes de solution stop (20 mM Tris [pH=8], 600 mM NaCl, 1 % SDS, 10 mM EDTA, 0,4 mg.mL<sup>-1</sup> protéinase K) et une incubation de 2 heures à 55 °C.

L'ADN est ensuite purifié par phénol : chloroforme et repris dans un volume d'eau adapté puis dosé au nanodrop. 1 µg de l'ADN purifié est converti au bisulfite afin de pouvoir différencier les cytosines méthylées des autres cytosines. Cette conversion est réalisée avec le kit EZ DNA Methylation de Zymo Research en suivant les recommandations du fournisseur.

La séquence d'intérêt est ensuite amplifiée par PCR classique avec la polymérase GoTaq G2 et insérée dans le plasmide pGEM-T easy. Des bactéries compétentes JM109 sont ensuite transformées avec ce plasmide et cultivées sur un milieu gélosé contenant du X-Gal, de l'IPTG et un antibiotique adapté : l'ampicilline. Les colonies recombinantes sont ensuite sélectionnées par deux méthodes : tout d'abord visuellement, les colonies ayant intégré le plasmide recombinant (avec insertion du produit PCR dans le gène de la bêta-galactosidase porté par pGEM-T easy) présentent une couleur blanche alors que les bactéries ayant intégré le vecteur vide présentent une couleur bleue (due au produit formé par clivage du X-gal par la bêta-galactosidase), puis par PCR classique avec la polymérase Maxima pour vérifier la présence de la séquence initialement insérée dans le plasmide.

Les plasmides sont enfin purifiés à partir d'une miniculture des clones bactériens recombinants avec le kit de Macherey-Nagel Nucleospin plasmid puis séquencés par la plateforme Eurofins. L'analyse de l'ensemble des clones, réalisée avec l'aide du site BLAST, pour la vérification de la séquence, puis avec le logiciel excel pour la mise en évidence des cytosines méthylées et accessibles, permet de déterminer un profil de méthylation et d'accessibilité.

# RÉSULTATS

Les résultats de mon travail de thèse ont permis la rédaction d'un article. Mes résultats principaux sont présentés ci-après grâce à cet article, actuellement en finalisation avant d'être soumis à un éditeur. Des résultats complémentaires non publiés sont présentés en deuxième point de cette partie.

## I. Article scientifique

### **DNA methylation, histone post-translational modifications and chromatin accessibility profiling of *hTERT* promoter in retinoic acid (ATRA)-resistant acute promyelocytic cells: implication for ATRA therapy**

Delphine Garsuault<sup>1,2,3</sup>, Claire Bouyer<sup>1,2</sup>, Eric Nguyen<sup>1,2</sup>, Rohan Kandhari<sup>1,4</sup>, Martina Prochazkova-Carlotti<sup>5</sup>, Edith Chevret<sup>5</sup>, Patricia Forgez<sup>1,2</sup>, Evelyne Ségal-Bendirdjian<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> INSERM UMR-S 1124, Team: Cellular Homeostasis, Cancer, and Therapies Paris, France

<sup>2</sup> Paris-Descartes University, Paris Sorbonne Cité, Paris, France

<sup>3</sup> Paris-Sud University, Paris-Saclay University, Orsay, France

<sup>4</sup> Indian Institute of Technology BHU, Varanasi, India

<sup>5</sup> INSERM U1053, Team Cutaneous Lymphoma Oncogenesis Bordeaux, France

#### **Abstract**

**Background:** Telomerase reactivation and sustained expression is a key event in the process of cellular transformation to tumor phenotype acquisition and its subsequent progression. The identification of mechanisms regulating *hTERT* expression is therefore of great interest in the development of new anticancer therapies. Retinoids are well-known as inducers of granulocytic maturation associated with *hTERT* repression in acute promyelocytic leukemia (APL) blasts. However, in an APL cell line NB4-LR1, resistant to all-*trans* retinoic acid (ATRA)-induced granulocytic maturation, we demonstrated that ATRA induced *hTERT* transcriptional repression in the absence of differentiation. We also identified a variant, the NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells, in which *hTERT* is resistant to this repression. This opposite response of *hTERT* to ATRA in these cell lines represents a unique and powerful tool for gaining insights into the mechanisms driving the expression of *hTERT* along the cancerous processes.

**Results:** Using several complementary approaches (chromatin immunoprecipitation combined with a high-resolution single-molecule nucleosome positioning assay and DNA methylation, as well as a FISH assay), we depicted the integrated epigenetic events that promote *hTERT* promoter transition from its silent to its active state, and inversely. Our results suggest a more complex relationship between methylation of *hTERT* promoter and transcriptional activity and point to a role outside the minimal promoter in activating *hTERT*.

**Conclusions:** Our findings force the revisiting of a number of previously proposed concepts regarding *hTERT* epigenetic regulation. The mechanisms described represent therefore a major advance in the potential development of therapies targeting *hTERT* expression.

**Keywords:** Telomerase, *hTERT* promoter, ATRA, acute promyelocytic leukemia, DNA methylation, histone modifications, NOME-seq.

## Background

Telomere maintenance is a primary and universal characteristic of cellular transformation, leading to unlimited replicative capacity. Without telomere maintenance, the other hallmarks of cancer described by Hanahan and Weinberg (Hanahan and Weinberg 2000, Hanahan and Weinberg 2011) could neither persist nor contribute to the subsequent cancerous events. This maintenance is performed mainly by a specialized ribonucleoprotein complex, the telomerase, which is crucial for cancer development. Any strategy to block its activity or expression, specifically in tumor cells, will contribute to new therapeutic developments in order to force tumor cells to enter replicative senescence or apoptosis. Nevertheless, the strategy targeting the inhibition of telomerase activity has been disappointing so far because of low efficacy and long-term toxicity (Avin, Umbricht et al. 2016). These failures are partially due to an insufficient understanding of telomerase regulation mechanisms. The telomerase complex consists of a catalytic reverse transcriptase protein subunit (hTERT) encoded by *TERT* gene located on chromosome 5 (5p15.33) (Lingner, Hughes et al. 1997, Meyerson, Counter et al. 1997), an RNA template (*hTR*) encoded by *TERC* gene located on chromosome 3 (3q26.2) (Shippen-Lentz and Blackburn 1990, Blasco, Funk et al. 1995) and accessory proteins required for proper telomerase assembly and recruitment to chromosomes (Cohen, Graham et al. 2007, Venteicher, Meng et al. 2008).

hTERT expression is the primary determinant and the limiting factor for telomerase activity. The regulation of hTERT expression in human cancers is consequently of a major importance. This expression is tightly regulated at the transcriptional level (Avilion, Piatyszek et al. 1996, Bodnar, Ouellette et al. 1998). As the reactivation of *hTERT* is critical in carcinogenesis and tumor progression, it is essential to further advance our understanding of *hTERT* regulation to develop pharmacological strategies targeting the mechanisms responsible for *hTERT* upregulation. Several transcription factors, either repressors (such as Mad1, E2F, WT1, MZF2) or activators (such as c-Myc, NF-kB, Sp1) are important in the tight control of *hTERT* expression (Renaud, Loukinov et al. 2005, Li and Tergaonkar 2016, Ramlee, Wang et al. 2016, Khattar and Tergaonkar 2017). However, these factors are involved in the regulation in numerous normal cells and thereby their functions are difficult to specifically target in cancer cells. Recent studies have identified cancer-associated *hTERT* promoter mutations as a genetic mechanism of *hTERT* upregulation. The most frequent mutations are found upstream of the transcription start site (TSS) at 1, 295, 228 (C288T), and 1, 295, 250 (C250T). These mutations generate novel binding sites for the ETS (E26 transformation-specific or E-twenty-six) family of transcription factors and thereby, alter positively the transcriptional regulation of *hTERT* (Horn, Figl et al. 2013, Huang, Hodis et al. 2013, Killela, Reitman et al. 2013, Vinagre, Almeida et al. 2013, Bell, Rube et al. 2015). However, Chiba *et al.* demonstrated recently that, although in some cancers *hTERT* mutations are necessary, they are not sufficient to maintain telomere length or telomerase upregulation (Chiba, Lorbeer et al. 2017). In addition, *hTERT* upregulation occurs independently of promoter bearing mutations in several tumor types, suggesting that other mechanisms are involved, and in particular, epigenetic mechanisms. The epigenetic state of *hTERT* promoter is important for the tight control of *hTERT* expression. Despite extensive studies on *hTERT* promoter DNA methylation alteration, contradicting reports have been proposed in the literature (Devereux, Horikawa et al. 1999, Dessain, Yu et al. 2000, Guilleret, Yan et al. 2002, Shin, Kang et al. 2003). Therefore, we still lack a clear understanding of the underlying

mechanisms by which epigenetic changes affect *hTERT* expression, under which conditions during the repression of *hTERT* they could be modulated, and if they can be specifically targeted.

DNA methylation is often linked to histone post-translational modifications (Bannister and Kouzarides 2011) that affect the compaction state of chromatin, and thereby gene expression by controlling the accessibility of transcription factors to the promoter. Histone marks have been categorized as active (*e.g.*, H3Ac), permissive (*e.g.*, H3K4Me3) or repressive (*e.g.*, H3K27Me3). All these modifications act as chromatin or nucleosome remodelers regulating chromatin accessibility. Nucleosomes have classically been thought to prevent DNA sequence from interacting with transcription factors (either activators or repressors). Therefore, the degree of nucleosome occupancy along DNA in the chromatin plays a major role in the activation and repression of chromatin regions because it modulates the accessibility of DNA to the transcriptional machinery and regulatory proteins (Li, Carey et al. 2007). A number of factors have been proposed to directly regulate this nucleosome positioning, including the genomic sequence, DNA methylation (Chodavarapu, Feng et al. 2010), and histone modifications. Importantly, the higher-order chromatin organization results in the formation of looping structures that could play a significant role in gene activity by clustering genomic loci into domains *via* long-range interactions. This chromatin looping is also influenced by nucleosome positioning and, therefore, by epigenetic modifications. The tight linkage between *hTERT* expression and DNA methylation, histone marks, chromatin accessibility and subnuclear localization of *hTERT* has not been formally examined. To address this question, we took the advantage of two well-established cell lines, in which *hTERT* expression and telomerase activity are regulated by retinoids in the opposite way.

All-*trans* retinoic acid (ATRA) is widely used as a first-line therapy in acute promyelocytic leukemia (APL) as an inducer of granulocytic maturation of APL blasts. Our previous studies showed in a maturation-resistant APL cell line (NB4-LR1) that long-term treatment with ATRA induced a strong repression of *hTERT* in the absence of cell differentiation leading to growth arrest and cell death (Pendino, Flexor et al. 2001, Pendino, Dudognon et al. 2003, Pendino, Hillion et al. 2006). These observations suggest that ATRA can exert antitumoral properties independently of differentiation by targeting *hTERT*. Moreover, we reported the isolation of a variant from the NB4-LR1 cell line, named NB4-LR1<sup>SFD</sup>, which is resistant to telomerase-dependent ATRA-induced cell death. Indeed, in NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells, *hTERT* is stably reactivated despite the continuous presence of ATRA (Pendino, Sahraoui et al. 2002). This steady telomerase reactivation, which occurs after an initial step of downregulation, reminds reactivation of telomerase occurring during tumorigenesis. Therefore, these two cell lines are a valuable model to study the molecular events leading to *hTERT* repression and reactivation. We have previously shown that transcription factor binding to *hTERT* promoter is dependent on the epigenetic status of the promoter, including DNA methylation (Azouz, Wu et al. 2010). In the present study, we explore the interplay between *hTERT* gene positioning in the nucleus, DNA methylation, nucleosome occupancy, and histone modifications at *hTERT* promoter. To this end, our investigation combines a highly sensitive single-molecule Nucleosome Occupancy and Methylome Sequencing assay (NOMe-seq) with histone ChIP analysis and 3D-FISH to generate an integrated view of chromatin organization and gene expression at the level of *hTERT*.

## Materials and Methods

### *Chemicals, cell lines, cell culture and treatments*

All-trans retinoic acid (ATRA), arsenic trioxide (ATO), and protease inhibitor cocktail (P8340) were purchased from Sigma (St Louis, MO, USA).

The maturation-resistant human acute promyelocytic leukemia cell lines, NB4-LR1 and NB4-LR1<sup>SFD</sup>, were cultured as previously described (Pendino, Flexor et al. 2001, Pendino, Sahraoui et al. 2002). The NB4-LR1<sup>SFD</sup> cell line was isolated as a population of cells emerging from a culture of NB4-LR1 cells under the selective presence of ATRA (1  $\mu$ M). It bypasses the death step induced by long-term ATRA treatment because of the reactivation of *hTERT*. The established NB4-LR1<sup>SFD</sup> cell line is stable and able to grow either in the presence or in the absence of ATRA. This property of resistance to ATRA-induced cell death during a prolonged treatment is maintained for more than 6 months of culture in the absence of ATRA. All cells were cultured at 37°C in a humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> (Binder Incubators, Nanterre, France). Every 2 or 3 days, cell density was determined using Coulter counting, cells were re-seeded when the density reached 6-7x10<sup>5</sup> cells/ml. For treatments, cells were seeded in medium containing 1  $\mu$ M of ATRA, 0.2  $\mu$ M of ATO alone or in combination.

### *Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR)*

Total cellular RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined using A260 nm absorbance with Nanodrop Spectrophotometer. RNA quality was assessed *via* A260/A230 and A260/A280 nm absorbance. One microgram of total RNA was subjected to reverse transcriptase with oligo(dT) reaction using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche Diagnostics) as described in the manufacturer's instructions. The cDNAs were subsequently submitted to quantitative real-time PCR using the LightCycler technology and the LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green Kit (Roche Diagnostics). *hTERT* levels were normalized to the expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) used as the internal control gene. Primer sequences and their localization on *hTERT* gene are shown in **Supplemental Table S1** and **Supplemental Figure S1A**.

### *Sanger sequencing*

The *hTERT* promoter and enhancer regions were screened for somatic mutations and SNPs using PCR and Sanger sequencing. Genomic DNA was extracted from cells as previously reported (Ségal-Bendirdjian and Jacquemin-Sablon 1995). *hTERT* promoter (from the position -650 bp to +150 bp relative to the transcription start site -TSS-) and a distal regulatory upstream region (from the position -5500 bp to -4900 bp relative to the TSS) were amplified using specific primers whose sequences and localizations are reported in **Supplemental Table S1** and **Supplemental Figure S1A**, respectively. DNA sequencing was carried out in both directions. Each SNP was confirmed by sequencing the PCR products from independent PCR amplifications.

### *3D Fluorescence in-situ Hybridization (3D FISH)*

FISH assay was performed as previously described (Chaumeil, Micsinai et al. 2013). Briefly,  $2 \cdot 10^6$  cells were fixed with 2% paraformaldehyde in 1X PBS for 10 min at room temperature (RT), then centrifuged and resuspended in 300  $\mu$ L PBS. Cells were spread on Superfrost slides (Menzel-Gläzer) and dried for 30 min at RT, then washed 3 times in 1X PBS before permeabilization with 0.5% Triton in PBS for 10 min on ice. Slides were dehydrated with gradual concentration of ethanol (70%, 85%, and 100%) for 2 min at RT, and then treated with RNase A (100  $\mu$ g/mL) for 1h at 37°C (Neobrite, NB12-0001, NeoBiotech). A second permeabilization step with 0.7% Triton in 0.1 M HCl was performed before denaturation with 50% formamide in 2X SSC (Saline Sodium Citrate) solution at 80°C for 30 min. Probes were denatured at 75°C for 5 min, and added to the sample for hybridization overnight at 37°C. After 3 washes in 2X SSC / 50% formamide, 3 washes in 2X SSC, 1 wash in 0.5X SSC and 1 wash in 1X PBS, slides were incubated with Hoechst 33342 (1  $\mu$ g/mL in 1X PBS) for 15 min at RT and mounted with MÖwiol. Probes were prepared using nick translation kit (Vysis kit, Abbott Laboratories) following manufacturer's instructions. Bacterial Artificial Chromosome (BAC) plasmids were purchased from Source BioScience: RP11-117B23 for hTERT locus staining (Spectrum Orange, 552 nm), RP11-44H14 for subtelomeric region 5p staining (Spectrum Green, 496 nm), RP11-846K3 for "intermediary" region, containing TPPP and CEP72 genes, staining (Spectrum Green, 496 nm). The positions of the FISH probes are indicated in **Supplemental Figure 1B**. Labelled probes were precipitated by adding 10-fold excess of Cot-1 DNA, 1/10 volume of 3 M sodium acetate (NaAc, pH 5.2) and 3 volumes of 100% ethanol. Probes were then centrifuged at 12 000 g for 45 min at 4 °C. After washing with 70% ethanol, probes were then dried at 37°C for 10 min and resuspended in 50  $\mu$ L of hybridization buffer (2X SSC/50% formamide/10% dextran-sulfate). Images were acquired using LSM 710 confocal microscope (Carl Zeiss). A 63X plan-apochromat oil immersion objective was used to capture optical sections at intervals of 0.37  $\mu$ m. Images. lsm-type images were generated and processed with Image J (NIH) and JACOP plugin. The 3D distance between each center of the deconvolved fluorescent spot of hTERT locus, and either the subtelomeric 5p region or the intermediate locus were collected and analyzed with GraphPad Prism.

### ***Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)***

ChIP assay was performed using Magna ChIP kit, following manufacturer's instructions (Millipore). Briefly,  $10^7$  cells were crosslinked with 1% paraformaldehyde for 8 min at RT, and then the reaction was stopped in 0.1  $\mu$ M glycine. Cells were then washed and lysed. The nuclei were recovered and resuspended in nuclear lysis buffer. Chromatin recovered from the lysate was sheared by sonication to obtain fragments ranging from 300 to 600 bp (Bioruptor pico, Diagenode). An aliquot (3  $\mu$ l, 6000 cells) of the sonicated chromatin was used as input fraction to quantify the total amount of DNA. For immunoprecipitation, 4 micrograms of antibodies were prebound to 20  $\mu$ L protein A/G magnetic beads and incubated with chromatin overnight at 4°C. As negative control, IgG of the same species as the antibody of interest was included. The following antibodies were used for the immunoprecipitation: H3K27me3 (Millipore, 07-449); H3K4me3 (Millipore, 04-745); H3Ac (Millipore, 06-599), H3K9me3 (Millipore, 07-442); IgG (Millipore, PP64B). Three biological replicates were produced independently at different time of cell culture. Immunoprecipitated chromatin samples were

uncrosslinked and protein digested by heating beads for 2 hours at 62°C with proteinase K followed by 10 min at 95°C, then DNA fragments were purified using spin column. Immunoprecipitated and input DNA were then analysed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR, LightCycler 2.0, Roche) with the appropriate primers targeting regions upstream and downstream *hTERT* TSS (**Supplemental Figure 1A**). The primer sequences are indicated in **Supplemental Table S1**. The amount of immunoprecipitated DNA is represented as normalized signal to total input DNA used in each immunoprecipitation.

### ***Nucleosome Occupancy and Methylome sequencing (NOMe-seq)***

NOMe-seq was performed as previously described (Kelly, Liu et al. 2012). To isolate intact nuclei,  $2 \cdot 10^6$  cells were centrifuged for 5 min at 250 g then washed in 1 mL of ice-cold 1X PBS, resuspended in 1 mL of ice-cold nuclei buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA and protease inhibitors), supplemented with 1% IPEGAL CA-630 and incubated on ice for 10 min. Nuclei were recovered by centrifugation for 5 min at 2 500 g, resuspended in 165 µL ice-cold GpC buffer (1X M.CviPI GC buffer, 0.3 M sucrose, 160 µM S-adenosylmethionine (SAM)) and splitted into two aliquots. One aliquot was treated with 75 U of GpC methyltransferase M.CviPI, the other was incubated with the same amount of water. The tubes were incubated for 15 min at 37°C before adding a boost of 75 U of M.CviPI, and 160 µM SAM in the treated nuclei for an additional 15 min at 37°C. The reaction was terminated by the addition of one volume of stop solution (20 mM Tris-HCl pH 8, 600 mM NaCl, 1% SDS, 10 mM EDTA, 400 µg/mL proteinase K) and the samples were incubated for 2 hours at 55°C. DNA was then purified by phenol:chloroform extraction and ethanol precipitation. Bisulfite conversion was performed on 1 µg of purified DNA using the EZ DNA methylation Kit (Zymo Research). Bisulfite-converted DNA was used for PCR amplification of the regions of interest with the primers reported in **Supplemental Table S1**. We designed NOMe-seq assays to explore two different regions. Region I located from -650 to +150 bp and region II located from -5500 to -4900 bp relative to the TSS of *hTERT*, respectively (see **Supplemental Figure 1A**). PCR amplicons were purified with Nucleospin Gel and PCR clean-up kit (Macherey-Nagel), and cloned into the pGEM-T Easy vector (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) as described in manufacturer's instructions. After transformation of JM109 competent cells (Promega), colonies were selected and grown overnight in Luria-Bertani medium containing ampicillin (100 µg/ml). Plasmid DNA was isolated using Nucleospin plasmid kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France). For each experiment, ten to twenty plasmid subclones were sequenced (MWG biotech, Ebersberg, Germany) with the pGEM-T Easy vector primers T7 and Sp6 for the assessment of nucleosome occupancy and CpG methylation. We performed at least two independent experiments, which show highly reproducible patterns. The M.CviPI enzyme methylates GpC sites in accessible DNA, whereas nucleosome bound DNA, which is inaccessible, remains refractory to GpC methylation. Reactions without M.CviPI were routinely performed to confirm endogenous CpG methylation levels. Regions of M.CviPI inaccessibility longer than 147 bp (the length of DNA wrapped around a single nucleosome) within a single molecule were considered to represent regions of nucleosome occupancy. Regions of inaccessibility shorter than 147 bp in size are termed "footprints". In addition, NOMe-seq retains the endogenous methylation status of the DNA allowing nucleosome positions and

DNA methylation to be determined on the same molecule. The efficiency of M.CviPI GpC methyltransferase was high (95%) and the bisulfite conversion rate was 99% on average. From these analyses, we integrated chromatin accessibility and DNA methylation information in relation with *hTERT* expression.

We confirmed the efficacy of the GpC M.CviPI methyltransferase by assessing GpC sites in the active CpG island (CGI) promoter of *HSPA5*, a constitutive and expressed gene that maintains a nucleosome-depleted region upstream of the transcriptional start site (Kelly, Liu et al. 2012). This indicated that the absence of GpC methylation when observed in *hTERT* gene promoter was caused by an altered chromatin accessibility rather than incomplete M.CviPI treatment.

**Table S1: Primers sequences (5' to 3') and amplification conditions used for NoMe-seq, ChIP and *hTERT* expression and promoter gene analysis.** The positions of the amplicons are indicated in **Supplemental Figure 1A**.

Primer name	Primers*	Annealing °C
<b>Sequencing</b>		
hTERT-5kbpromoter-seq	FW : ACCCTTCTCAAGGGAAAACCAGA RV : TGGAATCATTCAATCCTTGGGG	60
hTERT-promoter-seq	FW (-712) : AACAGATTTGGGGTGGTTTG RV (-435) : CTGGCCTGATCCGGAGAC	54-56
	FW (-514) : TCCCCTTCACGTCCGGCAT RV (+53) : TCCCACGTGCGCAGCAGGAC	60
	FW (-347) : GGCCGATTTCGACCTCTCT RV (+120) : AGCACCTCGCGGTAGTGG	60
<b>NOMeSeq</b>		
hTERT-5kbpromoter-NOMeSeq	FW-5kbBS3F : TTTGGAGAGAGGAGTTTGAG RV-5kbBS2R : TCATTCAATCCTTAAAAATAAAAAATAAATA	51
hTERT-promoter-NOMeSeq :	FW BS1F : GGGYTTGTGTTAAGGAGYTTAAGT RV BS3R : CCARCCCTAAARCCCAA	58
<b>PCR</b>		
hTERT-qPCR	FW : CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA RV : CTCCCACGACGTAGTCCATG	58
GAPDH-qPCR	FW : CACCCATGGCAAATTCCATGGC RV : GCATTGCTGATGATCTTGAGGCT	58
<b>ChIP</b>		
hTERT-ChIP-up5kb (-5401)	FW : CCAAAGGCGTAAAACAGGAA RV : CCTCGTGTACTTCCCTTGC	60
hTERT-ChIP-up2.5kb (-2582)	FW : AA ACTTCCCTGGGCTCAAGT RV : CGGTGTATCCCCAGTCTACG	60
hTERT-ChIP-up1.0kb (-1102)	FW : GTTTCTCGCCCCTTAGATCC RV : GCAGGACAGCTGAGGACTTC	60
hTERT-ChIP-up0.8kb (-773)	FW : CTCCATTTCCCACCCTTTCT RV : ACTTGGGCTCCTTGACACAG	60

hTERT-ChIP-up0.2kb (-233)	FW : CAGGCCGGGCTCCCAGTGGA RV : GGAAGGTGAAGGGGCAGGAC	65
hTERT-ChIP-down1.3kb (+1310)	FW : TGCCCCAGCGCTACTGGCAAA RV : TCGCAGCGGGCAGTGCCTTGA	67
hTERT-ChIP-down6.5kb	FW : TGGCAACGCTTGTCACCTTA RV : ACGTCAATCCATGTGAGGGG	60
hTERT-ChIP-down12.5kb	FW : CGTCTTTCTTTTATGTCACGGAG RV : AATGCTTTGCAACTTGCTCCA	60
hTERT-ChIP-down41.7kb	FW : CCATCCCCAGATTCGCCATT RV : CTGTGTACAGGGCACACCTT	60

\*Y = C or T and R = A or G

**Table S2: List of single nucleotide polymorphisms (SNPs) identified by genetic sequencing of the hTERT promoter.**

SNPs	Allele	References
rs33958877 GRCh38.p12-g.1295567 GRCh37.p13-g.1295682	A/C (NB4-LR1 and NB4-LR1 <sup>SFD</sup> )	(Montesanto, Bonfigli et al. 2018)
rs35161420 GRCh38.p12-g.1295337 GRCh37.p13-g.1295452	G/C (NB4-LR1 and NB4-LR1 <sup>SFD</sup> )	(Montesanto, Bonfigli et al. 2018)
rs35226131 GRCh38.p12-g.1295258 GRCh37.p13-g.1295373	A/G (NB4-LR1 and NB4-LR1 <sup>SFD</sup> )	(Montesanto, Bonfigli et al. 2018) (Zhang, Wang et al. 2016)
rs2735845 GRCh38.p12-g.1300469 GRCh37.p13-g.1300584	C/G (NB4-LR1 and NB4-LR1 <sup>SFD</sup> )	(Zhang, Zhao et al. 2014, Zhang, Zhang et al. 2016) (Pande, Spitz et al. 2011) (Beesley, Pickett et al. 2011) (Ge, Shi et al. 2016) (Zhou, Fu et al. 2016)
rs27355946 GRCh38.p12-g.1300314 GRCh37.p13-g.1300429	A>C (NB4-LR1 and NB4-LR1 <sup>SFD</sup> )	(Pande, Spitz et al. 2011)
rs2736103 GRCh38.p12-g.1300286 GRCh37.p13-g.0300401	A>G (NB4-LR1 and NB4-LR1 <sup>SFD</sup> )	(Pande, Spitz et al. 2011)
rs773702876 GRCh38.p12-	delTGCCT (NB4-LR1 and NB4-LR1 <sup>SFD</sup> )	-

g.1300251_1300255 GRCH37.p13- g.1300366_1300370		
---	--	--

## Results

### *hTERT mRNA expression in ATRA maturation resistant APL cell lines.*

We first investigated the relationship between *hTERT* expression, DNA methylation and chromatin architecture. We used two ATRA-maturation resistant cell lines, the NB4-LR1 derived from an APL patient (Lanotte, Martin-Thouvenin et al. 1991, Duprez, Ruchaud et al. 1992) and its variant, the NB4-LR1<sup>SFD</sup> cell line, selected after a prolonged culture of NB4-LR1 cells under ATRA (Pendino, Sahraoui et al. 2002). However, long term treatment with ATRA induced a strong repression of *hTERT* in NB4-LR1 cells leading to cell death, whereas, in NB4-LR1<sup>SFD</sup>, *hTERT* expression was maintained at a high level and the cells survived the treatment (Pendino, Flexor et al. 2001) (Pendino, Sahraoui et al. 2002) (**Figure 1**). Interestingly, in the NB4-LR1<sup>SFD</sup> cell line, *hTERT* repression was restored when ATRA treatment was combined with arsenic trioxide (ATO) (Tarkanyi, Dudognon et al. 2005). Therefore, this coupling of cell lines represents a unique model to study the regulatory mechanisms of *hTERT* reexpression and its silencing in cancer cells.

### *hTERT promoter sequencing*

*hTERT* promoter sequencing showed that neither NB4-LR1 nor NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells harbored the recurrent promoter mutations known to generate ETS binding sites at 124 bp (C228T) and 146 bp (C250T) upstream of the start codon (Horn, Figl et al. 2013, Huang, Hodis et al. 2013, Killela, Reitman et al. 2013, Vinagre, Almeida et al. 2013, Bell, Rube et al. 2015). Sequence analysis of the *hTERT* promoter and a region approximately 5 kb upstream of the *hTERT* transcription start site, previously characterized as an enhancer element (Eldholm, Haugen et al. 2014), revealed the presence of already described single nucleotide polymorphisms (SNPs) in both cell lines (**Supplemental Table S2, Supplemental Figure 2**). Also, of note was a 6bp deletion (rs773702876) affecting the upstream 5 kb region of *hTERT* promoter, which was observed similarly in both cell lines.

### *Analysis of the spatial genome organization at hTERT locus by 3D FISH*

Recently, a new gene regulatory control was proposed with the 3D genome spatial organization. Spatial chromosome arrangement can bring regulatory elements in close proximity of the genes under their control (Dekker and Mirny 2016). Similarly, telomeres can also make looping structures and thereby partly regulate gene expression including *hTERT* gene located 1.2 Mb from the end of chromosome 5p (Robin, Ludlow et al. 2014) (Kim, Ludlow et al. 2016). This mechanism, known as telomere position effect over long distances (TPE-OLD), might influence gene expression over long distances before replicative senescence. Based on recent observations suggesting that TPE-OLD can induce *hTERT* repression (Kim and Shay 2018), we performed three-dimensional fluorescence *in situ* hybridization (3D-FISH) on NB4-LR1 and NB4-LR1<sup>SFD</sup> cell lines with or without ATRA treatment to evaluate whether potential modifications of spatial genome organization at the *hTERT* locus could correlate with *hTERT* expression. We used three BAC probes corresponding to each region of interest: hTERT locus, Intermediate, and subtelomeric sequences (**Figure 3A** and **Supplemental Figure 1 B**). An example of the images obtained is shown in **Figure 3B**. We measured the three-dimensional distances of FISH signals between

the *hTERT* locus and the 5p subtelomeric region and we discriminated pairs in *cis* (i.e., on the same chromosome 5) from those in *trans* (i.e., on different chromosomes 5). The spots in a pair present on a same chromosome 5 were then categorized into adjacent and separated. Spots were classed adjacent when the distance measured was lower than 300 nm or 340 nm in NB4-LR1 and NB4-LR1<sup>SFD</sup>, respectively. Spots were classed as separated when the distance was greater than 665 nm or 730 nm, in NB4-LR1 and NB4-LR1<sup>SFD</sup>, respectively (**Figure 3C**). Because NB4-LR1 cells are slightly smaller than NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells different thresholds had to be adapted. In control NB4-LR1 and NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells, the percentages of spots in close proximity (adjacent) were ~37% and ~43%, respectively. After 7 days of ATRA treatment, this percentage was significantly increased to ~55% in the nucleus of NB4-LR1 treated cells, while the separated pairs decreased from ~63% to ~45%. In contrast, the distances between probes corresponding to these loci remained unchanged in the nucleus of ATRA-treated NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells as compared to untreated cells. Of note, we do not observe any difference in the distances between probes corresponding to the *hTERT* locus and the “intermediate” sequences between untreated and ATRA-treated in both NB4-LR1 and NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells (Figure 3D). Overall, these results suggest that *hTERT* repression by ATRA treatment may be modulated by long-range TPE-OLD interactions at the *hTERT* locus.

#### ***Histone modifications at hTERT promoter in ATRA maturation resistant APL cell lines.***

The histone modifications are reported to play a major role in *hTERT* expression. Therefore, we conducted site-specific ChIP-qPCR assays to monitor changes of histone marks at specific positions along *hTERT* gene, in relation with *hTERT* expression. Antibodies specific to one repressive (trimethylated lysine 27, H3K27Me3), two active (trimethylated lysine 4, H3K4Me3, and acetylated lysine H3, H3Ac) marks, and the native histone H3 were used for ChIP (**Figure 4**).

In NB4-LR1 untreated cells, the active H3K4Me3 mark (**Figure 4, panel 2**) was included within a larger region of H3K27Me3 repressive marks (**Figure 4, panel 3**). This concurrence of H3K4Me3 and H3K27Me3 across the *hTERT* promoter and TSS was already described (Zinn, Pruitt et al. 2007). The presence of this epigenetic feature, a characteristic of bivalent domains (or poised promoters) (Azura, Perry et al. 2006, Bernstein, Mikkelsen et al. 2006), suggests an effective plasticity of the chromatin at this location of the *hTERT* promoter crucial for the transition between active and repressive states. This feature was not observed in NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells since H3K27Me3 remained very low across the region of *hTERT* gene probed by the nine primer sets (**Figure 4, panel 3**).

In both cell lines, the active marks, H3K4Me3 and H3Ac (**Figure 4, panel 1 and 2**), were enriched at *hTERT* core promoter (mapped by primer sets *c*, *d*, and *e*), indicating a permissive transcriptional status of the chromatin. Remarkably, in the region mapped by the primer set *a*, H3K4Me3, and to a lesser extent H3Ac, were significantly enriched in NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells as compared to NB4-LR1 cells. After a 7 day-ATRA treatment, the levels of these active marks decreased dramatically only in NB4-LR1 but not in NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells. Interestingly, in NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells, the levels of these two marks decreased only when cells were exposed to the combination of ATRA and ATO, and the decrease occurred not only at the *hTERT* core

promoter (region in grey mapped by primers *c*, *d*, and *e*) but also in the region mapped by the primer set *a*. In NB4-LR1 cells, the levels of the repressive H3K27Me3 mark, which was already enriched upstream and downstream of the *hTERT* core promoter regions, further increased after ATRA treatment. In NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells, the level of this mark remained rather weak, even though a modest increase was observed when treated with ATRA and ATO in combination. Finally, H3 was detected at higher levels in ATRA-treated NB4-LR1 cells than in untreated ones. Such a difference was not readily observable in NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells.

#### ***Analysis of hTERT promoter methylation by targeted bisulfite sequencing***

As previously reported (Azouz, Wu et al. 2010), two regions of the promoter can be defined regarding the methylation pattern: a proximal region encompassing the core promoter, the transcription start site, exon1, and the beginning of exon 2, largely hypomethylated in both cell lines, and a distal region (about 200 bp upstream of the TSS) that is significantly more methylated. The overall methylation pattern of NB4-LR1 and NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells do not differ significantly. Similarly, no global modifications of these patterns have been observed after ATRA or ATO treatments alone or in combination. However, using this NGS targeted bisulfite sequencing approach, some data covering a region at the frontier between the differentially methylated domains of *hTERT* promoter were clearly missing.

#### ***Analysis of hTERT promoter DNA methylation and nucleosome occupancy by NOME-seq***

DNA methylation is an important feature of epigenetics and has been shown to be involved in the regulation of *hTERT* expression (Devereux, Horikawa et al. 1999, Dessain, Yu et al. 2000, Guilleret, Yan et al. 2002, Guilleret and Benhattar 2003, Zinn, Pruitt et al. 2007, Azouz, Wu et al. 2010, Avin, Umbricht et al. 2016). Furthermore, it is well established that nucleosome occupancy is determinant in modulating specific chromatin structures at the site of the occupancy. To investigate the relationship between DNA methylation and nucleosome occupancy in ATRA-treated and untreated NB4-LR1 and NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells and resolve the pattern of methylation at *hTERT* promoter gene, we applied to the *hTERT* gene promoter a high-resolution, single-molecule analysis named NOME-seq. This procedure allows the simultaneous investigation of nucleosome occupancy and endogenous CpG methylation on the same DNA molecule and the analysis of the relationships between these two chromatin features on a single locus (Kelly, Liu et al. 2012). We focused on two regions of *hTERT* promoter: the first region (region I) extended from -650 bp to +150 bp relative to TSS; the second region (region II) located far upstream from the TSS (-5500 bp to -4900 bp) (**Figure 5**). In region I, *hTERT* promoter DNA was weakly methylated with a mean methylation level of 23.7% and 14.7% in untreated NB4-LR1 and NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells, respectively. We confirmed the dual methylation pattern commonly observed in other telomerase positive cancer cells, including APL cells (Azouz, Wu et al. 2010), as the region near the TSS is hypomethylated, while the region further upstream was significantly more methylated (Zinn, Pruitt et al. 2007). Unexpectedly, in NB4-LR1 cells, ATRA-induced repression of *hTERT* was associated with a global decrease of CpG methylation level in region I (from 23.7% to 9.4%), suggesting that the methylation status of the proximal promoter may contribute to *hTERT* gene silencing. Moreover, associated with this decrease of DNA methylation, we observed a striking loss of chromatin accessibility particularly in the region between -200 bp to +1 bp.

The size of this region is large enough to accommodate at least one nucleosome. This observation is supported by the enrichment of histone H3 observed in this region. In contrast, ATRA treatment had no effect on either CpG methylation or chromatin accessibility in NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells. However, in this cell line, the combination of ATRA and ATO, which induced *hTERT* repression, generated a significant decrease of CpG methylation (from 14.7% to 2.2%), similar to that observed in ATRA-treated NB4-LR1 cells and a global reduction in chromatin accessibility.

In region II of *hTERT* DNA, NB4-LR1 cells displayed a marked hypermethylation (89.1%) compared to NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells (33.5%). Despite no significant change in DNA methylation profile of this region was observed in ATRA-treated NB4-LR1 cells, a decrease of chromatin accessibility was noticed. No clear modifications of DNA methylation pattern and chromatin accessibility were observed after treatments of NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells. Altogether, these results indicate that chromatin accessibility at *hTERT* promoter is associated with gene suppression in both cell lines.

#### ***Identification of an hTERT methylation signature in APL patient samples***

Given the above results, we analyzed the methylation profile of hTERT promoter and enhancer in APL patients using a publicly available dataset. DNA methylation data obtained by reduced representation bisulfite sequencing (RRBS) were downloaded from a published APL dataset deposited at the Gene expression omnibus (GSE42119, ref(Schoofs, Rohde et al. 2013)). Eighteen patient samples at primary diagnosis were analyzed, and density centrifugation-enriched mononuclear cells from remission bone marrow of eight matched patient samples. CD34<sup>+</sup> cells from healthy donors, and promyelocytes generated in vitro from these CD34<sup>+</sup> cells, were also included in the analysis as controls. Raw methylation levels from CpG sites covered by RRBS across all samples were used to perform unsupervised hierarchical clustering (**Figure 6**). The samples formed three main clusters: two encompassing APL patient samples at diagnosis and one encompassing hematopoietic progenitor cells from healthy donor and remission bone marrow samples

## Discussion

*hTERT* expression is upregulated in the majority of tumors. The elucidation of the mechanisms responsible for *hTERT* regulation will offer information that may be used for diagnosis and prognosis and could be translated into effective targeted cancer therapies. In the present study, the two specific cell lines used are illustrative of tumor progression process. They allowed us to understand how tumor cells are able to install a finely tuned transcriptional regulation for *hTERT*, and bypass its repression. In NB4-LR1 cells, long-term treatment with ATRA induced *hTERT* repression, telomere shortening and subsequently cell death. Whereas, NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells (isolated from the NB4-LR1 cell line), overcame the long-term ATRA-induced cell death step because of the reactivation of telomerase despite the continuous action of the drug. This reactivation of telomerase after an initial step of downregulation resembles what is observed during tumorigenesis when telomerase is reactivated. Therefore, this new variant provides an efficient tool to gain further insights on the molecular biology of telomerase regulation.

Recently, driving mutations in the promoter of *hTERT* have been discovered and found in over 50 cancer types (Heidenreich, Rachakonda et al. 2014). Although these mutations are frequent in certain type of cancers, they are weakly present in other type of cancers, including leukemia, breast, prostate and lung cancers. Other mechanisms contribute to the sustained expression and overexpression of *hTERT* in cancer cells. In the absence of *hTERT* mutations, its activation may occur through an epigenetic switch. It can be hypothesized that this switch mechanism mimics the consequences of promoter mutations. It has been well documented that DNA methylation, histone acetylation and methylation are involved in the regulation of *hTERT* transcription. However, the role and the molecular mechanisms are not well understood and can be even contradictory due to the different cellular models studied and the various methods used to analyze these epigenetic modifications. Furthermore, understanding the epigenetic regulation of *hTERT* requires a holistic examination of the relationship between DNA methylation, histone modifications and nucleosome positioning. In this study, we attempted to analyze the influence of the subnuclear environment of *hTERT* gene. We therefore investigated the epigenetic changes associated with ATRA-induced *hTERT* gene repression by combining several techniques for the first time. Our analyses used NOME-seq, a technique developed for analyzing the single base-pair resolution map of DNA methylation and nucleosome occupancy, ChiP, for mapping histone modification of the *hTERT* gene promoter, along with 3D-FISH for positional effects.

Recently Shay and Wright's groups described a phenomenon where genes are regulated by telomere length-dependent loops (TPE-OLD, telomere position effect over long distances). TPE-OLD represents a new mechanism by which *hTERT* can be partly regulated (Robin, Ludlow et al. 2014, Kim, Ludlow et al. 2016). The same group demonstrates that this mechanism of *hTERT* repression is also important in lymphocyte activation and cancer cell differentiation independently of the length of the telomeres. Based on these results and using the same 3D-FISH technical approach, we measured and compared the distance between *hTERT* locus and the subtelomeric 5p region in ATRA-treated NB4-LR1 and NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells. In NB4-LR1 cells, the strong repression of *hTERT* induced by ATRA treatment (more

than 90% compared to untreated cells) was associated with a significant decrease in the distance between the two loci, whereas in NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells this distance remained unchanged. Therefore, we confirmed that TPE-OLD is a potentially important epigenetic mechanism that may participate in *hTERT* expression regulation in contexts not related to telomere length modifications. Of note, in NB4-LR1<sup>SFD</sup> cell line, an initial decrease of *hTERT* expression was observed until it stabilized at 60% of that of untreated cells, and despite the continuous presence of ATRA. This observation suggests that TPE-OLD mechanism could contribute to a strong and permanent transcriptionally silent state of *hTERT* gene, rather than to initiate it.

As TPE-OLD could affect the epigenetic status of *hTERT* promoter, we analyzed active and inactive histone marks of *hTERT* gene using ChIP. We showed that in NB4-LR1 cells *hTERT* promoter has the features of a bivalent promoter, *i.e.* the simultaneous presence of the repressive mark H3K27Me3 and the activation marks H3K4Me3 and H3Ac around the TSS. These marks are commonly seen on genes “poised” for activation upon stem cell commitment and differentiation. In embryonic stem cells, bivalent promoters may achieve the possibility to respond rapidly to incoming signals by suppressing the formation of active RNA polymerase II complexes on one hand, and, on the other hand, not allow other less reversible suppressive regulatory mechanisms, like DNA methylation, to silence genes. This feature demonstrates plasticity of the *hTERT* gene in NB4-LR1 cells contributing to its reactivation during cellular transformation and tumorigenesis in a permissive environment. Indeed, ATRA treatment induced a strong decrease of the active histone marks, whereas enrichment of repressive marks was observed. By contrast, in NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells, the levels of H3K27Me3 were significantly lower. In this cell line, only the ATRA and ATO combined treatment induced a slight enrichment of this repressive mark associated with a decrease of the active histone marks more important for H3Ac than H3K4Me3.

Previous studies, including ours (Azouz, Wu et al. 2010), have shown that DNA methylation does not always correlate with *hTERT* expression levels in different types of cancer, suggesting that other mechanisms may regulate *hTERT* expression in these cells. Nucleosome occupancy and methylation sequencing (NOMe-seq) assay has been used for the first time to measure simultaneously endogenous DNA methylation and nucleosome occupancy at *hTERT* gene promoter. The low level of methylation at *hTERT* TSS was similar between cells that repressed *hTERT* (ATRA-treated NB4-LR1 and ATRA+ATO treated NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells) and cells that maintained *hTERT* expression (ATRA or ATO-treated NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells). This absence of methylation within the minimal promoter has been commonly correlated with higher levels of *hTERT* transcription. Despite the constant low level of methylation in the proximal part of *hTERT* promoter, modifications in chromatin accessibility were observed correlating with a reduction of active histone marks and *hTERT* transcriptional activity. Interestingly, our study shows that some sites of differential accessibility do not show any differential methylation demonstrating the complementarity of these two kinds of approaches. Our results clearly demonstrate that the transcriptional regulatory mechanisms for *hTERT* gene are controlled not only by DNA methylation at *hTERT* promoter but also by chromatin accessibility.

This study has identified a new region in *hTERT* promoter localized approximately 5 kb upstream of the TSS and previously described as an enhancer (Eldholm, Haugen et al. 2014). This domain is differentially methylated in both cell lines, being hypermethylated in NB4-LR1 cells and hypomethylated in NB4-LR1<sup>SFD</sup> cell. Interestingly and in contrast with NB4-LR1, in NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells, this region of *hTERT* promoter was enriched in both H3Ac and H3K4Me3 active marks. The levels of these marks dropped drastically after ATRA+ATO treatment. These results suggest that epigenetic features of this region could play an important role in the regulation of *hTERT* gene. *In silico* analysis of this region identifies putative consensus binding sites for multiple interacting transcription factors, including RAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ , PPAR $\alpha$ /RXR $\alpha$ , Sp1 and GABP $\alpha$ . Also, factors such as CTCF, which interacts with *hTERT* promoter (either proximal promoter or enhancer), are known for organizing global chromosomal architecture, changing accessibility but also possible interactions far away in distance. Thus, it can be put forward that a potential cross-talk exists between the distal and proximal domains of *hTERT* promoter to orchestrate *hTERT* expression. Our results suggest a more complex relationship between methylation of *hTERT* promoter and transcriptional activity and point to a role outside the minimal promoter in activating *hTERT* and thereby force the revisiting of a number of previously proposed concepts regarding *hTERT* epigenetic regulation.

In conclusion, we investigated how *hTERT* can be regulated by ATRA by mapping genomic features together with epigenetic features such as DNA methylation, histone modifications, and chromatin accessibility at *hTERT* promoter. The data generated attempts to fully represent the cellular complexity of *hTERT* regulation and the need for future work to extend these findings to other cancers. Many transcription factors are involved in the tight control of *hTERT* expression. However, those factors remain elusive as potential drug targets. Transcription factors could interact with some epigenetic modifiers and a better understanding of the cooperation between transcription factors and the epigenetic landscape will offer hope to develop new drug opportunities. Therefore, understanding the mechanistic basis of *hTERT* silencing and reexpression is a prerequisite for the development of therapies targeting *hTERT* expression.

## Fundings

The work of the authors was supported by grants from the Institute of Health and Medical Research (INSERM), the National Center for Scientific Research (CNRS), the Fondation de France (n° 201300038226 to E. S-B.), the French National Research Agency (ANR to C. B.), the Ligue nationale contre le cancer (E.S-B), the French Society of Dermatology (M. P-C and E.C.), and Charpak Lab scholarship (RK).

## Authors' contributions

DG, CB, EN, performed the experimental work. DG, EN, RK and ESB analyzed the data. MPC and EC contributed biological materials. DG, CB, EN, MPC, EC, PF, and ESB contributed for the drafted manuscript and for its critical revision. ESB designed the study and wrote the manuscript. Final manuscript was read and approved by all authors. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## References

- Avilion, A. A., M. A. Piatyszek, J. Gupta, J. W. Shay, S. Bacchetti and C. W. Greider (1996). "Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues." *Cancer Res* **56**(3): 645-650.
- Avin, B. A., C. B. Umbricht and M. A. Zeiger (2016). "Human telomerase reverse transcriptase regulation by DNA methylation, transcription factor binding and alternative splicing (Review)." *Int J Oncol* **49**(6): 2199-2205.
- Azouz, A., Y. L. Wu, J. Hillion, I. Tarkanyi, A. Karniguian, J. Aradi, M. Lanotte, G. Q. Chen, M. Chehna and E. Segal-Bendirdjian (2010). "Epigenetic plasticity of hTERT gene promoter determines retinoid capacity to repress telomerase in maturation-resistant acute promyelocytic leukemia cells." *Leukemia* **24**(3): 613-622.
- Azuara, V., P. Perry, S. Sauer, M. Spivakov, H. F. Jørgensen, R. M. John, M. Gouti, M. Casanova, G. Warnes, M. Merkschlager and A. G. Fisher (2006). "Chromatin signatures of pluripotent cell lines." *Nat Cell Biol* **8**(5): 532-538.
- Bannister, A. J. and T. Kouzarides (2011). "Regulation of chromatin by histone modifications." *Cell Res* **21**(3): 381-395.
- Beesley, J., H. A. Pickett, S. E. Johnatty, A. M. Dunning, X. Chen, J. Li, K. Michailidou, Y. Lu, D. N. Rider, R. T. Palmieri, M. D. Stutz, D. Lambrechts, E. Despierre, S. Lambrechts, I. Vergote, J. Chang-Claude, S. Nickels, A. Vrieling, D. Flesch-Janys, S. Wang-Gohrke, U. Eilber, N. Bogdanova, N. Antonenkova, I. B. Runnebaum, T. Dork, M. T. Goodman, G. Lurie, L. R. Wilkens, R. K. Matsuno, L. A. Kiemeny, K. K. Aben, T. Marees, L. F. Massuger, B. L. Fridley, R. A. Vierkant, E. V. Bandera, S. H. Olson, I. Orlov, L. Rodriguez-Rodriguez, L. S. Cook, N. D. Le, A. Brooks-Wilson, L. E. Kelemen, I. Campbell, S. A. Gayther, S. J. Ramus, A. Gentry-Maharaj, U. Menon, S. Ahmed, C. Baynes, P. D. Pharoah, I. kConFab, G. Australian Ovarian Cancer Study, A. Investigators, K. Muir, A. Lophatananon,

A. Chaiwerawattana, S. Wiangnon, S. Macgregor, D. F. Easton, R. R. Reddel, E. L. Goode, G. Chenevix-Trench and C. Ovarian Cancer Association (2011). "Functional polymorphisms in the TERT promoter are associated with risk of serous epithelial ovarian and breast cancers." PLoS One **6**(9): e24987.

Bell, R. J., H. T. Rube, A. Kreig, A. Mancini, S. D. Fouse, R. P. Nagarajan, S. Choi, C. Hong, D. He, M. Pekmezci, J. K. Wiencke, M. R. Wrensch, S. M. Chang, K. M. Walsh, S. Myong, J. S. Song and J. F. Costello (2015). "Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer." Science **348**(6238): 1036-1039.

Bernstein, B. E., T. S. Mikkelsen, X. Xie, M. Kamal, D. J. Huebert, J. Cuff, B. Fry, A. Meissner, M. Wernig, K. Plath, R. Jaenisch, A. Wagschal, R. Feil, S. L. Schreiber and E. S. Lander (2006). "A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells." Cell **125**(2): 315-326.

Blasco, M. A., W. Funk, B. Villeponteau and C. W. Greider (1995). "Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA." Science **269**(5228): 1267-1270.

Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner and W. E. Wright (1998). "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells." Science **279**(5349): 349-352.

Chaumeil, J., M. Micsinai and J. A. Skok (2013). "Combined immunofluorescence and DNA FISH on 3D-preserved interphase nuclei to study changes in 3D nuclear organization." J Vis Exp(72): e50087.

Chiba, K., F. K. Lorbeer, A. H. Shain, D. T. McSwiggen, E. Schruf, A. Oh, J. Ryu, X. Darzacq, B. C. Bastian and D. Hockemeyer (2017). "Mutations in the promoter of the telomerase gene TERT contribute to tumorigenesis by a two-step mechanism." Science **357**(6358): 1416-1420.

Chodavarapu, R. K., S. Feng, Y. V. Bernatavichute, P. Y. Chen, H. Stroud, Y. Yu, J. A. Hetzel, F. Kuo, J. Kim, S. J. Cokus, D. Casero, M. Bernal, P. Huijser, A. T. Clark, U. Kramer, S. S. Merchant, X. Zhang, S. E. Jacobsen and M. Pellegrini (2010). "Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation." Nature **466**(7304): 388-392.

Cohen, S. B., M. E. Graham, G. O. Lovrecz, N. Bache, P. J. Robinson and R. R. Reddel (2007). "Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells." Science **315**(5820): 1850-1853.

Dekker, J. and L. Mirny (2016). "The 3D Genome as Moderator of Chromosomal Communication." Cell **164**(6): 1110-1121.

Dessain, S. K., H. Yu, R. R. Reddel, R. L. Beijersbergen and R. A. Weinberg (2000). "Methylation of the human telomerase gene CpG island." Cancer Res **60**(3): 537-541.

Devereux, T. R., I. Horikawa, C. H. Anna, L. A. Annab, C. A. Afshari and J. C. Barrett (1999). "DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene." Cancer Res **59**(24): 6087-6090.

Duprez, E., S. Ruchaud, G. Houge, V. Martin-Thouvenin, F. Valensi, P. Kastner, R. Berger and M. Lanotte (1992). "A retinoid acid 'resistant' t(15;17) acute promyelocytic leukemia cell line: isolation, morphological, immunological, and molecular features." Leukemia **6**(12): 1281-1287.

Eldholm, V., A. Haugen and S. Zienolddiny (2014). "CTCF mediates the TERT enhancer-promoter interactions in lung cancer cells: identification of a novel enhancer region involved in the regulation of TERT gene." *Int J Cancer* **134**(10): 2305-2313.

Ge, M., M. Shi, C. An, W. Yang, X. Nie, J. Zhang, Z. Lv, J. Li, L. Zhou, Z. Du and M. Yang (2016). "Functional evaluation of TERT-CLPTM1L genetic variants associated with susceptibility of papillary thyroid carcinoma." *Sci Rep* **6**: 26037.

Guilleret, I. and J. Benhattar (2003). "Demethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter reduced hTERT expression and telomerase activity and shortened telomeres." *Exp Cell Res* **289**(2): 326-334.

Guilleret, I., P. Yan, F. Grange, R. Braunschweig, F. T. Bosman and J. Benhattar (2002). "Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity." *Int J Cancer* **101**(4): 335-341.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.

Heidenreich, B., P. S. Rachakonda, K. Hemminki and R. Kumar (2014). "TERT promoter mutations in cancer development." *Curr Opin Genet Dev* **24**: 30-37.

Horn, S., A. Figl, P. S. Rachakonda, C. Fischer, A. Sucker, A. Gast, S. Kadel, I. Moll, E. Nagore, K. Hemminki, D. Schadendorf and R. Kumar (2013). "TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma." *Science* **339**(6122): 959-961.

Huang, F. W., E. Hodis, M. J. Xu, G. V. Kryukov, L. Chin and L. A. Garraway (2013). "Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma." *Science* **339**(6122): 957-959.

Kelly, T. K., Y. Liu, F. D. Lay, G. Liang, B. P. Berman and P. A. Jones (2012). "Genome-wide mapping of nucleosome positioning and DNA methylation within individual DNA molecules." *Genome Res* **22**(12): 2497-2506.

Khattar, E. and V. Tergaonkar (2017). "Transcriptional Regulation of Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) by MYC." *Front Cell Dev Biol* **5**: 1.

Killela, P. J., Z. J. Reitman, Y. Jiao, C. Bettegowda, N. Agrawal, L. A. Diaz, Jr., A. H. Friedman, H. Friedman, G. L. Gallia, B. C. Giovanella, A. P. Grollman, T. C. He, Y. He, R. H. Hruban, G. I. Jallo, N. Mandahl, A. K. Meeker, F. Mertens, G. J. Netto, B. A. Rasheed, G. J. Riggins, T. A. Rosenquist, M. Schiffman, M. Shih Ie, D. Theodorescu, M. S. Torbenson, V. E. Velculescu, T. L. Wang, N. Wentzensen, L. D. Wood, M. Zhang, R. E. McLendon, D. D. Bigner, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, N. Papadopoulos and H. Yan (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**(15): 6021-6026.

Kim, W., A. T. Ludlow, J. Min, J. D. Robin, G. Stadler, I. Mender, T. P. Lai, N. Zhang, W. E. Wright and J. W. Shay (2016). "Regulation of the Human Telomerase Gene TERT by Telomere Position Effect-Over Long Distances (TPE-OLD): Implications for Aging and Cancer." *PLoS Biol* **14**(12): e2000016.

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

Lanotte, M., V. Martin-Thouvenin, S. Najman, P. Balerini, F. Valensi and R. Berger (1991). "NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3)." Blood **77**(5): 1080-1086.

Li, B., M. Carey and J. L. Workman (2007). "The role of chromatin during transcription." Cell **128**(4): 707-719.

Li, Y. and V. Tergaonkar (2016). "Telomerase reactivation in cancers: Mechanisms that govern transcriptional activation of the wild-type vs. mutant TERT promoters." Transcription **7**(2): 44-49.

Lingner, J., T. R. Hughes, A. Shevchenko, M. Mann, V. Lundblad and T. R. Cech (1997). "Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase." Science **276**(5312): 561-567.

Mallona, I., A. Diez-Villanueva and M. A. Peinado (2014). "Methylation plotter: a web tool for dynamic visualization of DNA methylation data." Source Code Biol Med **9**: 11.

Meyerson, M., C. M. Counter, E. N. Eaton, L. W. Ellisen, P. Steiner, S. D. Caddle, L. Ziaugra, R. L. Beijersbergen, M. J. Davidoff, Q. Liu, S. Bacchetti, D. A. Haber and R. A. Weinberg (1997). "hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization." Cell **90**(4): 785-795.

Montesanto, A., A. R. Bonfigli, P. Crocco, P. Garagnani, M. De Luca, M. Boemi, E. Marasco, C. Pirazzini, C. Giuliani, C. Franceschi, G. Passarino, R. Testa, F. Olivieri and G. Rose (2018). "Genes associated with Type 2 Diabetes and vascular complications." Aging (Albany NY) **10**(2): 178-196.

Pande, M., M. R. Spitz, X. Wu, I. P. Gorlov, W. V. Chen and C. I. Amos (2011). "Novel genetic variants in the chromosome 5p15.33 region associate with lung cancer risk." Carcinogenesis **32**(10): 1493-1499.

Pendino, F., C. Dudognon, F. Delhommeau, T. Sahraoui, M. Flexor, A. Bennaceur-Griscelli, M. Lanotte and E. Segal-Bendirdjian (2003). "Retinoic acid receptor alpha and retinoid-X receptor-specific agonists synergistically target telomerase expression and induce tumor cell death." Oncogene **22**(57): 9142-9150.

Pendino, F., M. Flexor, F. Delhommeau, D. Buet, M. Lanotte and E. Segal-Bendirdjian (2001). "Retinoids down-regulate telomerase and telomere length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(12): 6662-6667.

Pendino, F., J. Hillion, C. Dudognon, J. Delaunay, S. Mourah, M. P. Podgorniak, I. Lafon, C. Chomienne, M. Lanotte, H. Dombret, P. Rousselot and E. Segal-Bendirdjian (2006). "Telomerase targeting by retinoids in cells from patients with myeloid leukemias of various subtypes, not only APL." Leukemia **20**: 599-603.

Pendino, F., T. Sahraoui, M. Lanotte and E. Segal-Bendirdjian (2002). "A novel mechanism of retinoic acid resistance in acute promyelocytic leukemia cells through a defective pathway in telomerase regulation." Leukemia **16**(5): 826-832.

Ramlee, M. K., J. Wang, W. X. Toh and S. Li (2016). "Transcription Regulation of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Gene." Genes (Basel) **7**(8).

Renaud, S., D. Loukinov, F. T. Bosman, V. Lobanenko and J. Benhattar (2005). "CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription." Nucleic Acids Res **33**(21): 6850-6860.

Robin, J. D., A. T. Ludlow, K. Batten, F. Magdinier, G. Stadler, K. R. Wagner, J. W. Shay and W. E. Wright (2014). "Telomere position effect: regulation of gene expression with progressive telomere shortening over long distances." *Genes Dev* **28**(22): 2464-2476.

Schoofs, T., C. Rohde, K. Hebestreit, H. U. Klein, S. Gollner, I. Schulze, M. Lerdrup, N. Dietrich, S. Agrawal-Singh, A. Witten, M. Stoll, E. Lengfelder, W. K. Hofmann, P. Schlenke, T. Buchner, K. Hansen, W. E. Berdel, F. Rosenbauer, M. Dugas and C. Muller-Tidow (2013). "DNA methylation changes are a late event in acute promyelocytic leukemia and coincide with loss of transcription factor binding." *Blood* **121**(1): 178-187.

Ségal-Bendirdjian, E. and A. Jacquemin-Sablon (1995). "Cisplatin resistance in a murine leukemia cell line is associated with a defective apoptotic process." *Exp Cell Res* **218**(1): 201-212.

Shin, K. H., M. K. Kang, E. Dicterow and N. H. Park (2003). "Hypermethylation of the hTERT promoter inhibits the expression of telomerase activity in normal oral fibroblasts and senescent normal oral keratinocytes." *Br J Cancer* **89**(8): 1473-1478.

Shippen-Lentz, D. and E. H. Blackburn (1990). "Functional evidence for an RNA template in telomerase." *Science* **247**(4942): 546-552.

Tarkanyi, I., C. Dudognon, J. Hillion, F. Pendino, M. Lanotte, J. Aradi and E. Ségal-Bendirdjian (2005). "Retinoid/arsenic combination therapy of promyelocytic leukemia: induction of telomerase-dependent cell death." *Leukemia* **19**(10): 1806-1811.

Venteicher, A. S., Z. Meng, P. J. Mason, T. D. Veenstra and S. E. Artandi (2008). "Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly." *Cell* **132**(6): 945-957.

Vinagre, J., A. Almeida, H. Populo, R. Batista, J. Lyra, V. Pinto, R. Coelho, R. Celestino, H. Prazeres, L. Lima, M. Melo, A. G. da Rocha, A. Preto, P. Castro, L. Castro, F. Pardal, J. M. Lopes, L. L. Santos, R. M. Reis, J. Cameselle-Teijeiro, M. Sobrinho-Simoës, J. Lima, V. Maximo and P. Soares (2013). "Frequency of TERT promoter mutations in human cancers." *Nat Commun* **4**: 2185.

Zhang, M., Z. Wang, O. Obazee, J. Jia, E. J. Childs, J. Hoskins, G. Figlioli, E. Mocci, I. Collins, C. C. Chung, C. Hautman, A. A. Arslan, L. Beane-Freeman, P. M. Bracci, J. Buring, E. J. Duell, S. Gallinger, G. G. Giles, G. E. Goodman, P. J. Goodman, A. Kamineni, L. N. Kolonel, M. H. Kulke, N. Malats, S. H. Olson, H. D. Sesso, K. Visvanathan, E. White, W. Zheng, C. C. Abnet, D. Albanes, G. Andreotti, L. Brais, H. B. Bueno-de-Mesquita, D. Basso, S. I. Berndt, M. C. Boutron-Ruault, M. F. Bijlsma, H. Brenner, L. Burdette, D. Campa, N. E. Caporaso, G. Capurso, G. M. Cavestro, M. Cotterchio, E. Costello, J. Elena, U. Boggi, J. M. Gaziano, M. Gazouli, E. L. Giovannucci, M. Goggins, M. Gross, C. A. Haiman, M. Hassan, K. J. Helzlsouer, N. Hu, D. J. Hunter, E. Iskierka-Jazdzewska, M. Jenab, R. Kaaks, T. J. Key, K. T. Khaw, E. A. Klein, M. Kogevinas, V. Krogh, J. Kupcinskis, R. C. Kurtz, M. T. Landi, S. Landi, L. Le Marchand, A. Mambrini, S. Mannisto, R. L. Milne, R. E. Neale, A. L. Oberg, S. Panico, A. V. Patel, P. H. Peeters, U. Peters, R. Pezzilli, M. Porta, M. Purdue, J. R. Quiros, E. Riboli, N. Rothman, A. Scarpa, G. Scelo, X. O. Shu, D. T. Silverman, P. Soucek, O. Strobel, M. Sund, E. Małecká-Panas, P. R. Taylor, F. Tavano, R. C. Travis, M. Thornquist, A. Tjønneland, G. S. Tobias, D. Trichopoulos, Y. Vashist, P. Vodicka, J. Wactawski-Wende, N. Wentzensen, H. Yu, K. Yu, A. Zeleniuch-Jacquotte, C. Kooperberg, H. A. Risch, E. J. Jacobs, D. Li, C. Fuchs, R. Hoover, P. Hartge, S. J. Chanock, G. M. Petersen, R. S. Stolzenberg-

Solomon, B. M. Wolpin, P. Kraft, A. P. Klein, F. Canzian and L. T. Amundadottir (2016). "Three new pancreatic cancer susceptibility signals identified on chromosomes 1q32.1, 5p15.33 and 8q24.21." Oncotarget **7**(41): 66328-66343.

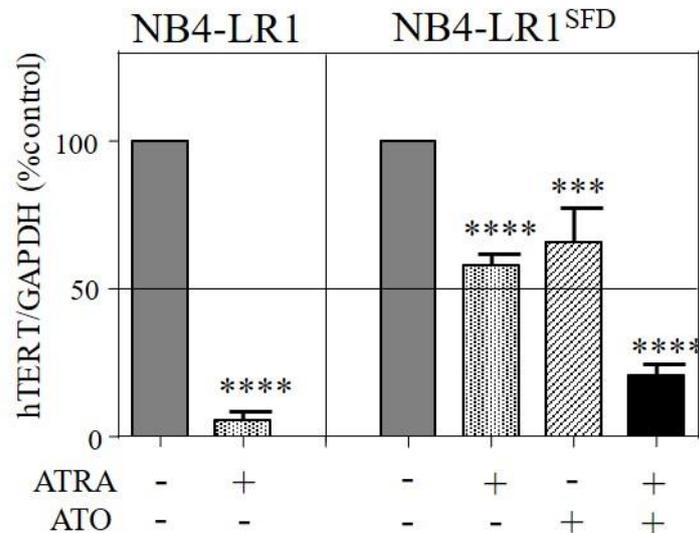
Zhang, Y., X. Zhang, H. Zhang, Y. Zhai, Z. Wang, P. Li, L. Yu, X. Xia, Y. Zhang, Y. Zeng, F. He and G. Zhou (2016). "Common variations in TERT-CLPTM1L locus are reproducibly associated with the risk of nasopharyngeal carcinoma in Chinese populations." Oncotarget **7**(1): 759-770.

Zhang, Y., M. Zhao, L. Shen, Y. Ren, L. Su, X. Li, Z. Yin and B. Zhou (2014). "Genetic polymorphisms of TERT and CLPTM1L and risk of lung cancer: a case-control study in northeast Chinese male population." Med Oncol **31**(7): 18.

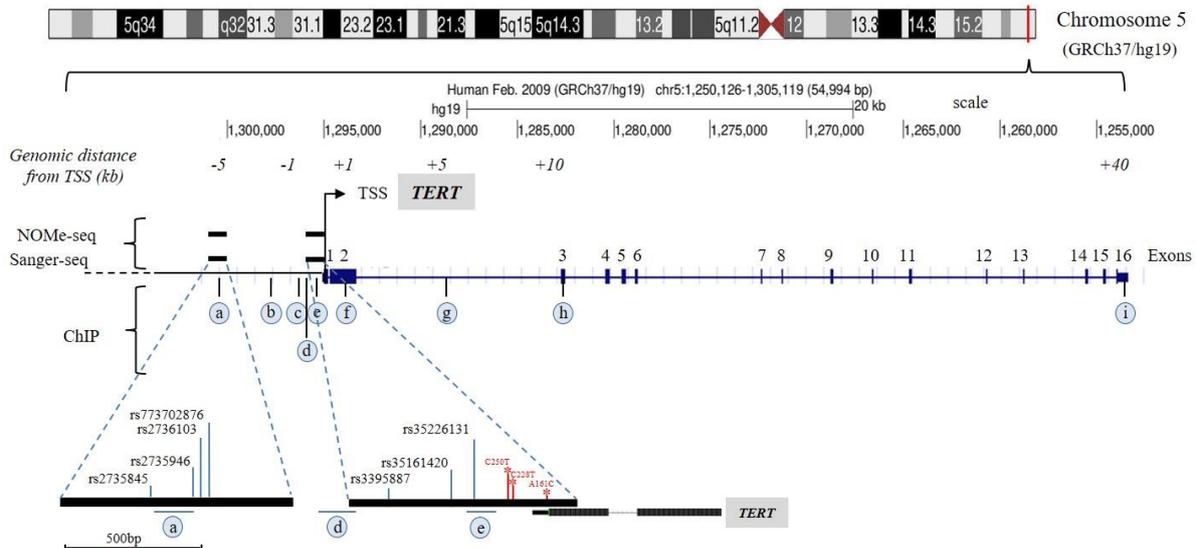
Zhou, L., G. Fu, J. Wei, J. Shi, W. Pan, Y. Ren, X. Xiong, J. Xia, Y. Shen, H. Li and M. Yang (2016). "The identification of two regulatory ESCC susceptibility genetic variants in the TERT-CLPTM1L loci." Oncotarget **7**(5): 5495-5506.

Zinn, R. L., K. Pruitt, S. Eguchi, S. B. Baylin and J. G. Herman (2007). "hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site." Cancer Res **67**(1): 194-201.

## Figures

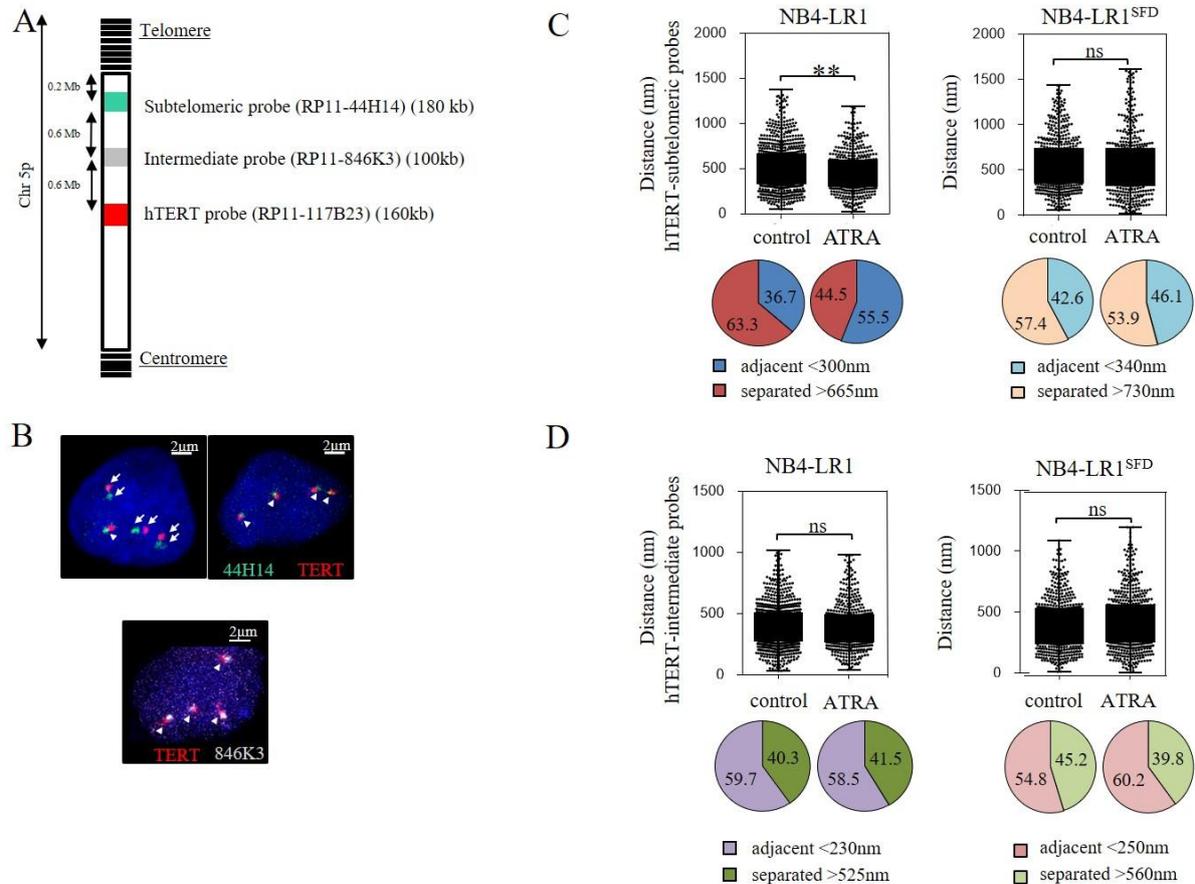


**Figure 1:** qRT-PCR results showing *hTERT* gene expression in NB4-LR1 and NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells. Cells were treated for 7 days with ATRA (1  $\mu$ M) alone or in combination with Arsenic trioxide (ATO, 0.2  $\mu$ M). Expression levels were normalized to GAPDH expression. Results were expressed as means  $\pm$  SEM. t-test or one way ANOVA with post-hoc Tukey, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

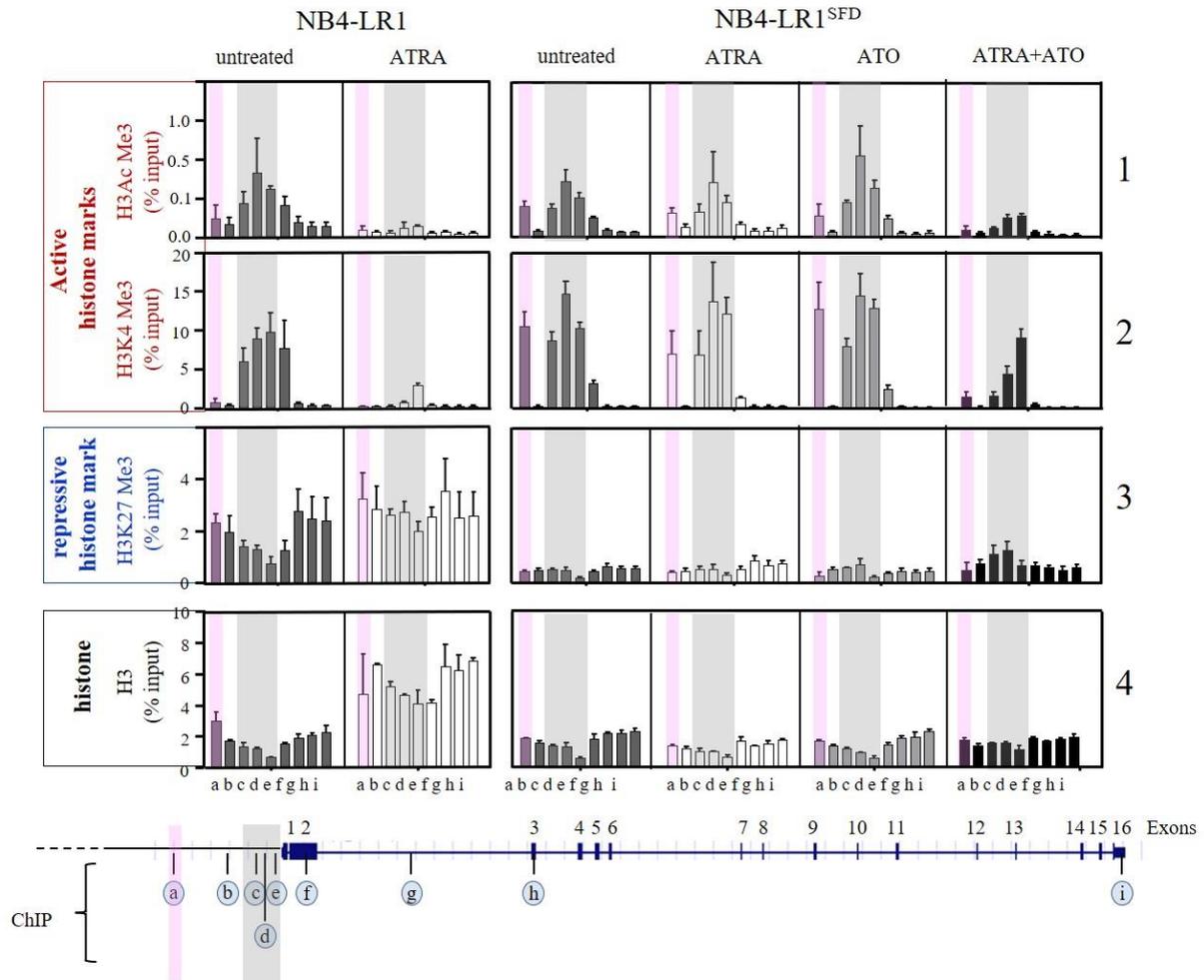


**Figure 2: Schematic representation of *hTERT* gene.** The figure encompasses the hg19 coordinates chr5: 1,250,126-1,305,119. The scale of this diagram is given above the gene. The overall intron/exon structure of the gene, which consists of 16 exons (blue boxes numbered from 1 to 16) and 15 introns, is represented. The transcription start site (TSS) is indicated by an arrow. The encircled letters under the schema indicate the localization on the gene where the different probe sets localize for analysis of ChIP studies. The regions sequenced in NOME-, NGS-BS- and Sanger sequencing are indicated by a solid dark line above the gene. The localization of the SNP identified in NB4-LR1 and NB4-LR1<sup>SFD</sup> are

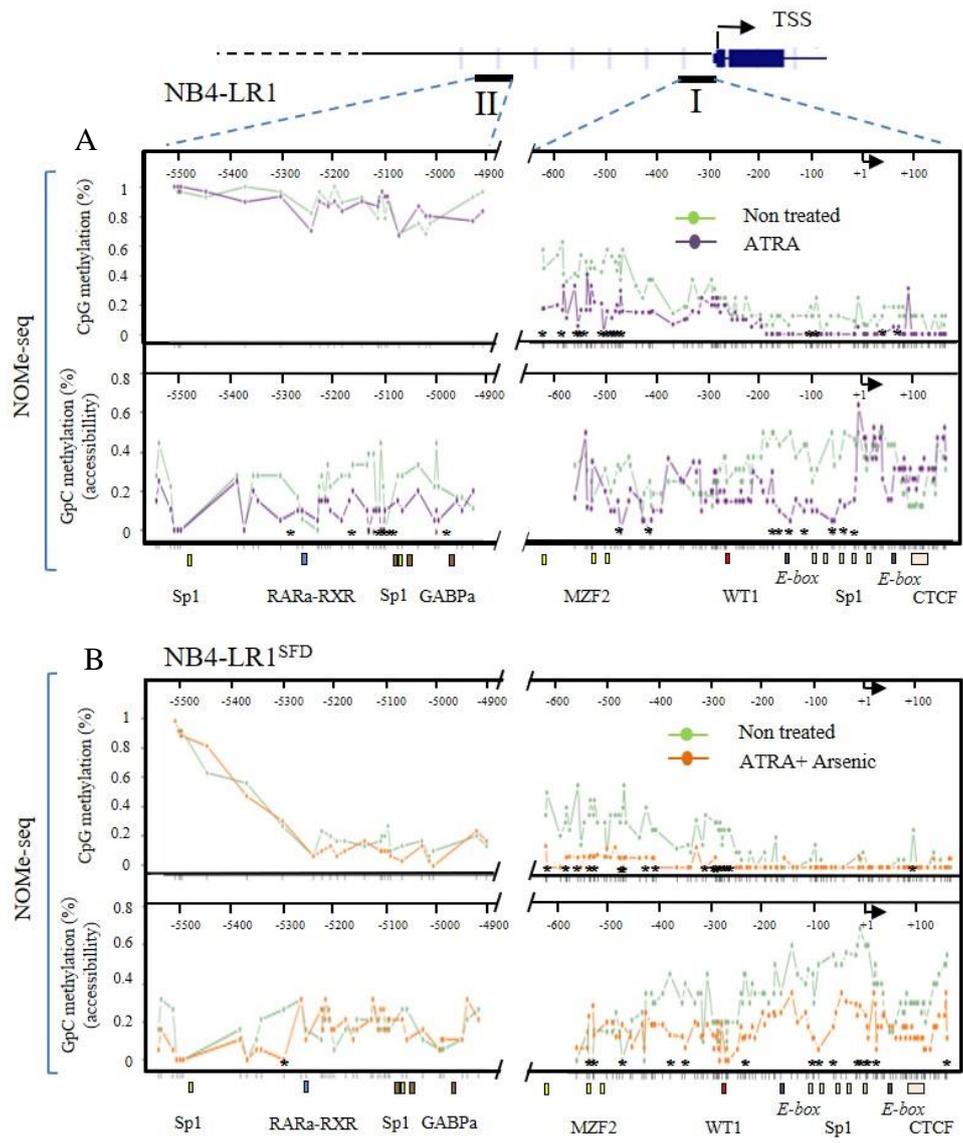
noted. The *hTERT* promoter mutations most frequently described in the literature are also indicated for information.

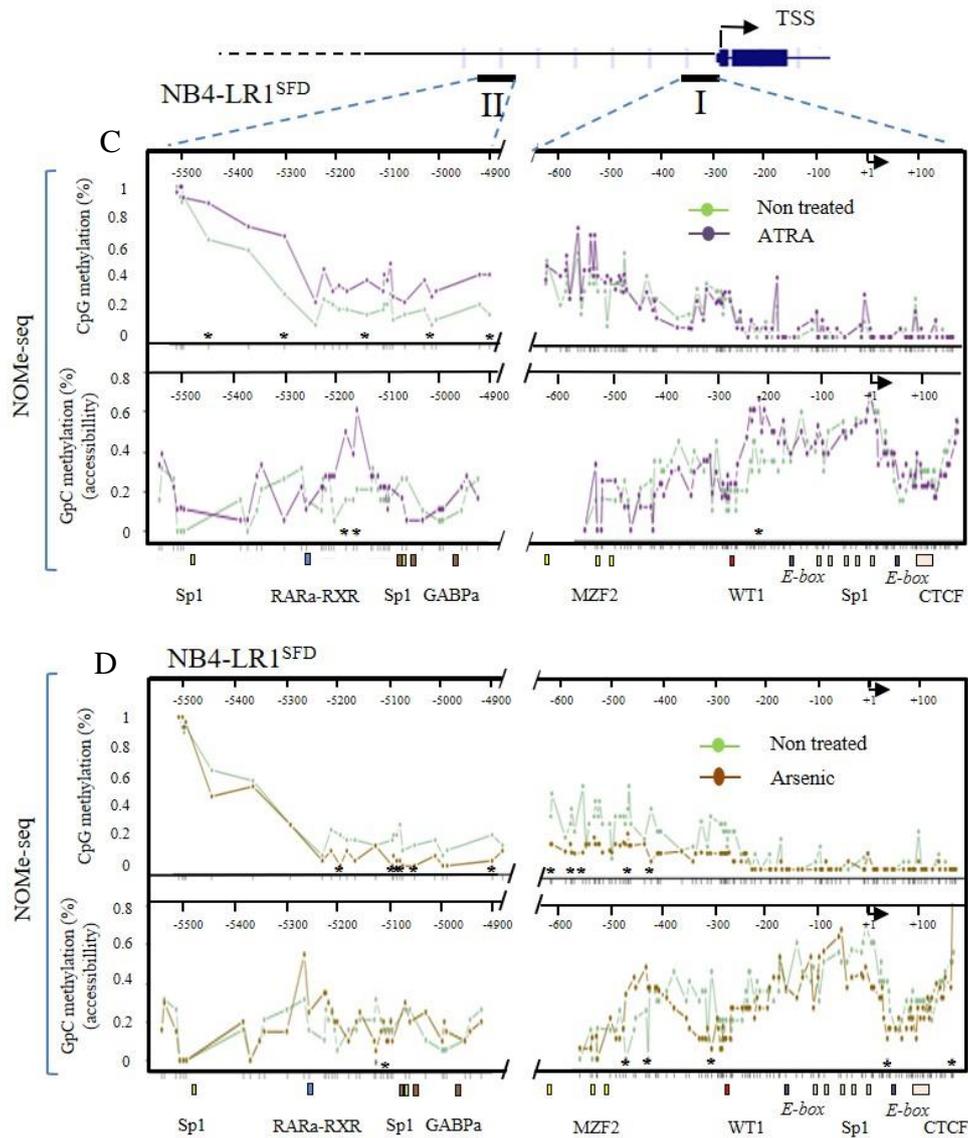


**Figure 3: 3D DNA-FISH analysis.** **A.** The location of each probe is shown in a schematic representation of the short arm (p) of chromosome 5. DNA probes (RP11-117B23 BAC) against *hTERT* locus (red) and targeting subtelomeric 5p region (RP11-44H14 BAC, green) are used to analyze physical proximity by 3D-FISH. **B.** Confocal images of 3D-FISH after ImageJ processing. Representative confocal images of 3D-FISH showing either the proximity or the separation of the loci. Arrow heads indicate spots that are considered adjacent; full arrows indicate spots that are separated. **C and D.** Box plots (upper panels) illustrate the distribution of the distances determined from processed images of *in situ* hybridization using either the subtelomeric (**C**) or the intermediate probe (**D**) relative to the *hTERT* probe in NB4-LR1 variants before and after ATRA treatment (1  $\mu$ M, 7 days). Images were processed with ImageJ for about 150 to 200 nuclei from 3 separate experiments per condition. Significant differences are marked with asterisks (Mann-Whitney test). Pie charts (lower panels) illustrate the relative proportion of adjacent and separated signals in NB4-LR1 and NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells. The criteria for the analyses depending on both the probes and the cell lines are indicated. BAC probes were more adjacent in the ATRA-treated NB4-LR1 cells than in control cells.

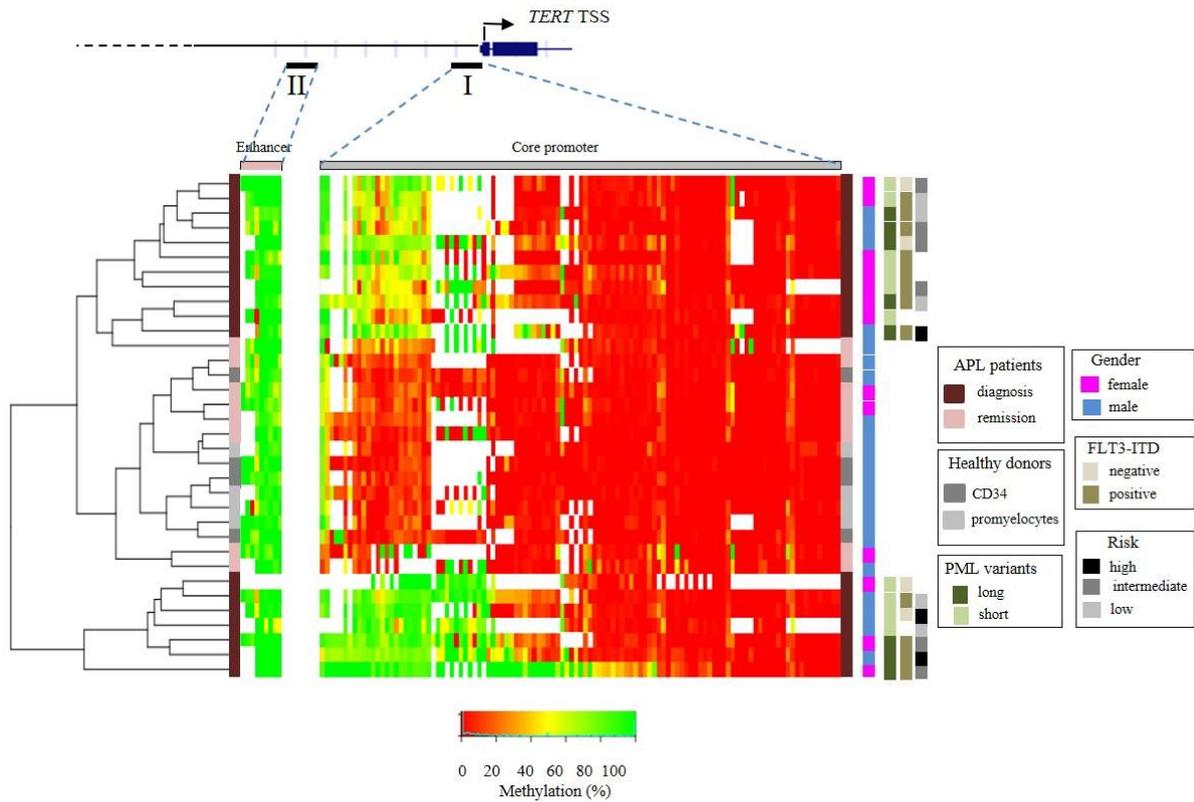


**Figure 4: Chromatin marks at *hTERT* gene.** Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was analyzed by quantitative PCR (qPCR) data using nine pairs of primers to amplify selected regions (a to i) encompassing the *hTERT* gene as indicated on the schematic representation above the graphs. Semitransparent grey and pink color label *hTERT* proximal promoter and enhancer, respectively. Site specific ChIPs of H3Ac, H3K4Me3, H3K27Me3, and H3 are presented as percentage of the input  $\pm$  the SEM of three independent experiments.



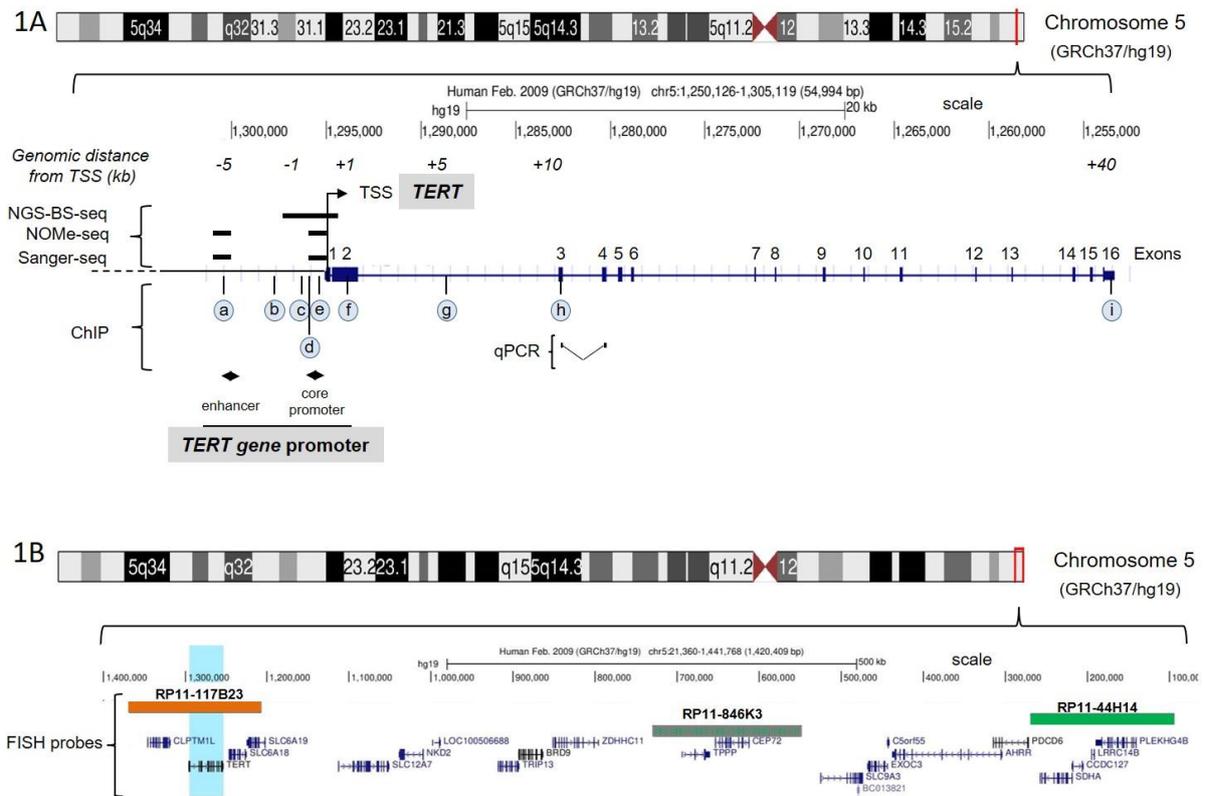


**Figure 5: Chromatin accessibility and endogenous CpG methylation at the *hTERT* gene promoter as determined by NOMe-seq analysis.** NOMe-seq was used to determine in the same time the level of endogenous DNA methylation and chromatin accessibility on individual DNA molecules for two sub-regions of the *hTERT* gene promoter visualized on the upper part of the figure as region I and II. Region I encompasses *hTERT* TSS, region II corresponds to the upstream conserved sequence described as an enhancer. For each sequence, 10 to 20 clones were analyzed from DNA obtained from NB4-LR1 (*panel A*) and NB4-LR1<sup>SFD</sup> (*panel B-D*) cells treated or not as indicated. The upper part of each panel indicates endogenous DNA methylation, the lower part chromatin accessibility. Data visualization as methylation profiling plot was performed using Methylation plotter web tool (Mallona, Diez-Villanueva et al. 2014). Each line represents for each group of samples the methylation mean for each position. Asterisks indicate a statistical significance between the treated and untreated groups as calculated by Kruskal-Wallis test ( $p < 0.05$ ). Ticks in x-axis indicate individual CpG (upper panel) and GpC (lower panel), respectively. Transcription factor binding sites (colored boxes), the *hTERT* promoter mutation (▼), and TSS (solid arrow) are depicted.

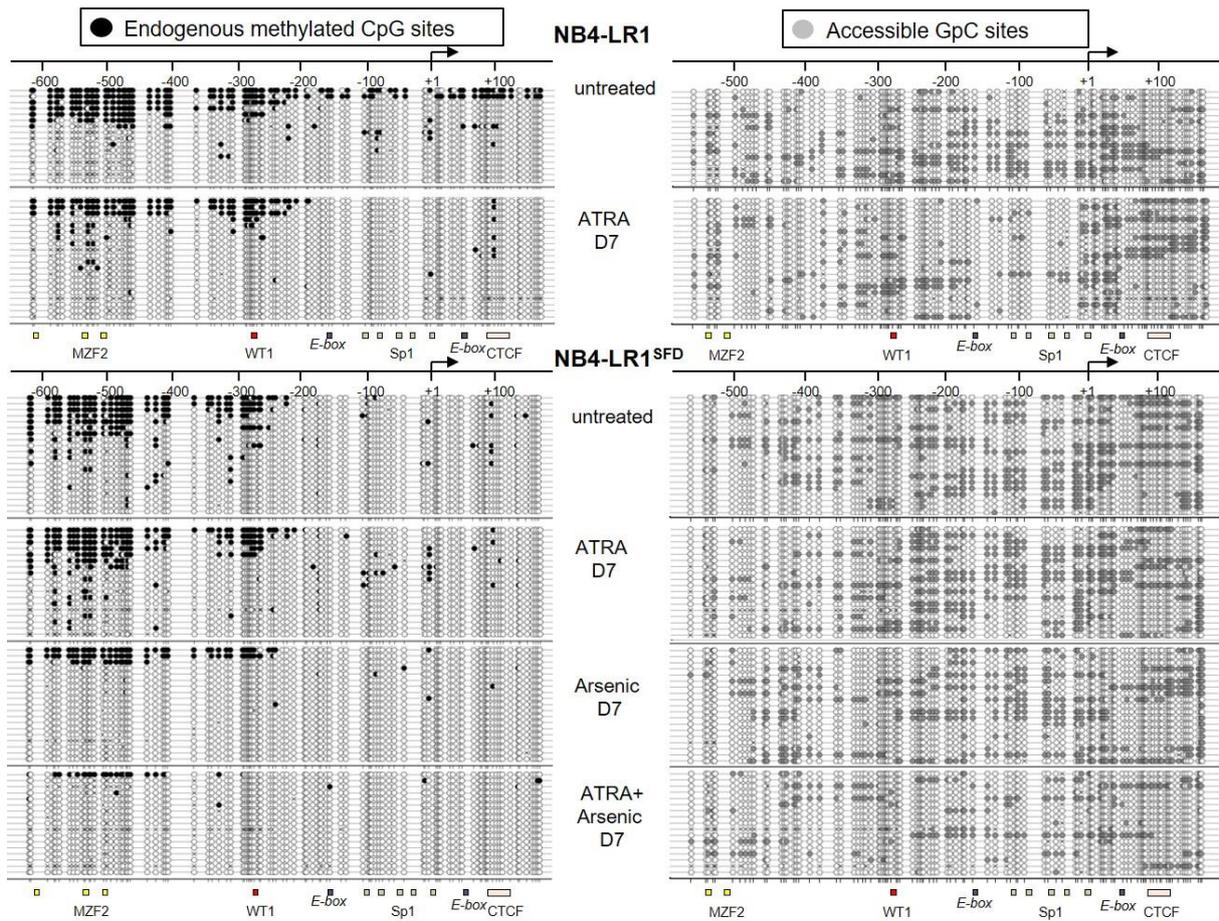


**Figure 6: Hierarchic cluster analysis of APL patients' samples and methylation profile at *hTERT* promoter and enhancer.** The unsupervised hierarchical clustering is based on raw RRBS DNA methylation values. The color grid on each side visualizes the sample characteristics.

## Supplemental Figures



**Supplemental Figure S1: Schematic representation of *hTERT* gene. A.** The figure encompasses the hg19 coordinates chr5: 1,250,126-1,305,119. The scale of this diagram is given above the gene. The overall intron/exon structure of the gene, which consists of 16 exons (blue boxes numbered from 1 to 16) and 15 introns, is represented. The transcription start site (TSS) is indicated by an arrow. The locations of enhancer and core promoter elements are indicated. The encircled letters under the schema indicate the localization on the gene where the different probe sets localize for analysis of ChIP studies. The regions sequenced in NOME-, NGS-BS- and Sanger sequencing are indicated by a solid dark line above the gene. qPCR primers used for measuring *hTERT* expression are indicated. **B.** The FISH probes (RP11-117B23 for *hTERT* locus, RP11-44H14 for subtelomeric region 5p and RP11-846K3 for the intermediary region) used in the present study are indicated. The region corresponding to the *hTERT* gene is highlighted in blue.

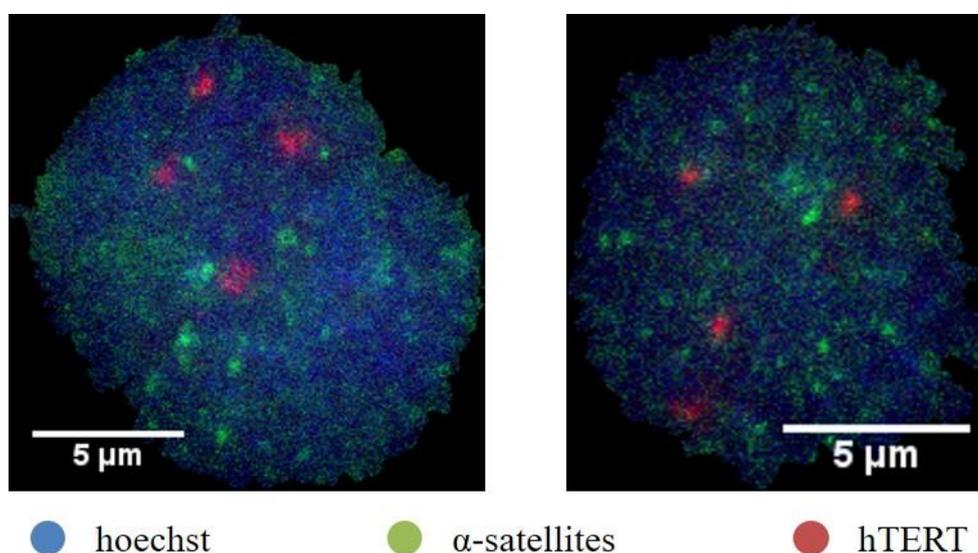


**Supplemental Figure S2: Nucleosome occupancy and endogenous CpG methylation at the *hTERT* gene promoter.** NOME-seq was used to map the position of nucleosome on individual DNA molecules at the *hTERT* gene promoter in NB4-LR1 and NB4-LR1<sup>SFD</sup> cells treated or not as indicated. Left panel indicates endogenous DNA methylation, right panel chromatin accessibility. Each horizontal row in each panel represents the same DNA molecule. For the DNA methylation plots: vertical bars below the line: CpG sites; black filled circles: methylated CpG dinucleotides; white filled circles: unmethylated CpG dinucleotides. For the accessibility plots: vertical bars below the line: GpC sites; grey circles: methylated GpC, accessible to M.CviPI; white circles: unmethylated GpC, inaccessible to M.CviPI.

## II. Résultats complémentaires

### 1. Étude du positionnement du gène *hTERT* par rapport aux sites d'hétérochromatine $\alpha$ -satellites.

Avant de m'intéresser aux régions d'hétérochromatine des subtélomères du bras court du chromosome 5, sur lequel est situé le locus du gène *hTERT*, j'ai voulu étudier la localisation de ce locus par rapport aux régions  $\alpha$ -satellites d'hétérochromatine, spécifiques des péricentromères. J'ai donc réalisé quatre expériences de 3D-FISH sur des cellules NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup> témoin ou sous traitement à l'ATRA de sept jours ( $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). La **figure 26** montre deux images exemples de noyaux de cellules NB4-LR1 obtenues au microscope confocal. Ces images sont « aplaties », c'est-à-dire qu'elles présentent la fusion de l'ensemble des coupes réalisées pour chacun des noyaux.

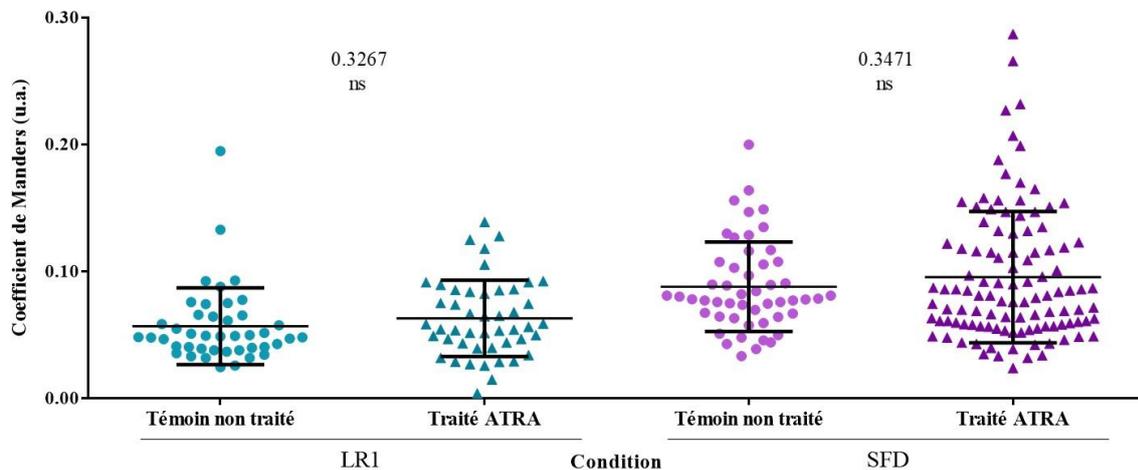


**Figure 26 : Noyaux de cellules NB4-LR1, microscopie confocale**

Les deux panels sont des images de microscopie confocale, prises avec un objectif x63 à immersion. Les noyaux proviennent de cellules NB4-LR1 non traitées. La coloration au Hoechst des noyaux apparaît en bleu, les signaux alpha-satellites des régions d'hétérochromatine apparaissent en vert et le locus du gène *hTERT* apparaît en rouge. Le gène *hTERT* est présent en quatre copies dans la lignée NB4-LR1, c'est pourquoi quatre signaux rouges sont observés. Le marquage alpha-satellite est très diffus dans l'ensemble du noyau.

Comme on peut le constater sur les images, les signaux  $\alpha$ -satellites (en vert) sont extrêmement nombreux et diffus dans l'ensemble du noyau (marqué au Hoechst et apparaissant en bleu). On observe en revanche le nombre théorique de signaux *hTERT* (en rouge), soit quatre du fait de la tétraploïdie des cellules NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup> pour le chromosome 5 où il est situé. À partir des images en trois dimensions, j'ai fait une analyse de colocalisation grâce au plugin JacoP du logiciel ImageJ en m'intéressant plus particulièrement au coefficient de Manders (Manders, Verbeek, & Aten, 1993), basé sur les objets et le plus pertinent pour cette étude. En effet, ce coefficient analyse l'ensemble des signaux *hTERT* d'un noyau et compare leur localisation par rapport aux signaux  $\alpha$ -satellites. Plus le coefficient s'approche de la valeur 1, plus on considère que les signaux rouges sont colocalisés avec les signaux verts. Plus la valeur se rapproche de 0, plus les signaux sont considérés comme distants. Ce coefficient ne

prend cependant pas en compte le nombre de signaux par noyau ou leur répartition dans le noyau mais uniquement la totalité des signaux d'une couleur et leur emplacement par rapport à la totalité des signaux de l'autre couleur, on n'obtient donc qu'une seule valeur par noyau. La distribution de ce coefficient pour l'ensemble des noyaux étudiés est représentée en **figure 27**.



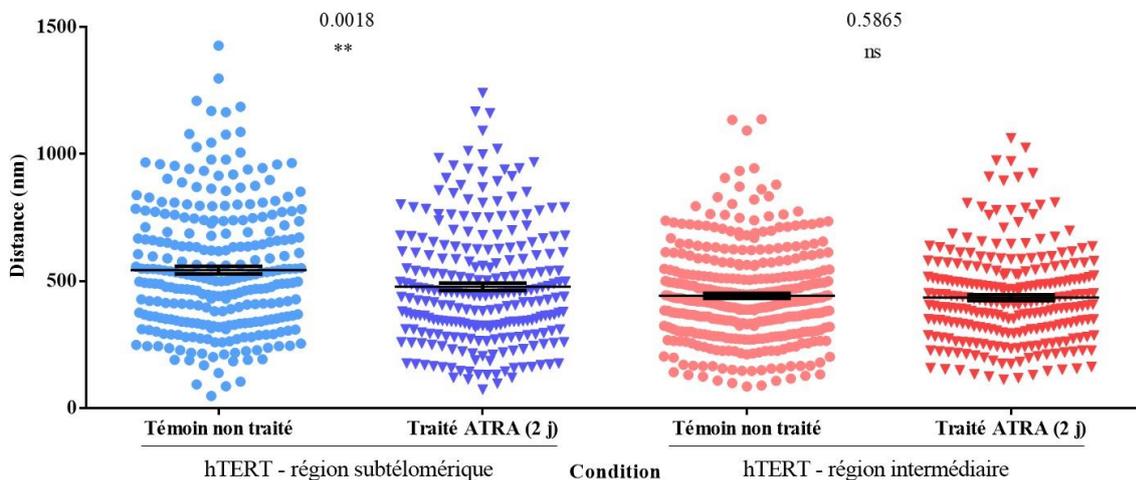
**Figure 27 : Effet d'un traitement de 7 jours à l'ATRA sur le coefficient de colocalisation des signaux  $\alpha$ -satellites et hTERT**

Chaque point représente un noyau. Les cercles représentent les noyaux des cellules témoins non traitées et les triangles, les noyaux des cellules traitées sept jours à l'ATRA ( $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). À gauche du graphique, en bleu, sont représentés les résultats pour la lignée NB4-LR1. À droite du graphique, en violet, les résultats de la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>. Les tests statistiques sont des tests de Student non paires avec correction de Welch.

Les signaux  $\alpha$ -satellites étant particulièrement nombreux et diffus, on n'observe aucune variation significative du coefficient de colocalisation de Manders entre les cellules témoins et les cellules traitées à l'ATRA. Ne pouvant donc conclure, j'ai décidé d'étudier des régions d'hétérochromatine plus ciblées : celles des subtélomères du bras court du chromosome 5.

## 2. Analyse de l'environnement subnucléaire du gène *hTERT* dans la lignée NB4-LR1 à un temps de traitement précoce

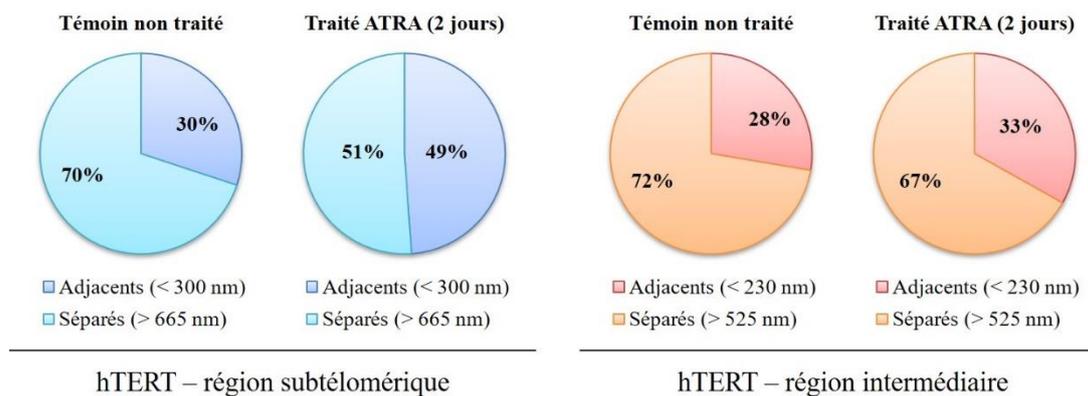
Ayant observé le rapprochement des signaux du locus *hTERT* et des régions subtélomériques du chromosome 5 dans la lignée NB4-LR1 après sept jours de traitement à l'ATRA ( $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ), j'ai souhaité étudier ce phénomène à un temps précoce de traitement, soit après deux jours. J'ai réalisé la même étude que pour le traitement plus long, uniquement dans la lignée NB4-LR1. Les résultats présentés sur la **figure 28** sont ceux d'une unique expérience mais le nombre de noyaux étudiés étant statistiquement suffisant (plus de 50 pour chaque condition), j'ai pu réaliser une analyse statistique. J'ai utilisé le test de Mann-Whitney entre les signaux provenant des noyaux des cellules témoins et ceux provenant des cellules traitées. Les résultats présentent sur un même graphe les variations de distance entre les signaux du locus *hTERT* et des régions subtélomériques du bras court du chromosome 5 (à gauche, en bleu) et les variations de distance entre les signaux du locus *hTERT* et de la région intermédiaire (à droite, en rouge).



**Figure 28** : Analyse de la distance entre le locus du gène *hTERT* et les régions subtélomériques du chromosome 5p ou la région "intermédiaire" dans la lignée NB4-LR1 après deux jours de traitement à l'ATRA

Chaque point représente un noyau. Les cercles représentent les noyaux des cellules témoins non traitées et les triangles, les noyaux des cellules traitées deux jours à l'ATRA ( $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). À gauche du graphique (en bleu) sont compilées les distances entre le locus du gène *hTERT* et la région subtélomérique du chromosome 5p. À droite du graphique (en rouge) se trouvent les distances entre le locus du gène *hTERT* et la région « intermédiaire ». Les tests statistiques sont des tests de Mann-Whitney.

On peut observer ici un rapprochement significatif des signaux du locus *hTERT* et des régions subtélomériques du bras court du chromosome 5. Cependant, ce rapprochement est moins marqué qu'après sept jours de traitement, supposant une diminution progressive de la distance entre le locus du gène *hTERT* et la région subtélomérique. La **figure 29** présente la répartition des signaux précédemment définis comme adjacents ou séparés.



**Figure 29 : Distribution des signaux séparés et adjacents dans la lignée NB4-LR1 après deux jours de traitement à l'ATRA**

En bleu, on peut observer la répartition des distances entre les signaux du locus *hTERT* et des régions subtélomériques du chromosome 5p dans la lignée NB4-LR1. À gauche se trouve la répartition pour le témoin non traité et à droite celle pour les cellules traitées deux jours à l'ATRA ( $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). En bleu foncé, les couples de signaux adjacents (dont la distance entre les deux signaux étudiés est inférieure à 300 nm) et en bleu clair, les couples de signaux séparés (dont la distance est supérieure à 665 nm). On observe une augmentation du nombre de signaux adjacents après deux jours de traitement.

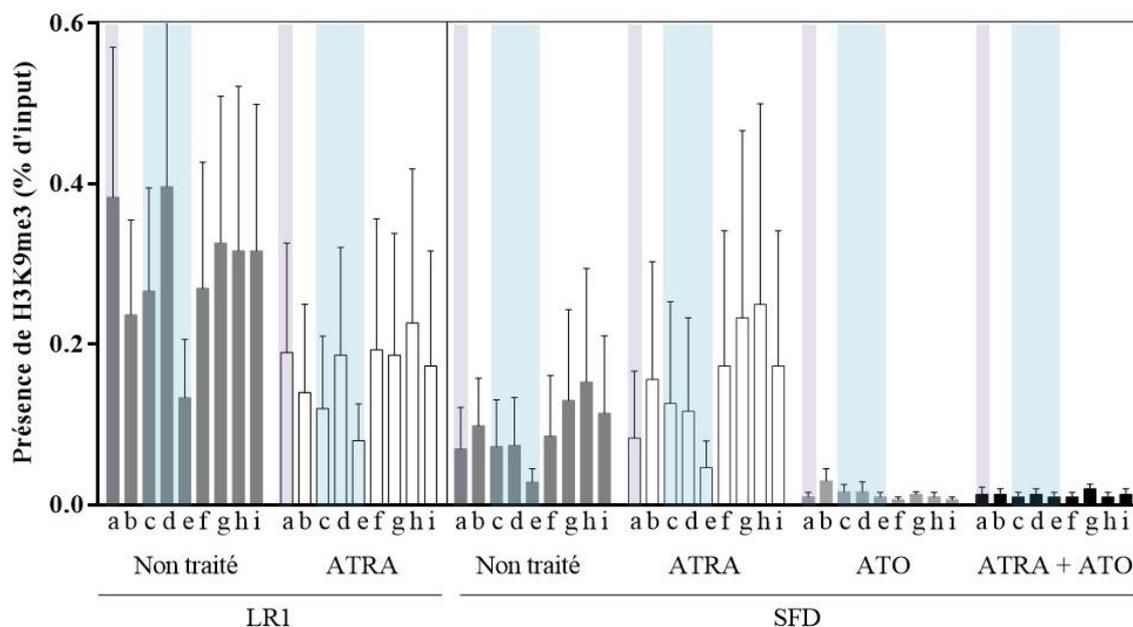
En rouge sont présentées les répartitions des distances entre les signaux du locus *hTERT* et de la région intermédiaire dans la lignée NB4-LR1. À gauche est présentée la répartition pour le témoin non traité et à droite la répartition pour les cellules traitées. En rouge sont représentés les couples de signaux adjacents (avec une distance inférieure à 230 nm) et en orange les couples de signaux séparés (avec une distance supérieure à 525 nm). On n'observe pas de variation significative de la répartition des distances après traitement ATRA.

Comme on pouvait déjà le remarquer sur la **figure 28**, après deux jours de traitement à l'ATRA il y a une augmentation du nombre d'adjacents pour les couples de signaux du locus *hTERT* et des régions subtélomériques du bras court du chromosome 5 (en bleu, à gauche) mais pas de variation dans la répartition des signaux du locus *hTERT* et de la région intermédiaire (en rouge, à droite). Le rapprochement observé est moins important qu'après sept jours de traitement puisqu'on ne dénombre pas plus de la moitié de signaux adjacents ici, contre presque 60 % pour le traitement plus long. Ainsi, le phénomène de TPE-OLD semble se mettre en place de façon progressive au cours du traitement à l'ATRA dans la lignée NB4-LR1.

Ce processus de répression permettant le rapprochement des régions télomériques et subtélomériques du gène *hTERT*, on peut émettre l'hypothèse que les marques d'histones répressives de ces régions pourraient s'étendre au gène *hTERT* pour contribuer à sa répression.

### 3. Étude de la marque répressive H3K9me3

La marque d'histone H3K9me3 est caractéristique de l'hétérochromatine constitutive. On la retrouve principalement dans les régions centromériques, péri-centromériques, sub-télomériques et télomériques. Le gène *hTERT* étant exprimé dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup>, on s'attend à ne pas trouver cette marque sur son promoteur ni son gène. Cependant, l'ATRA et la combinaison d'ATRA et d'ATO réprimant le gène, j'ai cherché à savoir si cette marque répressive était déposée sur le gène *hTERT* après ces traitements. Les résultats de trois expériences indépendantes de ChIP-qPCR sont présentés en **figure 30**.



**Figure 30 : Distribution de la marque répressive H3K9me3 sur le promoteur et le corps du gène *hTERT* dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup> en absence ou après sept jours de traitement**

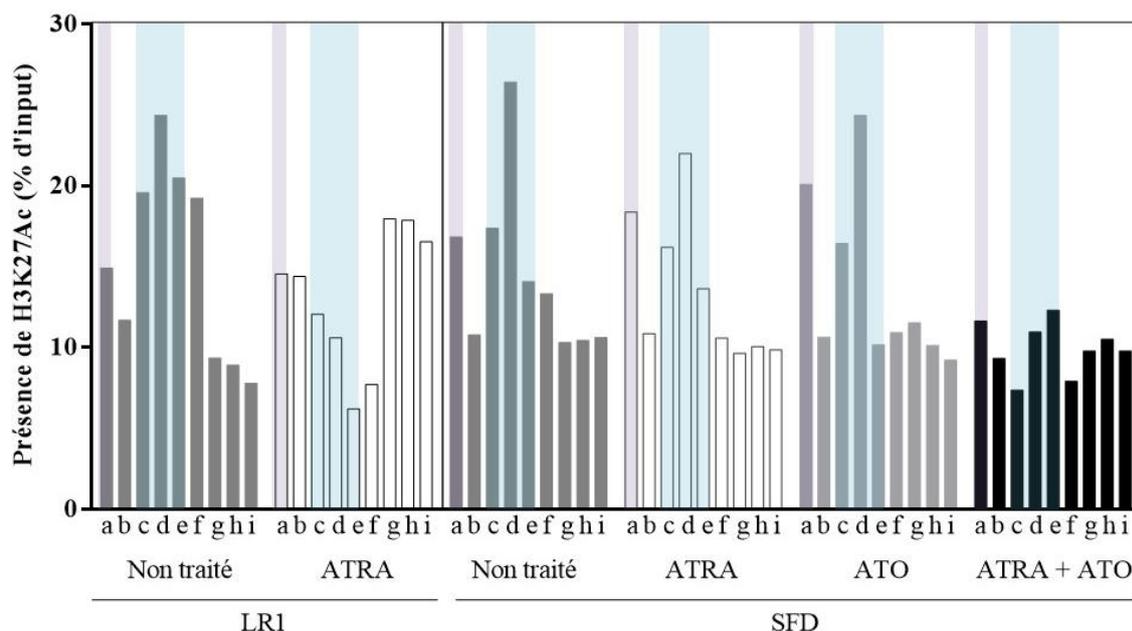
Sont représentés les résultats de trois expériences indépendantes de ChIP-qPCR. Dans le cadre de gauche sont présentés les résultats pour la lignée NB4-LR1 et dans le cadre de droite ceux de la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>. En gris foncé le contrôle non traité, en blanc le traitement à l'ATRA, en gris clair le traitement à l'ATO et en noir le traitement combiné à l'ATRA et à l'ATO. Les lettres a à i sont les couples d'amorces utilisés pour la qPCR (annexe 3). La région encadrée en violet correspond à la région activatrice du gène *hTERT* (- 5,0 kb par rapport au SIT), la région encadrée en bleu correspond au promoteur principal du gène (- 1,0 kb à - 0,2 kb par rapport au SIT). Concentration des différents traitements : ATRA : 1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , ATO : 0,2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

Amorces : a : - 5,0 kb, b : - 2,5 kb, c : - 1,0 kb, d : - 0,8 kb, e : - 0,2 kb, f : + 1,3 kb, g : + 6,5 kb, h : + 12,5 kb, i : + 41,7 kb. Toutes les positions sont exprimées par rapport au site d'initiation de la transcription (+ 1 bp)

La marque répressive H3K9me3 est extrêmement peu présente sur le gène *hTERT*, aussi bien dans la lignée NB4-LR1 que dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>. Les valeurs en pourcentage de la fraction totale (input) sont équivalentes à celles obtenues lors des mêmes expériences avec le contrôle négatif, les IgG. Ainsi, ces résultats nous indiquent que le gène *hTERT* ne se trouve pas dans une région d'hétérochromatine constitutive dans le modèle étudié. Les différents traitements ne font pas varier la distribution de la marque H3K9me3 qui reste absente sur l'ensemble des régions étudiées.

## 4. Étude de la marque activatrice H3K27Ac

La marque répressive H3K27me3 étant distribuée de façon très différente sur le gène *hTERT* entre les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup>, j'ai souhaité m'intéresser au profil de sa marque antagoniste, H3K27Ac. Je n'ai réalisé qu'une unique expérience de ChIP-qPCR sur cette modification d'histone, les résultats restent donc à confirmer. La distribution de cette marque activatrice est représentée **figure 31**.



**Figure 31 : Distribution de la marque d'histone H3K27Ac sur le gène *hTERT* dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup>**

Sont représentés les résultats d'une unique expérience de ChIP-qPCR. Dans le cadre de gauche, les résultats de la lignée NB4-LR1 et dans le cadre de droite ceux de la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>. Le contrôle non traité est en gris foncé, le traitement à l'ATRA en blanc, le traitement à l'ATO en gris clair et le traitement combiné à l'ATRA et à l'ATO en noir. Les lettres a à i sont les couples d'amorces utilisés pour la qPCR (annexe 3). La région encadrée en violet est la région activatrice du gène *hTERT* (- 5,0 kb par rapport au SIT), la région encadrée en bleu correspond au promoteur principal du gène (- 1,0 kb à - 0,2 kb par rapport au SIT). Concentration des différents traitements : ATRA : 1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , ATO : 0,2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

Amorces : a : - 5,0 kb, b : - 2,5 kb, c : - 1,0 kb, d : - 0,8 kb, e : - 0,2 kb, f : + 1,3 kb, g : + 6,5 kb, h : + 12,5 kb, i : + 41,7 kb. Toutes les positions sont exprimées par rapport au site d'initiation de la transcription (+ 1 bp)

Contrairement à ce que j'ai pu voir pour la marque H3K27me3, les profils de distribution de la marque H3K27Ac à l'état basal sont très similaires entre les deux lignées. On note cependant un effet différent des traitements sur les lignées. En effet, après sept jours d'ATRA (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), on peut constater que la présence de la marque H3K27Ac est fortement diminuée dans la région du promoteur principal de *hTERT* (région encadrée en bleu) dans la lignée NB4-LR1 et qu'elle est augmentée dans le corps du gène.

Dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>, les traitements ATRA (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) et ATO (0,2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) seuls ne semblent pas influencer la distribution de cette marque activatrice mais la combinaison des deux entraîne une diminution marquée de la présence de H3K27Ac dans la région du promoteur principal (encadrée en bleu).

## 5. Mise au point et validation du NOME-seq

Avant de pouvoir obtenir les résultats précédemment présentés, il m'a fallu mettre au point la technique du NOME-seq sur mon modèle cellulaire. Les conditions d'utilisation de la méthyltransférase M.CviPI, notamment, ont nécessité une mise au point afin de déterminer la concentration et le temps d'incubation optimaux pour mes expériences. En effet, cette enzyme est capable de méthyler, bien que très rarement, des cytosines en contexte CpG, faussant ainsi les données de méthylation endogène. Il m'a donc paru essentiel de trouver les meilleures conditions pour m'assurer d'une action optimale sur les cytosines en contexte GpC tout en évitant les erreurs de méthylation par M.CviPI.

Pour cela, j'ai testé plusieurs conditions et vérifié les résultats dans la lignée NB4-LR1 sur un gène connu pour être complètement déméthylé et accessible, le gène *HSPA5*. Ce gène sert de contrôle dans plusieurs expériences de NOME-seq (Kelly et al., 2012). Il est présent en deux copies dans la lignée NB4-LR1. J'ai finalement conservé une concentration d'enzyme intermédiaire (75 U) sur un temps court (15 min) avec un boost de même durée et de même quantité de M.CviPI, ces conditions m'ayant donné les résultats attendus sur le gène *HSPA5* (ou *GRP78*) comme le montre la **figure 32**. Chaque ligne correspond à un clone bactérien, duquel j'ai extrait depuis une même séquence les informations de méthylation endogène (à gauche) et d'accessibilité (à droite). Chaque cercle correspond à une cytosine dont la position sur la séquence étudiée est indiquée en bas.

### HSPA5 (GRP78)

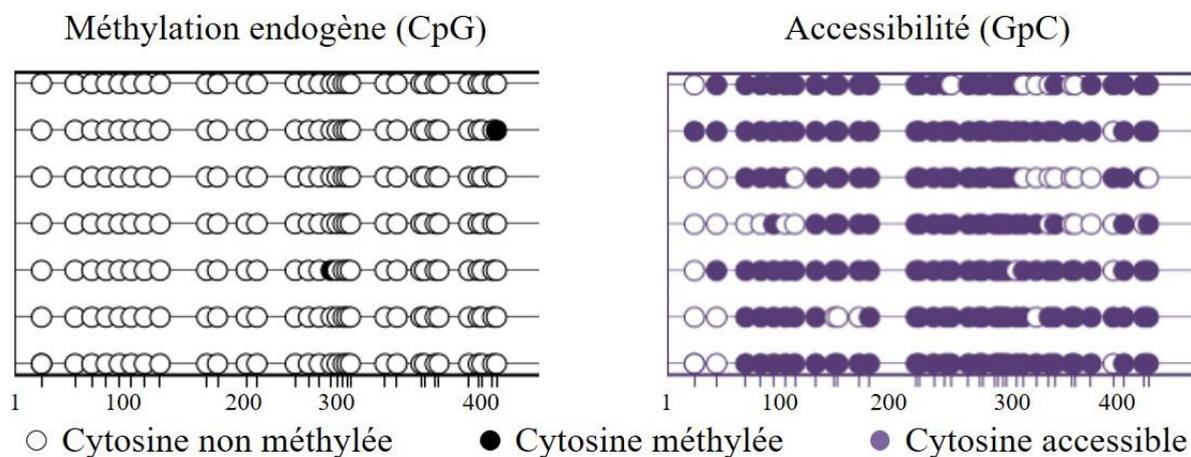


Figure 32 : Validation du NOME-seq sur le gène contrôle *HSPA5*

Chaque ligne représente un clone bactérien, chaque cercle un dinucléotide CpG (pour la méthylation, à gauche) ou GpC (pour l'accessibilité, à droite). Les cercles blancs représentent les cytosines non méthylées ou non accessibles, les cercles noirs les cytosines méthylées et les cercles violets les cytosines accessibles.

## 6. Analyse NOME-seq à un temps précoce du traitement à l'ATRA des cellules NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup>

Afin d'étudier le promoteur principal du gène *hTERT* dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup>, j'ai fait appel à des amorces contenant des nucléotides dégénérés (Y au lieu de C ou T, et R au lieu de A ou G). J'ai fait ce choix pour ne pas favoriser, lors des PCR, l'amplification d'un transcrit par rapport à un autre mais prendre en compte l'ensemble des combinaisons d'accessibilité possibles.

Dès deux jours de traitement, on observe l'effet répresseur de l'ATRA sur les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup>. J'ai donc voulu voir si l'on constatait, déjà à ce temps précoce, des changements dans les profils de méthylation et d'accessibilité du gène *hTERT*. Les résultats sont présentés sous forme de courbes dans la **figure 33** pour la lignée NB4-LR1 et la **figure 34** pour la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>.

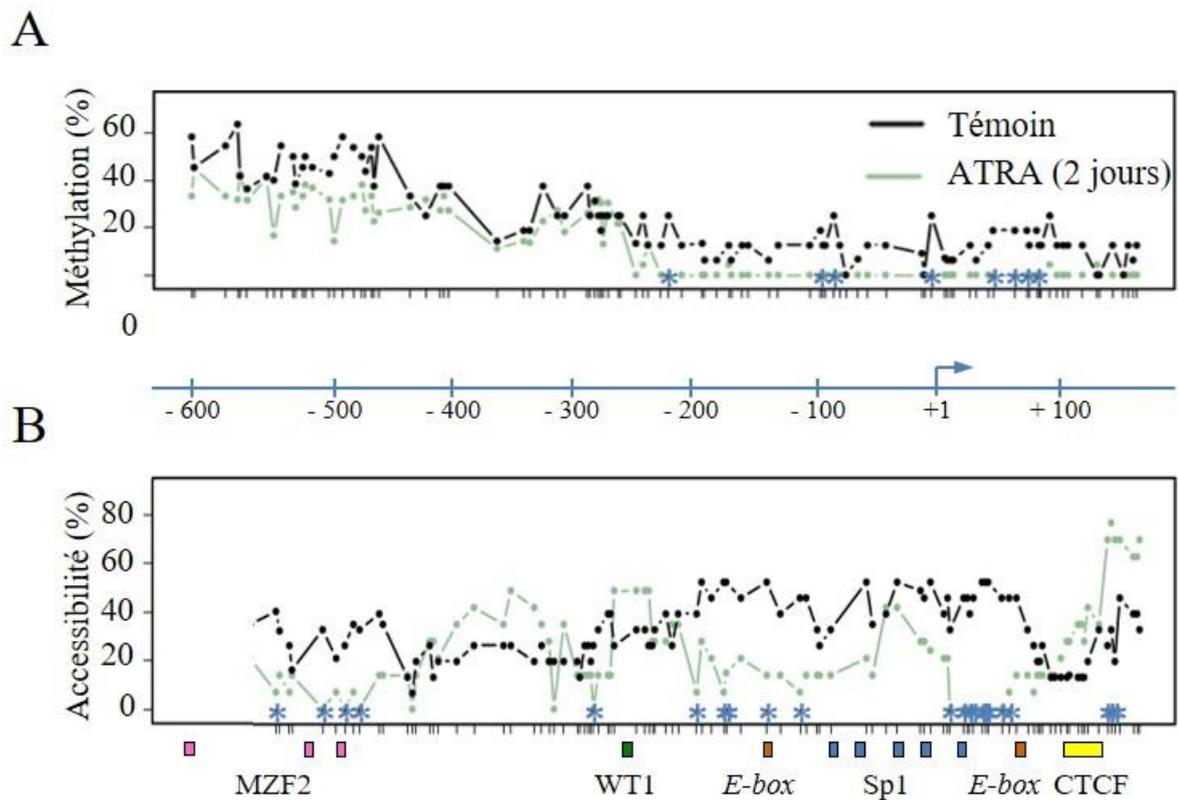


Figure 33 : Analyse NOME-seq de la lignée NB4-LR1 après deux jours de traitement à l'ATRA (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )

Le graphique A présente le pourcentage de méthylation sur l'ensemble des clones étudiés, avec chaque point représentant un dinucléotide CpG. Le graphique B montre le pourcentage d'accessibilité des clones avec chaque point représentant un dinucléotide GpC. Dans les deux graphes, la courbe verte est celle du témoin non traité et la courbe violette celle des clones traités deux jours à l'ATRA.

La méthylation du promoteur de *hTERT* dans la lignée NB4-LR1 (**figure 33A**) est à nouveau bien séparée en deux régions distinctes : la région distale est partiellement méthylée et la

région proximale hypométhylée. Le traitement à l'ATRA semble induire une légère baisse de la méthylation sur l'ensemble de la région étudiée mais rien de significatif.

En ce qui concerne l'accessibilité (**figure 33B**) on note que la région proximale est plus accessible que la région distale et que le traitement à l'ATRA n'affecte cette accessibilité qu'à des endroits bien spécifiques. En effet, on retrouve une diminution totale de l'accessibilité au niveau du deuxième motif E-Box, juste en aval du SIT de *hTERT*. Cette région retrouve son accessibilité première après sept jours de traitement et est remplacée par une région juste en amont, recouvrant les sites de fixation du facteur Sp1 et la première E-Box.

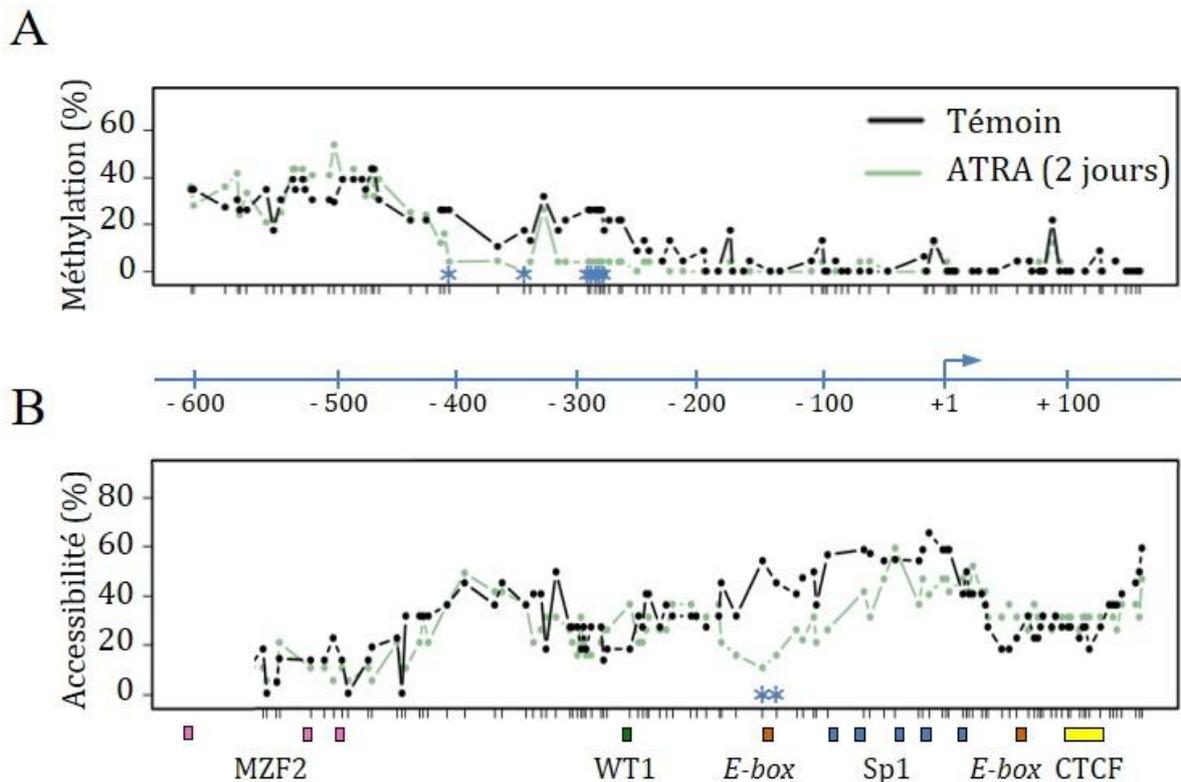


Figure 34 : Analyse NOME-seq de la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> après deux jours de traitement à l'ATRA (1 μmol.L<sup>-1</sup>)

Le graphe A présente le pourcentage de méthylation sur l'ensemble des clones étudiés, avec chaque point représentant un dinucléotide CpG. Le graphe B montre le pourcentage d'accessibilité des clones avec chaque point représentant un dinucléotide GpC. Dans les deux graphes, la courbe verte est celle du témoin non traité et la courbe violette celle des clones traités deux jours à l'ATRA.

Le profil de méthylation du promoteur de *hTERT* dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> (**figure 34A**) est similaire au profil de la lignée NB4-LR1 avec une région distale partiellement méthylée et une région proximale complètement déméthylée. Le traitement à l'ATRA induit une baisse significative de la méthylation entre 400 bp et 150 bp en amont du site d'initiation de la transcription, région contenant le site de fixation du facteur WT1 ainsi que la première E-Box de fixation de c-Myc. Cette variation de la méthylation disparaît complètement à sept jours de traitement, supposant peut-être un premier effet répresseur, contré par la suite par un mécanisme encore inconnu.

L'accessibilité (**figure 34B**) est partielle sur l'ensemble de la région et ne varie que peu après traitement à l'ATRA. On note notamment une diminution ponctuelle significative entre la première E-Box et les sites de fixation du facteur Sp1. On ne retrouve pas cette baisse après sept jours de traitement, supposant à nouveau un effet transitoire entamant la répression du gène *hTERT* qui est ensuite contré pour lui permettre d'être exprimé.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

Active dans les cellules souches embryonnaires puis désactivée dans la plupart des cellules somatiques adultes, la télomérase est réactivée dans une grande majorité des cancers. Cette enzyme ribonucléoprotéique allongeant les extrémités des chromosomes linéaires, les télomères, permet aux cellules qui l'expriment de proliférer de façon continue, sans limite. Sa réactivation constitue une étape précoce de la carcinogenèse puisqu'elle permet l'immortalisation des cellules (Meyerson et al., 1997; J. Zhou et al., 2014). Les mécanismes de cette réactivation sont divers mais la régulation de la sous-unité catalytique de la télomérase, hTERT, semble être le facteur déterminant l'activité de l'enzyme. En effet, contrairement à hTR, la sous-unité ARN de la télomérase, hTERT est réprimée dans la plupart des cellules somatiques adultes, tout comme l'est l'activité de l'enzyme (Avin et al., 2019; Y. S. Cong et al., 1999).

La régulation du gène *hTERT*, codant la sous-unité catalytique de la télomérase, est plurielle puisqu'elle dépend de mécanismes génétiques et épigénétiques. De nombreux laboratoires ont étudié la régulation de ce gène dans divers modèles de cancers, mais les techniques employées, les régions étudiées et les facteurs analysés varient entre les différentes études. Ceci a entraîné une certaine controverse sur les mécanismes impliqués dans la régulation du gène *hTERT* puisque plusieurs résultats publiés semblent contradictoires (Daniel et al., 2012; Devereux et al., 1999; Guilleret, Yan, Grange, et al., 2002; Shin et al., 2003).

Mon modèle d'étude est la leucémie aiguë promyélocytaire, une pathologie cancéreuse aujourd'hui presque complètement guérie alors qu'elle était l'une des plus fatales avant les années 1980. Mon laboratoire d'accueil a isolé deux lignées à partir d'un échantillon de moelle osseuse d'une patiente en rechute, puis une troisième lignée par acquisition de résistances à un traitement de longue durée par un agent différenciant : l'ATRA. La première lignée, NB4, entre en différenciation dès les premiers jours de traitement avec cet agent, ce qui est associé à une répression de *hTERT*. Les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup> ne répondent pas à cet effet différenciant et c'est pourquoi je me suis particulièrement intéressée à ces deux lignées dans mon étude, afin de m'abstraire du processus de différenciation dans l'étude de la régulation du gène *hTERT*. De plus, l'ATRA induit une extinction du gène *hTERT* dans la lignée NB4-LR1 après un traitement prolongé d'au moins une semaine. En revanche, malgré une diminution partielle de l'expression du gène *hTERT* dans les premiers jours de traitement, l'effet répresseur de l'ATRA est contré dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>, qui continue à exprimer la télomérase même en présence continue du traitement (F. Pendino et al., 2001, 2002; Tarkanyi et al., 2005).

Nous avons eu l'ambition avec mon projet de thèse d'analyser dans un modèle cellulaire isogénique, dans des conditions bien définies et spécifiques, plusieurs paramètres impliqués dans la régulation du gène *hTERT* afin d'essayer de mettre en place un profil multiparamétrique de sa régulation par des traitements utilisés en clinique dans le cas de la leucémie aiguë promyélocytaire. J'ai pu obtenir différents résultats dont je vais discuter ci-après.

## ∞ Les télomères ont un rôle dans la répression de l'expression du gène *hTERT* par l'ATRA dans la lignée NB4-LR1

L'environnement subnucléaire des gènes est important pour leur régulation. En effet, selon leur emplacement sur les chromosomes, les gènes peuvent être activement transcrits ou au contraire réprimés. Il a notamment été mis en évidence un effet répresseur des régions d'hétérochromatine constitutive que sont les télomères par les processus de TPE et de TPE-OLD. Ces processus consistent en une expansion des marques d'hétérochromatine aux régions voisines des télomères (TPE) ou à des régions plus éloignées, desquelles se rapprochent les télomères, probablement par la formation d'une boucle (TPE-OLD) (Decottignies, 2014; Robin et al., 2014). En me basant sur des résultats publiés récemment par le laboratoire de Jerry W. Shay montrant une régulation du gène *hTERT* par TPE-OLD, j'ai cherché à étudier si ce phénomène avait également lieu dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup> (W. Kim et al., 2016; W. Kim & Shay, 2018). Pour cela, j'ai analysé par 3D-FISH les positions relatives du locus du gène *hTERT* et des régions subtélomériques du bras court du chromosome 5, où ce locus est situé. J'ai pu observer qu'après sept jours de traitement à l'ATRA (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) les distances entre les deux régions observées diminuent dans la lignée NB4-LR1, passant d'environ 35 % d'allèles présentant des signaux adjacents dans les cellules témoins à 55 % après traitement, alors qu'elles restent inchangées dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>, avec environ 45 % d'allèles adjacents dans les deux conditions. L'étude de la distance entre le gène *hTERT* et une région intermédiaire par rapport à la sonde subtélomérique présente des résultats en faveur de la formation d'une boucle par les télomères. En effet, la distance entre *hTERT* et cette sonde intermédiaire ne varie dans aucune des deux lignées étudiées après traitement à l'ATRA.

Ainsi, ces résultats supportent l'hypothèse que les télomères exercent un effet répresseur sur le gène *hTERT* dans la lignée NB4-LR1 puisque plus de la moitié des allèles présentent des signaux adjacents après traitement de sept jours à l'ATRA (**figure 35**). Après un traitement plus court (deux jours) j'ai pu observer un stade intermédiaire, avec un peu moins de la moitié des allèles présentant des signaux adjacents. Ce dernier résultat étant celui d'une unique expérience, il faudrait le confirmer. Ceci suppose que le processus de TPE-OLD ne se met en place que progressivement au cours de la répression du gène *hTERT* dans la lignée NB4-LR1. Dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>, en revanche, je n'ai pas observé de rapprochement des signaux, ce qui suppose donc que le TPE-OLD ne se met pas en place dans cette lignée après sept jours de traitement à l'ATRA. Ainsi, la résistance des cellules NB4-LR1<sup>SFD</sup> à la répression de *hTERT* induite par l'ATRA est peut-être en partie due à un défaut dans la mise en place du TPE-OLD. Ce processus de régulation semble n'être mis en place que dans le cas d'une répression complète du gène. Ceci suppose donc que le TPE-OLD intervient dans la répression du gène *hTERT* par l'ATRA dans la lignée NB4-LR1 mais n'initie pas cette répression. Ce processus serait plutôt un facteur de consolidation de la répression, permettant d'assurer l'extinction du gène.

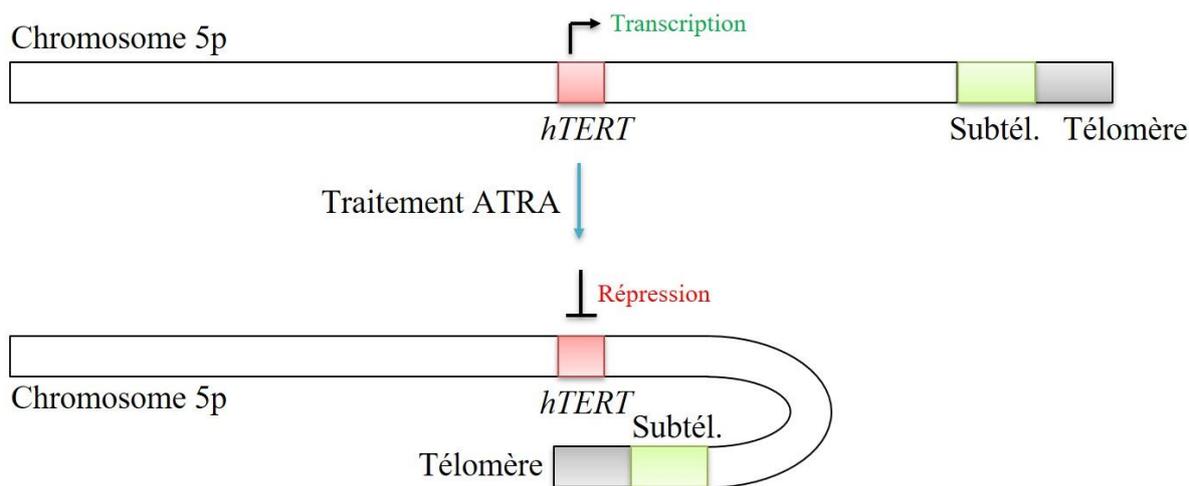


Figure 35 : L'effet TPE-OLD intervient dans la régulation du gène *hTERT* par l'ATRA dans la lignée NB4-LR1

Un traitement à l'ATRA dans la lignée NB4-LR1 induit la mise en place d'une boucle des télomères contribuant à la répression du gène *hTERT*. Ce phénomène est connu sous le nom de TPE-OLD.

Le laboratoire de Jerry W. Shay est celui ayant mis en évidence l'existence d'un effet de position des télomères sur de longues distances avec l'hypothèse que les télomères forment une boucle pour réprimer l'expression du gène *hTERT* dans certaines conditions. La formation de cette boucle serait favorisée par le facteur TRF2 du complexe shelterin mais ce dernier point reste encore à confirmer (W. Kim et al., 2016; Robin et al., 2014). Deux études ont été publiées sur la régulation du gène *hTERT* par le phénomène de TPE-OLD (W. Kim et al., 2016; W. Kim & Shay, 2018).

La première a analysé la régulation de *hTERT* dans des cultures de fibroblastes jeunes (après une vingtaine de passages) possédant des télomères longs et de fibroblastes plus âgés (plus de cinquante passages) possédant des télomères courts. Cette étude a montré que dans les cellules jeunes, réprimant *hTERT*, les régions subtélomériques du chromosome 5p et le locus du gène *hTERT* sont adjacents à plus de 70 %. *hTERT* est réexprimé dans les fibroblastes âgés et cette réexpression est associée à une séparation des télomères et du locus du gène *hTERT* dans au moins 60 % des allèles. L'étude a ainsi conclu à une inhibition de l'effet répresseur du TPE-OLD sur le gène *hTERT* avec le raccourcissement des télomères, supportant l'hypothèse que les télomères forment une boucle pour réprimer ce gène (W. Kim et al., 2016).

La deuxième étude a analysé ce phénomène de répression dans des lignées cellulaires HL60. L'induction de la différenciation de ces cellules par un traitement au DMSO entraîne la répression du gène *hTERT*, associée à un rapprochement des régions subtélomériques et du gène *hTERT* dans plus de 70 % des allèles. L'analyse des distances entre les subtélomères ou *hTERT* et d'une région intermédiaire à ces deux premières a permis de supporter l'hypothèse de la formation d'une boucle par les télomères. En effet, les distances par rapport à la région intermédiaire ne varient pas selon les conditions étudiées (W. Kim & Shay, 2018).

Les observations faites dans mon modèle d'étude sont moins tranchées que celles présentées dans les deux publications de l'équipe de Jerry W. Shay. Ceci peut s'expliquer par le fait que les cellules que cette équipe a étudiées sont toutes diploïdes, ne possédant ainsi que deux copies du gène *hTERT*, alors que les cellules des lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup> sont hypotétraploïdes et possèdent quatre copies du gène. Le nombre d'allèles actifs nécessaires pour assurer l'expression de *hTERT* dans mon modèle d'étude est peut-être différent de celui des cellules diploïdes. De plus, mes conditions d'étude sont très différentes de celles des publications précédemment citées puisque le traitement à l'ATRA n'induit pas de raccourcissement des télomères avant la répression du gène *hTERT* ni de maturation des cellules dans les deux lignées que j'ai utilisées. Ainsi, le processus de régulation par TPE-OLD se déroule peut-être différemment dans les conditions que j'ai utilisées lors de mon projet de thèse. La découverte de ce mécanisme de régulation du gène *hTERT* est encore très récente et l'on ne connaît donc pas toutes ses conditions de mise en place ni de fonctionnement. Une nouvelle analyse du TPE-OLD dans mon modèle d'étude par d'autres techniques de microscopie, comme le Hi-C par exemple, permettrait de confirmer les résultats observés. De plus, son étude dans d'autres modèles ou sous d'autres conditions pourrait nous en apprendre plus à son sujet et permettre de vraiment comprendre comment ce processus de TPE-OLD est stimulé.

Le laboratoire de Jerry W. Shay a montré que la répression par le phénomène de TPE-OLD est associée à une modification de l'environnement chromatinien du gène *hTERT*, dont les modifications post-traductionnelles des histones et la méthylation de l'ADN (W. Kim et al., 2016; W. Kim & Shay, 2018). J'ai donc étudié ces marques épigénétiques dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup> pour voir si les différents traitements les modifiaient.

### ∞ **Le gène *hTERT* possède un domaine bivalent sur son promoteur dans la lignée NB4-LR1**

L'environnement chromatinien des gènes intervient dans la régulation de leur expression en favorisant ou bloquant le recrutement de la machinerie de transcription. J'ai ainsi analysé les modifications post-traductionnelles des histones sur le gène *hTERT* dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup> par la technique de ChIP-qPCR. Je me suis notamment intéressée aux marques antagonistes H3K4me3 et H3K27me3. La première corrèle généralement avec une activation de la transcription alors que la seconde corrèle généralement avec une répression (Soares et al., 2017; Wiles & Selker, 2017; Zinner et al., 2006). J'ai étudié ces marques dans les cellules témoins non traitées et après sept jours de traitement à l'ATRA (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), à l'ATO (0,2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) ou par une combinaison de ces deux molécules.

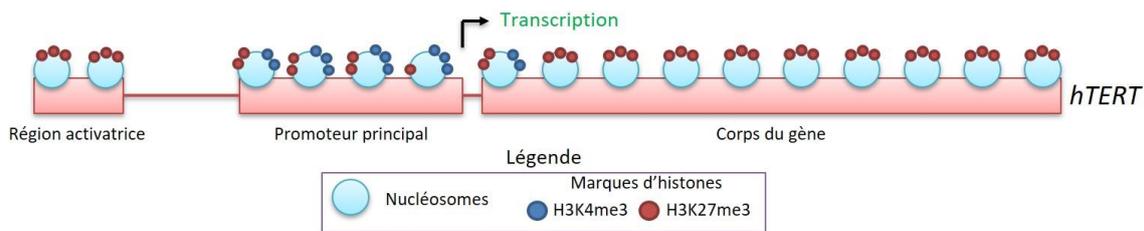
La marque H3K4me3 est très présente dans les deux lignées aux alentours du site d'initiation de la transcription (de 1,0 kb en amont à 1,0 kb en aval du SIT) du gène *hTERT* alors qu'elle est absente ailleurs sur le gène. Dans la lignée NB4-LR1, le traitement à l'ATRA induit la disparition quasi complète de cette marque sur le gène *hTERT*, à l'exception de la région correspondant au site d'initiation du gène (région e) où elle est diminuée de plus de moitié mais reste tout de même présente. Dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>, seul le traitement combiné entraîne une disparition de cette marque sur l'ensemble du gène *hTERT*. De nouveau, la

région correspondant au site d'initiation de la transcription (région e), répond différemment face au traitement puisque celui-ci n'induit aucun changement de présence de la marque H3K4me3 à cet endroit du gène.

Ces observations laissent supposer que la marque H3K4me3 ne constitue pas le facteur majeur dans la répression du gène *hTERT* par le traitement combiné d'ATRA et d'ATO dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> puisque celle-ci reste inchangée au niveau du site d'initiation de la transcription, où elle est nécessaire à l'activation de la transcription. En revanche, elle semble intervenir dans la régulation du gène par l'ATRA dans la lignée NB4-LR1 puisque sa présence diminue de plus de moitié sur ce site important du gène *hTERT*. Des études ont montré que la marque H3K4me3 était présente sur le promoteur du gène *hTERT* aussi bien dans les cellules où il est exprimé que celles où il est réprimé. Cette marque est cependant plus présente dans les cellules qui expriment le gène *hTERT* (Atkinson et al., 2005; Zinn et al., 2007). Ces observations sont donc en accord avec l'hypothèse émise précédemment que la marque H3K4me3 ne constituerait pas un facteur majeur dans la régulation du gène *hTERT*.

Dans la lignée NB4-LR1, j'ai pu observer que la marque H3K27me3 est très présente sur l'ensemble du gène *hTERT*, incluant le promoteur et la région codante, et qu'un traitement à l'ATRA favorise le dépôt de cette marque répressive qui est jusqu'à deux fois plus présente, en particulier autour du site d'initiation de la transcription du gène *hTERT*. Cette marque répressive est beaucoup moins présente dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> et des traitements à l'ATRA ou à l'ATO ne changent pas cette distribution. En revanche, un traitement combiné de ces deux molécules fait augmenter de deux à trois fois la présence de cette marque dans le promoteur principal de *hTERT* et au niveau du site d'initiation de la transcription. Cependant, celle-ci étant peu présente dans les cellules témoins non traitées, l'effet du traitement combiné sur cette marque répressive au niveau du gène *hTERT* reste tout de même limité dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>.

On observe ainsi que la lignée NB4-LR1 possède au niveau du gène *hTERT* une région riche en H3K4me3 au sein d'une région plus étendue riche en H3K27me3. Cette distribution particulière est typique d'un domaine bivalent, que l'on retrouve en particulier dans les cellules souches sur les promoteurs des gènes régulés lors de la différenciation. Ces gènes sont soit activés, et perdent alors la marque H3K27me3, soit réprimés et perdent la marque H3K4me3 au moment de leur engagement dans une voie de différenciation (Azuara et al., 2006; Bernstein et al., 2006; Cui et al., 2009). Dans mon modèle d'étude, le gène *hTERT* est réprimé par le traitement de sept jours à l'ATRA dans la lignée NB4-LR1 et on observe une augmentation de la présence de la marque H3K27me3 associée à une disparition de la marque H3K4me3. On retrouve donc ici un caractère de cellule souche pour la lignée NB4-LR1 avec le gène *hTERT* prêt à être réprimé avec le stimulus approprié, ici le traitement à l'ATRA (**figure 36**) (Azuara et al., 2006).



**Figure 36 : Le gène *hTERT* possède un domaine bivalent sur son promoteur dans la lignée NB4-LR1**

Dans la lignée NB4-LR1, à l'état basal, le gène *hTERT* (rectangles rouges) possède un domaine bivalent, caractérisé par la présence simultanée des marques H3K4me3 (petits cercles bleus) et H3K27me3 (petits cercles rouges).

Une étude a déjà observé ce type de distribution en domaine bivalent sur le gène *hTERT* dans des lignées cellulaires de cancer du côlon et de cancer du sein, avec la présence simultanée de marques activatrices (H3K9Ac et H3K4me2) et de marques répressives (H3K9me3 et H3K27me3) (Zinn et al., 2007). La mise en évidence de ce domaine bivalent dans la lignée NB4-LR1, et dans une moindre mesure dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>, montre que cette distribution particulière des marques d'histones n'est pas une caractéristique exclusive des cancers solides et pourrait constituer un marqueur de l'activité du gène *hTERT*. En effet, l'étude réalisée par Rebekah L. Zinn et ses collègues a montré que des cellules n'exprimant pas le gène *hTERT* (VA13, une lignée immortalisée de fibroblaste de poumon et présentant le mécanisme ALT) ne possèdent pas ce domaine bivalent (Zinn et al., 2007).

L'ATRA et l'ATO sont deux molécules reconnues pour leurs capacités à induire la maturation des cellules, en particulier leucémiques. Cependant, dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup>, ces traitements n'induisent pas la différenciation. Malgré cela, l'ATRA réprime l'expression de *hTERT* dans la lignée NB4-LR1 et ceci est associé à une entrée en apoptose des cellules. La combinaison d'ATRA et d'ATO dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> présente le même effet. Les variations dans la distribution des marques d'histones H3K4me3 et H3K27me3 sur le gène *hTERT* dans ces lignées ne sont pas identiques. Ceci suppose que le traitement à l'ATRA et le traitement combiné à l'ATRA et à l'ATO ne ciblent pas de la même manière les modifications post-traductionnelles des histones sur le gène *hTERT*. Ces résultats impliquent donc une coopération entre différents modes de répression de ce gène dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup> lors des différents traitements.

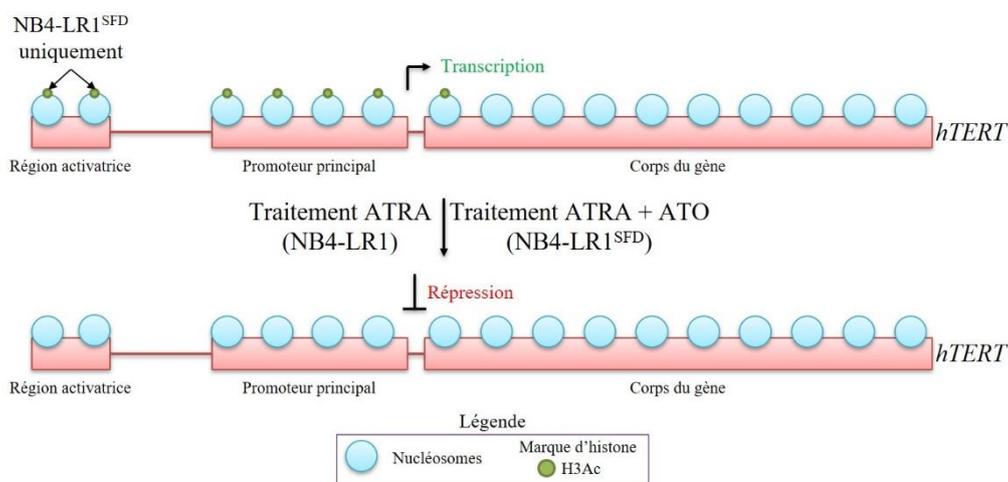
De plus, le promoteur du gène *hTERT* est riche en sites de fixation pour des facteurs de transcription. Mon laboratoire d'accueil a précédemment montré que le facteur c-Myc se fixe sur ce gène dans le modèle cellulaire de leucémie aiguë promyélocytaire. Ce facteur se retrouve dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup> à l'état basal mais le traitement à l'ATRA induit une diminution de la fixation de c-Myc dans la lignée NB4-LR1 (Azouz et al., 2010). Une étude précédente a montré que la méthyltransférase d'histone SMYD3, spécifique du dépôt des marques H3K4me2 et H3K4me3, est capable de se lier directement sur le promoteur de *hTERT* et présente ainsi un rôle majeur dans la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 sur ce gène (Kyo et al., 2008). D'après les résultats de cette étude, une perturbation ou une répression de l'expression de cette enzyme entraîne une sous-régulation du gène *hTERT* associée à une diminution de la fixation du facteur c-Myc sur le promoteur de

*hTERT* (Kyo et al., 2008). Ainsi, la diminution de la marque H3K4me3 observée lors de mon étude est peut-être due à une dérégulation de l'enzyme SMYD3 et entraîne une diminution de la fixation du facteur activateur c-Myc. Ce facteur est également connu pour interagir avec des acétyltransférases d'histones (Xu et al., 2001). Ainsi, une diminution de sa fixation pourrait entraîner une diminution de l'acétylation des histones sur le gène *hTERT* dans mon modèle d'étude.

### ∞ L'acétylation des histones sur l'ensemble du gène *hTERT* est importante pour sa transcription

En plus des modifications post-traductionnelles précédentes, j'ai étudié par ChIP-qPCR la distribution des histones H3 acétylées sur le gène *hTERT* dans les deux lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup>. Les histones acétylées sur leurs résidus lysine corrélient avec l'activation de la transcription. En effet, l'acétylation des histones neutralise leur charge positive et affaiblit ainsi la liaison des nucléosomes avec l'ADN, entraînant une ouverture de la chromatine qui devient alors accessible aux facteurs de transcription. Dans les deux lignées, les histones H3 sont acétylées sur l'ensemble du gène *hTERT* et la distribution de cette acétylation forme un pic. Ce pic culmine juste en amont du site d'initiation de la transcription (- 0,2 kb) et diminue ensuite progressivement en s'éloignant de ce point, aussi bien en amont qu'en aval.

Dans la lignée NB4-LR1, un traitement de sept jours à l'ATRA (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) induit une désacétylation de l'ensemble des histones H3 du gène *hTERT*. Les traitements ATRA et ATO (0,2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) seuls n'ont aucun effet dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>. La combinaison de ces deux molécules, en revanche, induit une désacétylation des histones H3 sur l'ensemble du gène *hTERT* à l'exception des deux régions juste en amont du site d'initiation de la transcription (- 0,8 kb et - 0,2 kb). Ces observations sont tout à fait cohérentes avec la répression de l'expression du gène *hTERT* observée avec les traitements ATRA pour la lignée NB4-LR1, mais supposent que d'autres mécanismes entrent en jeu lors de la régulation du gène par le traitement combiné d'ATRA et d'ATO dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> (**figure 37**).



**Figure 37 : Effet des traitements sur l'acétylation de l'histone H3 (H3Ac) sur le gène *hTERT* dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup>**

Le traitement à l'ATRA (NB4-LR1) et le traitement combiné à l'ATRA et à l'ATO (NB4-LR1<sup>SFD</sup>) entraînent une désacétylation de l'histone H3 sur le gène *hTERT*, ce qui contribue à sa répression.

Comme mon laboratoire d'accueil l'a précédemment montré, l'effet hypoacétylant de l'ATRA sur le promoteur du gène *hTERT* est aboli lorsque l'on retire le traitement, démontrant qu'il s'agit d'un effet réversible. L'équipe a également montré que l'hypoacétylation est un effet relativement précoce de l'ATRA puisqu'elle apparaît dès deux jours de traitement dans la lignée NB4-LR1 et que cette hypoacétylation diminue la transcription par l'ARNpolIII (Azouz et al., 2010). Des trois modifications post-traductionnelles des histones que j'ai analysées, la marque H3Ac est celle présentant le plus de variations après les traitements réprimant le gène *hTERT*. Ceci suggère que cette modification épigénétique pourrait jouer un rôle majeur dans la régulation du gène *hTERT* dans le modèle de leucémie aiguë promyélocytaire.

Les enzymes responsables du dépôt et du retrait de l'acétylation des histones, les HAT et les HDAC respectivement, sont importantes dans la gestion de la condensation de la chromatine et la régulation de l'expression des gènes. Plusieurs études ont montré que ces protéines sont dérégulées dans les leucémies et d'autres cancers (Y. Li & Seto, 2016; Mazzone et al., 2017; Triscioglio et al., 2018). Les résultats obtenus dans mon modèle d'étude sur le gène *hTERT* semblent effectivement en faveur de ces dérégulations puisque le gène est hyperacétylé au niveau de son promoteur principal dans les cellules témoins des lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup>.

Le traitement à l'ATRA dans la NB4-LR1 et le traitement combiné à l'ATRA et à l'ATO dans la NB4-LR1<sup>SFD</sup> entraînent une désacétylation du promoteur, possiblement par une surexpression ou activation des HDAC ou un blocage des HAT. En effet, mon laboratoire d'accueil a précédemment montré que le traitement à l'ATRA dans la lignée NB4-LR1 entraînait une inhibition de la fixation des facteurs c-Myc et Sp1 (Azouz et al., 2010). De même, différentes études ont montré que l'ATO cible également ces deux facteurs en inhibant leur expression dans des modèles de leucémie aiguë promyélocytaire (Chou et al., 2005; Guosheng Jiang, Albiñ, Tang, Tian, & Henriksson, 2008; Yao Zhang et al., 2015). Or, ces facteurs sont tous deux capables d'interagir avec des complexes de HDAC ou de HAT (Y. S. Cong & Bacchetti, 2000; Y.-S. Cong et al., 2002; Kyo et al., 2008; F. Zhang et al., 2016). Ainsi, peut-être que le traitement à l'ATRA, dans la lignée NB4-LR1, et le traitement combiné à l'ATRA et à l'ATO, dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>, agissent indirectement sur les acétyltransférases et désacétylases d'histones en empêchant la fixation des facteurs c-Myc et Sp1 sur le promoteur de *hTERT*. Ces facteurs de transcription ne peuvent alors plus recruter les enzymes en question pour réguler l'expression de ce gène.

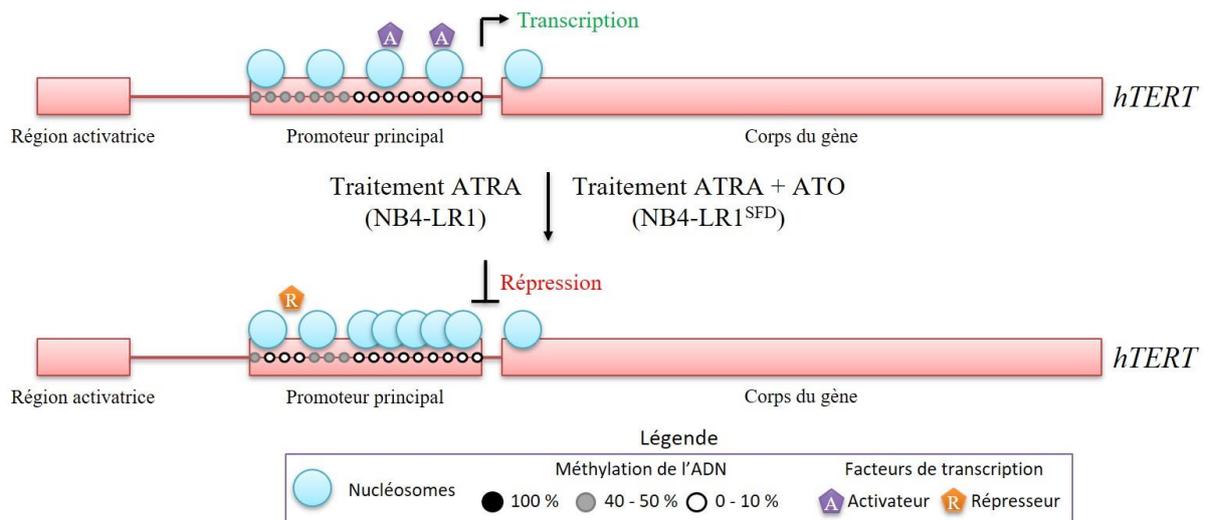
Le protocole que j'ai utilisé ne permet pas de discriminer les profils d'histones des allèles activés ou inactivés. Les résultats que j'ai obtenus sont ceux d'un groupe de cellules possiblement hétérogène par rapport à leur phase du cycle cellulaire et présentant alors des expressions variées du gène *hTERT*. Peut-être qu'une synchronisation des cellules permettrait de définir plus précisément des profils selon la phase du cycle cellulaire. Une étude a montré que, dans plusieurs lignées cellulaires cancéreuses ou immortalisées ainsi que dans des cellules souches embryonnaires, la distribution des marques activatrices est plus importante sur les allèles activés présentant une méthylation partielle à faible. En revanche, aucune corrélation n'a été trouvée par rapport aux marques répressives qui sont présentes sur l'ensemble des allèles (Zinn et al., 2007). De plus, la désacétylation des histones est

normalement associée à une diminution de l'accessibilité de l'ADN. J'ai donc voulu étudier cette accessibilité, ainsi que la méthylation de l'ADN sur le promoteur principal du gène *hTERT*.

∞ **L'expression de *hTERT* est régulée par le positionnement des nucléosomes et la méthylation de l'ADN dans sa région promotrice dans le modèle cellulaire de LAP**

La méthylation de l'ADN et le positionnement des nucléosomes sur le promoteur du gène *hTERT* jouant un rôle dans la régulation de son expression, j'ai souhaité étudier ces paramètres grâce à la technique du NOME-seq sur les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup>. J'ai pu obtenir des profils de méthylation et d'accessibilité pour différentes conditions cellulaires : pour les deux lignées, des témoins non traités et des cellules traitées sept jours à l'ATRA (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ), et pour la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>, des cellules traitées sept jours à l'ATO (0,2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) ou avec une combinaison d'ATRA et d'ATO (aux concentrations précédemment définies).

J'ai pu remarquer avec ces profils que, dans la lignée NB4-LR1, l'ATRA induit une diminution globale de la méthylation de l'ADN sur le promoteur, et plus particulièrement dans la région distale, ainsi qu'une augmentation de l'inaccessibilité, notamment au niveau du site d'initiation de la transcription. Dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>, les traitements ATRA et ATO seuls n'entraînent que peu de modifications dans les profils d'accessibilité et de méthylation mais la combinaison des deux traitements induit une déméthylation quasi complète du promoteur de *hTERT* ainsi qu'une diminution de l'accessibilité sur l'ensemble de la séquence étudiée. Ces résultats montrent des modifications simultanées du positionnement des nucléosomes et de la méthylation de l'ADN au niveau du promoteur du gène *hTERT* qui, toutes deux, peuvent impacter l'expression du gène. En effet, la perte importante d'accessibilité, particulièrement au niveau du site d'initiation de la transcription de *hTERT*, suppose une fermeture de la chromatine et ainsi une répression du gène. La méthylation de l'ADN, quant à elle, pourrait être impliquée dans la régulation de la fixation de facteurs de transcription sur le promoteur du gène *hTERT* (**figure 38**).



**Figure 38 : Effet des traitements réprimant *hTERT* sur le positionnement des nucléosomes et la méthylation**

Le traitement à l'ATRA (NB4-LR1) et le traitement combiné à l'ATRA et à l'ATO (NB4-LR1<sup>SFD</sup>) entraînent une déméthylation de la région distale du promoteur de *hTERT*, permettant la fixation d'un facteur répresseur, ainsi qu'un rapprochement des nucléosomes dans la région proximale du promoteur, empêchant la fixation de facteurs activateurs. Cette coopération est impliquée dans la répression du gène *hTERT* par ces traitements.

Différentes études ont analysé le profil de méthylation du gène *hTERT* dans des cellules normales, des cellules embryonnaires et des cellules cancéreuses. Elles n'ont pas permis de mettre en place un profil unique de méthylation associé à la transcription du gène *hTERT*, ni à sa répression. En effet, certaines études ont montré que l'hyperméthylation du promoteur de *hTERT* était liée à son expression (Guilleret, Yan, Grange, et al., 2002; D. D. Lee et al., 2019), alors que d'autres ont montré l'inverse (L. Liu et al., 2004; Shin et al., 2003). De plus, il a été montré que la méthylation du gène *hTERT* empêche la fixation de facteurs répresseurs de *hTERT* comme CTCF ou WT1 ou au contraire de facteurs activateurs comme c-Myc (Azouz et al., 2010; S. Renaud et al., 2007). La méthylation du gène *hTERT* a également été associée à la formation de structures en G-quadruplexes dans le premier exon qui peuvent favoriser (P.-T. Li et al., 2017) ou réprimer (Saha et al., 2017) la transcription du gène. Ces résultats contradictoires supportent l'idée que la méthylation du promoteur de *hTERT* n'est pas un facteur permettant, à lui seul, de prédire le niveau d'expression de ce gène mais qu'elle y contribue probablement selon le contexte cellulaire (Dessain et al., 2000). Il a tout de même été montré que toutes les cellules exprimant *hTERT*, quel que soit le degré de méthylation global de ce gène, présentent une région hypométhylée juste en amont et incluant le site d'initiation de la transcription (Avin et al., 2016; Leão et al., 2018; Zinn et al., 2007). Les résultats que j'ai obtenus semblent en accord avec ces observations puisque la région correspondant au SIT est hypométhylée dans les deux lignées. De plus, la diminution des niveaux de méthylation dans le domaine distal du promoteur du gène *hTERT* pourrait permettre la fixation de facteurs répresseurs comme WT1 ou MZF2 par exemple. En effet, ces facteurs sont sensibles à l'état de méthylation de leurs sites de liaison, sur lesquels ils ne peuvent se fixer qu'en absence de méthylation (Leão et al., 2018). Mon laboratoire d'accueil a précédemment montré que le facteur WT1 se fixait sur le promoteur de *hTERT* dans la lignée NB4-LR1 après sept jours de traitement à l'ATRA mais pas dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> dans

les mêmes conditions (Azouz et al., 2010). Il est à noter que le degré de méthylation au niveau des sites de fixation de WT1 reste partiel dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> après traitement alors qu'il diminue dans la lignée NB4-LR1. L'effet de la combinaison de traitements à l'ATRA et à l'ATO sur la fixation de WT1 dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> n'a pas été étudiée. Au vu des résultats que j'ai obtenus, on pourrait supposer que la déméthylation complète du promoteur du gène *hTERT* dans cette lignée suite au traitement combiné permet au facteur répresseur WT1 de se fixer et de contribuer à la répression du gène *hTERT*.

Une étude a précédemment montré une fermeture de la chromatine au niveau du site d'initiation du gène *hTERT* lors de la différenciation de cellules leucémiques HL60 par un traitement au DMSO. Cette fermeture de la chromatine, caractérisée par le dépôt d'au moins un nucléosome, est un événement précoce de la différenciation de ces cellules et joue un rôle important dans la répression du gène *hTERT* (S. Wang et al., 2010). De la même manière, il a été montré que le gène *hTERT* est situé dans un contexte d'hétérochromatine condensée dans les cellules somatiques normales, où il est réprimé. La réexpression du gène a été associée à la mise en place précoce d'une région déplétée en nucléosomes au niveau du site d'initiation de la transcription (S. Wang & Zhu, 2004; J. Zhu et al., 2010). Il a été supposé que ces modifications précoces de la chromatine permettent aux autres éléments régulateurs du gène *hTERT* de se mettre en place pour assurer sa répression ou sa réexpression. Ces observations sont en accord avec celles faites sur l'hypoacétylation des histones dans la partie précédente. Ainsi, l'hypoacétylation de l'histone H3 ainsi que le repositionnement des nucléosomes au niveau du promoteur du gène *hTERT* constitueraient peut-être la première étape de répression de son expression dans le modèle cellulaire de leucémie aiguë promyélocytaire.

### ∞ **Le gène *hTERT* est surrégulé par une région activatrice amont distale dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>**

Lors de mon étude par ChIP-qPCR des modifications post-traductionnelles des histones sur le promoteur du gène *hTERT*, j'ai pu observer une région en amont du promoteur (5,0 kb en amont du SIT) qui se démarque dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> par une forte présence de H3K4me3 alors que cette marque y est absente dans la lignée NB4-LR1. Cette région a précédemment été reconnue comme région activatrice du gène *hTERT* (Eldholm et al., 2014). Il a été montré auparavant que les régions activatrices peuvent être régulées par des modifications épigénétiques, dont les modifications post-traductionnelles des histones. Ces régions sont caractérisées par la présence des marques H3K4me3, H3K4me1, H3K27Ac et du variant d'histone H2AZ lorsqu'elles sont liées à des promoteurs actifs ou présentant un domaine bivalent. L'équipe de Peter A. Jones a alors proposé de nommer ces régions activatrices « permissives » (Taberlay et al., 2011).

Les résultats obtenus précédemment au sein de mon laboratoire d'accueil ainsi que le miens ont permis de montrer que l'expression basale du gène *hTERT* dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> est plus élevée que dans la lignée NB4-LR1. J'ai donc émis l'hypothèse que la région activatrice du gène *hTERT* n'est permissive que dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> et que son action est réprimée dans la lignée NB4-LR1. Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai étudié par ChIP-qPCR la distribution sur le gène du variant d'histone H2AZ ainsi que de la marque H3K27Ac.

Je n'ai cependant observé aucune différence entre les deux lignées par rapport à la présence de ces marques. Ces résultats sont préliminaires et nécessiteraient d'être confirmés en reproduisant les expériences.

Un autre élément pouvant entrer en jeu dans la régulation de l'interaction entre les régions activatrice et promotrice du gène *hTERT* est la présence du facteur CTCF entre celles-ci. En effet, il a été montré récemment dans un modèle de cancer du poumon que CTCF est impliqué dans la régulation du gène *hTERT* en se fixant juste en aval de la région activatrice définie plus haut (à environ 4,5 kb en amont du SIT) (Eldholm et al., 2014). Ce facteur possède un rôle d'insulateur et est impliqué dans la formation des domaines topologiquement associés. Je me suis donc intéressée à ce facteur dans mon modèle d'étude et ai analysé sa fixation sur le gène *hTERT* par ChIP-qPCR. Ce facteur possédant trois sites de liaison spécifiques sur *hTERT*, je m'attendais à le trouver plus présent à ces endroits-là. Cependant, les résultats de deux expériences indépendantes ont montré une fixation de CTCF sur l'ensemble du gène *hTERT*, sans préférence de site, dans les deux lignées. Les traitements n'ont eu aucune influence sur cette distribution. Ce résultat inattendu ne m'a pas permis de conclure mais l'anticorps est tout de même validé car j'ai obtenu des valeurs en pourcentage d'input bien supérieures à celles obtenues avec les IgG, qui constituaient le contrôle négatif des expériences. Il faudrait donc peut-être adapter le protocole pour obtenir un résultat optimal et pouvoir réanalyser la fixation de ce facteur de transcription particulier sur le gène *hTERT* et dans cette région notamment.

Une autre caractéristique des régions activatrices avec une forte présence de la marque H3K4me3 est de posséder une région déplétée en nucléosomes (Taberlay et al., 2011) et d'être déméthylées (Sharifi-Zarchi et al., 2017). J'ai ainsi étudié par NOMe-seq cette région activatrice du gène *hTERT*. Cette analyse a permis de mettre en évidence une différence de méthylation entre les deux lignées puisque la lignée NB4-LR1 présente une hyperméthylation alors que la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> est hypométhyliée. Les différents traitements n'influencent que très peu ces profils. L'accessibilité est relativement faible dans cette région du gène *hTERT* et ne varie pas non plus après les traitements. On ne retrouve donc pas la région déplétée en nucléosomes mais la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> est hypométhyliée dans cette région, ce qui supporte l'hypothèse que la région activatrice du gène *hTERT* est impliquée dans la régulation de son expression dans cette lignée, et non dans la lignée NB4-LR1. Ces différences peuvent en partie expliquer le fait que la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> exprime plus fortement *hTERT* à l'état basal que la lignée NB4-LR1.

Comme dans le promoteur principal du gène *hTERT*, la région activatrice que j'ai étudiée présente des sites de fixation pour des facteurs de transcription. Une recherche de sites consensus dans cette région m'a permis de trouver des sites potentiels de fixation pour le facteur Sp1. D'après les informations disponibles sur la base de données « *University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser* » (Haeussler et al., 2019; Kent et al., 2002), le facteur CTCF se fixerait également en amont de la région activatrice. De plus, toujours d'après les informations disponibles sur la base de données de l'UCSC, une analyse par ChIP-seq dans la lignée NB4 a permis de mettre en évidence la fixation du facteur Max dans cette

région. Max étant partenaire des facteurs c-Myc et Mad1, la fixation du premier facteur permet peut-être également la fixation de ses partenaires.

Il est intéressant de noter que les différents facteurs de transcription sont sensibles à la méthylation de l'ADN (Beishline & Azizkhan-Clifford, 2015; Choi et al., 2010; S. J. Clark, Harrison, & Molloy, 1997; P.-T. Li et al., 2017; S. Renaud et al., 2007). L'hyperméthylation de la région activatrice dans la lignée NB4-LR1 pourrait donc empêcher les facteurs activateurs Sp1 et Max/c-Myc de se fixer sur leurs sites de liaison. Dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>, en revanche, l'hypométhylation de la région activatrice permettrait à ces facteurs de se fixer. Le profil de méthylation dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> montre une hyperméthylation au début de la séquence étudiée, en amont de la partie hypométhylée. Ce niveau de méthylation élevé pourrait alors bloquer la fixation du facteur CTCF en amont de la séquence que j'ai analysée et favoriser l'activation du gène *hTERT* (figure 39).

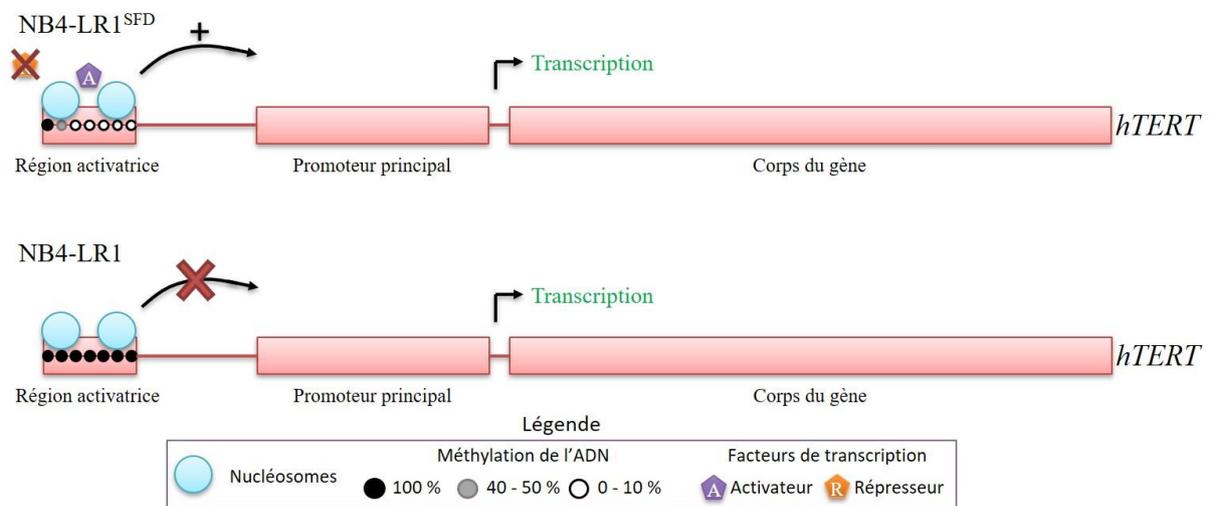


Figure 39 : État de méthylation et positionnement des nucléosomes dans la région activatrice du gène *hTERT* à l'état basal dans les lignées NB4-LR1 et NB4-LR1<sup>SFD</sup>

À l'état basal, la région activatrice du gène *hTERT* est majoritairement hypométhylée dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>, permettant la fixation de facteurs de transcription activateurs. Elle est cependant hyperméthylée en amont, empêchant probablement la fixation d'un facteur répresseur. Ainsi, cette région contribue à l'activation de la transcription du gène *hTERT* dans cette lignée. Dans la lignée NB4-LR1, en revanche, cette région est hyperméthylée, empêchant sa contribution dans l'activation de la transcription du gène.

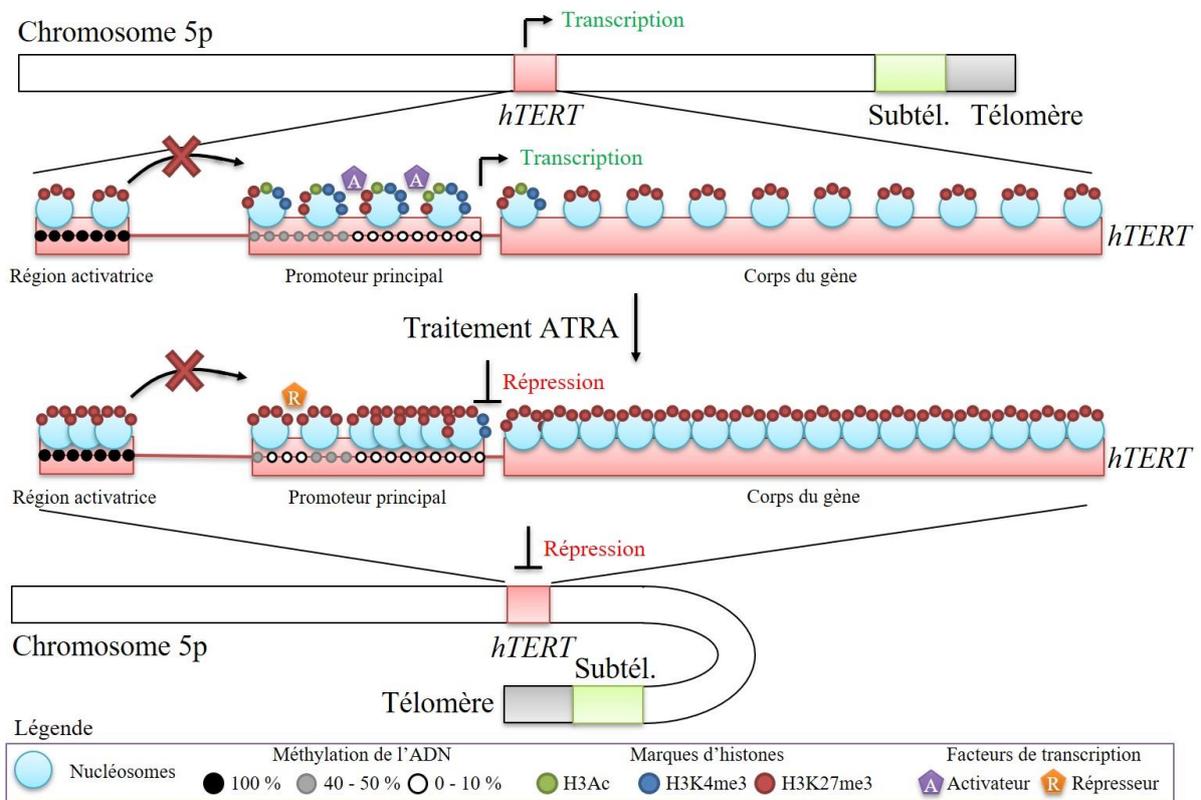
Dans cette même région activatrice, des études *in silico* ont mis en évidence la présence de sites particuliers liés à l'ATRA. En effet, la région activatrice du gène *hTERT* présente des sites consensus des récepteurs RAR $\alpha$  et RXR $\alpha$ , dont l'ATRA est le ligand naturel (en particulier RAR). J'ai analysé l'effet de ce traitement dans un modèle de leucémie aiguë promyélocytaire mais l'ATRA peut avoir des effets différents selon le contexte cellulaire. En effet, ce dérivé de la vitamine A est présent dans l'ensemble des cellules humaines à des doses physiologiques (0,01  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) bien inférieures à la dose utilisée ici. Les mécanismes d'action de cet agent dans la régulation de gènes cibles par l'intermédiaire des récepteurs RAR $\alpha$  ont été étudiés par de nombreux laboratoires mais celui mis en place dans le cas de la leucémie aiguë promyélocytaire et donc en présence de PML-RAR $\alpha$  n'a pas encore été totalement élucidé (Minucci & Ozato, 1996; Orfali et al., 2014; A. Tomita et al., 2013). Mes

résultats ne permettent pas de déterminer si les effets épigénétiques induits par l'ATRA sont dépendants ou non des récepteurs RAR $\alpha$ . Des études plus approfondies, en particulier de la région activatrice du gène *hTERT* où l'on trouve leurs sites consensus, pourraient aider à répondre à cette question. Une analyse dans des cellules n'exprimant pas RAR $\alpha$  ou encore dont l'expression serait inhibée serait probablement intéressante. Enfin, l'ATRA peut interagir avec les récepteurs « *peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta* » (PPAR $\beta/\delta$ ) (Levi, Wang, Doud, Hazen, & Noy, 2015; Schug, Berry, Shaw, Travis, & Noy, 2007) ainsi qu'avec l'enzyme « *peptidyl-prolyl trans/cis isomerase 1* » (Pin1) (Kozono et al., 2018; Wei et al., 2015) à des doses pharmacologiques (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). Or, les premiers peuvent interagir avec les récepteurs RXR, pour lesquels des sites de fixation sont présents dans la région activatrice du gène *hTERT*, et l'enzyme Pin1 a été suggérée dans les mécanismes d'action de l'ATRA et de l'ATO dans le traitement de la leucémie aiguë promyélocytaire (Ghaffari et al., 2012; Kozono et al., 2018; Wei et al., 2015). De plus, Pin1 est également impliquée dans d'autres cancers tels les cancers du sein et sa répression est associée à une répression de *hTERT* (Kozono et al., 2018; Wei et al., 2015). Les résultats obtenus ici avec l'ATRA et l'ATO pourraient donc être utiles pour l'analyse de ces protéines qui pourraient, elles aussi, servir de cibles potentielles dans différentes pathologies cancéreuses.

#### ➤ Proposition de schémas de régulation du gène *hTERT* dans le modèle cellulaire de leucémie aiguë promyélocytaire

Mon projet de thèse m'a permis d'analyser de multiples paramètres épigénétiques et leur implication dans la régulation du gène *hTERT* dans un modèle cellulaire de leucémie aiguë promyélocytaire. Des résultats obtenus, j'ai pu émettre plusieurs hypothèses quant aux mécanismes de régulation du gène *hTERT* après traitement de sept jours à l'ATRA (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) dans la lignée NB4-LR1 et après traitement de sept jours à l'ATRA, à l'ATO (0,2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) ou avec une combinaison de ces deux molécules dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>. En me basant sur mes différentes hypothèses, définies dans cette discussion, j'ai construit des schémas de régulation du gène *hTERT* dans les deux lignées, selon chaque modalité de traitement étudié. Ces schémas sont présentés en **figures 40 à 42**, avec les **figures 40 et 41** montrant les mécanismes mis en jeu lors d'une répression complète du gène *hTERT* (**figure 40** : lignée NB4-LR1, **figure 41** : lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>) et la **figure 42** montrant les modifications épigénétiques lors d'une répression partielle du gène *hTERT* (NB4-LR1<sup>SFD</sup>).

Dans la lignée NB4-LR1, le gène *hTERT* est complètement réprimé après sept jours de traitement à l'ATRA ( $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). La **figure 40** récapitule les différents phénomènes épigénétiques impliqués dans cette régulation.

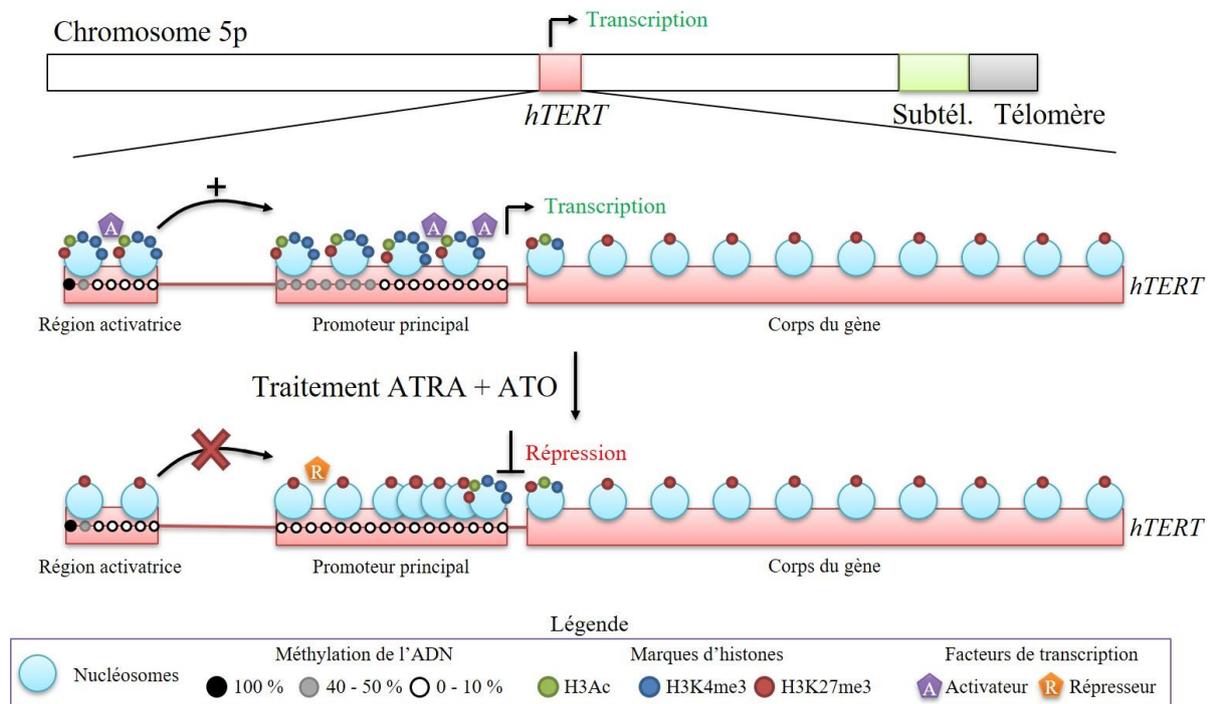


**Figure 40 : Schéma de régulation du gène *hTERT* dans la lignée NB4-LR1 après sept jours de traitement à l'ATRA ( $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ )**

Dans la lignée NB4-LR1, le traitement à l'ATRA induit sur le gène *hTERT* une disparition quasi-totale des marques activatrices H3Ac et H3K4me3 ainsi qu'une forte augmentation de la marque répressive H3K27me3. Ces modifications dans la distribution des marques d'histones sont associées à une répression de l'expression de *hTERT*. De plus, le traitement est associé à une condensation de la chromatine, caractérisée par un rapprochement des nucléosomes et ainsi une diminution de l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription activateurs (comme Sp1 ou c-Myc par exemple). Un changement dans le profil de méthylation dans la partie distale du promoteur principal corrèle également avec le traitement à l'ATRA, pouvant permettre la fixation de facteurs de transcription répresseurs (comme WT1 par exemple). Enfin, le télomère du bras court du chromosome 5, où se trouve le locus du gène *hTERT*, forme une boucle pour assurer l'extinction du gène.

Chromosome 5p : bras court du chromosome 5. Subtél. : subtélomère.

Le traitement combiné à l'ATRA et à l'ATO réprime totalement le gène *hTERT* dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>. La **figure 41** présente les différents phénomènes épigénétiques mis en jeu dans cette régulation du gène.



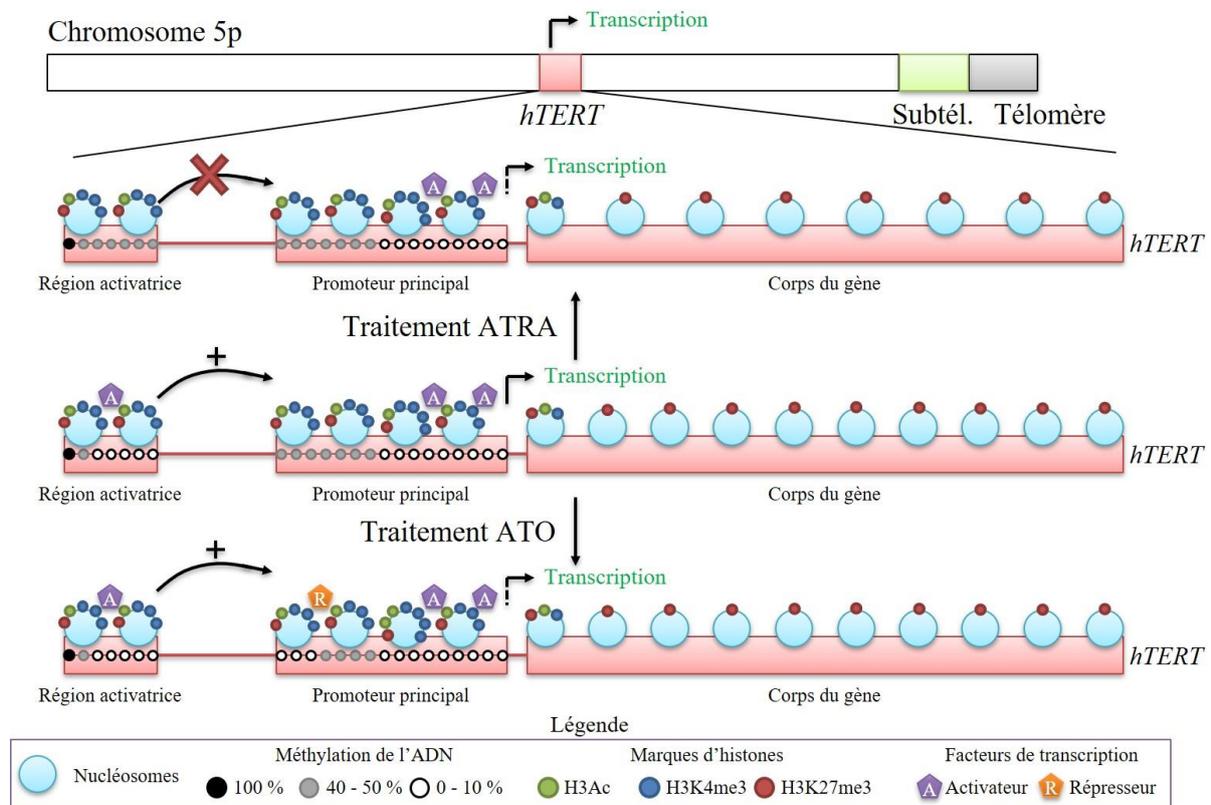
**Figure 41** : Schéma de régulation du gène *hTERT* dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> après sept jours de traitement à l'ATRA (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) et à l'ATO (0,2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )

Le traitement combiné à l'ATRA et à l'ATO entraîne une extinction du gène *hTERT* dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>. Celle-ci est associée à une déméthylation complète du promoteur principal du gène permettant peut-être la fixation de facteurs répresseurs, comme WT1 ou MZF2 par exemple. Le traitement combiné induit également une condensation de la chromatine au niveau du promoteur du gène *hTERT* ainsi que dans le premier exon. Cette condensation est probablement caractérisée par un rapprochement des nucléosomes et ainsi une diminution de l'accessibilité de l'ADN aux facteurs de transcription activateurs, comme c-Myc et Sp1 par exemple. De plus, la région activatrice du gène *hTERT* perd les marques activatrices H3Ac et H3K4me3 après traitement, suggérant ainsi qu'elle n'active plus l'expression du gène *hTERT*. La région distale du promoteur principal est caractérisée par une augmentation de la marque répressive H3K27me3 mais la distribution de celle-ci reste inchangée au niveau du site d'initiation de la transcription et dans la partie codante du gène *hTERT*. Les marques activatrices précédemment citées restent présentes au niveau du site d'initiation de la transcription mais disparaissent dans le reste de la région promotrice. Ainsi, la répression du gène *hTERT* par le traitement combiné d'ATRA et d'ATO dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> semble être véhiculée par la fixation de facteurs répresseurs sur le promoteur, la condensation de la chromatine dans cette même région et le blocage de la région activatrice de *hTERT*.

Chromosome 5p : bras court du chromosome 5. Subtél. : subtélomère.

Dans le cas d'une répression complète du gène *hTERT*, on observe, aussi bien pour le traitement à l'ATRA que pour le traitement combiné à l'ATRA et à l'ATO, une hypométhylation de la région distale du promoteur de *hTERT* combinée à un rapprochement des nucléosomes dans la région proximale. De même, on note une diminution du dépôt des marques activatrices, notamment au niveau du promoteur principal. Dans le cas d'une répression partielle du gène *hTERT*, on n'observe pas de coopération entre ces différents mécanismes, mais seulement certains se mettent en place, comme on peut le voir à la page suivante.

Dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>, les traitements à l'ATRA (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) et à l'ATO (0,2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) seuls répriment de façon partielle l'expression du gène *hTERT* jusqu'à atteindre un palier. La **figure 42** récapitule les processus épigénétiques observés sous ces traitements.



**Figure 42 :** Schéma de régulation du gène *hTERT* dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> après sept jours de traitement à l'ATRA (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) ou à l'ATO (0,2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )

Dans la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>, le traitement à l'ATRA réprime de façon partielle l'expression du gène *hTERT*. Ceci est corrélé à une augmentation de la méthylation dans la région activatrice, initialement hypométhylée, diminuant peut-être l'effet activateur de cette région. De plus, le traitement est associé à une décondensation de la chromatine dans cette même région activatrice et dans la région codante. Ceci est probablement un facteur contrant l'effet répresseur de l'ATRA et permettant ainsi à la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup> de continuer à exprimer le gène *hTERT* après une première étape de répression. La fixation des facteurs de transcription activateurs, comme c-Myc et Sp1 par exemple, sur le promoteur du gène *hTERT* n'est pas modifiée après traitement à l'ATRA dans cette lignée. Dans les cellules témoins comme traitées, les facteurs répresseurs, comme CTCF et WT1 par exemple, ne se fixent pas sur le promoteur du gène *hTERT*.

Le traitement à l'ATO n'entraîne aucun changement dans la région activatrice du gène *hTERT* mais est associé à une hypométhylation d'une région en amont du promoteur principal, permettant peut-être la fixation d'un facteur de transcription répresseur, comme MZF2 par exemple. Il est à noter que l'ATO réprime partiellement l'expression de *hTERT*, tout comme l'ATRA.

Chromosome 5p : bras court du chromosome 5. Subtél. : subtélomère.

Pour conclure, ce projet de recherche doctorale a permis de mettre en place des profils de régulation du gène *hTERT* en corrélant différents mécanismes épigénétiques dans des lignées modèles de leucémie aiguë promyélocytaire, dans des conditions données (sept jours de traitement à l'ATRA, à l'ATO ou avec une combinaison des deux molécules).

J'ai pu observer que, lors d'une répression partielle du gène *hTERT* (traitement à l'ATRA ou traitement à l'ATO sur la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>), des mécanismes épigénétiques répressifs se mettent en place mais de façon individuelle. En revanche, lors d'une répression complète du gène *hTERT* (traitement à l'ATRA sur la lignée NB4-LR1 et traitement combiné à l'ATRA et à l'ATO sur la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>), plusieurs mécanismes épigénétiques coopèrent pour assurer l'extinction du gène. Notamment, j'ai pu observer l'implication de la méthylation endogène, du positionnement des nucléosomes et des marques activatrices d'histones (du moins leur disparition).

Ce type d'étude n'avait jamais été réalisé auparavant et nécessiterait d'être poursuivi dans d'autres modèles cellulaires tumoraux afin de tenter de mettre en place un profil type de répression du gène *hTERT* dans différents cancers. Cette connaissance permettra sans doute la synthèse de molécules ciblant spécifiquement ce gène, surexprimé de façon aberrante dans les pathologies cancéreuses. En effet, les facteurs de transcription impliqués dans la régulation du gène *hTERT* ne peuvent être ciblés du fait de leur présence dans de nombreuses cellules de l'organisme et de leur implication dans différents processus cellulaires. Et les traitements ciblant directement la télomérase ou les télomères ne se sont pas montrés très efficaces jusqu'à présent ou présentent une toxicité élevée.

Ainsi, mettre en évidence un profil épigénétique du gène *hTERT* dans les cellules cancéreuses pourrait permettre de cibler les protéines le mettant en place et ainsi mener à la répression du gène et l'arrêt de l'activité de la télomérase dans ces cellules uniquement. Des traitements ciblant les méthyltransférases de l'ADN et des histones ainsi que les acétyltransférases d'histones seraient tout à fait pertinents. En effet, de plus en plus d'études cliniques montrent l'intérêt d'utiliser des drogues épigénétiques pour le traitement de leucémies ou de cancers solides. Certaines drogues (comme la décitabine, ciblant les DNMT, ou la trichostatine A, ciblant les HDAC, par exemple) sont déjà approuvées dans certaines indications en oncologie. Cette étude fondamentale focalisée sur les effets épigénétiques de l'ATRA et de l'ATO dans un modèle de leucémie aiguë promyélocytaire peut servir de base à de futures études dans d'autres types de pathologies cancéreuses.

## BIBLIOGRAPHIE

- Ablain, J., Rice, K., Soilihi, H., de Reynies, A., Minucci, S., & de Thé, H. (2014). Activation of a promyelocytic leukemia-tumor protein 53 axis underlies acute promyelocytic leukemia cure. *Nature Medicine*, 20(2), 167-174. <https://doi.org/10.1038/nm.3441>
- Acemel, R. D., Maeso, I., & Gómez-Skarmeta, J. L. (2017). Topologically associated domains: a successful scaffold for the evolution of gene regulation in animals. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 6(3). <https://doi.org/10.1002/wdev.265>
- Adams, J., & Nassiri, M. (2015). Acute Promyelocytic Leukemia: A Review and Discussion of Variant Translocations. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 139(10), 1308-1313. <https://doi.org/10.5858/arpa.2013-0345-RS>
- Agrawal, K., Das, V., Vyas, P., & Hajdúch, M. (2018). Nucleosidic DNA demethylating epigenetic drugs - A comprehensive review from discovery to clinic. *Pharmacology & Therapeutics*, 188, 45-79. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.02.006>
- Akincilar, S. C., Unal, B., & Tergaonkar, V. (2016). Reactivation of telomerase in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 73(8), 1659-1670. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2146-9>
- Anastasiadou, E., Jacob, L. S., & Slack, F. J. (2018). Non-coding RNA networks in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 18(1), 5-18. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.99>
- Arcipowski, K. M., Martinez, C. A., & Ntziachristos, P. (2016). Histone demethylases in physiology and cancer: a tale of two enzymes, JMJD3 and UTX. *Current Opinion in Genetics & Development*, 36, 59-67. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.03.010>
- Atkinson, S. P., Hoare, S. F., Glasspool, R. M., & Keith, W. N. (2005). Lack of telomerase gene expression in alternative lengthening of telomere cells is associated with chromatin remodeling of the hTR and hTERT gene promoters. *Cancer Research*, 65(17), 7585-7590. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1715>
- Audia, J. E., & Campbell, R. M. (2016). Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(4), a019521. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019521>
- Avilion, A. A., Piatyszek, M. A., Gupta, J., Shay, J. W., Bacchetti, S., & Greider, C. W. (1996). Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Research*, 56(3), 645-650.
- Avin, B. A., Umbricht, C. B., & Zeiger, M. A. (2016). Human telomerase reverse transcriptase regulation by DNA methylation, transcription factor binding and alternative splicing (Review). *International Journal of Oncology*, 49(6), 2199-2205. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3743>
- Avin, B. A., Wang, Y., Gilpatrick, T., Workman, R. E., Lee, I., Timp, W., ... Zeiger, M. A. (2019). Characterization of Human Telomerase Reverse Transcriptase Promoter Methylation and Transcription Factor Binding in Differentiated Thyroid Cancer Cell Lines. *Genes, Chromosomes & Cancer*. <https://doi.org/10.1002/gcc.22735>
- Azouz, A., Wu, Y.-L., Hillion, J., Tarkanyi, I., Karniguian, A., Aradi, J., ... Ségal-Bendirdjian, E. (2010). Epigenetic plasticity of hTERT gene promoter determines

- retinoid capacity to repress telomerase in maturation-resistant acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia*, 24(3), 613-622. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.283>
- Azuara, V., Perry, P., Sauer, S., Spivakov, M., Jørgensen, H. F., John, R. M., ... Fisher, A. G. (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nature Cell Biology*, 8(5), 532-538. <https://doi.org/10.1038/ncb1403>
- Azzalin, C. M., Reichenbach, P., Khoriavali, L., Giulotto, E., & Lingner, J. (2007). Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5851), 798-801. <https://doi.org/10.1126/science.1147182>
- Baljevic, M., Dumitriu, B., Lee, J.-W., Paietta, E. M., Wiernik, P. H., Racevskis, J., ... Tallman, M. S. (2016). Telomere Length Recovery: A Strong Predictor of Overall Survival in Acute Promyelocytic Leukemia. *Acta Haematologica*, 136(4), 210-218. <https://doi.org/10.1159/000448160>
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), 381-395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Wang, Z., ... Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129(4), 823-837. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.009>
- Barthel, F. P., Wei, W., Tang, M., Martinez-Ledesma, E., Hu, X., Amin, S. B., ... Verhaak, R. G. W. (2017). Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nature Genetics*, 49(3), 349-357. <https://doi.org/10.1038/ng.3781>
- Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2016). Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505>
- Beesley, J., Pickett, H. A., Johnatty, S. E., Dunning, A. M., Chen, X., Li, J., ... Ovarian Cancer Association Consortium. (2011). Functional polymorphisms in the TERT promoter are associated with risk of serous epithelial ovarian and breast cancers. *PLoS One*, 6(9), e24987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024987>
- Beishline, K., & Azizkhan-Clifford, J. (2015). Sp1 and the « hallmarks of cancer ». *The FEBS Journal*, 282(2), 224-258. <https://doi.org/10.1111/febs.13148>
- Benedetti, R., Conte, M., Iside, C., & Altucci, L. (2015). Epigenetic-based therapy: From single- to multi-target approaches. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 69, 121-131. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.10.016>
- Benoit, G., Roussel, M., Pendino, F., Ségal-Bendirdjian, E., & Lanotte, M. (2001). Orchestration of multiple arrays of signal cross-talk and combinatorial interactions for maturation and cell death: another vision of t(15;17) preleukemic blast and APL-cell maturation. *Oncogene*, 20(49), 7161-7177. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204760>
- Bernardes de Jesus, B., & Blasco, M. A. (2013). Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends in Genetics: TIG*, 29(9), 513-520. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.007>
- Bernstein, B. E., Meissner, A., & Lander, E. S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell*, 128(4), 669-681. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.033>
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., ... Lander, E. S. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in

- embryonic stem cells. *Cell*, 125(2), 315-326.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.041>
- Bertin, A., & Mangenot, S. (2008). [Structure and dynamic of the nucleosome core particle]. *Medecine Sciences: M/S*, 24(8-9), 715-719.  
<https://doi.org/10.1051/medsci/20082489715>
- Bickmore, W. A. (2013). The spatial organization of the human genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 14, 67-84. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153515>
- Biswas, S., & Rao, C. M. (2017). Epigenetics in cancer: Fundamentals and Beyond. *Pharmacology & Therapeutics*, 173, 118-134.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.011>
- Blackburn, E. H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*, 350(6319), 569-573.  
<https://doi.org/10.1038/350569a0>
- Bochtler, M., Kolano, A., & Xu, G.-L. (2017). DNA demethylation pathways: Additional players and regulators. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 39(1), 1-13. <https://doi.org/10.1002/bies.201600178>
- Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., ... Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5349), 349-352.
- Bollmann, F. M. (2008). The many faces of telomerase: emerging extratelomeric effects. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 30(8), 728-732. <https://doi.org/10.1002/bies.20793>
- Bolte, S., & Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy*, 224(Pt 3), 213-232.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
- Breccia, M., & Lo Coco, F. (2014). Thrombo-hemorrhagic deaths in acute promyelocytic leukemia. *Thrombosis Research*, 133 Suppl 2, S112-116.  
[https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(14\)50019-9](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(14)50019-9)
- Cao, Y., Bryan, T. M., & Reddel, R. R. (2008). Increased copy number of the TERT and TERC telomerase subunit genes in cancer cells. *Cancer Science*, 99(6), 1092-1099.  
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00815.x>
- Carelli, F. N., Sharma, G., & Ahringer, J. (2017). Broad Chromatin Domains: An Important Facet of Genome Regulation. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 39(12). <https://doi.org/10.1002/bies.201700124>
- Chan, H., Wang, Y., & Feigon, J. (2017). Progress in Human and Tetrahymena Telomerase Structure Determination. *Annual Review of Biophysics*, 46, 199-225.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-011140>
- Chang, H. R., Munkhjargal, A., Kim, M.-J., Park, S. Y., Jung, E., Ryu, J.-H., ... Kim, Y. (2018). The functional roles of PML nuclear bodies in genome maintenance. *Mutation Research*, 809, 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2017.05.002>
- Chaumeil, J., Micsinai, M., & Skok, J. A. (2013). Combined immunofluorescence and DNA FISH on 3D-preserved interphase nuclei to study changes in 3D nuclear organization. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (72), e50087. <https://doi.org/10.3791/50087>

- Chen, G. Q., Zhu, J., Shi, X. G., Ni, J. H., Zhong, H. J., Si, G. Y., ... Chen, Z. (1996). In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. *Blood*, 88(3), 1052-1061.
- Chen, P., Zhao, J., Wang, Y., Wang, M., Long, H., Liang, D., ... Li, G. (2013). H3.3 actively marks enhancers and primes gene transcription via opening higher-ordered chromatin. *Genes & Development*, 27(19), 2109-2124. <https://doi.org/10.1101/gad.222174.113>
- Chen, T., & Li, E. (2004). Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Current Topics in Developmental Biology*, 60, 55-89. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(04\)60003-2](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(04)60003-2)
- Chen, Y. (2018). The structural biology of the shelterin complex. *Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1515/hsz-2018-0368>
- Chiba, K., Johnson, J. Z., Vogan, J. M., Wagner, T., Boyle, J. M., & Hockemeyer, D. (2015). Cancer-associated TERT promoter mutations abrogate telomerase silencing. *ELife*, 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.07918>
- Chodavarapu, R. K., Feng, S., Bernatavichute, Y. V., Chen, P.-Y., Stroud, H., Yu, Y., ... Pellegrini, M. (2010). Relationship between nucleosome positioning and DNA methylation. *Nature*, 466(7304), 388-392. <https://doi.org/10.1038/nature09147>
- Choi, J.-H., Min, N. Y., Park, J., Kim, J. H., Park, S. H., Ko, Y. J., ... Lee, K.-H. (2010). TSA-induced DNMT1 down-regulation represses hTERT expression via recruiting CTCF into demethylated core promoter region of hTERT in HCT116. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391(1), 449-454. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.078>
- Chou, W.-C., Chen, H.-Y., Yu, S.-L., Cheng, L., Yang, P.-C., & Dang, C. V. (2005). Arsenic suppresses gene expression in promyelocytic leukemia cells partly through Sp1 oxidation. *Blood*, 106(1), 304-310. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0241>
- Cifuentes-Rojas, C., & Shippen, D. E. (2012). Telomerase regulation. *Mutation Research*, 730(1-2), 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.10.003>
- Clark, S. J., Harrison, J., & Molloy, P. L. (1997). Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation. *Gene*, 195(1), 67-71.
- Clark, Stephen J., Lee, H. J., Smallwood, S. A., Kelsey, G., & Reik, W. (2016). Single-cell epigenomics: powerful new methods for understanding gene regulation and cell identity. *Genome Biology*, 17, 72. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0944-x>
- Cleal, K., Norris, K., & Baird, D. (2018). Telomere Length Dynamics and the Evolution of Cancer Genome Architecture. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020482>
- Cohen, S. B., Graham, M. E., Lovrecz, G. O., Bache, N., Robinson, P. J., & Reddel, R. R. (2007). Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5820), 1850-1853. <https://doi.org/10.1126/science.1138596>
- Cole, A. J., Clifton-Bligh, R., & Marsh, D. J. (2015). Histone H2B monoubiquitination: roles to play in human malignancy. *Endocrine-Related Cancer*, 22(1), T19-33. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0185>

- Collings, C. K., & Anderson, J. N. (2017). Links between DNA methylation and nucleosome occupancy in the human genome. *Epigenetics & Chromatin*, *10*, 18. <https://doi.org/10.1186/s13072-017-0125-5>
- Cong, Y. S., & Bacchetti, S. (2000). Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(46), 35665-35668. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000637200>
- Cong, Y. S., Wen, J., & Bacchetti, S. (1999). The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Human Molecular Genetics*, *8*(1), 137-142.
- Cong, Y.-S., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2002). Human telomerase and its regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *66*(3), 407-425, table of contents.
- Coombs, C. C., Tavakkoli, M., & Tallman, M. S. (2015). Acute promyelocytic leukemia: where did we start, where are we now, and the future. *Blood Cancer Journal*, *5*, e304. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.25>
- Corella, D., & Ordovas, J. M. (2017). Basic Concepts in Molecular Biology Related to Genetics and Epigenetics. *Revista Espanola De Cardiologia (English Ed.)*, *70*(9), 744-753. <https://doi.org/10.1016/j.rec.2017.05.011>
- Cress, W. D., & Seto, E. (2000). Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *Journal of Cellular Physiology*, *184*(1), 1-16. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200007\)184:1<1::AID-JCP1>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200007)184:1<1::AID-JCP1>3.0.CO;2-7)
- Cui, K., Zang, C., Roh, T.-Y., Schones, D. E., Childs, R. W., Peng, W., & Zhao, K. (2009). Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell*, *4*(1), 80-93. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.11.011>
- Daniel, M., Peek, G. W., & Tollefsbol, T. O. (2012). Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene*, *498*(2), 135-146. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.095>
- Das, C., Tyler, J. K., & Churchill, M. E. A. (2010). The histone shuffle: histone chaperones in an energetic dance. *Trends in Biochemical Sciences*, *35*(9), 476-489. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.04.001>
- Dawson, M. A. (2017). The cancer epigenome: Concepts, challenges, and therapeutic opportunities. *Science (New York, N.Y.)*, *355*(6330), 1147-1152. <https://doi.org/10.1126/science.aam7304>
- De Koning, L., Corpet, A., Haber, J. E., & Almouzni, G. (2007). Histone chaperones: an escort network regulating histone traffic. *Nature Structural & Molecular Biology*, *14*(11), 997-1007. <https://doi.org/10.1038/nsmb1318>
- de Lange, T. (1994). Activation of telomerase in a human tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(8), 2882-2885.
- de Lange, Titia. (2018). Shelterin-Mediated Telomere Protection. *Annual Review of Genetics*, *52*, 223-247. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-032918-021921>
- de Thé, H., Pandolfi, P. P., & Chen, Z. (2017). Acute Promyelocytic Leukemia: A Paradigm for Oncoprotein-Targeted Cure. *Cancer Cell*, *32*(5), 552-560. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.10.002>

- Deans, C., & Maggert, K. A. (2015). What do you mean, « epigenetic »? *Genetics*, 199(4), 887-896. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>
- Decottignies, A. (2014). [The telomere position effect: silence in the back row!]. *Medecine Sciences: M/S*, 30(2), 173-178. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143002015>
- Dekker, J., & Mirny, L. (2016). The 3D Genome as Moderator of Chromosomal Communication. *Cell*, 164(6), 1110-1121. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.007>
- DesJarlais, R., & Tummino, P. J. (2016). Role of Histone-Modifying Enzymes and Their Complexes in Regulation of Chromatin Biology. *Biochemistry*, 55(11), 1584-1599. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01210>
- Dessain, S. K., Yu, H., Reddel, R. R., Beijersbergen, R. L., & Weinberg, R. A. (2000). Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Research*, 60(3), 537-541.
- Devereux, T. R., Horikawa, I., Anna, C. H., Annab, L. A., Afshari, C. A., & Barrett, J. C. (1999). DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Research*, 59(24), 6087-6090.
- Deville, L., Hillion, J., & Ségal-Bendirdjian, E. (2009). Telomerase regulation in hematological cancers: a matter of stemness? *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1792(4), 229-239. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.01.016>
- Di Croce, L., Raker, V. A., Corsaro, M., Fazi, F., Fanelli, M., Faretta, M., ... Pelicci, P. G. (2002). Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5557), 1079-1082. <https://doi.org/10.1126/science.1065173>
- Dillon, N. (2004). Heterochromatin structure and function. *Biology of the Cell*, 96(8), 631-637. <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2004.06.003>
- Dinami, R., Buemi, V., Sestito, R., Zappone, A., Ciani, Y., Mano, M., ... Schoeftner, S. (2017). Epigenetic silencing of miR-296 and miR-512 ensures hTERT dependent apoptosis protection and telomere maintenance in basal-type breast cancer cells. *Oncotarget*, 8(56), 95674-95691. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21180>
- Dixon, J. R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., ... Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature*, 485(7398), 376-380. <https://doi.org/10.1038/nature11082>
- Douer, D. (2003). The epidemiology of acute promyelocytic leukaemia. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 16(3), 357-367.
- Dudognon, C., Pendino, F., Hillion, J., Saumet, A., Lanotte, M., & Ségal-Bendirdjian, E. (2004). Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance. *Oncogene*, 23(45), 7469-7474. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208029>
- Duprez, E., Ruchaud, S., Houge, G., Martin-Thouvenin, V., Valensi, F., Kastner, P., ... Lanotte, M. (1992). A retinoid acid « resistant » t(15;17) acute promyelocytic leukemia cell line: isolation, morphological, immunological, and molecular features. *Leukemia*, 6(12), 1281-1287.
- Dyck, J. A., Maul, G. G., Miller, W. H., Chen, J. D., Kakizuka, A., & Evans, R. M. (1994). A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell*, 76(2), 333-343.

- Eckersley-Maslin, M. A., & Spector, D. L. (2014). Random monoallelic expression: regulating gene expression one allele at a time. *Trends in Genetics: TIG*, 30(6), 237-244. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.03.003>
- Edwards, J. R., O'Donnell, A. H., Rollins, R. A., Peckham, H. E., Lee, C., Milekic, M. H., ... Bestor, T. H. (2010). Chromatin and sequence features that define the fine and gross structure of genomic methylation patterns. *Genome Research*, 20(7), 972-980. <https://doi.org/10.1101/gr.101535.109>
- El Hajj, J., Nguyen, E., Liu, Q., Bouyer, C., Adriaenssens, E., Hilal, G., & Ségal-Bendirdjian, E. (2018). Telomerase regulation by the long non-coding RNA H19 in human acute promyelocytic leukemia cells. *Molecular Cancer*, 17(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0835-8>
- Elbahesh, E., Patel, N., & Tabbara, I. A. (2014). Treatment of acute promyelocytic leukemia. *Anticancer Research*, 34(4), 1507-1517.
- Eldholm, V., Haugen, A., & Zienolddiny, S. (2014). CTCF mediates the TERT enhancer-promoter interactions in lung cancer cells: identification of a novel enhancer region involved in the regulation of TERT gene. *International Journal of Cancer*, 134(10), 2305-2313. <https://doi.org/10.1002/ijc.28570>
- Erdmann, A., Halby, L., Fahy, J., & Arimondo, P. B. (2015). Targeting DNA methylation with small molecules: what's next? *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(6), 2569-2583. <https://doi.org/10.1021/jm500843d>
- Fahrner, J. A., & Baylin, S. B. (2003). Heterochromatin: stable and unstable invasions at home and abroad. *Genes & Development*, 17(15), 1805-1812. <https://doi.org/10.1101/gad.1123303>
- Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., ... Yu, J. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5228), 1236-1241.
- Flavahan, W. A., Gaskell, E., & Bernstein, B. E. (2017). Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 357(6348). <https://doi.org/10.1126/science.aal2380>
- Fressigné, L., & Simard, M. J. (2018). [Biogenesis of small non-coding RNAs in animals]. *Medecine Sciences: M/S*, 34(2), 137-144. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183402011>
- Furuya, K., Ikura, M., & Ikura, T. (2019). Epigenetic interplays between DNA demethylation and histone methylation for protecting oncogenesis. *Journal of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy124>
- Gaspar, T. B., Sá, A., Lopes, J. M., Sobrinho-Simões, M., Soares, P., & Vinagre, J. (2018). Telomere Maintenance Mechanisms in Cancer. *Genes*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/genes9050241>
- Gates, L. A., Shi, J., Rohira, A. D., Feng, Q., Zhu, B., Bedford, M. T., ... O'Malley, B. W. (2017). Acetylation on histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(35), 14456-14472. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.802074>
- Ge, M., Shi, M., An, C., Yang, W., Nie, X., Zhang, J., ... Yang, M. (2016). Functional evaluation of TERT-CLPTM1L genetic variants associated with susceptibility of

- papillary thyroid carcinoma. *Scientific Reports*, 6, 26037. <https://doi.org/10.1038/srep26037>
- Ghaffari, S. H., Momeny, M., Bashash, D., Mirzaei, R., Ghavamzadeh, A., & Alimoghaddam, K. (2012). Cytotoxic effect of arsenic trioxide on acute promyelocytic leukemia cells through suppression of NF $\kappa$ B-dependent induction of hTERT due to down-regulation of Pin1 transcription. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, 17(4), 198-206. <https://doi.org/10.1179/1607845412Y.0000000008>
- Giotopoulos, G., Chan, W.-I., Horton, S. J., Ruau, D., Gallipoli, P., Fowler, A., ... Huntly, B. J. P. (2016). The epigenetic regulators CBP and p300 facilitate leukemogenesis and represent therapeutic targets in acute myeloid leukemia. *Oncogene*, 35(3), 279-289. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.92>
- Goldman, J. M. (1974). Acute promyelocytic leukaemia. *British Medical Journal*, 1(5904), 380-382.
- Gomez, D. L. M., Armando, R. G., Cerrudo, C. S., Ghiringhelli, P. D., & Gomez, D. E. (2016). Telomerase as a Cancer Target. Development of New Molecules. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16(22), 2432-2440.
- Grandjenette, C., Schnekenburger, M., Karius, T., Ghelfi, J., Gaigneaux, A., Henry, E., ... Diederich, M. (2014). 5-aza-2'-deoxycytidine-mediated c-myc Down-regulation triggers telomere-dependent senescence by regulating human telomerase reverse transcriptase in chronic myeloid leukemia. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 16(6), 511-528. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.05.009>
- Grewal, S. I. S., & Moazed, D. (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, 301(5634), 798-802. <https://doi.org/10.1126/science.1086887>
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., & de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 97(4), 503-514.
- Grignani, F., De Matteis, S., Nervi, C., Tomassoni, L., Gelmetti, V., Cioce, M., ... Pelicci, P. G. (1998). Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature*, 391(6669), 815-818. <https://doi.org/10.1038/35901>
- Guidez, F., Ivins, S., Zhu, J., Söderström, M., Waxman, S., & Zelent, A. (1998). Reduced retinoic acid-sensitivities of nuclear receptor corepressor binding to PML- and PLZF-RARalpha underlie molecular pathogenesis and treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 91(8), 2634-2642.
- Guillemin, C., & Francastel, C. (2010). [Heterochromatin compartments and gene silencing: human hematopoietic differentiation as a model study]. *Biologie Aujourd'hui*, 204(3), 221-233. <https://doi.org/10.1051/jbio/2010016>
- Guilleret, I., & Benhattar, J. (2003). Demethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter reduced hTERT expression and telomerase activity and shortened telomeres. *Experimental Cell Research*, 289(2), 326-334.
- Guilleret, I., Yan, P., Grange, F., Braunschweig, R., Bosman, F. T., & Benhattar, J. (2002). Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *International Journal of Cancer*, 101(4), 335-341. <https://doi.org/10.1002/ijc.10593>

- Guilleret, I., Yan, P., Guillou, L., Braunschweig, R., Coindre, J.-M., & Benhattar, J. (2002). The human telomerase RNA gene (hTERC) is regulated during carcinogenesis but is not dependent on DNA methylation. *Carcinogenesis*, *23*(12), 2025-2030.
- Guittat, L., Alberti, P., Gomez, D., De Cian, A., Pennarun, G., Lemarteleur, T., ... Mergny, J.-L. (2004). Targeting human telomerase for cancer therapeutics. *Cytotechnology*, *45*(1-2), 75-90. <https://doi.org/10.1007/s10616-004-5127-z>
- Gunjan, A., Paik, J., & Verreault, A. (2005). Regulation of histone synthesis and nucleosome assembly. *Biochimie*, *87*(7), 625-635. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.02.008>
- Haeussler, M., Zweig, A. S., Tyner, C., Speir, M. L., Rosenbloom, K. R., Raney, B. J., ... Kent, W. J. (2019). The UCSC Genome Browser database: 2019 update. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D853-D858. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1095>
- Hajj, J. E., Garsuault, D., Bouyer, C., Nguyen, E., Hilal, G., & Ségal-Bendirdjian, E. (2017). Telomeres and Telomerase in Neuroblastoma. In *Neuroblastoma - Current state and recent updates*. Consulté à l'adresse <http://www.intechopen.com/books/neuroblastoma-current-state-and-recent-updates/telomeres-and-telomerase-in-neuroblastoma>
- Han, H., Cortez, C. C., Yang, X., Nichols, P. W., Jones, P. A., & Liang, G. (2011). DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. *Human Molecular Genetics*, *20*(22), 4299-4310. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr356>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70.
- Harley, C. B., & Villeponteau, B. (1995). Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*, *5*(2), 249-255.
- He, Y.-F., Li, B.-Z., Li, Z., Liu, P., Wang, Y., Tang, Q., ... Xu, G.-L. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science (New York, N.Y.)*, *333*(6047), 1303-1307. <https://doi.org/10.1126/science.1210944>
- Heidenreich, B., & Kumar, R. (2017). TERT promoter mutations in telomere biology. *Mutation Research*, *771*, 15-31. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2016.11.002>
- Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C. W., Hawkins, R. D., ... Ren, B. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature Genetics*, *39*(3), 311-318. <https://doi.org/10.1038/ng1966>
- Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England Journal of Medicine*, *349*(21), 2042-2054. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023075>
- Hesson, L. B., Patil, V., Sloane, M. A., Nunez, A. C., Liu, J., Pimanda, J. E., & Ward, R. L. (2013). Reassembly of nucleosomes at the MLH1 promoter initiates resilencing following decitabine exposure. *PLoS Genetics*, *9*(7), e1003636. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003636>
- Hesson, L. B., Sloane, M. A., Wong, J. W., Nunez, A. C., Srivastava, S., Ng, B., ... Ward, R. L. (2014). Altered promoter nucleosome positioning is an early event in gene silencing. *Epigenetics*, *9*(10), 1422-1430. <https://doi.org/10.4161/15592294.2014.970077>

- Hsieh, M.-H., Chen, Y.-T., Chen, Y.-T., Lee, Y.-H., Lu, J., Chien, C.-L., ... Teng, S.-C. (2017). PARP1 controls KLF4-mediated telomerase expression in stem cells and cancer cells. *Nucleic Acids Research*, 45(18), 10492-10503. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx683>
- Hu, M., Deng, K., Qin, Z., & Liu, J. S. (2013). Understanding spatial organizations of chromosomes via statistical analysis of Hi-C data. *Quantitative biology*, 1(2), 156-174. <https://doi.org/10.1007/s40484-013-0016-0>
- Huang, B., Jiang, C., & Zhang, R. (2014). Epigenetics: the language of the cell? *Epigenomics*, 6(1), 73-88. <https://doi.org/10.2217/epi.13.72>
- Huang, H., Sabari, B. R., Garcia, B. A., Allis, C. D., & Zhao, Y. (2014). SnapShot: histone modifications. *Cell*, 159(2), 458-458.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.037>
- Huang, M. E., Ye, Y. C., Chen, S. R., Chai, J. R., Lu, J. X., Zhou, L., ... Wang, Z. Y. (1988). Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 72(2), 567-572.
- Huff, J. T., & Zilberman, D. (2014). Dnmt1-independent CG methylation contributes to nucleosome positioning in diverse eukaryotes. *Cell*, 156(6), 1286-1297. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.029>
- Hukezalie, K. R., & Wong, J. M. Y. (2013). Structure-function relationship and biogenesis regulation of the human telomerase holoenzyme. *The FEBS Journal*, 280(14), 3194-3204. <https://doi.org/10.1111/febs.12272>
- Hussain, T., Saha, D., Purohit, G., Kar, A., Kishore Mukherjee, A., Sharma, S., ... Chowdhury, S. (2017). Transcription regulation of CDKN1A (p21/CIP1/WAF1) by TRF2 is epigenetically controlled through the REST repressor complex. *Scientific Reports*, 7(1), 11541. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11177-1>
- Hüttenhofer, A., & Vogel, J. (2006). Experimental approaches to identify non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research*, 34(2), 635-646. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj469>
- Irvine, R. A., Lin, I. G., & Hsieh, C.-L. (2002). DNA methylation has a local effect on transcription and histone acetylation. *Molecular and Cellular Biology*, 22(19), 6689-6696.
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S. C., Collins, L. B., Swenberg, J. A., ... Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6047), 1300-1303. <https://doi.org/10.1126/science.1210597>
- Jafri, M. A., Ansari, S. A., Alqahtani, M. H., & Shay, J. W. (2016). Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Medicine*, 8(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0324-x>
- Jahan, S., & Davie, J. R. (2015). Protein arginine methyltransferases (PRMTs): role in chromatin organization. *Advances in Biological Regulation*, 57, 173-184. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.09.003>
- Janssen, A., Colmenares, S. U., & Karpen, G. H. (2018). Heterochromatin: Guardian of the Genome. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 34, 265-288. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062653>
- Jeanne, M., Lallemand-Breitenbach, V., Ferhi, O., Koken, M., Le Bras, M., Duffort, S., ... de Thé, H. (2010). PML/RARA oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia

- response of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Cancer Cell*, 18(1), 88-98.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.06.003>
- Jeltsch, A., Ehrenhofer-Murray, A., Jurkowski, T. P., Lyko, F., Reuter, G., Ankri, S., ... Helm, M. (2017). Mechanism and biological role of Dnmt2 in Nucleic Acid Methylation. *RNA Biology*, 14(9), 1108-1123.  
<https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1191737>
- Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5532), 1074-1080. <https://doi.org/10.1126/science.1063127>
- Jenuwein, Thomas. (2006). The epigenetic magic of histone lysine methylation. *The FEBS Journal*, 273(14), 3121-3135. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05343.x>
- Jessen, W. J., Dhasarathy, A., Hoose, S. A., Carvin, C. D., Risinger, A. L., & Kladde, M. P. (2004). Mapping chromatin structure in vivo using DNA methyltransferases. *Methods (San Diego, Calif.)*, 33(1), 68-80. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.10.025>
- Jiang, Guanchao, Yang, F., Sanchez, C., & Ehrlich, M. (2004). Histone modification in constitutive heterochromatin versus unexpressed euchromatin in human cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93(2), 286-300. <https://doi.org/10.1002/jcb.20146>
- Jiang, Guosheng, Albiñ, A., Tang, T., Tian, Z., & Henriksson, M. (2008). Role of Myc in differentiation and apoptosis in HL60 cells after exposure to arsenic trioxide or all-trans retinoic acid. *Leukemia Research*, 32(2), 297-307.  
<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2007.06.021>
- Jin, B., Ernst, J., Tiedemann, R. L., Xu, H., Sureshchandra, S., Kellis, M., ... Robertson, K. D. (2012). Linking DNA methyltransferases to epigenetic marks and nucleosome structure genome-wide in human tumor cells. *Cell Reports*, 2(5), 1411-1424.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.017>
- Jin, G., Gao, Y., & Lin, H.-K. (2014). Cytoplasmic PML: from molecular regulation to biological functions. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115(5), 812-818.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.24727>
- Joh, R. I., Palmieri, C. M., Hill, I. T., & Motamedi, M. (2014). Regulation of histone methylation by noncoding RNAs. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1839(12), 1385-1394. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.06.006>
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, 13(7), 484-492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, 128(4), 683-692.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029>
- Jones, P. A., Issa, J.-P. J., & Baylin, S. (2016). Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nature Reviews. Genetics*, 17(10), 630-641. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.93>
- Jones, P. A., & Liang, G. (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature Reviews. Genetics*, 10(11), 805-811. <https://doi.org/10.1038/nrg2651>
- Jost, K. L., Bertulat, B., & Cardoso, M. C. (2012). Heterochromatin and gene positioning: inside, outside, any side? *Chromosoma*, 121(6), 555-563.  
<https://doi.org/10.1007/s00412-012-0389-2>
- Kaiser, S., Jurkowski, T. P., Kellner, S., Schneider, D., Jeltsch, A., & Helm, M. (2017). The RNA methyltransferase Dnmt2 methylates DNA in the structural context of a tRNA. *RNA Biology*, 14(9), 1241-1251. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1236170>

- Kamimura, T., Miyamoto, T., Harada, M., & Akashi, K. (2011). Advances in therapies for acute promyelocytic leukemia. *Cancer Science*, *102*(11), 1929-1937. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02045.x>
- Kelly, T. K., Liu, Y., Lay, F. D., Liang, G., Berman, B. P., & Jones, P. A. (2012). Genome-wide mapping of nucleosome positioning and DNA methylation within individual DNA molecules. *Genome Research*, *22*(12), 2497-2506. <https://doi.org/10.1101/gr.143008.112>
- Kelsey, G., Stegle, O., & Reik, W. (2017). Single-cell epigenomics: Recording the past and predicting the future. *Science (New York, N.Y.)*, *358*(6359), 69-75. <https://doi.org/10.1126/science.aan6826>
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., & Haussler, D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Research*, *12*(6), 996-1006. <https://doi.org/10.1101/gr.229102>
- Khattar, E., Kumar, P., Liu, C. Y., Akıncılar, S. C., Raju, A., Lakshmanan, M., ... Tergaonkar, V. (2016). Telomerase reverse transcriptase promotes cancer cell proliferation by augmenting tRNA expression. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(10), 4045-4060. <https://doi.org/10.1172/JCI86042>
- Killela, P. J., Reitman, Z. J., Jiao, Y., Bettegowda, C., Agrawal, N., Diaz, L. A., ... Yan, H. (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(15), 6021-6026. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303607110>
- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., ... Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science (New York, N.Y.)*, *266*(5193), 2011-2015.
- Kim, W., Ludlow, A. T., Min, J., Robin, J. D., Stadler, G., Mender, I., ... Shay, J. W. (2016). Regulation of the Human Telomerase Gene TERT by Telomere Position Effect-Over Long Distances (TPE-OLD): Implications for Aging and Cancer. *PLoS Biology*, *14*(12), e2000016. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000016>
- Kim, W., & Shay, J. W. (2018). Long-range telomere regulation of gene expression: Telomere looping and telomere position effect over long distances (TPE-OLD). *Differentiation; Research in Biological Diversity*, *99*, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2017.11.005>
- Klungland, A., & Robertson, A. B. (2017). Oxidized C5-methyl cytosine bases in DNA: 5-Hydroxymethylcytosine; 5-formylcytosine; and 5-carboxycytosine. *Free Radical Biology & Medicine*, *107*, 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.038>
- Koivunen, P., & Laukka, T. (2018). The TET enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *75*(8), 1339-1348. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2721-8>
- Kornberg, R. D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science (New York, N.Y.)*, *184*(4139), 868-871.
- Koubi, M., Chabannon, C., & Duprez, E. (2017). [The biological complexity of Polycomb group proteins: the case of EZH2]. *Medicine Sciences: M/S*, *33*(5), 499-505. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173305013>

- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128(4), 693-705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Kozono, S., Lin, Y.-M., Seo, H.-S., Pinch, B., Lian, X., Qiu, C., ... Zhou, X. Z. (2018). Arsenic targets Pin1 and cooperates with retinoic acid to inhibit cancer-driving pathways and tumor-initiating cells. *Nature Communications*, 9(1), 3069. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05402-2>
- Kumar, A., Nilednu, P., Kumar, A., & Sharma, N. K. (2017). Epigenetic perturbation driving asleep telomerase reverse transcriptase: Possible therapeutic avenues in carcinoma. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(3), 1010428317695951. <https://doi.org/10.1177/1010428317695951>
- Kyo, S., Takakura, M., Fujiwara, T., & Inoue, M. (2008). Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Science*, 99(8), 1528-1538. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00878.x>
- Lai, W. K. M., & Pugh, B. F. (2017). Understanding nucleosome dynamics and their links to gene expression and DNA replication. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 18(9), 548-562. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.47>
- Laisné, M., Gupta, N., Kirsh, O., Pradhan, S., & Defossez, P.-A. (2018). Mechanisms of DNA Methyltransferase Recruitment in Mammals. *Genes*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/genes9120617>
- Lallemand-Breitenbach, V., & de Thé, H. (2018). PML nuclear bodies: from architecture to function. *Current Opinion in Cell Biology*, 52, 154-161. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.03.011>
- Lanotte, M., Martin-Thouvenin, V., Najman, S., Balerini, P., Valensi, F., & Berger, R. (1991). NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood*, 77(5), 1080-1086.
- Lawrence, M., Daujat, S., & Schneider, R. (2016). Lateral Thinking: How Histone Modifications Regulate Gene Expression. *Trends in Genetics: TIG*, 32(1), 42-56. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.10.007>
- Lay, F. D., Liu, Y., Kelly, T. K., Witt, H., Farnham, P. J., Jones, P. A., & Berman, B. P. (2015). The role of DNA methylation in directing the functional organization of the cancer epigenome. *Genome Research*, 25(4), 467-477. <https://doi.org/10.1101/gr.183368.114>
- Leão, R., Apolónio, J. D., Lee, D., Figueiredo, A., Tabori, U., & Castelo-Branco, P. (2018). Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: clinical impacts in cancer. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0422-8>
- Lee, D. D., Leão, R., Komosa, M., Gallo, M., Zhang, C. H., Lipman, T., ... Tabori, U. (2019). DNA hypermethylation within TERT promoter upregulates TERT expression in cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, 129(1), 223-229. <https://doi.org/10.1172/JCI121303>
- Lee, S., Borah, S., & Bahrami, A. (2017). Detection of Aberrant TERT Promoter Methylation by Combined Bisulfite Restriction Enzyme Analysis for Cancer Diagnosis. *The*

- Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 19(3), 378-386.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2017.01.003>
- Levi, L., Wang, Z., Doud, M. K., Hazen, S. L., & Noy, N. (2015). Saturated fatty acids regulate retinoic acid signalling and suppress tumorigenesis by targeting fatty acid-binding protein 5. *Nature Communications*, 6, 8794.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms9794>
- Levy, M. Z., Allsopp, R. C., Futcher, A. B., Greider, C. W., & Harley, C. B. (1992). Telomere end-replication problem and cell aging. *Journal of Molecular Biology*, 225(4), 951-960.
- Lewis, K. A., & Tollefsbol, T. O. (2016). Regulation of the Telomerase Reverse Transcriptase Subunit through Epigenetic Mechanisms. *Frontiers in Genetics*, 7, 83.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00083>
- Li, B., Carey, M., & Workman, J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell*, 128(4), 707-719. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>
- Li, Jun, Lei, H., Xu, Y., & Tao, Z.-Z. (2015). miR-512-5p suppresses tumor growth by targeting hTERT in telomerase positive head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *PloS One*, 10(8), e0135265.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135265>
- Li, Junmin, Zhu, H., Hu, J., Mi, J., Chen, S., Chen, Z., & Wang, Z. (2014). Progress in the treatment of acute promyelocytic leukemia: optimization and obstruction. *International Journal of Hematology*, 100(1), 38-50. <https://doi.org/10.1007/s12185-014-1603-1>
- Li, L., Gao, Y., Wu, Q., Cheng, A., & Yip, K. (2019). New guidelines for DNA methylome studies regarding 5-hydroxymethylcytosine for understanding transcriptional regulation. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.240036.118>
- Li, P.-T., Wang, Z.-F., Chu, I.-T., Kuan, Y.-M., Li, M.-H., Huang, M.-C., ... Chen, C.-T. (2017). Expression of the human telomerase reverse transcriptase gene is modulated by quadruplex formation in its first exon due to DNA methylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(51), 20859-20870.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.808022>
- Li, S., Shen, L., & Chen, K.-N. (2018). Association between H3K4 methylation and cancer prognosis: A meta-analysis. *Thoracic Cancer*, 9(7), 794-799.  
<https://doi.org/10.1111/1759-7714.12647>
- Li, Y., & Seto, E. (2016). HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10).  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026831>
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N. L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., ... Dekker, J. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5950), 289-293. <https://doi.org/10.1126/science.1181369>
- Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V., & Cech, T. R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5312), 561-567.

- Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., ... Ecker, J. R. (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), 315-322. <https://doi.org/10.1038/nature08514>
- Liu, L., Saldanha, S. N., Pate, M. S., Andrews, L. G., & Tollefsbol, T. O. (2004). Epigenetic regulation of human telomerase reverse transcriptase promoter activity during cellular differentiation. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 41(1), 26-37. <https://doi.org/10.1002/gcc.20058>
- Liu, Q., Nguyen, E., Døskeland, S., & Ségal-Bendirdjian, É. (2015). cAMP-Dependent Protein Kinase A (PKA)-Mediated c-Myc Degradation Is Dependent on the Relative Proportion of PKA-I and PKA-II Isozymes. *Molecular Pharmacology*, 88(3), 469-476. <https://doi.org/10.1124/mol.115.097915>
- Lizardi, P. M., Yan, Q., & Wajapeyee, N. (2017). Analysis of DNA Methylation in Mammalian Cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2017(12), pdb.top094821. <https://doi.org/10.1101/pdb.top094821>
- Lo-Coco, F., & Ammatuna, E. (2006). The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 156-161, 514. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2006.1.156>
- Lo-Coco, F., & Hasan, S. K. (2014). Understanding the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 27(1), 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2014.04.006>
- Lorch, Y., LaPointe, J. W., & Kornberg, R. D. (1987). Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell*, 49(2), 203-210.
- Lövkvist, C., Sneppen, K., & Haerter, J. O. (2017). Exploring the Link between Nucleosome Occupancy and DNA Methylation. *Frontiers in Genetics*, 8, 232. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00232>
- Lu, W., Zhang, Y., Liu, D., Songyang, Z., & Wan, M. (2013). Telomeres-structure, function, and regulation. *Experimental Cell Research*, 319(2), 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.09.005>
- Ludlow, A. T., Slusher, A. L., & Sayed, M. E. (2019). Insights into Telomerase/hTERT Alternative Splicing Regulation Using Bioinformatics and Network Analysis in Cancer. *Cancers*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/cancers11050666>
- Ludlow, A. T., Wong, M. S., Robin, J. D., Batten, K., Yuan, L., Lai, T.-P., ... Shay, J. W. (2018). NOVA1 regulates hTERT splicing and cell growth in non-small cell lung cancer. *Nature Communications*, 9(1), 3112. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05582-x>
- Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews. Genetics*, 19(2), 81-92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>
- MacNeil, D. E., Bensoussan, H. J., & Autexier, C. (2016). Telomerase Regulation from Beginning to the End. *Genes*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/genes7090064>

- Mai, A., & Altucci, L. (2009). Epi-drugs to fight cancer: from chemistry to cancer treatment, the road ahead. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(1), 199-213. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.020>
- Malhotra, S., Freeberg, M. A., Winans, S. J., Taylor, J., & Beemon, K. L. (2017). A Novel Long Non-Coding RNA in the hTERT Promoter Region Regulates hTERT Expression. *Non-Coding RNA*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/ncrna4010001>
- Mallona, I., Díez-Villanueva, A., & Peinado, M. A. (2014). Methylation plotter: a web tool for dynamic visualization of DNA methylation data. *Source Code for Biology and Medicine*, 9, 11. <https://doi.org/10.1186/1751-0473-9-11>
- Manders, E. M. M., Verbeek, F. J., & Aten, J. A. (1993). Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of Microscopy*, 169(3), 375-382. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x>
- Marchesini, M., Matocci, R., Tasselli, L., Cambiaghi, V., Orleth, A., Furia, L., ... Grignani, F. (2016). PML is required for telomere stability in non-neoplastic human cells. *Oncogene*, 35(14), 1811-1821. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.246>
- Martínez, P., & Blasco, M. A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nature Reviews. Cancer*, 11(3), 161-176. <https://doi.org/10.1038/nrc3025>
- Mazzone, R., Zwergel, C., Mai, A., & Valente, S. (2017). Epi-drugs in combination with immunotherapy: a new avenue to improve anticancer efficacy. *Clinical Epigenetics*, 9, 59. <https://doi.org/10.1186/s13148-017-0358-y>
- McCulloch, D., Brown, C., & Iland, H. (2017). Retinoic acid and arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia: current perspectives. *OncoTargets and Therapy*, 10, 1585-1601. <https://doi.org/10.2147/OTT.S100513>
- McEachern, M. J., Krauskopf, A., & Blackburn, E. H. (2000). Telomeres and their control. *Annual Review of Genetics*, 34, 331-358. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.331>
- Mello, M. L. (1983). Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin. *The Histochemical Journal*, 15(8), 739-751.
- Mercer, T. R., & Mattick, J. S. (2013). Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(3), 300-307. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2480>
- Meyer, C. A., & Liu, X. S. (2014). Identifying and mitigating bias in next-generation sequencing methods for chromatin biology. *Nature Reviews. Genetics*, 15(11), 709-721. <https://doi.org/10.1038/nrg3788>
- Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., ... Weinberg, R. A. (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, 90(4), 785-795.
- Minucci, S., & Ozato, K. (1996). Retinoid receptors in transcriptional regulation. *Current Opinion in Genetics & Development*, 6(5), 567-574.
- Miranda, T. B., Kelly, T. K., Bouazoune, K., & Jones, P. A. (2010). Methylation-sensitive single-molecule analysis of chromatin structure. *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 21, Unit 21.17.1-16. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2117s89>

- Miura, F., Enomoto, Y., Dairiki, R., & Ito, T. (2012). Amplification-free whole-genome bisulfite sequencing by post-bisulfite adaptor tagging. *Nucleic Acids Research*, *40*(17), e136. <https://doi.org/10.1093/nar/gks454>
- Montesanto, A., Bonfigli, A. R., Crocco, P., Garagnani, P., De Luca, M., Boemi, M., ... Rose, G. (2018). Genes associated with Type 2 Diabetes and vascular complications. *Aging*, *10*(2), 178-196. <https://doi.org/10.18632/aging.101375>
- Mulero-Navarro, S., & Esteller, M. (2008). Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *68*(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2008.03.001>
- Musgrove, C., Jansson, L. I., & Stone, M. D. (2018). New perspectives on telomerase RNA structure and function. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA*, *9*(2). <https://doi.org/10.1002/wrna.1456>
- Naftelberg, S., Schor, I. E., Ast, G., & Kornblihtt, A. R. (2015). Regulation of alternative splicing through coupling with transcription and chromatin structure. *Annual Review of Biochemistry*, *84*, 165-198. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034242>
- Nebbioso, A., Tambaro, F. P., Dell'Aversana, C., & Altucci, L. (2018). Cancer epigenetics: Moving forward. *PLoS Genetics*, *14*(6), e1007362. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007362>
- Nichol, J. N., Dupéré-Richer, D., Ezponda, T., Licht, J. D., & Miller, W. H. (2016). H3K27 Methylation: A Focal Point of Epigenetic Deregulation in Cancer. *Advances in Cancer Research*, *131*, 59-95. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2016.05.001>
- Nicoglou, A., & Merlin, F. (2017). Epigenetics: A way to bridge the gap between biological fields. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, *66*, 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2017.10.002>
- Ohnishi, K. (2007). PML-RARalpha inhibitors (ATRA, tamibaroten, arsenic trioxide) for acute promyelocytic leukemia. *International Journal of Clinical Oncology*, *12*(5), 313-317. <https://doi.org/10.1007/s10147-007-0694-6>
- Okamoto, K., & Seimiya, H. (2019). Revisiting Telomere Shortening in Cancer. *Cells*, *8*(2). <https://doi.org/10.3390/cells8020107>
- Okazuka, K., Masuko, M., Seki, Y., Hama, H., Honma, N., Furukawa, T., ... Aizawa, Y. (2007). Successful all-trans retinoic acid treatment of acute promyelocytic leukemia in a patient with NPM/RAR fusion. *International Journal of Hematology*, *86*(3), 246-249. <https://doi.org/10.1532/IJH97.07036>
- Oomen, M. E., Hansen, A. S., Liu, Y., Darzacq, X., & Dekker, J. (2019). CTCF sites display cell cycle-dependent dynamics in factor binding and nucleosome positioning. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.241547.118>
- Orfali, N., McKenna, S. L., Cahill, M. R., Gudas, L. J., & Mongan, N. P. (2014). Retinoid receptor signaling and autophagy in acute promyelocytic leukemia. *Experimental Cell Research*, *324*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.03.018>
- Osborne, C. S., Chakalova, L., Brown, K. E., Carter, D., Horton, A., Debrand, E., ... Fraser, P. (2004). Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nature Genetics*, *36*(10), 1065-1071. <https://doi.org/10.1038/ng1423>

- Ottaviani, A., Gilson, E., & Magdinier, F. (2008). Telomeric position effect: from the yeast paradigm to human pathologies? *Biochimie*, *90*(1), 93-107. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.07.022>
- Palm, W., & de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual Review of Genetics*, *42*, 301-334. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130350>
- Pan, M.-R., Hsu, M.-C., Chen, L.-T., & Hung, W.-C. (2018). Orchestration of H3K27 methylation: mechanisms and therapeutic implication. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *75*(2), 209-223. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2596-8>
- Pande, M., Spitz, M. R., Wu, X., Gorlov, I. P., Chen, W. V., & Amos, C. I. (2011). Novel genetic variants in the chromosome 5p15.33 region associate with lung cancer risk. *Carcinogenesis*, *32*(10), 1493-1499. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr136>
- Pandiyan, K., You, J. S., Yang, X., Dai, C., Zhou, X. J., Baylin, S. B., ... Liang, G. (2013). Functional DNA demethylation is accompanied by chromatin accessibility. *Nucleic Acids Research*, *41*(7), 3973-3985. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt077>
- Parks, J. W., & Stone, M. D. (2017). Single-Molecule Studies of Telomeres and Telomerase. *Annual Review of Biophysics*, *46*, 357-377. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-011256>
- Pastor, W. A., Pape, U. J., Huang, Y., Henderson, H. R., Lister, R., Ko, M., ... Rao, A. (2011). Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature*, *473*(7347), 394-397. <https://doi.org/10.1038/nature10102>
- Patil, V. S., Zhou, R., & Rana, T. M. (2014). Gene regulation by non-coding RNAs. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *49*(1), 16-32. <https://doi.org/10.3109/10409238.2013.844092>
- Pendino, F., Flexor, M., Delhommeau, F., Buet, D., Lanotte, M., & Segal-Bendirdjian, E. (2001). Retinoids down-regulate telomerase and telomere length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(12), 6662-6667. <https://doi.org/10.1073/pnas.111464998>
- Pendino, F., Sahraoui, T., Lanotte, M., & Ségal-Bendirdjian, E. (2002). A novel mechanism of retinoic acid resistance in acute promyelocytic leukemia cells through a defective pathway in telomerase regulation. *Leukemia*, *16*(5), 826-832. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402470>
- Pendino, F., Tarkanyi, I., Dudognon, C., Hillion, J., Lanotte, M., Aradi, J., & Ségal-Bendirdjian, E. (2006). Telomeres and telomerase: Pharmacological targets for new anticancer strategies? *Current Cancer Drug Targets*, *6*(2), 147-180.
- Pendino, Frédéric, Dudognon, C., Delhommeau, F., Sahraoui, T., Flexor, M., Bennaceur-Griscelli, A., ... Ségal-Bendirdjian, E. (2003). Retinoic acid receptor alpha and retinoid-X receptor-specific agonists synergistically target telomerase expression and induce tumor cell death. *Oncogene*, *22*(57), 9142-9150. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207093>
- Perera, A., Eisen, D., Wagner, M., Laube, S. K., Künzel, A. F., Koch, S., ... Michalakis, S. (2015). TET3 is recruited by REST for context-specific hydroxymethylation and

- induction of gene expression. *Cell Reports*, 11(2), 283-294. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.020>
- Petrie, K., Zelent, A., & Waxman, S. (2009). Differentiation therapy of acute myeloid leukemia: past, present and future. *Current Opinion in Hematology*, 16(2), 84-91. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283257aee>
- Podlevsky, J. D., & Chen, J. J.-L. (2012). It all comes together at the ends: telomerase structure, function, and biogenesis. *Mutation Research*, 730(1-2), 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.11.002>
- Powell, B. L. (2013). Acute promyelocytic leukemia: progress far and wide. *Blood*, 121(11), 1925-1926. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-12-470757>
- Purton, L. E., Dworkin, S., Olsen, G. H., Walkley, C. R., Fabb, S. A., Collins, S. J., & Chambon, P. (2006). RARgamma is critical for maintaining a balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(5), 1283-1293. <https://doi.org/10.1084/jem.20052105>
- Ramlee, M. K., Wang, J., Toh, W. X., & Li, S. (2016). Transcription Regulation of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Gene. *Genes*, 7(8). <https://doi.org/10.3390/genes7080050>
- Ramsahoye, B. H., Biniszkiwicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A. P., & Jaenisch, R. (2000). Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5237-5242.
- Renaud, S., Loukinov, D., Abdullaev, Z., Guilleret, I., Bosman, F. T., Lobanenkova, V., & Benhattar, J. (2007). Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene. *Nucleic Acids Research*, 35(4), 1245-1256. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1125>
- Renaud, Stéphanie, Bosman, F. T., & Benhattar, J. (2003). Implication of the exon region in the regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(1), 47-54.
- Renaud, Stéphanie, Loukinov, D., Bosman, F. T., Lobanenkova, V., & Benhattar, J. (2005). CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription. *Nucleic Acids Research*, 33(21), 6850-6860. <https://doi.org/10.1093/nar/gki989>
- Rhie, S. K., Schreiner, S., & Farnham, P. J. (2018). Defining Regulatory Elements in the Human Genome Using Nucleosome Occupancy and Methylome Sequencing (NOMe-Seq). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1766, 209-229. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7768-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7768-0_12)
- Richards, E. J., & Elgin, S. C. R. (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, 108(4), 489-500.
- Robert Finestra, T., & Gribnau, J. (2017). X chromosome inactivation: silencing, topology and reactivation. *Current Opinion in Cell Biology*, 46, 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.01.007>
- Robin, J. D., Ludlow, A. T., Batten, K., Magdinier, F., Stadler, G., Wagner, K. R., ... Wright, W. E. (2014). Telomere position effect: regulation of gene expression with progressive telomere shortening over long distances. *Genes & Development*, 28(22), 2464-2476. <https://doi.org/10.1101/gad.251041.114>

- Romano, G., Veneziano, D., Acunzo, M., & Croce, C. M. (2017). Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis*, *38*(5), 485-491. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx026>
- Ropio, J., Merlio, J.-P., Soares, P., & Chevret, E. (2016). Telomerase Activation in Hematological Malignancies. *Genes*, *7*(9). <https://doi.org/10.3390/genes7090061>
- Roussel, M. J., & Lanotte, M. (2001). Maturation sensitive and resistant t(15;17) NB4 cell lines as tools for APL physiopathology: nomenclature of cells and repertory of their known genetic alterations and phenotypes. *Oncogene*, *20*(49), 7287-7291. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204863>
- Ruchaud, S., Duprez, E., Gendron, M. C., Houge, G., Genieser, H. G., Jastorff, B., ... Lanotte, M. (1994). Two distinctly regulated events, priming and triggering, during retinoid-induced maturation and resistance of NB4 promyelocytic leukemia cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(18), 8428-8432.
- Ryan, M. M. (2018). Acute Promyelocytic Leukemia: A Summary. *Journal of the Advanced Practitioner in Oncology*, *9*(2), 178-187.
- Saha, D., Singh, A., Hussain, T., Srivastava, V., Sengupta, S., Kar, A., ... Chowdhury, S. (2017). Epigenetic suppression of human telomerase (hTERT) is mediated by the metastasis suppressor NME2 in a G-quadruplex-dependent fashion. *The Journal of Biological Chemistry*, *292*(37), 15205-15215. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.792077>
- Sarda, S., & Hannenhalli, S. (2018). Orphan CpG islands as alternative promoters. *Transcription*, *9*(3), 171-176. <https://doi.org/10.1080/21541264.2017.1373209>
- Sawicka, A., & Seiser, C. (2012). Histone H3 phosphorylation - a versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie*, *94*(11), 2193-2201. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.04.018>
- Sayed, M. E., Yuan, L., Robin, J. D., Tedone, E., Batten, K., Dahlson, N., ... Ludlow, A. T. (2019). NOVA1 directs PTBP1 to hTERT pre-mRNA and promotes telomerase activity in cancer cells. *Oncogene*, *38*(16), 2937-2952. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0639-8>
- Schmidt, J. C., & Cech, T. R. (2015). Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes & Development*, *29*(11), 1095-1105. <https://doi.org/10.1101/gad.263863.115>
- Schoeftner, S., & Blasco, M. A. (2010). Chromatin regulation and non-coding RNAs at mammalian telomeres. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *21*(2), 186-193. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.09.015>
- Schrader, A., Gross, T., Thalhammer, V., & Längst, G. (2015). Characterization of Dnmt1 Binding and DNA Methylation on Nucleosomes and Nucleosomal Arrays. *PLoS One*, *10*(10), e0140076. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140076>
- Schübeler, D. (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nature*, *517*(7534), 321-326. <https://doi.org/10.1038/nature14192>
- Schuebel, K., Gitik, M., Domschke, K., & Goldman, D. (2016). Making Sense of Epigenetics. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, *19*(11). <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyw058>

- Schug, T. T., Berry, D. C., Shaw, N. S., Travis, S. N., & Noy, N. (2007). Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell*, *129*(4), 723-733. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.050>
- Schwartzman, O., & Tanay, A. (2015). Single-cell epigenomics: techniques and emerging applications. *Nature Reviews. Genetics*, *16*(12), 716-726. <https://doi.org/10.1038/nrg3980>
- Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(4), a018713. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>
- Shachar, S., & Misteli, T. (2017). Causes and consequences of nuclear gene positioning. *Journal of Cell Science*, *130*(9), 1501-1508. <https://doi.org/10.1242/jcs.199786>
- Sharifi-Zarchi, A., Gerovska, D., Adachi, K., Totonchi, M., Pezeshk, H., Taft, R. J., ... Araúzo-Bravo, M. J. (2017). DNA methylation regulates discrimination of enhancers from promoters through a H3K4me1-H3K4me3 seesaw mechanism. *BMC Genomics*, *18*(1), 964. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4353-7>
- Shay, J. W. (2016). Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. *Cancer Discovery*, *6*(6), 584-593. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0062>
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2019). Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nature Reviews. Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0099-1>
- Shiio, Y., & Eisenman, R. N. (2003). Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(23), 13225-13230. <https://doi.org/10.1073/pnas.1735528100>
- Shin, K.-H., Kang, M. K., Dicterow, E., & Park, N.-H. (2003). Hypermethylation of the hTERT promoter inhibits the expression of telomerase activity in normal oral fibroblasts and senescent normal oral keratinocytes. *British Journal of Cancer*, *89*(8), 1473-1478. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601291>
- Shippen-Lentz, D., & Blackburn, E. H. (1990). Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science (New York, N.Y.)*, *247*(4942), 546-552.
- Sims, R. J., Nishioka, K., & Reinberg, D. (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends in Genetics: TIG*, *19*(11), 629-639. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.09.007>
- Soares, L. M., He, P. C., Chun, Y., Suh, H., Kim, T., & Buratowski, S. (2017). Determinants of Histone H3K4 Methylation Patterns. *Molecular Cell*, *68*(4), 773-785.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.013>
- Soudet, J., Jolivet, P., & Teixeira, M. T. (2014). Elucidation of the DNA end-replication problem in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, *53*(6), 954-964. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.02.030>
- Sprouse, A. A., Steding, C. E., & Herbert, B.-S. (2012). Pharmaceutical regulation of telomerase and its clinical potential. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *16*(1), 1-7. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01460.x>
- Spruijt, C. G., Gnerlich, F., Smits, A. H., Pfaffeneder, T., Jansen, P. W. T. C., Bauer, C., ... Vermeulen, M. (2013). Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. *Cell*, *152*(5), 1146-1159. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.004>

- Stern, J. L., Paucek, R. D., Huang, F. W., Ghandi, M., Nwumeh, R., Costello, J. C., & Cech, T. R. (2017). Allele-Specific DNA Methylation and Its Interplay with Repressive Histone Marks at Promoter-Mutant TERT Genes. *Cell Reports*, *21*(13), 3700-3707. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.001>
- Stern, J. L., Theodorescu, D., Vogelstein, B., Papadopoulos, N., & Cech, T. R. (2015). Mutation of the TERT promoter, switch to active chromatin, and monoallelic TERT expression in multiple cancers. *Genes & Development*, *29*(21), 2219-2224. <https://doi.org/10.1101/gad.269498.115>
- Stewart, S. A., Hahn, W. C., O'Connor, B. F., Banner, E. N., Lundberg, A. S., Modha, P., ... Weinberg, R. A. (2002). Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(20), 12606-12611. <https://doi.org/10.1073/pnas.182407599>
- Strahl, C., & Blackburn, E. H. (1996). Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(1), 53-65.
- Stricker, S. H., Köferle, A., & Beck, S. (2017). From profiles to function in epigenomics. *Nature Reviews. Genetics*, *18*(1), 51-66. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.138>
- Stroud, H., Feng, S., Morey Kinney, S., Pradhan, S., & Jacobsen, S. E. (2011). 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome Biology*, *12*(6), R54. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r54>
- Struhl, K., & Segal, E. (2013). Determinants of nucleosome positioning. *Nature Structural & Molecular Biology*, *20*(3), 267-273. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2506>
- Suetake, I., Shinozaki, F., Miyagawa, J., Takeshima, H., & Tajima, S. (2004). DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(26), 27816-27823. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400181200>
- Szutorisz, H., Lingner, J., Cuthbert, A. P., Trott, D. A., Newbold, R. F., & Nabholz, M. (2003). A chromosome 3-encoded repressor of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene controls the state of hTERT chromatin. *Cancer Research*, *63*(3), 689-695.
- Taberlay, P. C., Kelly, T. K., Liu, C.-C., You, J. S., De Carvalho, D. D., Miranda, T. B., ... Jones, P. A. (2011). Polycomb-repressed genes have permissive enhancers that initiate reprogramming. *Cell*, *147*(6), 1283-1294. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.040>
- Taberlay, P. C., Statham, A. L., Kelly, T. K., Clark, S. J., & Jones, P. A. (2014). Reconfiguration of nucleosome-depleted regions at distal regulatory elements accompanies DNA methylation of enhancers and insulators in cancer. *Genome Research*, *24*(9), 1421-1432. <https://doi.org/10.1101/gr.163485.113>
- Takakura, M., Kyo, S., Sowa, Y., Wang, Z., Yatabe, N., Maida, Y., ... Inoue, M. (2001). Telomerase activation by histone deacetylase inhibitor in normal cells. *Nucleic Acids Research*, *29*(14), 3006-3011.
- Tallman, M. S. (2014). Acute promyelocytic leukemia. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, *27*(1), 1. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2014.04.010>

- Tang, M. K., Liang, Y. J., Chan, J. Y. H., Wong, S. W., Chen, E., Yao, Y., ... Lee, K. K. H. (2013). Promyelocytic leukemia (PML) protein plays important roles in regulating cell adhesion, morphology, proliferation and migration. *PloS One*, 8(3), e59477. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059477>
- Tarkanyi, I., Dudognon, C., Hillion, J., Pendino, F., Lanotte, M., Aradi, J., & Ségal-Bendirdjian, E. (2005). Retinoid/arsenic combination therapy of promyelocytic leukemia: induction of telomerase-dependent cell death. *Leukemia*, 19(10), 1806-1811. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403923>
- Tomita, A., Kiyoi, H., & Naoe, T. (2013). Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in acute promyelocytic leukemia. *International Journal of Hematology*, 97(6), 717-725. <https://doi.org/10.1007/s12185-013-1354-4>
- Tomita, K. (2018). How long does telomerase extend telomeres? Regulation of telomerase release and telomere length homeostasis. *Current Genetics*, 64(6), 1177-1181. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0836-6>
- Trisciuglio, D., Di Martile, M., & Del Bufalo, D. (2018). Emerging Role of Histone Acetyltransferase in Stem Cells and Cancer. *Stem Cells International*, 2018, 8908751. <https://doi.org/10.1155/2018/8908751>
- Tsai, M.-C., Manor, O., Wan, Y., Mosammamparast, N., Wang, J. K., Lan, F., ... Chang, H. Y. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5992), 689-693. <https://doi.org/10.1126/science.1192002>
- Turner, B. M. (2007). Defining an epigenetic code. *Nature Cell Biology*, 9(1), 2-6. <https://doi.org/10.1038/ncb0107-2>
- Tyagi, M., Imam, N., Verma, K., & Patel, A. K. (2016). Chromatin remodelers: We are the drivers!! *Nucleus (Austin, Tex.)*, 7(4), 388-404. <https://doi.org/10.1080/19491034.2016.1211217>
- Vaissière, T., Sawan, C., & Herceg, Z. (2008). Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research*, 659(1-2), 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.02.004>
- Vakoc, C. R., Sachdeva, M. M., Wang, H., & Blobel, G. A. (2006). Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Molecular and Cellular Biology*, 26(24), 9185-9195. <https://doi.org/10.1128/MCB.01529-06>
- van der Wijst, M. G. P., Venkiteswaran, M., Chen, H., Xu, G.-L., Plösch, T., & Rots, M. G. (2015). Local chromatin microenvironment determines DNMT activity: from DNA methyltransferase to DNA demethylase or DNA dehydroxymethylase. *Epigenetics*, 10(8), 671-676. <https://doi.org/10.1080/15592294.2015.1062204>
- Venteicher, A. S., Meng, Z., Mason, P. J., Veenstra, T. D., & Artandi, S. E. (2008). Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell*, 132(6), 945-957. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.019>
- Vera, E., Canela, A., Fraga, M. F., Esteller, M., & Blasco, M. A. (2008). Epigenetic regulation of telomeres in human cancer. *Oncogene*, 27(54), 6817-6833. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.289>

- Vinagre, J., Almeida, A., Pópulo, H., Batista, R., Lyra, J., Pinto, V., ... Soares, P. (2013). Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nature Communications*, 4, 2185. <https://doi.org/10.1038/ncomms3185>
- Völkel, P., & Angrand, P.-O. (2007). The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie*, 89(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.009>
- Vu, L. P., Luciani, L., & Nimer, S. D. (2013). Histone-modifying enzymes: their role in the pathogenesis of acute leukemia and their therapeutic potential. *International Journal of Hematology*, 97(2), 198-209. <https://doi.org/10.1007/s12185-012-1247-y>
- Wagner, M., Steinbacher, J., Kraus, T. F. J., Michalakis, S., Hackner, B., Pfaffeneder, T., ... Carell, T. (2015). Age-dependent levels of 5-methyl-, 5-hydroxymethyl-, and 5-formylcytosine in human and mouse brain tissues. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 54(42), 12511-12514. <https://doi.org/10.1002/anie.201502722>
- Wang, J., Lawry, S. T., Cohen, A. L., & Jia, S. (2014). Chromosome boundary elements and regulation of heterochromatin spreading. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 71(24), 4841-4852. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1725-x>
- Wang, S., Hu, C., & Zhu, J. (2010). Distinct and temporal roles of nucleosomal remodeling and histone deacetylation in the repression of the hTERT gene. *Molecular Biology of the Cell*, 21(5), 821-832. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-06-0456>
- Wang, S., & Zhu, J. (2004). The hTERT gene is embedded in a nuclease-resistant chromatin domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(53), 55401-55410. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411352200>
- Wang, X.-T., Dong, P.-F., Zhang, H.-Y., & Peng, C. (2015). Structural heterogeneity and functional diversity of topologically associating domains in mammalian genomes. *Nucleic Acids Research*, 43(15), 7237-7246. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv684>
- Wang, Y., & Feigon, J. (2017). Structural biology of telomerase and its interaction at telomeres. *Current Opinion in Structural Biology*, 47, 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2017.06.010>
- Wang, Z., Schones, D. E., & Zhao, K. (2009). Characterization of human epigenomes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 19(2), 127-134. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.02.001>
- Wang, Z.-Y., & Chen, Z. (2008). Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*, 111(5), 2505-2515. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-102798>
- Watts, J. M., & Tallman, M. S. (2014). Acute promyelocytic leukemia: what is the new standard of care? *Blood Reviews*, 28(5), 205-212. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2014.07.001>
- Wei, S., Kozono, S., Kats, L., Nechama, M., Li, W., Guarnerio, J., ... Lu, K. P. (2015). Active Pin1 is a key target of all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia and breast cancer. *Nature Medicine*, 21(5), 457-466. <https://doi.org/10.1038/nm.3839>
- Wellinger, R. J. (2014). In the end, what's the problem? *Molecular Cell*, 53(6), 855-856. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.008>
- Wen, L., & Tang, F. (2018). Single cell epigenome sequencing technologies. *Molecular Aspects of Medicine*, 59, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.09.002>

- Wesche, J., Kühn, S., Kessler, B. M., Salton, M., & Wolf, A. (2017). Protein arginine methylation: a prominent modification and its demethylation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 74(18), 3305-3315. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2515-z>
- Wick, M., Zubov, D., & Hagen, G. (1999). Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene*, 232(1), 97-106.
- Wiles, E. T., & Selker, E. U. (2017). H3K27 methylation: a promiscuous repressive chromatin mark. *Current Opinion in Genetics & Development*, 43, 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2016.11.001>
- Wojtyla, A., Gladych, M., & Rubis, B. (2011). Human telomerase activity regulation. *Molecular Biology Reports*, 38(5), 3339-3349. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0439-x>
- Wong, M. S., Chen, L., Foster, C., Kainthla, R., Shay, J. W., & Wright, W. E. (2013). Regulation of telomerase alternative splicing: a target for chemotherapy. *Cell Reports*, 3(4), 1028-1035. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.03.011>
- Wong, M. S., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2014). Alternative splicing regulation of telomerase: a new paradigm? *Trends in Genetics: TIG*, 30(10), 430-438. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.07.006>
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., & Diver, W. P. (1987). The majority of methylated deoxycytidines in human DNA are not in the CpG dinucleotide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 145(2), 888-894.
- Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W., & Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental Genetics*, 18(2), 173-179. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1996\)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3)
- Wu, X., & Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nature Reviews. Genetics*, 18(9), 517-534. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>
- Wyatt, H. D. M., West, S. C., & Beattie, T. L. (2010). InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Research*, 38(17), 5609-5622. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq370>
- Xu, D., Popov, N., Hou, M., Wang, Q., Björkholm, M., Gruber, A., ... Henriksson, M. (2001). Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 3826-3831. <https://doi.org/10.1073/pnas.071043198>
- Yang, X., Noshmehr, H., Han, H., Andreu-Vieyra, C., Liang, G., & Jones, P. A. (2012). Gene reactivation by 5-aza-2'-deoxycytidine-induced demethylation requires SRCAP-mediated H2A.Z insertion to establish nucleosome depleted regions. *PLoS Genetics*, 8(3), e1002604. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002604>
- Yen, C.-Y., Huang, H.-W., Shu, C.-W., Hou, M.-F., Yuan, S.-S. F., Wang, H.-R., ... Chang, H.-W. (2016). DNA methylation, histone acetylation and methylation of epigenetic modifications as a therapeutic approach for cancers. *Cancer Letters*, 373(2), 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.036>

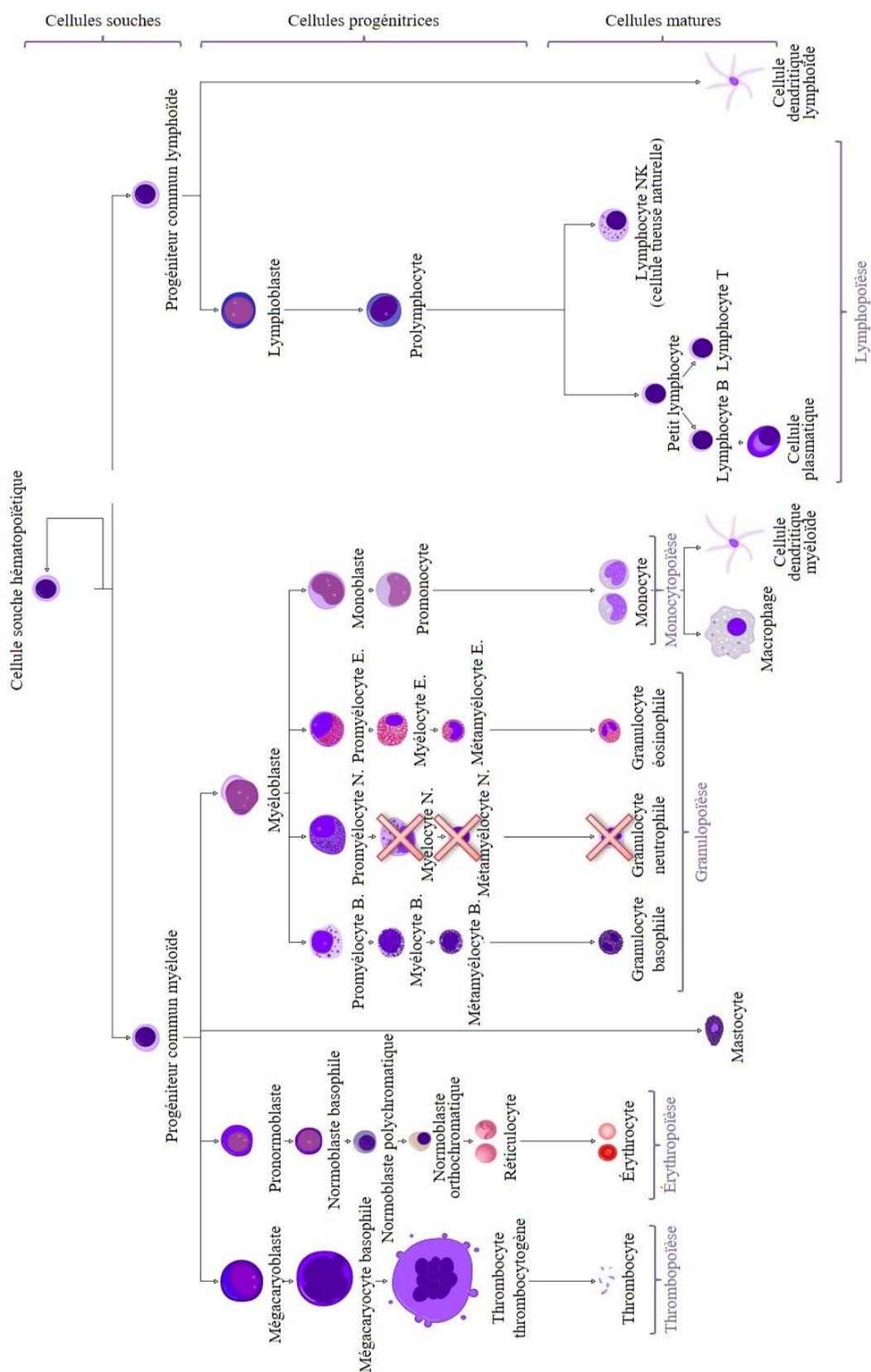
- Yin, Y., Morgunova, E., Jolma, A., Kaasinen, E., Sahu, B., Khund-Sayeed, S., ... Taipale, J. (2017). Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors. *Science (New York, N.Y.)*, 356(6337). <https://doi.org/10.1126/science.aaj2239>
- Yoon, S., & Eom, G. H. (2016). HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases. *Chonnam Medical Journal*, 52(1), 1-11. <https://doi.org/10.4068/cmj.2016.52.1.1>
- You, J. S., Kelly, T. K., De Carvalho, D. D., Taberlay, P. C., Liang, G., & Jones, P. A. (2011). OCT4 establishes and maintains nucleosome-depleted regions that provide additional layers of epigenetic regulation of its target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(35), 14497-14502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111309108>
- Yu, J., Guo, X.-L., Bai, Y.-Y., Yang, J.-J., Zheng, X.-Q., Ruan, J.-C., & Chen, Z.-G. (2018). Genome-wide profiling of lncRNA expression patterns in patients with acute promyelocytic leukemia with differentiation therapy. *Oncology Reports*, 40(3), 1601-1613. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6521>
- Zaratiegui, M., Irvine, D. V., & Martienssen, R. A. (2007). Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell*, 128(4), 763-776. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.016>
- Zemach, A., McDaniel, I. E., Silva, P., & Zilberman, D. (2010). Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5980), 916-919. <https://doi.org/10.1126/science.1186366>
- Zeng, C., Xu, Y., Xu, L., Yu, X., Cheng, J., Yang, L., ... Li, Y. (2014). Inhibition of long non-coding RNA NEAT1 impairs myeloid differentiation in acute promyelocytic leukemia cells. *BMC Cancer*, 14, 693. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-693>
- Zeng, C., Yu, X., Lai, J., Yang, L., Chen, S., & Li, Y. (2015). Overexpression of the long non-coding RNA PVT1 is correlated with leukemic cell proliferation in acute promyelocytic leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*, 8, 126. <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0223-4>
- Zentner, G. E., & Henikoff, S. (2014). High-resolution digital profiling of the epigenome. *Nature Reviews. Genetics*, 15(12), 814-827. <https://doi.org/10.1038/nrg3798>
- Zhang, A., Zheng, C., Lindvall, C., Hou, M., Ekedahl, J., Lewensohn, R., ... Xu, D. (2000). Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors. *Cancer Research*, 60(22), 6230-6235.
- Zhang, F., Cheng, D., Wang, S., & Zhu, J. (2016). Human Specific Regulation of the Telomerase Reverse Transcriptase Gene. *Genes*, 7(7). <https://doi.org/10.3390/genes7070030>
- Zhang, K., & Dent, S. Y. R. (2005). Histone modifying enzymes and cancer: going beyond histones. *Journal of Cellular Biochemistry*, 96(6), 1137-1148. <https://doi.org/10.1002/jcb.20615>
- Zhang, M., Wang, Z., Obazee, O., Jia, J., Childs, E. J., Hoskins, J., ... Amundadottir, L. T. (2016). Three new pancreatic cancer susceptibility signals identified on chromosomes 1q32.1, 5p15.33 and 8q24.21. *Oncotarget*, 7(41), 66328-66343. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11041>

- Zhang, W., & Xu, J. (2017). DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis. *Biomarker Research*, 5, 1. <https://doi.org/10.1186/s40364-017-0081-z>
- Zhang, Yang, Zhang, H., Zhai, Y., Wang, Z., Ma, F., Wang, H., ... Zhou, G. (2011). A functional tandem-repeats polymorphism in the downstream of TERT is associated with the risk of nasopharyngeal carcinoma in Chinese population. *BMC Medicine*, 9, 106. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-106>
- Zhang, Yao, Sun, M., Shi, W., Yang, Q., Chen, C., Wang, Z., & Zhou, X. (2015). Arsenic trioxide suppresses transcription of hTERT through down-regulation of multiple transcription factors in HL-60 leukemia cells. *Toxicology Letters*, 232(2), 481-489. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.11.028>
- Zhang, Yue, Zhao, M., Shen, L., Ren, Y., Su, L., Li, X., ... Zhou, B. (2014). Genetic polymorphisms of TERT and CLPTM1L and risk of lung cancer: a case-control study in northeast Chinese male population. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 31(7), 18. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0018-4>
- Zhang, Z.-X., Wang, Y., Tao, Z.-Z., Chen, S.-M., Xiao, B.-K., & Zhou, T. (2014). Subtelomeric demethylation deregulated hTERT expression, telomerase activity, and telomere length in four nasopharyngeal carcinoma cell lines. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 29(7), 289-294. <https://doi.org/10.1089/cbr.2013.1581>
- Zhao, X., Tian, X., Kajigaya, S., Cantilena, C. R., Strickland, S., Savani, B. N., ... Ito, S. (2016). Epigenetic landscape of the TERT promoter: a potential biomarker for high risk AML/MDS. *British Journal of Haematology*, 175(3), 427-439. <https://doi.org/10.1111/bjh.14244>
- Zhao, Y., & Garcia, B. A. (2015). Comprehensive Catalog of Currently Documented Histone Modifications. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9), a025064. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025064>
- Zhong, X., Zhang, D., Xiong, M., & Zhang, L. (2016). Noncoding RNA for Cancer Gene Therapy. *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer*, 209, 51-60. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-42934-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-42934-2_4)
- Zhou, J., Ding, D., Wang, M., & Cong, Y.-S. (2014). Telomerase reverse transcriptase in the regulation of gene expression. *BMB Reports*, 47(1), 8-14.
- Zhou, L., Fu, G., Wei, J., Shi, J., Pan, W., Ren, Y., ... Yang, M. (2016). The identification of two regulatory ESCC susceptibility genetic variants in the TERT-CLPTM1L loci. *Oncotarget*, 7(5), 5495-5506. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6747>
- Zhu, H.-H., Qin, Y.-Z., & Huang, X.-J. (2014). Resistance to arsenic therapy in acute promyelocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 370(19), 1864-1866. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1316382>
- Zhu, J., Zhao, Y., & Wang, S. (2010). Chromatin and epigenetic regulation of the telomerase reverse transcriptase gene. *Protein & Cell*, 1(1), 22-32. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0014-1>
- Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., & Henikoff, S. (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature*, 456(7218), 125-129. <https://doi.org/10.1038/nature07324>

- Zinn, R. L., Pruitt, K., Eguchi, S., Baylin, S. B., & Herman, J. G. (2007). hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site. *Cancer Research*, *67*(1), 194-201. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3396>
- Zinner, R., Albiez, H., Walter, J., Peters, A. H. F. M., Cremer, T., & Cremer, M. (2006). Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones. *Histochemistry and Cell Biology*, *125*(1-2), 3-19. <https://doi.org/10.1007/s00418-005-0049-1>

# ANNEXES

## Annexe 1 : Schéma de l'hématopoïèse (adaptation du travail de A. Rad<sup>cc</sup>)



L'hématopoïèse englobe les différentes voies de différenciation des cellules souches hématopoïétiques en cellules du sang. Elle se divise en deux grandes voies : celle des cellules lymphoïdes et celle des cellules myéloïdes. Les promyélocytes neutrophiles (N), dont la maturation est bloquée lors de la leucémie aiguë promyélocytaire, font partie de la voie myéloïde. Le blocage est figuré par des croix rouges. B. : basophile, N. : neutrophile, E. : éosinophile.

## Annexe 2 : Nomenclature des acides aminés

Acide aminé	Nomenclature	
	Trois lettres	Une lettre
Nom		
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide aspartique	Asp	D
Acide glutamique	Glu	E
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

### Annexe 3 : Amorces utilisées pour les différentes techniques

#### RT-qPCR

Nom	Séquence	Température d'amorçage
hTERT	S : 5'-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3'	58 °C
	AS : 5'-CTCCCACGACGTAGTCCATG-3'	
GAPDH	S : 5'-CACCCATGGCAAATTCATGGC-3'	58 °C
	AS : 5'-GCATTGCTGATGATCTTGAGGCT-3'	

#### NOMe-seq

Nom	Séquence	Température d'amorçage
hTERT – BS1-BS3	S : 5'-GGGYTTGTGTTAAGGAGYTTAAGT-3' <sup>(1)</sup>	58 °C
	AS : 5'-CCARCCCTAAARCCCAA-3' <sup>(1)</sup>	
hTERT – - 5,0 kb	S : 5'-CCTGGAGAGAGGAGTCTGAG-3'	51 °C
	AS : 5'-TATTCATCTTCACCCCAAGGATTGAATGA-3'	

(1) Y = C ou T, R = A ou G

ChIP

Nom	Séquence	Température d'amorçage
hTERT-up5,0kb	S : 5'-CCAAAGGCGTAAAACAGGAA-3' AS : 5'-CCTCGTGTACTTTCCCTTGC-3'	60 °C
hTERT-up2,5kb	S : 5'-AAACTTCCCTGGGCTCAAGT-3' AS : 5'-CGGTGTATCCCCAGTCTACG-3'	60 °C
hTERT-up1,0kb	S : 5'-GTTTCTCGCCCCTTAGATCC-3' AS : 5'-GCAGGACAGCTGAGGACTTC-3'	60 °C
hTERT-up0,8kb	S : 5'-CTCCATTTCCCACCCTTTCT-3' AS : 5'-ACTTGGGCTCCTTGACACAG-3'	60 °C
hTERT-up0,2kb	S : 5'-CAGGCCGGGCTCCCAGTGGA-3' AS : 5'-GGAAGGTGAAGGGGCAGGAC-3'	65 °C
hTERT-down1,3kb	S : 5'-TGCCCCAGCGCTACTGGCAAA-3' AS : 5'-TCGCAGCGGGCAGTGCGTCTTGA-3'	67 °C
hTERT-down6,5kb	S : 5'-TGGCAACGCTTGTCACCTTA-3' AS : 5'-ACGTCAATCCATGTGAGGGG-3'	60 °C
hTERT-down12,5kb	S : 5'-CGTCTTTCTTTTATGTCACGGAG-3' AS : 5'-AATGCTTTGCAACTTGCTCCA-3'	60 °C
hTERT-down41,7kb	S : 5'-CCATCCCCAGATTCGCCATT-3' AS : 5'-CTGTGTACAGGGCACACCTT-3'	60 °C

---

## Telomeres and Telomerase in Neuroblastoma

---

Joëlle El Hajj, Delphine Garsuault, Claire Bouyer,  
Eric Nguyen, George Hilal and  
Evelyne Ségal-Bendirdjian

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69567>

---

### Abstract

Telomeres are nucleoprotein structures located at the ends of linear chromosomes. In most human adult normal somatic cells, telomeres shorten after each cellular division. This shortening ultimately leads to senescence and/or apoptosis. By contrast, in most cancer cells, telomerase activation compensates this loss and confers to these cells their infinite cell proliferation potential. Neuroblastoma (NBL) is a malignant tumor of the peripheral sympathetic nervous system and the most frequent extracranial solid tumor of childhood. NBLs are remarkably heterogeneous both at the levels of biology, genetic and clinical courses. Indeed, some of NBLs can regress spontaneously or after a mild treatment, while others are in the high-risk category with poor prognosis. The molecular bases underlying this heterogeneity are poorly understood. MYCN (V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Neuroblastoma-derived Homolog) amplification, recognized as strongly associated with unfavorable patient outcome, is found in only 40% of the high-risk disease, indicating the involvement of other mechanisms. Recent observations suggest that telomerase expression and telomere dysfunctions may be one critical step in NBL development. This review provides recent insights on telomeres/telomerase regulation in NBL. Because of their involvement in the tumor cell biology, telomere and telomerase are currently at the core of new drug development.

**Keywords:** telomerase, telomeres, regulation, therapies, neuroblastoma

---

### 1. Introduction

Cancer development is a multistep process requiring genetic and epigenetic events leading to the deregulation of the expression of key genes. Among these genes, telomerase, by its

action on telomere maintenance, plays a major contribution in carcinogenesis and drug resistance. This enzyme is activated in almost 90% of cancers, including neuroblastoma (NBL).

Neuroblastoma is a malignant tumor of the peripheral sympathetic nervous system and the most common extracranial solid tumor in childhood [1, 2]. NBL is remarkably heterogeneous and displays a wide spectrum of differentiation stages from benign ganglioneuroma and well-differentiated tumors to undifferentiated malignant NBL. NBL is also a heterogeneous disease in terms of outcome and response to treatments: from spontaneous regression to resistance to all known treatments. In about 60% of the cases, NBL is diagnosed as a disseminated high-risk disease (stage 4), and most are diagnosed after 18 months of age. Genomic amplification of *MYCN* (V-Myc avian myelocytomatosis viral oncogene neuroblastoma-derived homolog) has been strongly associated with unfavorable patient outcome in approximately 20% of primary neuroblastoma tumors and approximately 40% of high-risk NBL. This alteration has thus been established as a robust marker for the definition of high-risk NBL. However, that *MYCN* amplification occurs only in 40% of high-risk NBL indicates that other genetic and/or epigenetic alterations play an important role in this disease. Array comparative genomic hybridizations have been widely employed to discover genome abnormalities and evaluate patient's risk. NBL displays several numerical and structural copy number variations such as the loss of 1p, 3p, 9p, 11q, and 14q, and the gain of 1q, 2p, and 17q, which identify high-risk subsets of NBL [3, 4]. That aggressive stage 4 neuroblastoma expressed high levels of telomerase activity, whereas favorable tumors had no or little telomerase expression and activity [5, 6], suggest an important role of this enzyme in the biology of neuroblastoma and its response to chemotherapy. NBL has a very low mutation frequency. The most two mutated genes are *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) coding a tyrosine kinase, altered in about 7–8% of all primary tumors and 50% of familial NBL cases [7, 8], and *ATRX* (alpha thalassemia/mental retardation syndrome, X-linked) in about 10% of NBL and generally found in older patients.

Recently, the next-generation sequencing has shown that high-risk NBLs are characterized by defects that in common lead to the activation of telomere maintenance pathways supporting the idea that targeting these pathways will benefit to the patients [9, 10].

Many excellent recent reviews [11, 12] already exist on telomeres and telomerase in many aspects (structure and functions, regulation, and epigenetic control). This paper will therefore briefly review the recent knowledge on this topic, then, it will focus on the mechanisms of telomerase reactivation and telomere length maintenance in NBL, and discuss how these regulatory mechanisms can be targeted or “manipulated” for therapeutic purposes to modify cell fate and anticancer drug response in NBL.

## 2. Telomeres and telomerase

### 2.1. Telomeres

Every normal human somatic cell has a molecular clock for dividing, a process discovered by Leonard Hayflick, half a century ago, who observed that diploid cells in culture can divide

only a limited number of times before stopping in a state known as the cellular senescence or the “Hayflick limit” [13]. In eukaryotic organisms, conventional DNA polymerases alone cannot fully replicate the ends of linear chromosomes, called telomeres. Therefore, telomere ends are progressively shortened after each cellular division [14, 15]. This leads to genomic instability and senescence or apoptosis.

Telomeres are specialized nucleoprotein structures made of 10–15 kb of short non-protein-coding repetitive 5′-TTAGGG-3′ DNA sequences. Telomeric DNA is mainly double-stranded, terminating in a single-stranded 3′ G-rich overhang of 150–200 nucleotides (nt) [16, 17]. These double-stranded repeats have one guanosine-rich strand (G-strand) copied by the lagging-strand replication, and one cytosine-rich strand (C-strand) synthesized by leading-strand replication. The telomeric DNAs are bound by shelterin protein complexes consisting of telomeric repeat factors 1 and 2 (TRF1 and TRF2), repressor/activator protein 1 (RAP1), TRF1- and TRF2-interacting nuclear protein 2 (TIN2), tripeptidyl-peptidase 1 (TPP1), and protection of telomeres 1 (POT1) [18, 19]. TRF1 and TRF2 bind to the double-stranded telomere DNA repeats, whereas POT1 binds to the single-stranded G-rich overhang. The three remaining proteins of the shelterin complex act as adaptors to mediate the interactions between the complex constituents: POT1 interacts with TPP1, a ternary complex of other proteins (TINT1/PTOP/PIP1), which interacts in turn with TIN2 that plays a key role in stabilizing the shelterin complex *via* its interaction with TPP1, TRF1, and TRF2. TPP1 also plays a major role in controlling the recruitment of the telomerase to the telomeres. RAP1 binds to TRF2 and acts as a mandatory element to the formation of the t-loop and the protection of the telomeres from the non-homologous end-joining (NHEJ) process. This process is dependent on the ataxia telangiectasia-mutated (ATM) kinase, the ataxia telangiectasia, and Rad3 (ATR) kinase, involved in the repair of the double-stranded and the single-stranded DNA breaks, respectively.

Due to the tandem organization of the G-rich telomeric DNA, the telomeres can form specialized four-stranded helical structures that involve Hoogsteen-type base pairing between four guanines, named G-quadruplex (or G4) [20]. Alternatively, the G-strand overhang is also involved in the formation of the t-loop in which it invades the double-stranded region [21]. It has been hypothesized that those structures, which are not mutually exclusive, are able, by sequestering the 3′ end, to prevent the extension of the telomeres by telomerase.

Besides their role of capping chromosomes and protecting them from being recognized as DNA breaks [22], telomeres ensure proper chromosome segregation during mitosis [23] as well as transcriptional silencing of genes located close to them. Indeed, telomere shortening can alter gene expression by a process named telomere position effect (TPE) [24]. This process leads to the reversible silencing of genes near the telomere and thus is dependent on telomere length. In yeast, TPE can repress genes located up to 20 kb from the end [25, 26]. Recently, using a Hi-C (chromosome capture followed by high-throughput-sequencing) technique, three genes located at three different subtelomeric ends (1p, 6p, and 12p) were reported to have their expression altered with telomere length: *ISG15* (interferon-stimulated gene 15kD), *DSP* (Desmoplakin), and *C15* (complement component 1s subcomponent). This phenomenon occurs through chromosomal looping between the loci of these genes and their respective telomere ends [27, 28]. Therefore, many loci may be regulated by telomere length.

This observation provides a new potential mechanism by which telomere shortening could contribute to the aging process and cancer development.

Two mechanisms of telomere maintenance have been identified in humans: the telomerase-mediated maintenance observed in 90% of cancers and, in the remaining 10%, the alternative lengthening of telomeres (ALT), which depends on homologous recombination [29, 30].

## 2.2. Telomerase: a ribonucleoprotein complex with multiple functions

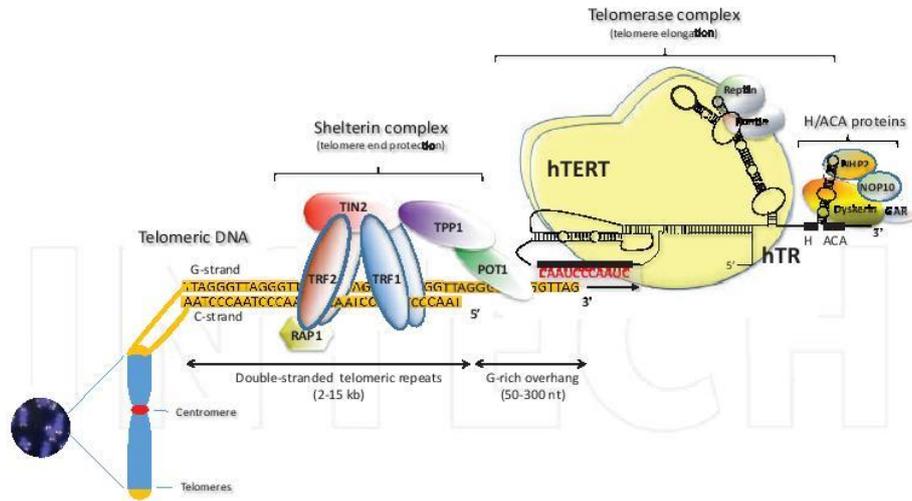
Elizabeth Blackburn and her graduate student Carol Greider (2009 Nobel Prize in Physiology or Medicine) who worked on the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila* identified the enzyme responsible for the telomeric repeat synthesis [31]. This ribonucleoprotein (RNP) enzyme maintains telomere length by adding repetitive sequences to chromosome ends, slowing down telomere attrition [32].

Telomerase is an RNA-dependent DNA polymerase that plays a key role in carcinogenesis. By synthesizing telomeric DNA at the termini of chromosomes and stabilizing telomere lengths, it overcomes the senescence barrier due to the progressive telomere shortening associated with cell divisions [33]. Normal human somatic cells have very low or undetectable telomerase activity. By contrast, this activity has been detected in a wide range of human cancers (85–90%), in stem cells and adult germline tissues [34, 35]. By its action on telomeres, this enzyme confers to cancer cells their infinite cell proliferation potential and controls cell survival [36–38]. Telomerase is believed to be a significant target in cancer therapy since its upregulation appears to be a feature of malignant cells.

The human telomerase is a ribonucleoprotein enzyme (127 kDa) composed of at least two components, a catalytic subunit, telomerase reverse transcriptase (hTERT), and a template RNA component (hTR) (**Figure 1**).

hTR is a non-polyadenylated 451-nt long non-coding RNA containing eight conserved regions (CR1–CR8) that acts mainly as a template for the synthesis of the telomeric DNA. hTR binds hTERT *via* a template-pseudoknot domain (CR1/CR2) and a stem-loop domain (CR4/CR5) located in the middle of this RNA structure, which interacts with the DNA-binding domain of hTERT (**Figure 1**). hTERT protein functions as a dimer in the telomerase complex. Additional proteins are also required for a functional telomerase complex *in vivo*: small nucleolar RNPs, NHP2 (non-histone protein 2), NOP10 (nucleolar protein 10), GAR1, shelterin, and the ATPases Pontin and Reptin [39, 40]. The shelterin complex aids at the stabilization of the 3' end at the telomeres. The appropriate stabilization of hTR and its proper interaction with hTERT involves the recruitment of dyskerin (DKC1), an RNA-binding protein, facilitated by the ATPases Reptin and Pontin [41]. The assembly of telomerase occurs in the nucleus in the Cajal bodies, and its localization at telomeres requires TCAB1 (Telomerase CAjal Body protein 1) and TPP1 proteins [42, 43].

Loss-of-function mutations of either *hTERT* or *hTR* are associated with pathologies such as aplastic anemia, pulmonary fibrosis, and dyskeratosis congenital, diseases characterized by stem cell depletion, deficiency in tissue regeneration, and tissue atrophy [44].



**Figure 1.** The human telomere and telomerase: the human telomerase is composed at least of telomerase reverse transcriptase (hTERT), telomerase RNA component (hTR), and accessory proteins that are members of the H/ACA small nucleolar ribonucleoprotein family: dyskerin; NHP2 (non-histone protein 2); NOP10 (nucleolar protein 10); GAR1 ribonucleoprotein.

Besides its canonical role, accumulated evidence indicates that telomerase elicits other functions in several essential cell-signaling pathways, including apoptosis, differentiation, DNA damage responses, and regulation of gene expression [45–50]. Even though these functions appear independent of telomerase activity, it is not excluded that some transient effect at telomeres can affect chromatin structure and gene expression. One example of these non-canonical functions of hTERT is the demonstration that hTERT binds NF- $\kappa$ B p65 subunit and regulates some of its target genes such as *IL (Interleukin)-6*, *IL-8*, *TNF (tumor necrosis factor)  $\alpha$* , and matrix metallo proteinases (*MMPs*) [51, 52]. In turn, NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells) can activate the expression of hTERT by binding to its promoter indicating a feed-forward loop between telomerase and NF- $\kappa$ B [53]. hTERT protein can also function as a transcriptional modulator of the Wnt(wingless-related integration site)/ $\beta$ -catenin-signaling pathway [54]. Indeed, hTERT and  $\beta$ -catenin co-associate at the Wnt/ $\beta$ -catenin target gene promoters by forming a complex with the ATPase subunit of SWI/SNF (switch/sucrose non-fermentable) chromatin-remodeling complex, BRG1 (Brahma-related gene 1). Interestingly both wild-type and catalytically inactive hTERT led to the reactivation of Wnt/ $\beta$ -catenin target genes suggesting that this function is independent of its conventional function at telomeres. In turn, the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway regulates the expression of hTERT in embryonic stem cells and in cancer cells through the recruitment of  $\beta$ -catenin to the promoter of *hTERT* indicating, in this case also, a positive feed-forward loop between telomerase and  $\beta$ -catenin [55]. Furthermore, functioning as an RNA-dependent RNA polymerase, hTERT has been implicated in the production of small-interfering (si) RNAs in a Dicer-dependent

manner and thereby is involved in posttranscriptional gene silencing [56]. This activity of hTERT occurs through the interaction of hTERT protein with BRG1 and nucleostemin [57, 58]. For example, hTERT, through this activity, mediates the production of endogenous siRNAs using the RNA component of the mitochondrial RNA-processing endonuclease (RMRP) as a template.

Recently, it has been shown that BRG1 plays an essential role in maintaining the proliferation and viability of NBL cells. Interestingly, BRG1 is consistently upregulated in several NBL cell lines and in advanced stages of NBLs. Furthermore, high BRG1 levels have been correlated with poor patient outcome [59]. Therefore, BRG1 inhibition could be a possible new line of treatment for high-risk NBL patients. In view of these observations, the relationship between BRG1 and hTERT in NBL should be investigated.

### 2.3. Human hTERT regulation

Given the key role of telomerase in malignant transformation and tumor progression, great efforts have been deployed to unravel the mechanisms underlying telomerase activation.

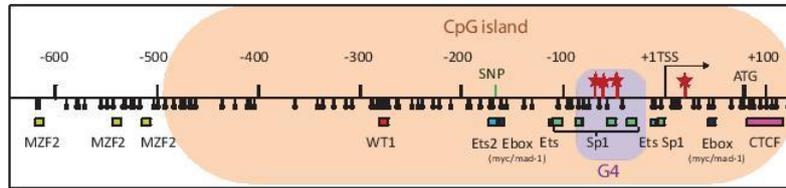
#### 2.3.1. *hTERT* gene and its promoter

The *hTERT* gene is 42-kb (kilobases) long with 16 exons [60] located in humans on the short arm of chromosome 5 (5p15.33) [61], more than 2 Mb away from telomeres. The reverse transcriptase domain is coded by exons 5–9. Differential splicing of *hTERT* mRNA has been demonstrated during embryonal development in various tissues. So far, 22 isoforms have been described resulting from alternative splicing [62, 63]; however, only the full-length isoform, which retains the reverse transcriptase activity, is able to elongate telomeres [64, 65]. Variants that lack the reverse transcriptase domain could affect telomerase activity by acting as competitive inhibitors as reported for the  $\alpha$ -variant [66] or may have by themselves telomere-independent activities [62, 67, 68]. However, these experiments should be interpreted cautiously because they are based on overexpression conditions that are far beyond the physiological conditions.

Telomerase activity is generally well correlated with *hTERT* expression indicating that *hTERT* is a key regulator of this enzyme. *hTERT* gene is mostly regulated at the transcriptional level. This regulation is complex and includes multiple levels [69, 70].

The *hTERT* promoter does not have typical transcription-regulatory elements as TATA or CAAT boxes but is GC-rich. The core promoter harbors at least five GC boxes and two E-boxes (enhancer boxes with the canonical sequence of 5'-CACGTG-3'), which are sites for Sp1 (specificity protein 1), and c-Myc-binding, respectively, as well as multiple other transcription factor-binding sites involved in *hTERT* gene transcription: E-26 (ETS) family members, E2F, AP1 (activator protein 1), p53, p21, HIF (hypoxia-inducible factor), NF- $\kappa$ B,  $\beta$ -catenin, CTCF (CCCTC-binding factor), WT1 (Wilms' tumor 1), and MZF2 (myeloid zinc finger 2) [71] (Figure 2).

### hTERT gene promoter



**Figure 2.** Schematic representation of the *hTERT* promoter: binding sites for various transcription factors are shown. The transcription start site (TSS, +1) and the translation start site (ATG, +78) are indicated. Stars indicate hotspot promoter mutations. The rs2853669 polymorphism (SNP) is shown in the ETS2-binding site. CTCF: CTCF factor-binding site; E-Box: Myc/Mad-family factor-binding site; Sp1: binding site for the SP1 transcription factor; ETS: ETS-domain site; WT1: binding site for the Wilms' tumor 1 transcription factor; MZF2: binding site for the myeloid zinc finger 2 transcription factor. Vertical tick marks with dark circles indicate the location of CpG dinucleotides. G4 indicates the localization of the G-quadruplex structure that can be adopted by *hTERT* promoter.

#### 2.3.2. Transcriptional regulators of *hTERT*

The factors that bind *hTERT* promoter were characterized as transcriptional activators or transcriptional repressors or can play both roles depending on the cell type and the cellular context. Different factors can sometimes compete for binding to the same site or cooperate for binding to adjacent sites on *hTERT* promoter. Most of the studies concern the effect of transcription factors interacting with the core region of *hTERT* promoter, spanning from -180 bp (base pair) upstream to +1 bp downstream of the transcription start site. However, transcription factors interacting with a more distant region can also play an important role. Their action can be modulated by epigenetic modifications (see below). Therefore, the transcriptional level of *hTERT* results from a complex regulatory network of all these factors. These latter observations can explain the contradictory results that are reported in the literature. Given the complexity of *hTERT* regulation, it is difficult to integrate all the information. In addition, many factors indirectly regulate *hTERT* transcription through their interaction with other signaling pathways. All these processes ensure a tight and coordinated control of the *hTERT* gene in order to silence it in most human somatic adult cells. This control is lost in most malignant cells.

Recent articles have already reviewed exhaustively the roles of specific regulatory factors of *hTERT* [33, 71, 72]. Here, we have selected the most important ones, those whose binding has been demonstrated by *in vivo* assays, and also those that could be involved in the pathophysiology of neuroblastomas.

##### 2.3.2.1. *c-Myc/Max/Mad-1*

*c-Myc* and its dimerization partner Max (Myc-associated factor X) bind to regulatory elements called E-boxes and recruits histone acetyltransferases in order to activate the transcription of various genes, including *hTERT* [73]. *c-Myc* binds to two canonical E-box sequences

(5'-CACGTC-3') found in the core promoter of *hTERT* (at -165 and +44 bp from the transcription start site). This binding leads to the upregulation of *hTERT* gene, and the increase in telomerase activity [74, 75]. However, c-Myc alone is not always sufficient to upregulate the expression of *hTERT* suggesting the requirement of additional factors. For example, the cooperation between Sp1 and c-Myc has been demonstrated to upregulate *hTERT* expression in human foreskin keratinocytes transduced by E6 [76]. Recently, it has been reported that c-Myc can exert a dual role on *hTERT* promoter. Indeed, besides its action as a transcriptional activator of *hTERT*, c-Myc can also maintain its promoter in a repressive state [77]. This latter action is independent of the two E-boxes.

Numerous factors thereby are able to indirectly upregulate *hTERT* expression through their action on c-Myc expression: transforming growth factor (TGF)- $\beta$ /Smad signaling, estrogen, Aurora-A, Survivin, Leptin, mitogen-activated protein kinase (MAPK)/PI3K (phosphoinositol-3-kinase)-signaling pathway, MMP9, and Sirtuin 1 (SIRT1). Conversely, many factors are able to repress *hTERT* expression by counteracting the c-Myc expression or activity. The most important one is Mad-1 (Max dimerization protein 1), a potent antagonist of c-Myc, which acts as a direct competitor for dimerization with Max and binding on the E-boxes. Other factors are also known to act on c-Myc expression and/or inhibit its binding to *hTERT* promoter: breast cancer 1 (BRCA1), p27KIP21, HIF-1 $\alpha$ , and so on.

Despite the strong evidence of the action of c-Myc as a transcriptional activator of *hTERT*, several studies reported the lack of correlation between c-Myc expression and *hTERT* mRNA levels [78, 79]. However, in these studies, the direct binding of c-Myc on *hTERT* promoter has not been investigated.

NBL cells generally do not express c-Myc but N-MYC, a protein belonging to the same family. c-Myc and N-MYC are encoded by different genes but have similar structures and domains. As c-Myc, N-MYC protein was shown to be recruited to the *hTERT* promoter and to activate it in NBL [80]. However, it is not known whether N-MYC can always functionally replace c-Myc in *hTERT* regulation. Moreover, *hTERT* has been shown to regulate c-Myc protein stability by interacting directly with c-Myc suggesting the existence of a feed-forward loop. In addition, in c-Myc-driven lymphoma, *hTERT* can also be recruited to c-Myc target promoters [81]. Such a crosstalk between *hTERT* and N-MYC protein has not been reported in NBL yet.

#### 2.3.2.2. Specificity protein 1 (*Sp1*)

Sp1 is a transcription factor that binds to GC-box motifs in the promoter of *hTERT*. It activates *hTERT* gene expression in telomerase-positive cells but suppresses it in telomerase-negative one [82]. Sp1 may work in cooperation with c-Myc to upregulate *hTERT* expression. However, in cooperation with Sp3, another GC-box binding protein, Sp1 can also suppress the expression of *hTERT*.

It is important to note that this GC-rich region of *hTERT* promoter is able to form a tandem G-quadruplex structure [83]. The formation and stabilization of these structures that involves at least three of the five Sp1-binding sites could, therefore, interfere with *hTERT* transcriptional regulation.

#### 2.3.2.3. Nuclear factor $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B)

NF- $\kappa$ B is a transcription factor complex playing a role in telomerase expression and activity either directly through its binding on *hTERT* promoter or indirectly through the modulation of the expression of transcription factors known to affect *hTERT* expression. The binding site of NF- $\kappa$ B on *hTERT* promoter is located 600 bp upstream of the ATG translation start codon. However, recently, another pathway for the activation of *hTERT* by this complex has been proposed. This new mechanism involves a hotspot *hTERT* promoter mutation (see below).

#### 2.3.2.4. Upstream stimulatory factor (USF) proteins

As c-Myc, USF proteins bind directly to E-box motifs on the core promoter of *hTERT*. They play both activating and repressing roles in the regulation of *hTERT* gene expression depending on the cell context.

#### 2.3.2.5. CCCTC-binding factor

CTCF transcription factor binds at the beginning of exon 1 (+4 to +39 bp) and near the beginning of exon 2 (+422 to +440 bp) relative to the ATG in *hTERT* promoter. It is a repressor of *hTERT* transcription. CTCF is unable to bind to methylated DNA and therefore its binding is dependent on the degree of DNA methylation [84].

#### 2.3.2.6. Wilms, tumor protein 1

WT1 is described as a repressor of *hTERT*. Its binding site lies from -358 to -349 bp on *hTERT* promoter [85]. However, similar to CTCF, the binding of WT1 is known to be methylation-sensitive. This observation was further supported by Azouz et al. whose experiments, in an acute promyelocytic leukemia (APL) cell model, showed that hypermethylation of a distal domain of *hTERT* promoter induced by retinoic treatment prevented WT1 binding and therefore, the subsequent *hTERT* gene repression [86]. A recent study reports an inverse correlation between *WT1* expression and *MYCN* amplification and expression. Moreover, a high expression of WT1 has been associated with a poor outcome only for patients showing non-*MYCN*-amplified tumors [87]. In a cohort of 67 primary NBL tumors, no significant correlation between WT1 and *hTERT* expression was found ( $p = 0.056$ ), whereas, considering only stage 4 tumors ( $n = 51$ ), there was a significant higher WT1 expression in patients with a low *hTERT* expression ( $p = 0.033$ ).<sup>1</sup>

#### 2.3.3. *hTERT* promoter mutations

Recently, hotspot promoter recurrent mutations were identified first in sporadic and familial malignant melanoma [88, 89]. These mutations, which cause an adenine-to-cytosine (A>C) mutation or a cytosine-to-thymine (C>T) transition at chromosome 5: 1,295,161, 1,295,228, and

<sup>1</sup>E. Ségal-Bendirdjian et al., unpublished results.

1,295,250 (-57, -124, and -146 bp upstream of the ATG translation start codon), are named -57A>C (or A161C), -124C>T (or C228T), and -146C>T (or C250T), respectively. From there, the *hTERT* promoter mutations have been identified in various types of cancers with different frequencies [90]. The two main mutations, -124C>T and -146 C>T, have been suggested to be oncogenic drivers on the basis of experimental data showing that (1) their introduction into the *hTERT* promoter reporter could significantly enhance the promoter activity [91]; (2) the creation of these mutations by genome editing in *hTERT* promoter of human pluripotent stem cells is sufficient to inhibit the repression of *hTERT* gene transcription normally observed in wild-type *hTERT* promoter-bearing stem cells after induction of differentiation [92]; and (3) tumors carrying *hTERT* promoter mutations were frequently observed to express higher levels of *hTERT* mRNA and telomerase activity compared with those carrying a wild-type promoter. The frequency of the -124C>T mutation is generally higher than the frequency of the -146C>T mutations (80 vs. 20%). Other less common mutations were also detected in the *hTERT* promoter such as the CC>TT mutations at -124/-125 (Chr.5: 1,295,228-1,295,229) and -138/-139 (Chr.5: 1,295,242-1,295,243) positions. Note that these mutations occur in the G-rich region of the promoter known to form G-quadruplex structures [83]; therefore they can abrogate their negative effect on transcription by changing their stability and/or altering their recognition.

*hTERT* promoter mutation rates vary significantly from undetectable to 85% among studied human cancer types. The mutations occur most frequently in bladder, thyroid, hepatocellular cancers, malignant glioblastoma, and melanoma [93-96], while they are rarely present in hematological malignancies, prostate, gastrointestinal, breast, and lung cancers [90, 97, 98]. That a high frequency of *hTERT* promoter mutations was found in a multitude of advanced cancers suggests their key role in the reactivation of telomerase activity.

Mechanistically, -124C>T or -146C>T mutation generates an 11-base nucleotide stretch (5'-CCCCTTCCGGG-3'), which contains a consensus-binding site (GGAA in reverse complement) for ETS family transcription factors [99]. It was shown that the multimeric GA-binding protein (GABP), an ETS family transcription factor, was specifically recruited to the mutant rather than wild-type *hTERT* promoter in different cancer cells. This recruitment is associated with an enhanced enrichment of active chromatin leading to the opening of chromatin, an increased recruitment of PolII, and upregulation of *hTERT* expression and activity [91, 100]. This effect is further enhanced by the activation of the non-canonical NF- $\kappa$ B-signaling pathway. Indeed, the recruitment of the p52 subunit of NF- $\kappa$ B to the C250T site facilitates the stimulation of *hTERT* transcription.

Genome-wide association studies revealed the presence of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) within the *hTERT* locus that were associated with increased risks in a variety of cancers. For example, rs2736100, located in intron 2, was associated with various types of cancer as glioma and colorectal cancer [101, 102]. Another SNP, rs2853669, found at *hTERT* promoter upstream of the first E-box, disrupts an ETS2-binding site [103, 104] and also hampers c-Myc binding to the adjacent E-box. The presence of this SNP can modify the effects of *hTERT* promoter mutations [105].

While *hTERT* promoter mutations have been identified in a broad range of cancers, not all cancers possess these mutations suggesting that other mechanisms contribute to *hTERT* reactivation.

#### 2.3.4. Epigenetic regulation of *hTERT* transcription

The *hTERT* promoter is located in a 4-kb CpG island from -1800 to +2200 bp (relative to the TSS). Besides the involvement of transcription factors, epigenetic control and overall chromatin structure at *hTERT* promoter add another layer of *hTERT* regulation. It is well established that DNA methylation, histone acetylation, and methylation are also involved in the regulation of *hTERT* transcription even though the precise role and the molecular mechanisms are not well understood and even contradictory due to the different cellular models studied and the various methods used to analyze these epigenetic modifications.

Considering the methylation pattern categorized in different cell lines, it is possible to narrow the promoter to only two regions: one methylated, sometimes hypermethylated (from -650 to -200 bp from ATG) and one unmethylated or only slightly methylated (from -200 to +100 bp) [86, 106–110].

It is known that DNA methylation at gene promoter plays a major role in transcription factor binding. For example, hypomethylation at the *hTERT* core promoter may allow the binding of c-Myc to the E-boxes. Some reports, including ours, suggest that DNA methylation of *hTERT* promoter might have a key role in *hTERT* expression, but in a way opposite to what has been proposed so far. The hypothesis is that DNA methylation at *hTERT* promoter can contribute to prevent the binding of repressors and could account for high *hTERT* expression. This has been demonstrated for two transcription factors known to repress *hTERT*: CTCF whose binding site is located in exon 1 [71, 111, 112] and WTI whose binding site is located in the distal promoter [86].

Besides DNA methylation, histones contribute to chromatin organization. Modifications can occur to their amino acid tails: methylation and acetylation are the most common. In general, methylation of histone 3 at its lysine 4 (H3K4) and hyperacetylation of histones are signs of hypo- or unmethylated DNA and active transcription gene. On the contrary, methylation of lysine 9 and 27 of histone 3 (H3K9 and H3K27, respectively) and hypoacetylation of histones are signs of hypermethylated DNA, so inactive transcription gene [110].

#### 2.4. Human *TR* regulation

As *hTERT* is generally expressed only in telomerase-positive cells and its ectopic introduction alone can immortalize normal human cells, *hTERT* has been regarded as the limiting component of telomerase activity and much of the research has thus focused on the regulation of *hTERT* gene. However, even though *hTR* is ubiquitously expressed, evidence supports the notion that *hTR* can be also limiting for telomerase activity and telomere maintenance [113]. Indeed, the gene encoding *hTR*, a single-copy gene located on chromosome 3 at 3q26.3 [114], is highly regulated. A number of transcription-binding sites have been validated by either

electrophoretic mobility gel shift assays, promoter reporters, and chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments, including Sp1, Sp3, and NF-Y [115, 116]. Furthermore, different signaling pathways have also been implicated in *hTR* transcription as JNK pathway.

### 3. Telomeres and telomerase in neuroblastoma

#### 3.1. Telomerase as a biological marker and predictive factor in neuroblastoma

Several distinguishable groups in NBL have been identified based on their telomere biology and telomerase activation suggesting that telomerase expression may be one critical step in the development of neuroblastoma [5]. High telomerase activity allowing the maintenance of telomere length has been previously reported to correlate with advanced stages of the disease and with poor prognosis [5, 117–121]. By contrast, tumors without detectable telomerase activity showed favorable outcomes and some tumors regressed or matured [122]. This phenomenon of spontaneous regression led to propose a specific pattern of the metastatic disease called stage 4S. Children with stage 4S were restricted to infants aged less than 12 months at diagnosis, had generally small primary tumors with dissemination limited to the liver and skin and minimum bone marrow involvement [123]. The mechanisms involved in this regression remain to be elucidated. The expression of the alternate splice variants of *hTERT* could constitute a negative regulatory mechanism of telomerase at the posttranscriptional level and might account for the favorable evolution of these tumors [119, 124]. Therefore, full-length *hTERT* expression and telomerase activity, due to its strong correlation with the biological behavior of neuroblastoma tumors, may prove to be a good indicator of malignancy, in particular in 4S neuroblastoma. This may have consequences in the therapeutic strategies that can be adopted for these patients. As this form presents similar features as classic stage 4, it can be therefore treated as a high-risk group although in these cases, less therapeutic intensity could be given.

Several mechanisms have been proposed to explain the phenomenon of spontaneous regression. These include the neurotrophin receptor signaling when deprivation in nerve growth factor occurs, immune-mediated killing by anti-neural antibodies in patients, epigenetic regulation of gene expression through DNA methylation, histone modifications or chromatin remodeling, and finally telomere shortening and consequently apoptosis. Indeed, most of the tumor samples from 4S NBL have low telomerase activity or short telomeres [5]. This mechanism is further supported by Samy et al. who showed that a neuroblastoma cell line transfected by a dominant-negative form of human telomerase was more prone to apoptosis and had reduced tumorigenicity in a mouse xenograft model compared to untransfected neuroblastoma cells [125].

A correlation between *hTR* expression in primary NBLs, stage of disease, and survival [126, 127] has also been reported demonstrating a potential role for *hTR* as a biomarker even though most of the studies focused on *hTERT* expression. However, *hTR* expression does not always correlate with telomerase activity. This can be explained by the complexity of the different molecular mechanisms involved in telomerase regulation.

Even though the main role of telomerase is to maintain telomere length in tumors, non-canonical functions could also promote tumor growth and contribute to poor prognosis in primary NBLs (Wnt signaling, DNA repair, genomic instability, apoptosis, and escape from oncogene-induced senescence) [117].

Using a novel approach of three-dimensional (3D) telomere quantitative fluorescence *in situ* hybridization on 74 NBL tissue samples, a recent report demonstrates a possible classification of NBLs based on the level of telomere dysfunction, telomere length, and nuclear organization. Telomere dysfunctions were associated with unfavorable tumor characteristics, including *MYCN* amplification, and poor prognosis [128].

### **3.2. Potential mechanisms of hTERT activation and/or telomere maintenance mechanisms in neuroblastoma**

The mechanisms by which telomerase activity is activated in high-stage NBL remain elusive. However, recent studies have shed some light on this important question. Although some controversies may remain, hTERT expression upregulation may occur through at least two pathways: *MYCN* amplification and genomic rearrangements around *hTERT*. Alternatively, ALT pathway can be activated in the absence of telomerase activation providing a mean for tumor cells to stabilize their telomeres as a necessary requirement for the immortalization and progression of the tumors.

#### *3.2.1. MYCN amplification*

*MYCN* amplification is the best characterized genetic marker and a powerful prognostic indicator of high-risk neuroblastoma [3]. *MYCN*-amplified tumors usually exhibit high telomerase activity and expression [118]. As developed earlier, *c-Myc*-binding sites are present on *hTERT* gene promoter and it is now well demonstrated that this factor, alone, or in cooperation with other transcription factors, determines the activity of *hTERT* promoter. N-MYC and *c-Myc* proteins are highly homologous. As *c-Myc*, N-MYC heterodimerizes with Max at consensus E-box sequences, therefore, *MYCN* overexpression could promote telomere stabilization through a transcriptional increase of *hTERT* gene expression associated with an increase in telomerase activity even though only one study reported such a direct interaction by ChIP in NBL [80]. An inverse correlation of *MYCN* and *c-Myc* expression was found in NBL subtypes [129]. As mentioned earlier, whether N-MYC protein can replace all *c-Myc* functions for *hTERT* regulation is still an unanswered question. Several lines of evidence suggest that MYC family members have separate physiological functions. The interplay between N-MYC and hTERT in NBL needs, thus, to be further investigated.

A recent study shows that *DKC1* gene promoter is targeted by both *c-Myc* and N-MYC and that high *DKC1* expression is an independent prognostic indicator for adverse clinical outcome in NBL. *DKC1* gene encodes the RNA-binding protein dyskerin, a core component of the telomerase holoenzyme. This new function of *DKC1* in NBL appears to be telomerase-independent [130].

### 3.2.2. *hTERT* promoter mutations

Although hotspot mutations in *hTERT* promoter driving telomerase activity are frequently described in neural crest-derived tumors such as melanoma [88, 89] and in a variety of other neuronal tumors including medulloblastoma and glioma [90, 131, 132], no *hTERT* promoter mutations have been detected in a large series ( $n = 131$ ) of primary neuroblastoma [133], in line with previous studies performed on a smaller number of patients [90, 134]. However, these mutations were searched only in the core promoter of *hTERT*; it is not excluded that mutations may exist in more distant regulatory elements. The existence of a given SNP should also be searched.

### 3.2.3. *hTERT* gains

Chromosome 5p is often amplified in NBL, and focal *hTERT* gains were recently detected in several stage 4 primary NBLs. *hTERT* gains were more frequently detected in *MYCN* non-amplified cases, suggesting that *hTERT* gain performs a function similar to *MYCN* amplification [135, 136]. As N-MYC protein can bind and activate *hTERT* promoter, it is likely that *hTERT* gains are selected in order to increase *hTERT* expression in the absence of *MYCN* amplification.

### 3.2.4. *hTERT* rearrangements

Recent whole-genome sequencing of primary neuroblastoma, performed by two independent groups, discovered recurrent genomic rearrangements in a 70-kb region proximal to *hTERT* locus on the chromosome 5p15.33 [9, 10].

Indeed, in the first study [10], the authors were searching for structural alterations that might occur in high-risk NBL and, analyzing 56 tumors, they identified 4 locations exhibiting clustered breakpoints. These are related to *MYCN* amplifications, *ATRX* deletions, copy number gains of chromosome 17q, and rearrangements located at chromosome 5p15.33 proximal to *hTERT* gene. *hTERT* rearrangements occurred in 21% of tumors and included balanced translocations, copy number gains, high-level amplifications, and chromothripsis [137]. Chromothripsis corresponds to a massive and localized genome rearrangement [138], affecting high-risk tumors. Chromothripsis occurs in 2–3% of human cancers and, in a whole-genome-sequencing study, it occurs in 18% of high-risk NBL [137]. In an extended case series ( $n = 217$ ), the authors showed that *hTERT* rearrangements are associated with a poor patient outcome and occur in mutually exclusive fashion with *MYCN* amplification and *ATRX* mutations (see below). They do not affect directly the *hTERT* gene or its promoter but they are all associated with an increase in *hTERT* transcription and telomerase activity as well as genes present in its vicinity (*SLC6A18* and *SLC6A19*) [139]. ChIP sequencing of *hTERT*-rearranged tumors indicated next to the breakpoints the presence of histone modifications known to mark active promoters (H3K4me3 and H3K27ac) and transcription elongation (H3K36me3), whereas in cells lacking *hTERT* alterations the repressive mark H3K27me3 was identified. Therefore, the structural rearrangement occurring at 5p15.33 results in a massive chromatin remodeling of this genomic region. The biological effect is the repositioning of regulatory elements very close

to *hTERT* locus that could be responsible for the high induction of *hTERT* expression (up to 90 times that of normal cells) in these tumors.

In a similar whole-sequencing study [9] screening 108 NBLs, structural rearrangements of *hTERT* associated with *hTERT* overexpression were identified in 23% of cases. In *hTERT*-rearranged NBLs, a significant increase in telomere length has been demonstrated compared to non-rearranged NBLs. Both studies describe *hTERT* rearrangement as the second most frequent genetic defect in high-risk NBL after *MYCN* alteration. It is important to note that in those cases the promoter and coding regions of *hTERT* gene remain non-altered.

These results have been major advances in our understanding of NBL genetic and biology placing telomere biology at the core of this pathology.

### 3.2.5. Small nucleolar ribonucleoproteins (snoRNPs)

A recent study reported that the expression of proteins involved in the formation and stabilization of snoRNP complex (including DKC1, GAR1, and NHP2 proteins) is elevated in high-risk NBL and associated with poor prognosis. Furthermore, this study shows a positive correlation between DKC1 expression and telomerase activity. This increase is associated with an increase of *hTR* expression. Therefore, in NBL, upregulation of snoRNPs may contribute to telomere maintenance and stabilization [140].

### 3.2.6. ALT and neuroblastoma: ATRX (alpha thalassemia/mental retardation syndrome, X-linked) mutations

Telomere length does not necessarily correlate with telomerase activity [141]. Recently, it has been reported that some neuroblastomas (generally associated with unfavorable NBL in older children without *MYCN* amplification and regardless of telomerase activation status) preserve their telomere length in the absence of telomerase through telomere-binding proteins and alternative lengthening of telomeres, a process based on DNA repair/homologous recombination pathways [141–143]. ALT tumors represent 10–20% of NBL. These tumors have a very poor outcome. Phenotypically, ALT cells present long and heterogeneous telomere lengths [144], ALT-associated promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies [145], and abundant extra-chromosomal telomeric repeats [146]. A recent whole-genome-sequencing study identifies, in most ALT NBL cases, loss-of-function mutations in *ATRX* [137, 147, 148]. *ATRX* maps to the X chromosome and encodes a SWI/SNF chromatin-remodeling ATP-dependent helicase. *ATRX* regulates chromatin structure at both centromeric heterochromatin and telomeric regions [149]. In vitro analyses demonstrate its binding to GC-rich sequences and to G-quadruplexes [150]. Loss of *ATRX* functions may allow the destabilization of repressive heterochromatin at telomeres. NBLs with *ATRX* mutations show longer telomeres. *ATRX* mutations include in-frame deletions, missense, nonsense, and frameshift single-nucleotide variations. They are predominantly observed in adolescent and young adult patients (44% in patients older than 12 years, whereas no mutation was detected in infants <18 months of age [148]) and are frequently associated with chemo-resistance. *ATRX* protein establishes a functional interaction with DAXX (death domain-associated protein). At telomeres, *ATRX* and

DAXX proteins cooperate to deposit the histone H3 variants, H3.3, to maintain chromosome stability [151]. Loss of function of *ATRX/DAXX* is also associated with ALT activation [152] and poor overall survival among older patients. As mentioned earlier, *ATRX* mutations were mutually exclusive from *MYCN* amplification. However, how *ATRX* mutations lead to NBL progression is still an unanswered question.

### 3.2.7. *ARID1A* and *ARID1B*

Next-generation sequencing, genome-wide rearrangements analyses, and targeted analysis of specific genomic loci of 71 NBL patients identified mutations in chromatin-remodeling complexes encoded by *ARID1A/1B* (AT-rich interaction domain 1A/1B) genes in 11% of cases with decreased survival of patients [147]. Both proteins are subunits of the SWI/SNF transcriptional complex. They have emerged as tumor-suppressor genes and thereby when mutated can drive NBL tumorigenesis. However, additional studies will be required to elucidate the role of these proteins in the initiation or progression of NBL.

In conclusion, it is important to note that through either *MYCN* amplification, *hTERT* rearrangements, or *ATRX/DAXX* mutations, most high-risk NBLs have activated mechanisms, all of which are involved in the maintenance of telomere length and contribute to the tumor progression. This relationship highlights the major role of telomere/telomerase biology in NBL. These three mechanisms identify therefore distinct groups of NBL patients at very high risk with poor outcome [139]. That low-risk tumors lack such alterations support the notion that these kinds of tumors are more prone to spontaneously regress.

Altogether, these observations provide new important mechanisms that could be targeted in new therapeutic strategies to treat the most aggressive forms of neuroblastoma.

## 4. Telomerase, a target for cancer therapeutics

That, on one hand, both *MYCN* amplification and 5p15.33 rearrangement targeting *hTERT* locus lead to an increase in telomerase activity and subsequent telomere lengthening, and on the other hand ALT pathway is activated in tumors lacking *hTERT* or *MYCN* alterations indicate that the fate of high-risk NBL is largely dependent on telomerase/telomere biology. These new findings may help to improve tumor diagnostics and prognosis but also supports the development of novel therapeutic strategies targeting telomere/telomerase to treat the most aggressive form of this disease. Different molecules were shown to target telomerase by different mechanisms such as nucleoside analogs and reverse transcriptase inhibitors (zidovudine, stavudine, and tenofovir), synthetic non-nucleoside inhibitors as BIBR1532 (2-[(E)-3 naphthalen-2-yl-but-2-enoylamino]-benzoic acid), natural compounds (EGCG, MST-132), G-quadruplex stabilizers (telomestatin, BRACO-19), and molecular chaperone inhibitors affecting hTERT assembly (Hsp90 inhibitors). However, these compounds generally lack specificity and have adverse effects, and for now, no clinically validated drug targeting telomerase has been successfully developed. GRN163L (imetelstat), a phosphoramidate oligonucleotide targeting the template region of hTR, has undergone clinical trials by Geron Corporation (Menlo Park,

CA, USA) [153–155]. However, the phase II study has been discontinued in breast cancers and non-small-cell lung carcinoma because no significant improvement in median progression-free survival was demonstrated. Moreover, hematological toxicity has been observed. However, these side effects have been used to propose this drug in hematological diseases. A phase II study evaluating the activity of imetelstat in patients with essential thrombocythemia or polycythemia vera is in progress. However, the actual mechanism of action of this molecule is still to be determined. For now, no clinical trials have been performed on NBL.

Regarding NBL, perhaps future attempts could be to target specifically N-MYC protein in patients who have NBL with *MYCN* amplification. However, the lack of specificity of the strategies targeting directly transcription factors is still a major concern. Bromodomain and extra terminal (BET) inhibitors, as JQ1 to specifically downregulate *MYCN* expression, are at the preclinical stage of evaluation [156]. Small molecules have been identified to inhibit c-Myc/Max interaction as well as decrease c-Myc protein levels and inhibit cell growth [157]. It has been shown that these molecules also interfere with N-MYC/Max interaction resulting in cell cycle arrest in *MYCN*-overexpressing NBL cell lines [158]. The consequences on hTERT expression have not been investigated yet.

The recent identification of *ATRX* mutations associated with their consequences on telomere structure in a specific group of high-risk NBL patients suggests that G-quadruplex stabilizers could be a potential therapeutic strategy to partially reverse the effects of *ATRX* mutations.

Telomerase expression was proposed as a selectively targetable mechanism for retinoids and specifically all *trans* retinoic acid (ATRA), an already clinically relevant drug used to stimulate differentiation of APL. Indeed, in a APL cellular model, it has been shown that retinoids can induce transcriptional repression of *hTERT* gene not only in differentiation of sensitive cells but also in cells resistant to ATRA-induced differentiation [159–161]. As the mechanism of *hTERT* repression occurs at the level of gene transcription, all the functions of telomerase can thus be targeted. Therefore, it is worth considering this antitelomerase property of retinoids in combination with more conventional therapies to target NBL. A recent study reporting the efficacy of a combination therapy, using retinoids and epigenetic modulators, in reducing NBL cell growth supports this idea [162].

## 5. Conclusions

Several potential chemotherapy strategies based on telomerase and telomere biology have been developed and explored by pharmaceutical and biotechnology companies [163]. However, in spite of ever-growing knowledge on telomere and telomerase biology, a number of questions remain to be answered as most of these numerous strategies are not yet clinically available because of a weak efficiency and/or a high toxicity. Therefore, to develop agents that will be effective, we need a sharper picture of how the enzyme functions and how we can manage to target specifically and destabilize telomeres in cancer cells. Epigenetic therapies aimed at counteracting the genetic alterations (mutations) are emerging alternatives against aggressive tumors.

Telomerase regulation is highly complex, involving the interplay between numerous biological and molecular processes. Despite the extensive studies that have been already done, a lot more is necessary to unravel the mechanisms underlying the switching off/on of *hTERT* gene during cell differentiation and cell transformation. However, progress in this direction is hampered by the absence of standardized methods to measure hTERT expression and telomerase activity and the lack of suitable tools in the study of telomere/telomerase biology.

First, telomerase repeated amplification protocol (TRAP) assay is a rather artificial assay to quantify telomerase activity; it is based on a quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) method that measures only the capacity of the telomerase reverse transcriptase to elongate artificial telomeric substrates without giving any measurement of the other functions of this protein. To date, no assay exists to evaluate the non-conventional functions of hTERT.

Second, *hTERT* expression is generally quantified using also a quantitative real-time PCR; however, in most cases it is not clearly known which *hTERT* isoform (full-length or specific splice variants) is detected. This would explain why, sometimes, comparison between telomerase activity and *hTERT* transcripts yielded contradictory results. Indeed, generally exhaustive measurements using different primer sets for the detection of various *hTERT* isoforms are not usually done. The detection and quantification of splice variants can be of interest for clinical outcome and prognosis. Moreover, further studies are also required to define precisely the functions of these variants.

Third, *hTR* is rarely quantified; however, it is also a limiting factor in telomere homeostasis.

Finally, due to the low expression of telomerase even in cancer cells, the detection of telomerase by western blot or fluorescence is puzzling. In addition, commercially available anti-hTERT antibodies are still a problem with specificity [164]. Because of these limitations, several published studies used overexpressed hTERT protein (generally tagged). However, the unusually high concentration of the protein due to the overexpression could alter the dynamic and the localization of the protein compared to the endogenous protein leading to misinterpretations.

Since the first paper published in 1995 [5], very few scientific advances have been done on a potential involvement of telomere/telomerase in NBL biology. However, the recent findings highlighting the role of telomere/telomerase biology in high-risk NBL will definitely impact the research in this pathology as well as in other cancers and help to develop new therapeutic strategies.

## Acknowledgements

The work of the authors was supported by grants from the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), the National Center for Scientific Research (CNRS), the Ligue Nationale contre le Cancer, the Fondation de France (n° 201300038226), the French National Research Agency (ANR), Gefluc, Agence Universitaire de la Francophonie (AUF), Hubert Curien Partnership (PHC-CEDRE), and Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR). Yann Blondin is acknowledged for his help in preparing **Figure 1**.

## Author details

Joëlle El Hajj<sup>1,2,3</sup>, Delphine Garsuault<sup>1,3</sup>, Claire Bouyer<sup>1</sup>, Eric Nguyen<sup>1</sup>, George Hilal<sup>2</sup> and Evelyne Ségal-Bendirdjian<sup>1\*</sup>

\*Address all correspondence to: [evelyne.segal-bendirdjian@inserm.fr](mailto:evelyne.segal-bendirdjian@inserm.fr)

1 INSERM UMR-S 1007, Cellular Homeostasis and Cancer, Paris Descartes University, Paris, France

2 Cancer and Metabolism Laboratory, Faculty of Medicine, Saint-Joseph University, Beirut, Lebanon

3 Paris-Sud University, Paris-Saclay University, Orsay, France

## References

- [1] Maris JM. Recent advances in neuroblastoma. *The New England Journal of Medicine*. 2010;**362**:2202-2211
- [2] Brodeur GM. Neuroblastoma: Biological insights into a clinical enigma. *Nature Reviews Cancer*. 2003;**3**:203-216
- [3] Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. 1984;**224**:1121-1124
- [4] Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, et al. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: An INRG Task Force report. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;**27**:289-297
- [5] Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nature Medicine*. 1995;**1**:249-255
- [6] Poremba C, Hero B, Heine B, Scheel C, Schaefer KL, Christiansen H, et al. Telomerase is a strong indicator for assessing the proneness to progression in neuroblastomas. *Medical and Pediatric Oncology*. 2000;**35**:651-655
- [7] Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. 2008;**455**:930-935
- [8] Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, Ribeiro A, de Pontual L, Combaret V, et al. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*. 2008;**455**:967-970
- [9] Valentijn LJ, Koster J, Zwijnenburg DA, Hasselt NE, van Sluis P, Volckmann R, et al. TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors. *Nature Genetics*. 2015;**47**:1411-1414

- [10] Peifer M, Hertwig F, Roels F, Drexler D, Gartlgruber M, Menon R, et al. Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature*. 2015;**526**:700-704
- [11] Wu RA, Upton HE, Vogan JM, Collins K. Telomerase mechanism of telomere synthesis. *Annual Review of Biochemistry*. 2017, in press
- [12] Low KC, Tergaonkar V. Telomerase: Central regulator of all of the hallmarks of cancer. *Trends in Biochemical Sciences*. 2013;**38**:426-434
- [13] Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 1965;**37**:614-636
- [14] Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell*. 2001;**106**:661-673
- [15] Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *Journal of Molecular Biology*. 1992;**225**:951-960
- [16] Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes & Development*. 1997;**11**:2801-2809
- [17] Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*. 1997;**88**:657-666
- [18] de Lange T. How shelterin solves the telomere end-protection problem. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2010;**75**:167-177
- [19] de Lange T. Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development*. 2005;**19**:2100-2110
- [20] Sundquist WI, Klug A. Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature*. 1989;**342**:825-829
- [21] Stansel RM, de Lange T, Griffith JD. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *The EMBO Journal*. 2001;**20**:5532-5540
- [22] Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991;**350**:569-573
- [23] Donate LE, Blasco MA. Telomeres in cancer and ageing. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*. 2011;**366**:76-84
- [24] Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: Reversible repression of Pol II transcription. *Cell*. 1990;**63**:751-762
- [25] Stavenhagen JB, Zakian VA. Yeast telomeres exert a position effect on recombination between internal tracts of yeast telomeric DNA. *Genes & Development*. 1998;**12**:3044-3058
- [26] Tham WH, Zakian VA. Transcriptional silencing at *Saccharomyces* telomeres: Implications for other organisms. *Oncogene*. 2002;**21**:512-521
- [27] Kim W, Ludlow AT, Min J, Robin JD, Stadler G, Mender I, et al. Regulation of the human telomerase gene TERT by telomere position effect-over long distances (TPE-OLD): Implications for aging and cancer. *PLoS Biology*. 2016;**14**:e2000016

- [28] Robin JD, Ludlow AT, Batten K, Magdinier F, Stadler G, Wagner KR, et al. Telomere position effect: Regulation of gene expression with progressive telomere shortening over long distances. *Genes & Development*. 2014;**28**:2464-2476
- [29] Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nature Medicine*. 1997;**3**:1271-1274
- [30] Bryan TM, Marusic L, Bacchetti S, Namba M, Reddel RR. The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit. *Human Molecular Genetics*. 1997;**6**:921-926
- [31] Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*. 1987;**51**:887-898
- [32] Morin GB. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell*. 1989;**59**:521-529
- [33] Ramlee MK, Wang J, Toh WX, Li S. Transcription regulation of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Genes*. 2016;**7**:50
- [34] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994;**266**:2011-2015
- [35] Armanios M, Greider CW. Telomerase and cancer stem cells. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 2005;**70**:205-208
- [36] Blackburn EH. Telomeres and telomerase: Their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Letters*. 2005;**579**:859-862
- [37] Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, et al. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*. 1997;**90**:785-795
- [38] Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, et al. The RNA component of human telomerase. *Science*. 1995;**269**:1236-1241
- [39] Podlevsky JD, Chen JJ. It all comes together at the ends: Telomerase structure, function, and biogenesis. *Mutation Research*. 2012;**730**:3-11
- [40] Venteicher AS, Meng Z, Mason PJ, Veenstra TD, Artandi SE. Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell*. 2008;**132**:945-957
- [41] Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*. 1999;**402**:551-555
- [42] Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, McCann KE, Terns RM, Veenstra TD, et al. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science*. 2009;**323**:644-648

- [43] Venteicher AS, Artandi SE. TCAB1: Driving telomerase to Cajal bodies. *Cell Cycle*. 2009;**8**:1329-1331
- [44] Dokal I. Dyskeratosis congenita. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2011;**2011**:480-486
- [45] Cong Y, Shay JW. Actions of human telomerase beyond telomeres. *Cell Research*. 2008;**18**:725-732
- [46] Smith LL, Collier HA, Roberts JM. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nature Cell Biology*. 2003;**5**:474-479
- [47] Dudognon C, Pendino F, Hillion J, Saumet A, Lanotte M, Segal-Bendirdjian E. Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance. *Oncogene*. 2004;**23**:7469-7474
- [48] Lee J, Sung YH, Cheong C, Choi YS, Jeon HK, Sun W, et al. TERT promotes cellular and organismal survival independently of telomerase activity. *Oncogene*. 2008;**27**:3754-3760
- [49] Bollmann FM. The many faces of telomerase: Emerging extratelomeric effects. *Bioessays*. 2008;**30**:728-732
- [50] Park JI, Venteicher AS, Hong JY, Choi J, Jun S, Shkreli M, et al. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*. 2009;**460**:66-72
- [51] Ding D, Zhou J, Wang M, Cong YS. Implications of telomere-independent activities of telomerase reverse transcriptase in human cancer. *The FEBS Journal*. 2013;**280**:3205-3211
- [52] Ghosh A, Saginc G, Leow SC, Khattar E, Shin EM, Yan TD, et al. Telomerase directly regulates NF-kappaB-dependent transcription. *Nature Cell Biology*. 2012;**14**:1270-1281
- [53] Yin L, Hubbard AK, Giardina C. NF-kappa B regulates transcription of the mouse telomerase catalytic subunit. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;**275**:36671-36675
- [54] Listerman I, Gazzaniga FS, Blackburn EH. An investigation of the effects of the core protein telomerase reverse transcriptase on Wnt signaling in breast cancer cells. *Molecular and Cell Biology*. 2014;**34**:280-289
- [55] Hoffmeyer K, Raggioli A, Rudloff S, Anton R, Hierholzer A, Del Valle I, et al. Wnt/beta-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science*. 2012;**336**:1549-1554
- [56] Maida Y, Yasukawa M, Furuuchi M, Lassmann T, Possemato R, Okamoto N, et al. An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature*. 2009;**461**:230-235
- [57] Maida Y, Yasukawa M, Okamoto N, Ohka S, Kinoshita K, Totoki Y, et al. Involvement of telomerase reverse transcriptase in heterochromatin maintenance. *Molecular and Cell Biology*. 2014;**34**:1576-1593
- [58] Okamoto N, Yasukawa M, Nguyen C, Kasim V, Maida Y, Possemato R, et al. Maintenance of tumor initiating cells of defined genetic composition by nucleostemin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;**108**:20388-20393

- [59] Jubierre L, Soriano A, Planells-Ferrer L, Paris-Coderch L, Tenbaum SP, Romero OA, et al. BRG1/SMARCA4 is essential for neuroblastoma cell viability through modulation of cell death and survival pathways. *Oncogene*. 2016;**35**:5179-5190
- [60] Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: Organization of the gene and characterization of the promoter. *Human Molecular Genetics*. 1999;**8**: 137-142
- [61] Bryce LA, Morrison N, Hoare SF, Muir S, Keith WN. Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia*. 2000;**2**:197-201
- [62] Hrdlickova R, Nehyba J, Bose HR, Jr. Alternatively spliced telomerase reverse transcriptase variants lacking telomerase activity stimulate cell proliferation. *Molecular and Cell Biology*. 2012;**32**:4283-4296
- [63] Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, et al. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Human Molecular Genetics*. 1997;**6**:2011-2019
- [64] Saeboe-Larssen S, Fossberg E, Gaudernack G. Characterization of novel alternative splicing sites in human telomerase reverse transcriptase (hTERT): Analysis of expression and mutual correlation in mRNA isoforms from normal and tumour tissues. *BMC Molecular Biology*. 2006;**7**:26
- [65] Wong MS, Wright WE, Shay JW. Alternative splicing regulation of telomerase: A new paradigm? *Trends in Genetics: TIG*. 2014;**30**:430-438
- [66] Colgin LM, Wilkinson C, Englezou A, Kilian A, Robinson MO, Reddel RR. The hTERT- $\alpha$  splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia*. 2000;**2**:426-432
- [67] Listerman I, Sun J, Gazzaniga FS, Lukas JL, Blackburn EH. The major reverse transcriptase-incompetent splice variant of the human telomerase protein inhibits telomerase activity but protects from apoptosis. *Cancer Research*. 2013;**73**:2817-2828
- [68] Mukherjee S, Firpo EJ, Wang Y, Roberts JM. Separation of telomerase functions by reverse genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;**108**:E1363-E1371
- [69] Wick M, Zubov D, Hagen G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene*. 1999;**232**:97-106
- [70] Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Hirano H, Takeda J, Yutsudo M, et al. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Research*. 1999;**59**:551-557
- [71] Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M. Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers. *Cancer Science*. 2008;**99**:1528-1538

- [72] Daniel M, Peek GW, Tollefsbol TO. Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene*. 2012;**498**:135-146
- [73] Khattar E, Tergaonkar V. Transcriptional regulation of telomerase reverse transcriptase (TERT) by MYC. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2017;**5**:1
- [74] Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, et al. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nature Genetics*. 1999;**21**:220-224
- [75] Xu D, Popov N, Hou M, Wang Q, Bjorkholm M, Gruber A, et al. Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;**98**:3826-3831
- [76] Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: Induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *Journal of Virology*. 2001;**75**:5559-5566
- [77] Zhao Y, Cheng D, Wang S, Zhu J. Dual roles of c-Myc in the regulation of hTERT gene. *Nucleic Acids Research*. 2014;**42**:10385-10398
- [78] Kirkpatrick KL, Newbold RF, Mokbel K. There is no correlation between c-Myc mRNA expression and telomerase activity in human breast cancer. *International Seminars in Surgical Oncology*. 2004;**1**:2
- [79] Elkak AE, Meligonis G, Salhab M, Mitchell B, Blake JRS, Newbold M, et al. hTERT protein expression is independent of clinicopathological parameters and c-Myc protein expression in human breast cancer. *Journal of Carcinogenesis*. 2005;**4**:17
- [80] Mac SM, D' Cunha CA, Farnham PJ. Direct recruitment of N-myc to target gene promoters. *Molecular Carcinogenesis*. 2000;**29**:76-86
- [81] Koh CM, Khattar E, Leow SC, Liu CY, Muller J, Ang WX, et al. Telomerase regulates MYC-driven oncogenesis independent of its reverse transcriptase activity. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015;**125**:2109-122
- [82] Kyo S, Takakura M, Taira T, Kanaya T, Itoh H, Yutsudo M, et al. Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Research*. 2000;**28**:669-677
- [83] Palumbo SL, Ebbinghaus SW, Hurley LH. Formation of a unique end-to-end stacked pair of G-quadruplexes in the hTERT core promoter with implications for inhibition of telomerase by G-quadruplex-interactive ligands. *Journal of the American Chemical Society*. 2009;**131**:10878-10891
- [84] Renaud S, Loukinov D, Bosman FT, Lobanenkov V, Benhattar J. CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription. *Nucleic Acids Research*. 2005;**33**:6850-6860
- [85] Sitaram RT, Degerman S, Ljungberg B, Andersson E, Oji Y, Sugiyama H, et al. Wilms' tumour 1 can suppress hTERT gene expression and telomerase activity in clear cell renal cell carcinoma via multiple pathways. *British Journal of Cancer*. 2010;**103**:1255-1262

- [86] Azouz A, Wu YL, Hillion J, Tarkanyi I, Karniguian A, Aradi J, et al. Epigenetic plasticity of hTERT gene promoter determines retinoid capacity to repress telomerase in maturation-resistant acute promyelocytic leukemia cells. *Leukemia*. 2010;**24**:613-622
- [87] Masserot C, Liu Q, Nguyen E, Gattolliat CH, Valteau-Couanet D, Benard J, et al. WT1 expression is inversely correlated with MYCN amplification or expression and associated with poor survival in non-MYCN-amplified neuroblastoma. *Molecular Oncology*. 2016;**10**:240-252
- [88] Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*. 2013;**339**:957-959
- [89] Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*. 2013;**339**:959-961
- [90] Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, Jr., et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;**110**:6021-6026
- [91] Bell RJ, Rube HT, Kreig A, Mancini A, Fouse SD, Nagarajan RP, et al. Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science*. 2015;**348**:1036-1039
- [92] Chiba K, Johnson JZ, Vogan JM, Wagner T, Boyle JM, Hockemeyer D. Cancer-associated TERT promoter mutations abrogate telomerase silencing. *Elife*. 2015;**4**
- [93] Liu T, Wang N, Cao J, Sofiadis A, Dinets A, Zedenius J, et al. The age- and shorter telomere-dependent TERT promoter mutation in follicular thyroid cell-derived carcinomas. *Oncogene*. 2014;**33**:4978-4984
- [94] Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nature Communications*. 2013;**4**:2218
- [95] Wang K, Liu T, Liu L, Liu J, Liu C, Wang C, et al. TERT promoter mutations in renal cell carcinomas and upper tract urothelial carcinomas. *Oncotarget*. 2014;**5**:1829-1836
- [96] Wang N, Liu T, Sofiadis A, Juhlin CC, Zedenius J, Hoog A, et al. TERT promoter mutation as an early genetic event activating telomerase in follicular thyroid adenoma (FTA) and atypical FTA. *Cancer*. 2014;**120**:2965-2979
- [97] Liu T, Liang X, Bjorkholm M, Jia J, Xu D. The absence of TERT promoter mutations in primary gastric cancer. *Gene*. 2014;**540**:266-267
- [98] Stoehr R, Taubert H, Zinnall U, Giedl J, Gaisa NT, Burger M, et al. Frequency of TERT promoter mutations in prostate cancer. *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology*. 2015;**82**:53-57
- [99] Li Y, Zhou QL, Sun W, Chandrasekharan P, Cheng HS, Ying Z, et al. Non-canonical NF-kappaB signalling and ETS1/2 cooperatively drive C250T mutant TERT promoter activation. *Nature Cell Biology*. 2015;**17**:1327-1338

- [100] Stern JL, Theodorescu D, Vogelstein B, Papadopoulos N, Cech TR. Mutation of the TERT promoter, switch to active chromatin, and monoallelic TERT expression in multiple cancers. *Genes & Development*. 2015;**29**:2219-2224
- [101] Zhou P, Wei L, Xia X, Shao N, Qian X, Yang Y. Association between telomerase reverse transcriptase rs2736100 polymorphism and risk of glioma. *The Journal of Surgical Research*. 2014;**191**:156-160
- [102] Kinnersley B, Migliorini G, Broderick P, Whiffin N, Dobbins SE, Casey G, et al. The TERT variant rs2736100 is associated with colorectal cancer risk. *British Journal of Cancer*. 2012;**107**:1001-1008
- [103] Hsu CP, Hsu NY, Lee LW, Ko JL. Ets2 binding site single nucleotide polymorphism at the hTERT gene promoter--effect on telomerase expression and telomere length maintenance in non-small cell lung cancer. *European Journal of Cancer*. 2006;**42**:1466-1474
- [104] Shen N, Lu Y, Wang X, Peng J, Zhu Y, Cheng L. Association between rs2853669 in TERT gene and the risk and prognosis of human cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2017; in press
- [105] Batista R, Cruvinel-Carloni A, Vinagre J, Peixoto J, Catarino TA, Campanella NC, et al. The prognostic impact of TERT promoter mutations in glioblastomas is modified by the rs2853669 single nucleotide polymorphism. *International Journal of Cancer*. 2016;**139**:414-423
- [106] Zinn RL, Pruitt K, Eguchi S, Baylin SB, Herman JG. hTERT is expressed in cancer cell lines despite promoter DNA methylation by preservation of unmethylated DNA and active chromatin around the transcription start site. *Cancer Research*. 2007;**67**:194-201
- [107] Guilleret I, Benhattar J. Unusual distribution of DNA methylation within the hTERT CpG island in tissues and cell lines. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;**325**:1037-1043
- [108] Guilleret I, Benhattar J. Demethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter reduced hTERT expression and telomerase activity and shortened telomeres. *Experimental Cell Research*. 2003;**289**:326-334
- [109] Zhao X, Tian X, Kajigaya S, Cantilena CR, Strickland S, Savani BN, et al. Epigenetic landscape of the TERT promoter: A potential biomarker for high risk AML/MDS. *British Journal of Haematology*. 2016;**175**:427-439
- [110] Lewis KA, Tollefsbol TO. Regulation of the telomerase reverse transcriptase subunit through epigenetic mechanisms. *Frontiers in Genetics*. 2016;**7**:83
- [111] Renaud S, Loukinov D, Abdullaev Z, Guilleret I, Bosman FT, Lobanenkov V, et al. Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene. *Nucleic Acids Research*. 2007;**35**:7372-7388

- [112] Richardson RM, Nguyen B, Holt SE, Broaddus WC, Fillmore HL. Ectopic telomerase expression inhibits neuronal differentiation of NT2 neural progenitor cells. *Neuroscience Letters*. 2007;**421**:168-172
- [113] Cairney CJ, Keith WN. Telomerase redefined: Integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie*. 2008;**90**:13-23
- [114] Soder AI, Hoare SF, Muire S, Balmain A, Parkinson EK, Keith WN. Mapping of the gene for the mouse telomerase RNA component, *Terc*, to chromosome 3 by fluorescence in situ hybridization and mouse chromosome painting. *Genomics*. 1997;**41**:293-294
- [115] Zhao JQ, Hoare SF, McFarlane R, Muir S, Parkinson EK, Black DM, et al. Cloning and characterization of human and mouse telomerase RNA gene promoter sequences. *Oncogene*. 1998;**16**:1345-1350
- [116] Zhao J, Bilslund A, Hoare SF, Keith WN. Involvement of NF-Y and Sp1 binding sequences in basal transcription of the human telomerase RNA gene. *FEBS Letters*. 2003;**536**:111-119
- [117] Coco S, Theissen J, Scaruffi P, Stigliani S, Moretti S, Oberthuer A, et al. Age-dependent accumulation of genomic aberrations and deregulation of cell cycle and telomerase genes in metastatic neuroblastoma. *International Journal of Cancer*. 2012;**131**:1591-1600
- [118] Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, Yamaoka H, Ichikawa T, Shay JW, et al. Telomerase activity in neuroblastoma: Is it a prognostic indicator of clinical behaviour? *European Journal of Cancer*. 1997;**33**:1932-1936
- [119] Krams M, Hero B, Berthold F, Parwaresch R, Harms D, Rudolph P. Full-length telomerase reverse transcriptase messenger RNA is an independent prognostic factor in neuroblastoma. *The American Journal of Pathology*. 2003;**162**:1019-1026
- [120] Streutker CJ, Thorner P, Fabricius N, Weitzman S, Zielenska M. Telomerase activity as a prognostic factor in neuroblastomas. *Pediatric and Developmental Pathology: The Official Journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society*. 2001;**4**:62-67
- [121] Ohali A, Avigad S, Ash S, Goshen Y, Luria D, Feinmesser M, et al. Telomere length is a prognostic factor in neuroblastoma. *Cancer*. 2006;**107**:1391-1399
- [122] Poremba C, Willenbring H, Hero B, Christiansen H, Schafer KL, Brinkschmidt C, et al. Telomerase activity distinguishes between neuroblastomas with good and poor prognosis. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. 1999;**10**:715-721
- [123] Taggart DR, London WB, Schmidt ML, DuBois SC, Monclair TF, Nakagawara A, et al. Prognostic value of the stage 4S metastatic pattern and tumor biology in patients with metastatic neuroblastoma diagnosed between birth and 18 months of age. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;**29**:4358-4364

- [124] Krams M, Claviez A, Heidorn K, Krupp G, Parwaresch R, Harms D, et al. Regulation of telomerase activity by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase mRNA in a subset of neuroblastomas. *The American Journal of Pathology*. 2001;**159**:1925-1932
- [125] Samy M, Gattolliat CH, Pendino F, Hillion J, Nguyen E, Bombard S, et al. Loss of the malignant phenotype of human neuroblastoma cells by a catalytically inactive dominant-negative hTERT mutant. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2012;**11**:2384-2393
- [126] Reynolds CP, Zuo JJ, Kim NW, Wang H, Lukens JN, Matthay KK, et al. Telomerase expression in primary neuroblastomas. *European Journal of Cancer*. 1997;**33**:1929-1931
- [127] Choi LM, Kim NW, Zuo JJ, Gerbing R, Stram D, Lukens JN, et al. Telomerase activity by TRAP assay and telomerase RNA (hTR) expression are predictive of outcome in neuroblastoma. *Medical and Pediatric Oncology*. 2000;**35**:647-650
- [128] Kuzyk A, Gartner J, Mai S. Identification of neuroblastoma subgroups based on three-dimensional telomere organization. *Translational Oncology*. 2016;**9**:348-356
- [129] Westermann F, Muth D, Benner A, Bauer T, Henrich KO, Oberthuer A, et al. Distinct transcriptional MYCN/c-MYC activities are associated with spontaneous regression or malignant progression in neuroblastomas. *Genome Biology*. 2008;**9**:R150
- [130] O'Brien R, Tran SL, Maritz MF, Liu B, Kong CF, Purgato S, et al. MYC-driven neuroblastomas are addicted to a telomerase-independent function of dyskerin. *Cancer Research*. 2016;**76**:3604-3617
- [131] Remke M, Ramaswamy V, Peacock J, Shih DJ, Koelsche C, Northcott PA, et al. TERT promoter mutations are highly recurrent in SHH subgroup medulloblastoma. *Acta Neuropathologica*. 2013;**126**:917-929
- [132] Koelsche C, Sahm F, Capper D, Reuss D, Sturm D, Jones DT, et al. Distribution of TERT promoter mutations in pediatric and adult tumors of the nervous system. *Acta Neuropathologica*. 2013;**126**:907-915
- [133] Lindner S, Bachmann HS, Odersky A, Schaefer S, Klein-Hitpass L, Hero B, et al. Absence of telomerase reverse transcriptase promoter mutations in neuroblastoma. *Biomedical Reports*. 2015;**3**:443-446
- [134] Papatomas TG, Oudijk L, Zwarthoff EC, Post E, Duijkers FA, van Noesel MM, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in tumors originating from the adrenal gland and extra-adrenal paraganglia. *Endocrine-Related Cancer*. 2014;**21**:653-661
- [135] Kumps C, Fieuw A, Mestdagh P, Menten B, Lefever S, Pattyn F, et al. Focal DNA copy number changes in neuroblastoma target MYCN regulated genes. *PLoS One*. 2013;**8**:e52321
- [136] Cobrinik D, Ostrovskaya I, Hassimi M, Tickoo SK, Cheung IY, Cheung NK. Recurrent pre-existing and acquired DNA copy number alterations, including focal TERT gains,

- in neuroblastoma central nervous system metastases. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2013;**52**:1150-1166
- [137] Molenaar JJ, Koster J, Zwijnenburg DA, van Sluis P, Valentijn LJ, van der Ploeg I, et al. Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature*. 2012;**483**:589-593
- [138] Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*. 2011;**144**:27-40
- [139] Kawashima M, Kojima M, Ueda Y, Kurihara S, Hiyama E. Telomere biology including TERT rearrangements in neuroblastoma: A useful indicator for surgical treatments. *Journal of Pediatric Surgery*. 2016;**51**:2080-2085
- [140] von Stedingk K, Koster J, Piqueras M, Noguera R, Navarro S, Pahlman S, et al. snoRNPs regulate telomerase activity in neuroblastoma and are associated with poor prognosis. *Translational Oncology*. 2013;**6**:447-457
- [141] Onitake Y, Hiyama E, Kamei N, Yamaoka H, Sueda T, Hiyama K. Telomere biology in neuroblastoma: Telomere binding proteins and alternative strengthening of telomeres. *Journal of Pediatric Surgery*. 2009;**44**:2258-2266
- [142] Kurihara S, Hiyama E, Onitake Y, Yamaoka E, Hiyama K. Clinical features of ATRX or DAXX mutated neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery*. 2014;**49**:1835-1838
- [143] Lundberg G, Sehic D, Lansberg JK, Ora I, Frigyesi A, Castel V, et al. Alternative lengthening of telomeres--an enhanced chromosomal instability in aggressive non-MYCN amplified and telomere elongated neuroblastomas. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2011;**50**:250-262
- [144] Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene*. 2002;**21**:598-610
- [145] Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Research*. 1999;**59**:4175-4179
- [146] Nabetani A, Ishikawa F. Alternative lengthening of telomeres pathway: Recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells. *Journal of Biochemistry*. 2011;**149**:5-14
- [147] Sausen M, Leary RJ, Jones S, Wu J, Reynolds CP, Liu X, et al. Integrated genomic analyses identify ARID1A and ARID1B alterations in the childhood cancer neuroblastoma. *Nature Genetics*. 2013;**45**:12-17
- [148] Cheung NK, Zhang J, Lu C, Parker M, Bahrami A, Tickoo SK, et al. Association of age at diagnosis and genetic mutations in patients with neuroblastoma. *Journal of the American Medical Association*. 2012;**307**:1062-1071

- [149] Clynes D, Higgs DR, Gibbons RJ. The chromatin remodeller ATRX: A repeat offender in human disease. *Trends in Biochemical Sciences*. 2013;**38**:461-466
- [150] Law MJ, Lower KM, Voon HP, Hughes JR, Garrick D, Viprakasit V, et al. ATR-X syndrome protein targets tandem repeats and influences allele-specific expression in a size-dependent manner. *Cell*. 2010;**143**:367-378
- [151] Lewis PW, Elsaesser SJ, Noh KM, Stadler SC, Allis CD. Daxx is an H3.3-specific histone chaperone and cooperates with ATRX in replication-independent chromatin assembly at telomeres. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;**107**:14075-14080
- [152] Heaphy CM, de Wilde RF, Jiao Y, Klein AP, Edil BH, Shi C, et al. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science*. 2011;**333**:425
- [153] Akiyama M, Hideshima T, Shamma MA, Hayashi T, Hamasaki M, Tai YT, et al. Effects of oligonucleotide N3'→P5' thio-phosphoramidate (GRN163) targeting telomerase RNA in human multiple myeloma cells. *Cancer Research*. 2003;**63**:6187-6194
- [154] Shamma MA, Koley H, Bertheau RC, Neri P, Fulciniti M, Tassone P, et al. Telomerase inhibitor GRN163L inhibits myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Leukemia*. 2008;**22**:1410-1418
- [155] Asai A, Oshima Y, Yamamoto Y, Uochi TA, Kusaka H, Akinaga S, et al. A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent. *Cancer Research*. 2003;**63**:3931-3939
- [156] Puissant A, Frumm SM, Alexe G, Bassil CF, Qi J, Chanthery YH, et al. Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition. *Cancer Discovery*. 2013;**3**:308-323
- [157] Yin X, Giap C, Lazo JS, Prochownik EV. Low molecular weight inhibitors of Myc-Max interaction and function. *Oncogene*. 2003;**22**:6151-6159
- [158] Muller I, Larsson K, Frenzel A, Oliynyk G, Zirath H, Prochownik EV, et al. Targeting of the MYCN protein with small molecule c-MYC inhibitors. *PLoS One*. 2014;**9**:e97285
- [159] Tarkanyi I, Dudognon C, Hillion J, Pendino F, Lanotte M, Aradi J, et al. Retinoid/arsenic combination therapy of promyelocytic leukemia: Induction of telomerase-dependent cell death. *Leukemia*. 2005;**19**:1806-1811
- [160] Pendino F, Dudognon C, Delhommeau F, Sahraoui T, Flexor M, Bennaceur-Griscelli A, et al. Retinoic acid receptor alpha and retinoid-X receptor-specific agonists synergistically target telomerase expression and induce tumor cell death. *Oncogene*. 2003;**22**:9142-9150
- [161] Pendino F, Flexor M, Delhommeau F, Buet D, Lanotte M, Segal-Bendirdjian E. Retinoids down-regulate telomerase and telomere length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;**98**:6662-6667

- [162] Almeida VR, Vieira IA, Buendia M, Brunetto AT, Gregianin LJ, Brunetto AL, et al. Combined treatments with a retinoid receptor agonist and epigenetic modulators in human neuroblastoma cells. *Molecular Neurobiology*. 2016; in press
- [163] Pendino F, Tarkanyi I, Dudognon C, Hillion J, Lanotte M, Aradi J, et al. Telomeres and telomerase: Pharmacological targets for new anticancer strategies? *Current Cancer Drug Targets*. 2006;**6**:147-180
- [164] Wu YL, Dudognon C, Nguyen E, Hillion J, Pendino F, Tarkanyi I, et al. Immunodetection of human telomerase reverse-transcriptase (hTERT) re-appraised: Nucleolin and telomerase cross paths. *Journal of Cell Science*. 2006;**119**:2797-2806

INTECH

INTECH

## Annexe 5 : Curriculum Vitae

### **Delphine Garsuault**

Doctorante en 3<sup>ème</sup> année de thèse  
delphine.garsuault@gmail.com

#### **EXPÉRIENCES PROFESSIONNELLES**

Mai 2016 – Actuel :

**Thèse** au Centre Interdisciplinaire de Chimie et de Biologie (CICB) au sein de l'UMR-S 1007, Paris, sous la direction du Dr Evelyne SEGAL-BENDIRDJIAN

**Financement** : Bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (MESRI)

**Sujet** : Régulation épigénétique de la télomérase dans un modèle de leucémie aiguë promyélocytaire

**Techniques utilisées** : Nucleosome Occupancy and Methylome sequencing (NOMe-seq), Hybridation in situ en fluorescence, en 3 dimensions (3D-FISH), Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Octobre 2015 – Mai 2016 :

**Thèse** à l'institut Gustave Roussy, abandonnée au profit d'un autre laboratoire et d'un autre sujet de thèse.

Mars 2014 – Août 2014 (6 mois)

**Stage de fin d'études** à l'Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Paris

**Sujet** : Étude des effets de l'orexine A dans des multi-thérapies contre le cancer du pancréas

Été 2013 (9 semaines)

**Stage** au laboratoire de recherche de Jacobs University, Brême (Allemagne)

**Sujet** : Étude de la thermostabilité de liposomes, avec carboxyfluoresceine encapsulée à l'intérieur, dans le temps et en fonction de la température

#### **FORMATION**

2016 – Actuel : **Doctorat de science à l'école doctorale Cancérologie, Biologie, Médecine, Santé (CBMS)**, rattachée à la faculté Paris Sud

2011 - 2014 **Cursus Ingénieur Agronome - VetAgro Sup** (Clermont-Ferrand - 63)

2013 – 2014 (Spécialisation) **BIOTECH - AgroParisTech** (Paris)

**Projet de fin d'études : Les biomatériaux et leurs applications**

2008 - 2011 Classe Préparatoire aux Grandes Ecoles BCPST - Lycée Jacques Prévert (Boulogne - 92)

#### **LANGUES**

Anglais : \*\*\*\* (TOEIC : 905/990)

Japonais : \*

Allemand : \*

#### **INFORMATIQUE ET TECHNIQUE**

Maîtrise des logiciels Office, du logiciel ImageJ (adaptation du code d'un plugin à mon étude), du code sous Scilab, des logiciels de séquençages en ligne (BLAST notamment)

Maîtrise des techniques de NOMe-seq, FISH, ChIP, PCR, qPCR, extraction d'ADN et d'ARN, culture cellulaire, analyses bioinformatiques, microscopie confocale

#### **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES**

**Participation à l'écriture d'une revue** : El Hajj J, Garsuault D, Bouyer C, Nguyen E, Hilal G, Ségala-Bendirdjian E. Telomere and Telomerase in Neuroblastoma. "Neuroblastoma" ISBN 978-953-51-5514-0  
Book edited by: Chandrika Shivappa Gowda. Chapitre de livre

<https://www.intechopen.com/books/neuroblastoma-current-state-and-recent-updates/telomeres-and-telomerase-in-neuroblastoma>

#### **VIE ASSOCIATIVE**

Représentante des doctorants au conseil de l'école doctorale CBMS

Responsable du club Téléthon à VetAgro Sup

#### **CENTRES D'INTÉRÊT**

Culture asiatique, en particulier japonaise

Écriture : **Premier roman publié** sous le titre **Magic Academy** (Chemin Vert éditions)

**Titre : Régulation épigénétique de la télomérase dans un modèle de leucémie aiguë promyélocytaire**

**Mots clés :** télomérase, régulation épigénétique, leucémie aiguë promyélocytaire

**Résumé :** La télomérase est présente dans un nombre limité de cellules, telles que la plupart des cellules cancéreuses où son activité est indispensable pour l'immortalisation de ces dernières. C'est pourquoi cette enzyme a été proposée comme cible prometteuse pour des thérapies anticancéreuses. Ainsi, il est d'un intérêt certain d'identifier les mécanismes par lesquels elle est régulée, notamment via sa sous-unité catalytique, *hTERT*. Les rétinoïdes sont des inducteurs bien connus de la maturation granulocytaire associée à une répression de *hTERT* dans les blastes de leucémie aiguë promyélocytaire (LAP). Dans une lignée cellulaire LAP résistant à la maturation induite par les rétinoïdes (NB4-LR1), a précédemment été identifiée une nouvelle voie de répression transcriptionnelle de *hTERT* en absence de différenciation. De plus, mon laboratoire d'accueil a isolé un variant de la lignée NB4-LR1 résistant à cette

répression transcriptionnelle de *hTERT*, la lignée NB4-LR1<sup>SFD</sup>. Ensemble, ces lignées cellulaires, qui se comportent différemment face à un traitement à l'ATRA, fournissent un outil unique et puissant pour obtenir plus d'informations sur plusieurs problèmes de la régulation de la biologie moléculaire de la télomérase. Dans cette étude, en utilisant plusieurs approches complémentaires (immunoprécipitation de la chromatine combinée à une technique d'analyse à haut débit du positionnement des nucléosomes et de la méthylation de l'ADN et une approche de FISH), j'ai pu obtenir une vue intégrée des événements épigénétiques qui promeuvent la transition du promoteur de *hTERT* d'un état silencieux à un état actif et inversement. Cette information sera cruciale pour le développement de stratégies anticancéreuses ciblant l'expression de *hTERT*

**Title: Epigenetic regulation of telomerase in an acute promyelocytic leukemia model**

**Keywords:** telomerase, epigenetic regulation, promyelocytic acute leukemia

**Abstract:** Telomerase is present in a limited number of cells, most of them cancerous where its activity is crucial for their immortalisation. Thus, that enzyme has been proposed as a promising target for anticancer therapies. Therefore, it is of great interest to identify the mechanisms by which it is regulated, notably through its catalytic subunit *hTERT*. Retinoids are well-known inducers of granulocytic maturation associated with *hTERT* repression in acute promyelocytic leukemia

cells resistant to this repression: NB4-LR1<sup>SFD</sup>. These two cell lines, which behave distinctly in response to ATRA treatment, provide a unique and interesting tool to gain further insights into the molecular biology of telomerase regulation. In this thesis project, using several complementary approaches (chromatin immunoprecipitation combined to a high-resolution, single-molecule nucleosome positioning assay and DNA methylation, and a FISH approach) allowed me to shed

(APL) blasts. However, in NB4-LR1, a maturation-resistant APL cell line, was previously identified a new pathway of retinoid-induced hTERT transcriptional repression independent of differentiation. Furthermore, my host lab reported the isolation of a variant of NB4-LR1 more light on the integrated epigenetic events that lead to hTERT promoter transition from its silent to its active state and vice versa. The information obtained could be crucial for the development of anticancer strategies targeting hTERT expression.