Université de Reims Champagne Ardenne

UFR Pharmacie

2005 N°

THESE

Présentée pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE REIMS-CHAMPAGNE ARDENNE

Spécialité : Biologie Moléculaire et Physiologie

Par

Thibault LEMARTELEUR

Né le 29 avril 1975 à Reims (51)

Etude de ligands de l'ADN G-quadruplexe sur la transcription et la prolifération dans des lignées cellulaires humaines

Laboratoire d'Onco-Pharmacologie JE2428

IFR53 Biomolécule - 51, rue Cognacq Jay

51096 Reims Cedex

Présentée publiquement le 13 septembre 2005

Membres du Jury

Président :	Monsieur le docteur Jean Louis Mergny (Paris)
Rapporteurs :	Madame le docteur Evelyne Ségal-Bendirdjian (DR2 CNRS) (Paris)
	Monsieur le docteur José Arturo Londoño-Vallejo (CR1 CNRS) (Paris)
Examinateurs :	Monsieur le docteur Patrick Mailliet (Paris)
	Monsieur le professeur Jean Marc Millot (Reims)
Directeur de thèse :	Monsieur le professeur Jean François Riou (Reims)

A mes parents

A mes soeurs

A Lauriane

A Léane

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Monsieur le Professeur Jean-François Riou pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire JE Onco-Phramacologie et permis d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions. Soyez assuré de mon plus profond respect.

Je témoigne toute ma gratitude à Monsieur le docteur Dennis Gomez pour son aide précieuse apportée au cours de ce travail.

Je voudrais remercier vivement Madame le docteur Evelyne Ségal-Bendirdjian et Monsieur le Docteur José Arturo Londoño-Vallejo d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également Monsieur le docteur Jean-Louis Mergny, Monsieur le Docteur Patrick Mailliet et Monsieur le Professeur Jean-Marc Millot d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

Je remercie Hélène et Alain pour leurs aides précieuses apportées pour les expériences de séquençage, et toutes les personnes ayant contribué à cette thèse.

Je remercie également tous les membres de la JE Onco-pharmacologie.

Je voudrais remercier mes parents pour tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Enfin, Je voudrais remercier Lauriane pour son soutien durant toutes ces années, pour ses conseils et son aide précieuse apportée lors de la réalisation de ce mémoire. Avec tout mon amour.

Abréviations

A :	adénine
ADN :	acide désoxyribonucléique
ALT :	alternative lengthening of telomeres
APB :	ALT associated PML bodies
ARN :	acide ribonucléique
b :	base
β-gal :	β-galactosidase
BLM :	Bloom
C :	cytosine
CHAPS :	3-[3-(Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CI_{50} :	concentration inhibitrice de 50% de l'activité
c-myc :	myelocytomastosis
D-loop :	displacement loop
DMSO :	diméthylsulfoxyde
ECTR :	extrachromosomal telomeric repeat
EDTA :	acide éthylenediamine tétra-acétique
G :	guanine
hTERT :	human telomerase reverse transcriptase
hTR :	human telomerase RNA
kb :	kilobase
kDa :	kilo-Dalton
pb :	paire de bases
PCR :	polymerase chain reaction
PD :	doublement de population
PIP1 :	POT1 interacting protein 1
PML :	promyelocytic leukemia
POT_1 :	protection of telomere 1
RT :	reverse transcriptase
SV40 :	Simian Virus 40
SVF :	sérum de veau fœtal
T :	thymine
TANK :	tankyrase
TBE :	Tris/Borate/EDTA
T-loop :	telomeric loop
TRAP :	telomeric repeat amplification protocol
TRF1-2 :	TTAGGG repeat factor 1 -2
Tris-HCl :	hydrochlorure de Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV :	ultraviolet
WRN :	Werner

Sommaire

Avant Propos *8*
I. Introduction *9*
A. Les télomères *10*
1. Historique **10**
2. Description et Structure **11**
3. Le problème de la réplication terminale **13**
4. Les télomères chez les différentes espèces **14**
5. Les protéines associées au télomère chez l'homme **15**
a. TRF1 15
b. TRF2 16
c. POT_1 16
6. La sénescence cellulaire **18**
B. Le mécanisme d'allongement des télomères par la télomérase *21*
1. Historique et introduction **21**
2. Structure **21**
a. La sous-unité catalytique TERT 22
b. La sous-unité ribonucléotidique TR 23
3. Fonctionnement de la télomérase **25**
4. La régulation de la télomérase **25**
a. La régulation de la transcription du gène hTERT 25
b. La régulation de la transcription du gène hTR 29
C. Télomère et ALT *32*
1. Introduction et historique **32**
2. Les télomères dans les cellules ALT **33**
3. Les protéines associées aux mécanismes ALT **35**
4. La recombinaison dans les cellules ALT **38**
a. La recombinaison inter-télomérique 38
b. Recombinaison, T-loop, cercle télomérique et ECTR 40
c. Les échanges entre chromatides sœurs 40
5. Fréquence des recombinaisons homologues dans les cellules ALT **41**
6. Expression de l'activité télomérase dans les cellules ALT **42**
D. La régulation des télomères *44*
1. hTERT dans la protection des télomères **44**
2. TRF1 et les protéines de la coiffe télomérique associées **44**
3. TRF2 et les protéines de la coiffe télomérique associées **46**

4. POT_1 dans la régulation des télomères ... 48
5. Interconnexion TRF1-TRF2-POT_1 ... 50
6. Structure en T-loop et protection des télomères ... 51
7. La régulation des télomères chez la levure ... 53
8. La régulation des télomères chez l'homme ... 54
9. La réponse aux dommages de l'ADN ... 56
E. Les structures G-quartets et G-quadruplexes ... 58
1. Structure ... 58
2. G-quadruplexe et télomère ... 61
3. Les autres G-quadruplexes potentiels du génome ... 61
a. Les régions « switch » des immunoglobulines ... 61
b. Les régions répétées du rDNA et du centromère ... 62
c. Les promoteurs de gènes ... 62
4. Quadruplexe et ARN ... 67
5. Protéines reconnaissant les G-quadruplexes ... 68
a. Hélicases et topoisomérases ... 68
b. Nucléoline et hnRNP ... 69
c. Les autres protéines reconnaissant les G-quadruplexes ... 69
F. Inhiber l'activité télomérase et lutte contre le cancer ... 70
1. Les stratégies visant la télomérase ... 71
a. La sous-unité hTR ... 71
b. La sous unité hTERT ... 72
c. Le complexe hTR – hTERT ... 72
2. Les stratégies visant les G-quadruplexes et le télomère ... 73
a. TMPyP4 ... 74
b. BRACO19 ... 75
c. L'éthidium et son dérivé le 9944 ... 75
d. Les dérivés de triazine 12459 et 115405 ... 76
e. La télomestatine ... 77
f. Le dérivé du 2,6-pyridine-dicarboxamide : A003129307A (307A) ... 78
G. Conclusion et présentation des objectifs du travail ... 79
II. Matériels et Méthodes ... 80
A. Culture cellulaire ... 81
1. Les lignées cellulaires ... 81
a. Les lignées Ramos et CA46 ... 81
b. Les lignées A549 et JFD11 ... 81
c. Les lignées MRC_5V_1, MRC_5V_1-MIGR1, MRC_5V_1-hTERT et MRC_5V_1-DN-hTERT ... 81
d. Les lignées WI38, VA13, VA13-33.3 et JW10 ... 82

2. Conditions de cultures **82**
a. Généralités 82
b. Entretien des lignées 82
c. Conservation des cellules 83
B. Prolifération et viabilité cellulaire ***83***
1. Mesure de la viabilité cellulaire **83**
2. Détermination de la prolifération et de la viabilité cellulaire par mesure de la réduction du MTT **83**
C. Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR ***83***
1. Extraction et dosage des ARN totaux **83**
2. Transcription inverse **84**
3. Réaction de polymérisation en chaîne **84**
4. Analyse des produits de PCR **85**
D. Le test de PCR stop assay ***85***
1. Principe **85**
2. Les oligonucléotides **86**
3. Les tampons **86**
4. Protocole **87**
E. Le test RT stop assay ***88***
1. Principe **88**
2. Oligonucléotides **88**
3. Protocole **88**
F. Insertion d'un G-quadruplexe dans une séquence codante ***89***
1. Amplification de G4-POT$_1$ **89**
2. Insertion des G4-POT$_1$ dans le plasmide pET22b et clonage **89**
3. Séquençage des plasmides G4-1-POT$_1$ **90**
4. Amplification PCR des plasmides pET22b-G4-POT$_1$ **91**
5. Synthèse protéique des G4-POT$_1$ dans E. coli **91**
6. Traduction in vitro par le test TnT® couplé à des lysats de réticulocytes (PROMEGA) **92**
7. Transcription par le système Riboprobe® (PROMEGA) **93**
G. Action de ligands de G-quadruplexe sur la sénescence cellulaire ***93***
H. Les tests TRAP et TRAP-G4 (Telomeric Repeat Amplification Protocol) ***94***
1. Principe **94**
2. Préparation des extraits protéiques **96**
3. Protocole du test TRAP **96**
4. Protocole du test TRAP-G4 ..... **96**
I. Restriction des fragments télomériques (TRF) ***96***

1. Principe du TRF **96**
2. Protocoles **97**
a. Préparation de la sonde brin C radiomarquée 97
b. Préparation des ADN 97
c. Hybridation 97
J. Expérience d'hybridation en solution ***97***
1. Principe **97**
2. Protocoles **98**
III. Résultats et Discussions ***99***
A. Action de ligands G4 sur les complexes réplication, transcription et traduction ***99***
1. Ligands G4 et promoteur du gène c-myc **100**
a. But du travail 100
b. Action des ligands G4 sur la transcription de *c-myc* dans les lignées Ramos et CA46 101
c. Le test de PCR stop assay (figure 51) 104
d. Publication 1 : Stabilisation of the *c-myc* gene promoter quadruplex by specific ligands' inhibitors of telomerase. 105
α. Résumé en français 105
β. Publication 106
χ. Résultats complémentaires 113
e. Discussion et conclusion 120
2. Ligands G4 et épissage alternatif de hTERT **122**
a. But du travail 122
b. Publication 2 : Telomerase downregulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing. 122
α. Résumé en français 122
β. Publication 123
χ. Commentaires 132
δ. Résultats complémentaires 135
c. Discussion et conclusion 140
3. Effet de l'insertion d'un G- quadruplexe dans une séquence codante **142**
a. But du travail 142
b. Construction d'ADNc chimères de POT_1 142
c. Synthèse protéique de G4-POT_1 dans *E.coli* 145
d. Amplification PCR des plasmides pET22b-G4-POT_1 145
e. PCR stop assay de la séquence télomérique du cilié G4-1 148
f. Effet des ligands de G-quadruplexe sur la transcription / traduction des protéines chimères G4-1-POT_1 et G4-2-POT_1. 149
g. Discussion 152
B. Action de ligands G4 sur la croissance cellulaire ***155***
1. But du travail **155**

2. Action de ligands G4 sur des lignées dérivées de la souche fibroblastique humaine MRC5 155

a. Caractérisation des lignées MRC5V1, MRC5V1-MIGR1, MRC5V1-hTERT et MRC5V1-DNhTERT 155

b. Action de ligands G4 sur l'entrée en sénescence 156

3. Action de ligands G4 sur des lignées dérivées de la souche fibroblastique humaine WI38 161

a. Caractérisation des lignées..... 161

b. Effets cellulaires de la télomestatine : étude de la cytotoxicité à court terme..... 163

c. Effets cellulaires des ligands G4 : étude de sénescence..... 164

d. Effets des ligands G4 sur le télomère simple brin..... 167

4. Discussion 171

C. Conclusion générale..... 176

IV. Références Bibliographiques 179

V. Annexes..... 218

Avant Propos

Depuis plusieurs dizaines d'années, la communauté scientifique cherche à découvrir de nouvelles stratégies pour lutter contre le cancer. Devant le nombre considérable de personnes atteintes par cette maladie, plusieurs équipes ont focalisé leur recherche sur cette pathologie. Parmi les thématiques étudiées, les extrémités chromosomiques (les télomères) présentent de nombreux avantages pour de nouvelles approches anti-cancéreuses. En effet, le complexe télomérique possède des spécificités dans les cellules cancéreuses. La découverte de nouveaux médicaments dirigés contre ces télomères permettrait d'augmenter l'efficacité des traitements, de diminuer l'aspect cytotoxique des molécules et également de réduire leurs effets secondaires afin d'améliorer les conditions de vie des malades. Notre laboratoire s'est donc spécialisé dans l'étude des télomères afin d'apporter de nouvelles connaissances, de nouvelles techniques et de contribuer à l'élaboration de nouveaux médicaments pour lutter contre le cancer.

Ce mémoire présente dans une première partie les dernières connaissances sur la thématique des télomères puis dans une deuxième, les approches expérimentales réalisées au cours de mon travail.

I. Introduction

A. Les télomères

1. *Historique* (Wai L. K., 2004)

Télomère provient des mots grecs signifiant « la fin » (telos) et « la partie » (meros). C'est en 1938 que Hermann J. Muller et Barbara Mc Clintock décrivent pour la première fois le télomère. Muller observa que les extrémités chromosomiques ne subissaient pas de délétions ni d'inversions après irradiation aux rayons X alors que le reste du génome en présentait (Muller H. J., 1938). Mc Clintock démontra que des chromosomes de maïs ayant subi des cassures double brin étaient capables de fusionner entre eux alors que les extrémités de ces chromosomes restaient stables (Mcclintock B, 1939) (Lebel C., et al., 2004). Ces auteurs décrivent le télomère comme étant une structure protectrice de l'extrémité des chromosomes. Lorsque cette protection est absente, il apparaît des fusions chromosomiques suivies d'une mort cellulaire. En 1961, Hayflick donne une description biologique du vieillissement. Il découvre que des cellules somatiques humaines ont une capacité de division limitée (Hayflick L., et al., 1961). Lorsque cette limite est dépassée, les cellules montrent des modifications biochimiques et morphologiques qui entraînent un arrêt de la prolifération cellulaire appelée sénescence (Shay J. W., et al., 2000) (Greider C. W., et al., 1996).

Dans les années 70, James D Watson décrit ce qu'il appelle le problème de la réplication terminale (the end replication problem). Pendant la réplication, l'ADN polymérase ne réplique pas complètement l'extrémité 5' terminale des chromosomes, ce qui entraîne la perte d'une petite partie du télomère. Il propose également qu'un mécanisme de protection de l'extrémité chromosomique soit nécessaire sinon le télomère raccourcit à chaque division (Watson J. D., 1972).

Le rapprochement entre la sénescence cellulaire et le problème de la réplication terminale a été fait par Aleksei Matveevich Olovnikov en 1971. Il propose une théorie dans laquelle le raccourcissement télomérique correspond à une horloge interne qui régule le nombre de divisions cellulaires et contrôle le vieillissement (Olovnikov A. M., 1971). Cette théorie a été confirmée par Harley en 1990 lorsqu'il observe une diminution progressive de la taille du télomère dans des cellules en division en culture cellulaire (Harley C. B., et al., 1990).

L'enzyme responsable du maintien de la taille du télomère a été découverte par l'équipe d'E. Blackburn en 1985 (Greider C. W., et al., 1985). En 1989, Morin montre l'existence d'une activité télomérase dans des cellules cancéreuses humaines contribuant à l'immortalisation des cellules tumorales (Morin G. B., 1989). Au même moment, l'équipe de

Greider montre que la télomérase est quasiment absente dans des cellules somatiques normales (Harley C. B., et al., 1990). Depuis les années 90, près de 2600 lignées tumorales ont été examinées et la télomérase est présente dans environ 90% des cellules cancéreuses (Greider C. W., et al., 1996).

Mais qu'en est-il des 10% restantes ? En 1997, Roger Reddel décrit des études réalisées sur des lignées en présence du Simian Virus 40 (SV40), du papillomavirus humain (HPV), de l'adénovirus, d'agents carcinogènes ou irradiées. Dans la plupart des cas, les cellules présentent une augmentation de l'espérance de vie et certaines deviennent immortelles (Bryan T. M., et al., 1997). Dans les ¾ des cas, les cellules montrent une activité télomérase augmentée. Dans le quart restant, et de façon surprenante, les cellules ne montrent pas d'activité télomérase mais présentent des télomères de longue taille et très hétérogènes. Il propose que ces cellules « télomérase négatives » maintiennent la taille de leur télomère par un nouveau mécanisme qu'il nomme ALT pour « Alternative Lengthening of Telomeres » et que le maintien des télomères dans ces cellules peut être dû à un mécanisme de recombinaison non réciproque entre les télomères, comme chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Bryan T. M., et al., 1997). En 2000, l'équipe de R. Reddel montre que ce mécanisme ALT est bien dû à des recombinaisons homologues (Dunham M. A., et al., 2000).

2. Description et Structure

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques complexes qui protègent l'extrémité des chromosomes. Ils interviennent dans des fonctions essentielles de la cellule (Blackburn E. H., 2001) :

- Ils préviennent des cassures doubles brins. Ils permettent également différencier les extrémités du chromosome d'éventuelles lésions de l'ADN afin de maintenir l'intégrité du génome.
- Ils protègent le génome des fusions chromosomiques et des recombinaisons.
- Ils protègent les chromosomes des exonucléases.
- Ils permettent de contrôler le nombre de divisions des cellules somatiques et d'induire à terme la sénescence cellulaire et/ou l'apoptose.
- Ils participent à une bonne répartition spatiale et une organisation fonctionnelle des chromosomes dans le noyau et interviennent dans la régulation de la transcription.

Chez l'homme, leur taille varie de 5 à 15 kilobases (kb) (Morin G. B., 1989). Ils présentent de nombreux résidus de guanines et sont composés d'une partie double brin contenant des séquences répétées en tandem, suivie d'une extrémité simple brin en 3'

terminale (*Figure 1*). Le nombre de répétitions varie selon les espèces, les individus et également selon les différents chromosomes d'une cellule. L'analyse de l'ADN télomérique chez différentes espèces montre que la séquence des extrémités des chromosomes est relativement bien conservée (*Tableau 1*) (Wikipedia). Dans tous les organismes étudiés, le brin riche en guanines (G-riche), correspondant à l'extrémité 3', est plus long que le brin complémentaire riche en cytosines (C-riche), créant ainsi une extension simple brin en 3' du chromosome (*Figure 1*). Cette extension simple brin est essentielle pour assurer la fonction de protection du télomère au niveau des chromosomes (De Lange T., 2001).

Groupe	Organisme	Répétitions télomériques (5' vers 3')
Vertebrates	*Human, mouse, Xenopus*	TTAGGG
Filamentous fungi	*Neurospora*	TTAGGG
Slime molds	*Physarum*, *Didymium* *Dictyostelium*	TTAGGG AG(1-8)
Kinetoplastids protozoa	*Trypanosoma*, *Crithidia*	TTAGGG
Ciliate protozoa	*Tetrahymena*, *Glaucoma* *Paramecium* *Oxytricha*, *Stylonychia*, *Euplotes*	TTGGGG TTGGG(T/G) TTTTGGGG
Apicomplexan protozoa	*Plasmodium*	TTAGGG(T/C)
Higher plants	*Arabidopsis, Silene*	TTAGGG
Algae	*Chlamydomonas*	TTTTAGGG
Insects	*Bombyx mori*	TTAGG
Roundworms	*Ascaris lumbricoides*	TTAGGC
Fission yeasts	*Schizosaccharomyces pombe*	TTAC(A)(C)G(1-8)
Budding yeasts	*Saccharomyces cerevisiae* *Candida glabrata* *Candida albicans* *Candida tropicalis* *Candida maltosa* *Candida guillermondii* *Candida pseudotropicalis* *Kluyveromyces lactis*	TGTGGGTGTGGTG (from RNA) or G(2-3)(TG)(1-6)T (consensus) GGGGTCTGGGTGCTG GGTGTACGGATGTCTAACTTCTT GGTGTA[C/A]GGATGTCACGATCATT GGTGTACGGATGCAGACTCGCTT GGTGTAC GGTGTACGGATTTGATTAGTTATGT GGTGTACGGATTTGATTAGGTATGT

Tableau 1. Structure primaire des télomères. Séquences télomériques des chromosomes de différents organismes (Wikipedia).

-Chromosome ---5'-TTAGGGTTAGGG(TTAGGG)$_n$TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGT-- 3'

-Chromosome ---3'-AATCCCAATCCC(AATCCC)$_n$AATCCCAATCCC- 5'

Répétitions télomériques double brin

Extension télomérique simple brin

Figure 1. Structure primaire de l'ADN d'un télomère humain

3. Le problème de la réplication terminale

Rieko Ohki et al ont été les premier à démontrer l'existence du problème de la réplication terminale en établissant un modèle *in vitro* de réplication (Ohki R., et al., 2001). La réplication de l'ADN se fait dans le sens 5' vers 3'. Elle est initiée à divers endroits par la fixation d'amorces d'ARN qui sont allongées par la polymérase. Ces amorces sont ensuite éliminées par une autre polymérase. L'élimination de l'amorce d'ARN laisse une extrémité simple brin de l'ADN (*Figure 2*).

1. La réplication des 2 brins d'ADN est réalisée dans des directions opposées à partir de l'origine de réplication.
2. A la fin de la réplication, seule une amorce d'ARN reste présente au niveau de l'extrémité de chaque brin néoformé.
3. Les dernières amorces sont éliminées par l'action d'une 5'→ 3' exonucléase laissant une extrémité simple brin.
4. Chaque cycle de réplication génère un raccourcissement des extrémités télomériques.

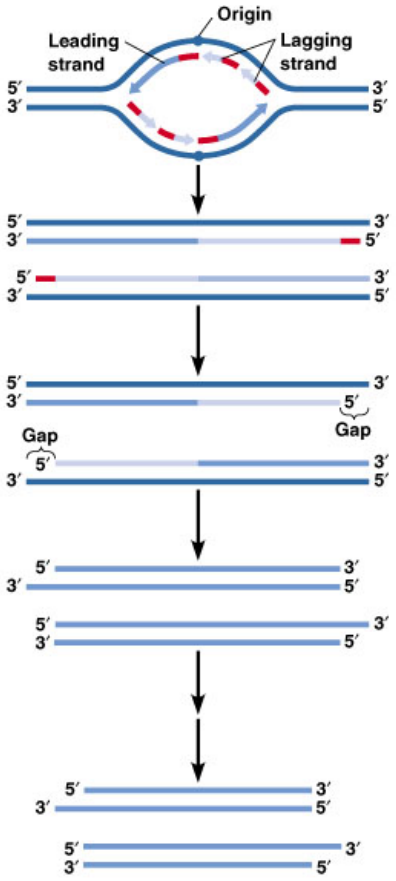


Figure 2. « The end replication problem »

Le raccourcissement de la taille des télomères est cependant plus complexe. En effet, la perte de l'amorce d'ARN à l'extrémité télomérique induit un raccourcissement d'une dizaine de nucléotides par division et uniquement sur l'extrémité 3' terminale (Smogorzewska A., et al., 2004). Or, les télomères humains et murins raccourcissent de 50 à 150 pb par division. Ceci suggère qu'il existe d'autres mécanismes de dégradation du télomère, comme l'action d'exonucléases.

4. Les télomères chez les différentes espèces

La séquence des télomères est variable en fonction des espèces. C'est chez le protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila* que la première séquence télomérique fut déterminée (Blackburn E. H., et al., 1978). Ses télomères sont composés de la séquence TTGGGG répétée de 50 à 70 fois.

Chez la levure, la séquence télomérique peut être différente pour chaque télomère et le nombre de guanines dans chacune des répétitions peut varier. Cette variation de répétitions télomériques est due à un alignement de la sous-unité d'ARN de la télomérase à différents endroits du télomère (Forstemann K., et al., 2000). Les télomères de *Saccharomyces cerevisiae* ont une taille d'environ 300pb constitués de séquences répétées TG_{1-3}. Les régions subtélomériques sont composées d'une région appelée Core X qui contient des séquences consensus ARS (Autonomously Replicating Sequences : séquence d'ADN caractéristique des origines de réplication) et de 0 à 4 copies de régions Y' plus proches des télomères. Entre X et Y', se trouvent généralement de courtes répétitions subtélomériques en nombre variable contenant des répétitions télomériques dégénérées de vertébrés (*Figure 3*). Cette organisation particulière du télomère joue un rôle important dans des processus de recombinaison télomérique (Pryde F. E., et al., 1997).

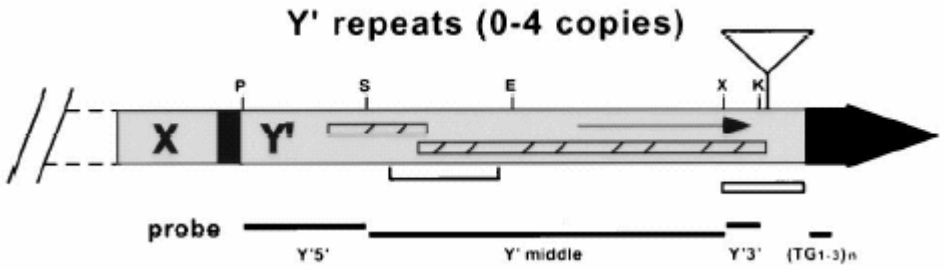


Figure 3. Structure télomérique et subtélomérique de S. cerevisiae (d'après (Teng S. C., et al., 1999).

Chez les mammifères, les télomères sont plus longs et leurs tailles sont très variables d'une lignée à une autre. Chez de nombreux vertébrés, la séquence télomérique est bien conservée. Elle consiste en une répétition en tandem de la séquence TTAGGG (Moyzis R. K., et al., 1988).

La longueur des extrémités simple brin est également différente en fonction des espèces. Chez *Tetrahymena thermophila* elle varie de 14 à 21 nucléotides et reste constante sur tous les chromosomes. Cependant, la taille de cette extension peut varier lorsque les cellules sont soumises à certaines restrictions nutritionnelles et lorsque les cellules sortent du cycle cellulaire (Jacob N. K., et al., 2001). Chez *Saccharomyces cerevisiae,* l'extension simple brin est relativement stable (de 12 à 15 bases) mais peut atteindre plus de 30 nucléotides pendant la phase S. Chez l'homme, l'extension simple brin présente une taille de 150 à 400 bases qui serait présente durant toutes les phases du cycle cellulaire (Wright W. E., et al., 1997).

5. Les protéines associées au télomère chez l'homme

Des études réalisées chez plusieurs espèces ont montré que les télomères sont des complexes ribonucléoprotéiques dans lesquels, l'ADN est associé à de nombreuses protéines. TRF1, TRF2 et POT_1 représentent les 3 protéines principales se liant directement à l'ADN télomérique. Elles interagissent avec d'autres protéines qui seront décrites dans le chapitre « La régulation des télomères ».

a. TRF1

En 1992, le groupe de T. de Lange a identifié la première protéine spécifique de l'ADN télomérique et l'a appelée TRF1 pour TTAGGG repeat factor 1 (Zhong Z., et al., 1992). TRF1 fixe l'ADN double brin linéaire et circulaire mais pas l'ADN simple brin. De plus, cette protéine est spécifique de la répétition TTAGGG présente au niveau des télomères de mammifères. Elle a été identifiée comme étant une protéine de 60kDa formant un homodimère grâce à un domaine TRFH (TRF homology) de dimérisation. Elle fait partie des protéines se liant à l'ADN par l'intermédiaire d'un domaine type Myb (Smith S., et al., 1997). A son extrémité N terminale, se trouve un domaine acide pouvant servir de site de reconnaissance pour des protéines de régulation (*Figure 4*). Le rôle de TRF1 a été déterminé en modifiant son expression dans des cellules exprimant la télomérase. La surexpression de TRF1 entraîne une diminution de la taille des télomères alors que la surexpression d'un dominant négatif de TRF1 entraîne une élongation des télomères (Smogorzewska A., et al.,

2000) (Van Steensel B., et al., 1997). Ces données montrent que TRF1 agit comme un régulateur négatif de l'activité télomérase.

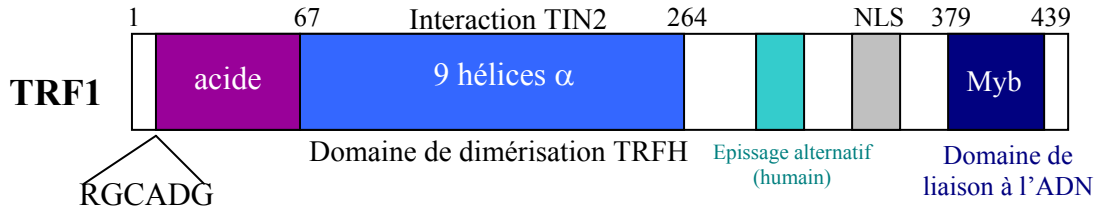


Figure 4. Représentation schématique de la structure primaire de la protéine TRF1.

b. TRF2

La seconde protéine associée au télomère est TRF2 et a été découverte en 1997 par les équipes de E. Gilson et de T. De lange (Bilaud T., et al., 1997) (Broccoli D., et al., 1997). TRF2 est une protéine essentielle qui interagit directement avec l'ADN double brin. Elle présente également un domaine Myb de reconnaissance à l'ADN, et fonctionne comme un homodimère grâce à son site TRFH. Contrairement à TRF1, TRF2 possède, à son extrémité N terminale, un domaine basique (*Figure 5*). Le rôle de TRF2 est associé à la protection des extrémités chromosomiques en maintenant la structure des télomères (Van Steensel B., et al., 1998).

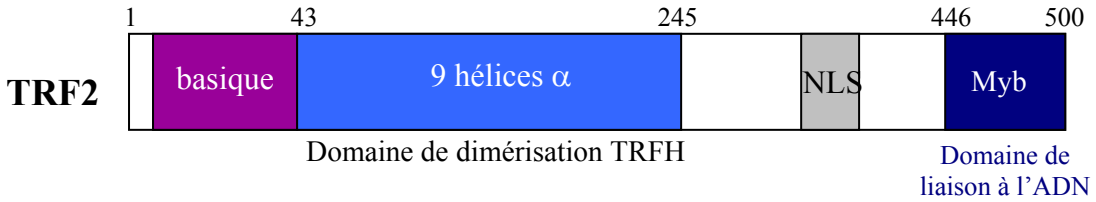


Figure 5. Représentation schématique de la structure primaire de la protéine TRF2.

Chez *S. pombe*, un homologue des protéines TRF a été référencé sous le nom de Taz1p (telomere-associated in *Schizosaccharomyces pombe*). Cette protéine présente un domaine de liaison à l'ADN de type Myb, ainsi qu'un domaine de dimérisation TRFH (Spink K. G., et al., 2000). Taz1p joue un rôle important dans la protection des télomères ainsi que dans la réparation des cassures de l'ADN (Miller K. M., et al., 2003).

c. POT_1

POT_1 (Protection Of Telomere 1) est la protéine se fixant à l'ADN simple brin. Elle a été découverte par similarité de séquence avec la sous-unité TEBPα, une protéine capable de

fixer l'ADN simple brin chez le cilié *Oxytricha nova* (Baumann P., et al., 2001) (Lei M., et al., 2002). Cette protéine possède à son extrémité N-terminale un domaine « Oligonucleotide Binding fold » (OB fold) de fixation à l'ADN simple brin qui lui permet de reconnaître spécifiquement la séquence TAGGGTTAG comme séquence minimale de reconnaissance (*Figure 6*). A son extrémité C-terminale, se trouve un domaine de reconnaissance à un complexe associé à TRF1.

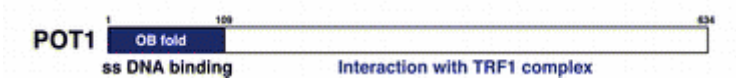


Figure 6. Structure linéaire de la protéine POT$_1$.

L'équipe de Thomas Cech a réalisé des études de cristallographie de hPOT$_1$ (human POT$_1$). Le monomère hPOT$_1$ possède en réalité deux domaines OB fold distinct. Le domaine OB1 interagit avec les 5 premiers nucléotides (T1-G5) de la séquence TTAGGGTTAG alors que OB2 interagit avec les nucléotides T7-G10. Les deux domaines OB1 et OB2 interagissent également avec la guanine en G6 (Lei M., et al., 2004) (*Figure 7*).

Chez la levure, l'homologue fonctionnel de POT$_1$, CDC13, présente également un domaine OB-fold capable de reconnaître l'ADN simple brin. (Theobald D. L., et al., 2004).

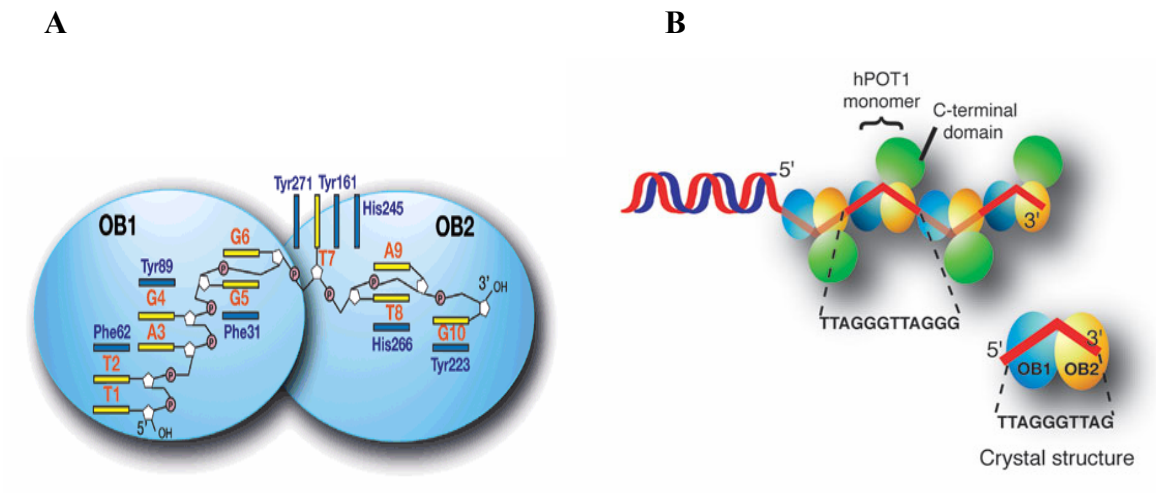


Figure 7. A) représentation schématique des deux domaines OB-fold de la protéine hPOT$_1$. B) Illustration schématique montrant comment hPOT1 se fixe à l'extrémité 3' simple brin des télomères (Lei M., et al., 2004).

6. *La sénescence cellulaire*

La sénescence cellulaire a été définie par Hayflick dans les années 60 et correspond à un arrêt de la capacité proliférative des cellules normales. Des cellules en culture sont capables de se multiplier rapidement jusqu'à une limite (la limite de « Hayflick ») à partir de laquelle la croissance cellulaire va rapidement diminuer jusqu'à un arrêt du cycle cellulaire connu sous le nom de sénescence réplicative, agissant comme un mécanisme anti-tumoral (Hayflick L., 1979) (Shay J. W., et al., 2000). Généralement les cellules en sénescence sont arrêtées en G1/S du cycle cellulaire (Cristofalo V. J., et al., 1989). Ces cellules montrent des caractéristiques morphologiques particulières comme un cytoplasme plus grand et granulaire, un niveau élevé d'enzymes de la matrice extracellulaire associé à une diminution des inhibiteurs des matrices métalloprotéinases (TIMP) (pour revue, voir (Cristofalo V. J., et al., 2004)). Cet état est aussi associé à de nombreux changements du métabolisme cellulaire, notamment une activité accrue de l'activité β galactosidase (SA-β-galactosidase) (Dimri G. P., et al., 1995), ainsi qu'une perte de nombreuses fonctions de cellules différenciées comme pour les cellules neuronales.

Différents aspects ont été décrits pour caractériser la sénescence (Roninson I. B., et al., 2001).

- La sénescence réplicative (ou sénescence intrinsèque selon (Itahana K., et al., 2004)) correspond à un processus normal du vieillissement cellulaire. Les raccourcissements répétés des télomères à chaque division cellulaire (dus au problème de réplication terminal) conduisent les cellules à entrer en sénescence réplicative (Olovnikov A. M., 1971) (Harley C. B., et al., 1990). De plus, ces cellules en sénescence présentent également une érosion de l'extrémité simple brin télomérique (Stewart S. A., et al., 2003). La sénescence réplicative apparaît après 50 à 100 divisions cellulaires chez l'homme et fait intervenir la protéine p53. p53 est fortement augmentée dans les cellules en sénescence et son inactivation entraîne une augmentation de l'espérance de vie des cellules (Itahana K., et al., 2001). Lorsque les télomères deviennent trop courts, p53 pourrait être phosphorylée par ATM, ce qui induit l'entrée en sénescence des cellules (Pandita T. K., 2002). Une activité ATM élevée a été trouvée dans des cellules en sénescence (Herbig U., et al., 2004).

- Certaines cellules normales sont amenées en sénescence accélérée suite à d'importants dommages à l'ADN ou lorsqu'elles subissent différents stress biologiques ou physiques (rayons X et UV, H_2O_2 ou l'expression ectopique de certains oncogènes ou facteurs suppresseurs de tumeurs) (*Figure 8*). Ce mécanisme de sénescence extrinsèque pourrait

correspondre à un programme de protection et de maintient de l'organisme suite à des agressions successives par différents agents carcinogènes (Itahana K., et al., 2004). Ce mécanisme n'est pas forcement lié à un raccourcissement du télomère (Ben-Porath I., et al., 2004). La sénescence extrinsèque est liée à la protéine pRb mais sa voie de signalisation semble différente de la sénescence intrinsèque (*Figure 9*). Dans cette voie, l'inhibition de l'activité CDK passe par la protéine p16. En effet, dans cette voie de sénescence, la surexpression de la protéine Bmi-1 décrite comme étant capable d'inactiver la protéine p16 induit une augmentation de l'espérance de vie de cellules fibroblastiques humaines et son inactivation dans ces fibroblastes de souris induit une entrée rapide en sénescence due à une accumulation rapide de p16 (Itahana Koji, et al., 2003) (Jacobs J. J., et al., 1999).

- La sénescence peut également être induite dans des cellules cancéreuses par certains gènes suppresseurs de tumeurs comme p53, RB, p16 ou p21 qui normalement sont inhibés dans les cellules cancéreuses mais qui peuvent être surexprimés dans certains cas. Ces gènes, associés au « DNA damage », interviennent également dans la sénescence accélérée.
- La sénescence peut également être induite après traitement par différents agents anticancéreux. En effet, à des doses non toxiques n'induisant pas l'apoptose, certaines molécules peuvent conduire des cellules traitées en sénescence après plusieurs divisions cellulaires (Roninson I. B., et al., 2001).

Les cellules sénescentes présentent une activité accrue en β-galactosidase. De nombreux auteurs ont décrit de tels phénotypes après traitement et notamment que des ligands capables de stabiliser les structures G-quadruplexes au niveau du télomère sont capables d'induire les cellules traitées en sénescence, associées à un raccourcissement de la taille des télomères (Riou J. F., et al., 2002) (Incles C. M., et al., 2004).

Récemment, des effecteurs du DNA damage ont été associés à la sénescence, comme le « DNA damage effector checkpoint kinase » Chk2, montrant qu'il existe probablement d'autres voies de signalisation dans l'induction de la sénescence (Gire V., 2004). De même, la E3 ubiquitine ligase Smurf2, impliquée dans la voie de signalisation de TGFβ, est régulée positivement dans la sénescence intrinsèque et cette régulation est une conséquence de l'usure des télomères (Zhang H., et al., 2004).

Les cellules en sénescence ne poursuivent pas forcément une voie apoptotique. En effet, des fibroblastes en sénescence réplicative semblent être résistants à l'entrée en apoptose par différents stress comme les irradiations UV et cette résistance correspond à une perte du

transcrit et de l'activité de la caspase-3, un facteur responsable de l'entrée en apoptose et par une augmentation du facteur anti-apoptotique Bcl-2 (Marcotte R., et al., 2004).

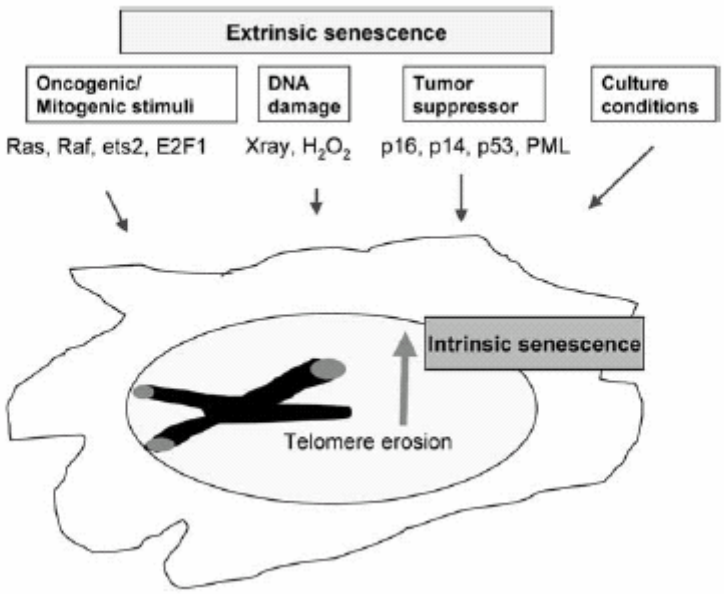


Figure 8. Les différents facteurs capables d'induire la sénescence.

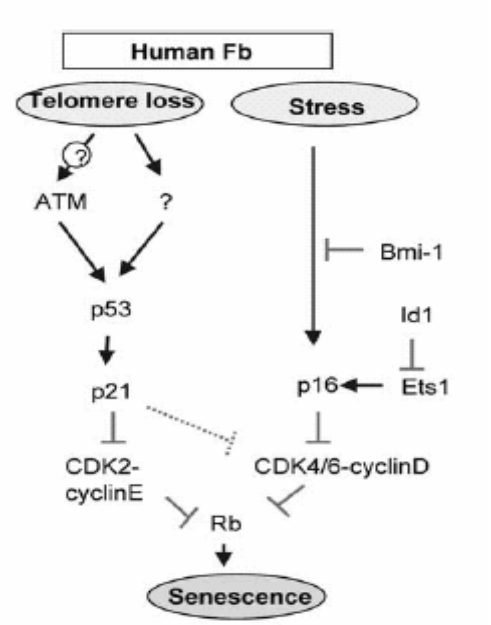


Figure 9. Les voies de signalisations des sénescences intrinsèque et extrinsèque chez les fibroblastes humains.

B. Le mécanisme d'allongement des télomères par la télomérase

1. Historique et introduction

La télomérase fut découverte par EH Blackburn et CW Greider en 1985 chez *Tetrahymena*. Ils ont élaboré un protocole dans lequel ils mélangent des télomères synthétiques et des extraits cellulaires de *Tetrahymena* et constatent que les télomères acquièrent des sous unités supplémentaires. Ils découvrent également que cette activité d'élongation était sensible à la chaleur et à la protéinase K (Greider C. W., et al., 1985). En 1987, ils découvrent que la télomérase est un complexe ribonucléoprotéique dans lequel les sous unités d'ARN et protéiques sont essentielles pour l'activité d'élongation des télomères (Greider C. W., et al., 1987). L'introduction d'une activité télomérase dans des cellules humaines normales entraîne une augmentation de l'espérance de vie des cellules, associée à une diminution de la sénescence et une augmentation de la taille des télomères (Bodnar A. G., et al., 1998).

Dans les cellules normales, la télomérase est fortement régulée pendant le développement. Son activité est inhibée dans la plupart des cellules somatiques mais reste active dans certains cas comme les cellules germinales, les cellules hématopoïétiques les lymphocytes ou l'endomètre utérin (Ishikawa F., 1997). L'activité télomérase dans ces cellules est aussi régulée par différents stimuli comme certains facteurs de croissance, par contact avec des anticorps pour les cellules hématopoïétiques, ou bien par l'action de certaines hormones sur les cellules endométriales et peut également diminuer avec l'âge (Ishikawa F., 1997).

2. Structure

La télomérase existe chez l'homme et chez *Saccharomyces cerevisiae* sous une forme holoenzyme. Sa taille est d'environ 1000 kDa chez l'homme (Beattie T. L., et al., 2001). Elle comprend deux sous unités principales. La sous-unité catalytique est une reverse transcriptase (TERT) fortement conservée chez les organismes uni et pluricellulaires (Nakamura T. M., et al., 1997) (Lingner J., et al., 1997) (Meyerson M., et al., 1997). La seconde sous-unité correspond à une séquence d'ARN, TERC (Telomerase RNA Component) également référencée sous les noms TR ou TER (Singer M. S., et al., 1994) (Shippen-Lentz D., et al., 1990) (Greider C. W., et al., 1989) (Feng J., et al., 1995). Ces deux sous-unités sont les

éléments minimums essentiels pour l'activité de la télomérase (Bachand F., et al., 1999) (Bachand F., et al., 2001b).

a. La sous-unité catalytique TERT

Le gène qui code pour TERT fut identifié en premier chez le protozoaire *Euplote*. L'analyse de la séquence de TERT montre que cette sous-unité est l'homologue de Est2p chez la levure (Lendvay T. S., et al., 1996) (*Figure 12A*). La protéine possède plusieurs motifs reverse transcriptases fortement conservés (motifs RT) et un motif télomérase spécifique (motif T) (Bachand F., et al., 2001a) (*Figure 10*).

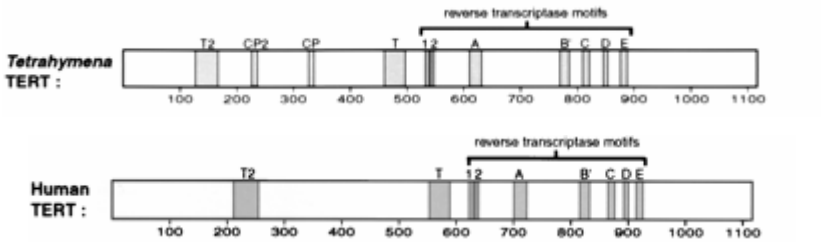


Figure 10. Structure linéaire de TERT chez Tetrahymena et chez l'humain.

Plusieurs protéines indispensables pour l'assemblage, la conformation et la localisation nucléaire de la télomérase sont capables de reconnaître des sites d'interaction de hTERT (*Tableau 2*). Par exemple, les protéines chaperonnes (p23/p90) intervenant dans l'assemblage du complexe télomérique fixent les acides aminés 1 à 195 de la protéine.

Protein	Interacting region	Function
hTERT associated		
TEP1	aa 1–350, 601–927	Unknown
P23/p90	aa 1–195	Assembly/conformation
14-3-3	aa 1004–1132	Nuclear localization
hTR associated		
TEP1	nt 1–871	Unknown
hGAR1	hTR H/ACA domain	Stability, maturation, localization
Dyskerin/NAP57	hTR H/ACA domain	Stability, maturation, localization
hNOP10	hTR H/ACA domain	Unknown
hNHP2	hTR H/ACA domain	Stability, maturation, localization
C1/C2	nt 33–147	Stability, maturation, localization
La	nt 1–205, 250–451	Accessibility to telomeres?
A1/UP1	nt 1–208	Unknown
hStau	nt 64–222	Accessibility to telomeres?
L22	nt 64–222	hTR processing, localization?

Tableau 2. Régions d'interaction et fonction de certaines protéines associées à hTERT et hTR (Cong Y. S., et al., 2002).

b. La sous-unité ribonucléotidique TR

Chez l'homme, la sous unité d'ARN hTR est exprimé avec un taux 5 fois supérieur dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales (Yi X., et al., 1999). hTR est transcrite par l'ARN polymérase II et allongée en son extrémité 3' afin de produire un transcrit mature de 451 nucléotides (Feng J., et al., 1995). Elle présente des motifs variables afin de moduler l'interaction avec hTERT, ou de contrôler les étapes d'alignement, d'extension ou de translocation de TR vis-à-vis de hTERT. Elle présente également plusieurs régions spécifiques indispensables à l'activité télomérase (Chen J. L., et al., 2000). hTR possède une structure secondaire relativement bien conservée chez les vertébrés indiquant un rôle important de cette structure dans la fonction de la télomérase (Chen J. L., et al., 2000) (*Figure 11*).

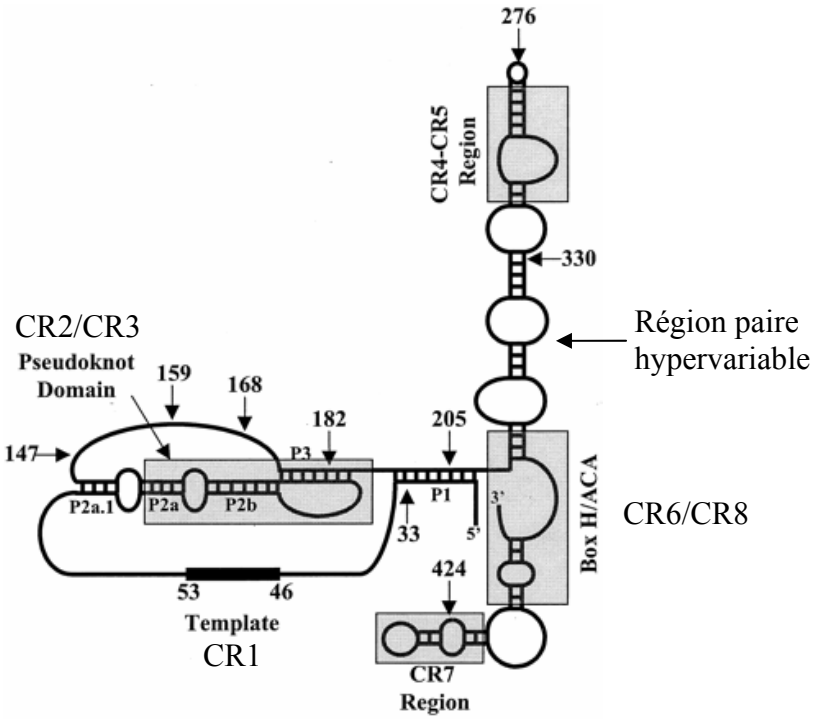


Figure 11. La structure secondaire et linéaire de hTR. hTR présente plusieurs domaines conservés, les domaines « pseudoknot », CR4-5, Box H/ACA et CR7.

La structure secondaire de TR présente quatre domaines fonctionnels (Bachand F., et al., 2001a). Les domaines « pseudoknot » (CR2/CR3) et CR4/CR5 sont essentiels à l'activité télomérase *in vitro* (Tesmer V. M., et al., 1999). Les domaines H/ACA (CR6/CR8) CR7 ne sont pas indispensables *in vitro* mais sont essentiels pour la stabilité de l'ARN *in vivo* (Mitchell J. R., et al., 2000). La sous-unité TR chez les ciliés est plus petite (150 à 200 nucléotides) et ne présente pas de boite H/ACA (Chen J. L., et al., 2000) alors que chez la levure, elle présente un site de reconnaissance pour les protéines Sm qui intervient dans

l'épissage des ARN messager nucléaires (Seto A. G., et al., 1999). Les différents domaines conservés sont des sites de reconnaissances pour un certain nombre de protéines spécifiques qui interviennent dans la stabilité, la maturation, l'accumulation et l'assemblage fonctionnel du complexe télomérase (Yeo M., et al., 2005) (*Tableau 2*).

Chez *S. cerevisiae*, les protéines Est1 (qui se fixe à la sous-unité d'ARN TLC1) et Est3 (une protéine intervenant dans la stabilité du complexe télomérase), se trouvent associées aux sous-unités catalytiques et d'ARN (Est2 et TLC1 respectivement). Ces protéines se trouvent mutées dans le phénotype Est (ever short telomeres) dans lequel nous observons un raccourcissement progressif de la taille des télomères (Seto A. G., et al., 2002) (Hughes T. R., et al., 2000) (Lendvay T. S., et al., 1996). Des analogues de ces protéines ont été retrouvés chez l'homme, parmi lesquelles Est1A, Est1B (Lundblad V., 2003). Nous retrouvons également chez l'homme une autre protéine associée au motif H /ACA de la sous-unité d'ARN : la dyskérine (Dokal I., 2000). Cette enzyme est une pseudouridine synthase jouant un rôle important dans les processus ribosomaux (*Figure 12A et B*).

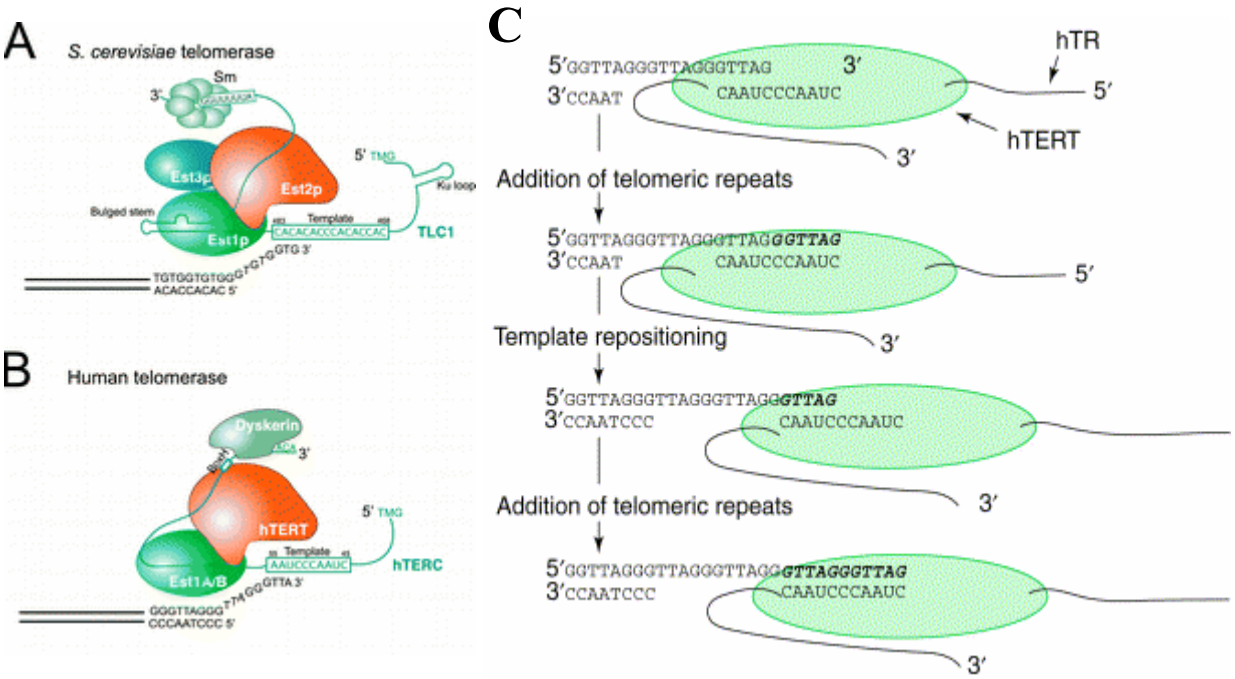


Figure 12. Représentation schématique des complexes télomériques chez S. cerevisiae (A) et chez l'homme (B). (C) : L'addition des répétitions télomériques. La télomérase ajoute des répétitions de l'hexamère TTAGGG en se fixant à l'extrémité du chromosome. Elle utilise sa séquence d'ARN comme amorce pour ajouter les nucléotides. Après l'hexamère ajouté, elle se repositionne pour permettre un nouveau cycle d'élongation. (White L. K., et al., 2001).

La dyskérine a été décrite comme étant responsable de la maladie génétique rare humaine DKC (dyskeratosis congenita) (Dokal I., 2000). Dans cette pathologie, les conséquences des mutations des gènes *DKC1* et *TERC* sont une réduction de l'activité télomérase et un raccourcissement accéléré de la taille des télomères (Shay J. W., et al., 2004) (Knudson M., et al., 2005).

3. Fonctionnement de la télomérase

La télomérase est une enzyme processive qui allonge l'extrémité 3' terminale des télomères en se positionnant sur un site de reconnaissance au niveau de l'extrémité télomérique par l'intermédiaire d'un site matrice de TERC (« template », *Figure 11*). Le site de fixation du télomère est une courte séquence dite matricielle d'ARN caractéristique de chaque type cellulaire (CAAUCCCAAUC chez l'homme) au niveau du domaine CR1 (Feng J., et al., 1995). L'extension du télomère qui en résulte correspond à l'ajout d'une répétition télomérique à son extrémité 3'. Après l'élongation, le brin C néoformé est normalement utilisé pour synthétiser l'ADN télomérique double brin. Cependant, les mécanismes de cette étape n'ont été étudiés que chez les ciliés (Price C. M., 1997) (*Figure 12C*).

4. La régulation de la télomérase

L'expression de l'activité télomérase est régulée à différents niveaux, notamment la transcription, l'épissage alternatif de l'ARNm, la maturation de hTERT et hTR.

a. La régulation de la transcription du gène hTERT

Le gène humain (*hTERT*), présent en une seule copie dans le génome, est localisé sur le bras court du chromosome 5, à la position 5p15.33 (Kilian A., et al., 1997). Ce gène contenant 16 exons et 15 introns s'étend sur 41kb (Baur J. A., et al., 2001). Le promoteur, riche en séquence GC contient de nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription (Takakura M., et al., 1999) (Horikawa I., et al., 1999) et de méthylation (Devereux T. R., et al., 1999) (Horikawa I., et al., 1999) (*Figure 13*). Ce gène peut être fortement amplifié dans les cellules cancéreuses, suggérant qu'une augmentation du nombre de copie du gène hTERT pourrait contribuer à une régulation positive de la télomérase (Cong Y. S., et al., 2002) (Ducrest A. L., et al., 2002). La position subtélomérique du gène hTERT joue un rôle important dans sa répression par le télomère. Cette modulation à été observée

chez *S. cerevisiae* (Tham W. H., et al., 2002) ainsi que chez l'homme (Baur J. A., et al., 2001).

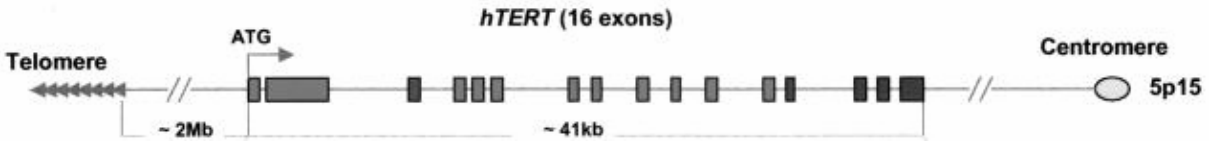


Figure 13. Organisation du gène de hTERT.

α. Le promoteur de hTERT

La régulation de hTERT a été découverte en réalisant des transfections transitoires avec un promoteur-luciférase de hTERT. Ces expériences montrent que le promoteur est inactif dans les cellules normales et actif dans les cellules cancéreuses (Takakura M., et al., 1999). Des transfections de promoteurs tronqués montrent que la séquence minimum nécessaire à l'activité du promoteur correspond à une région proximale de 181 pb en amont de l'ATG (Takakura M., et al., 1999). C'est dans cette région que de nombreux facteurs de transcription vont reconnaître le promoteur pour moduler l'activité du gène. De plus, la séquence du promoteur de hTERT montre qu'il possède de nombreuses régions riches en GC formant des îlots CpG autour du promoteur (CpG island). Ceci suggère que des méthylations peuvent intervenir au niveau du promoteur pour réguler le gène hTERT (Cong Y. S., et al., 2002) (Takakura M., et al., 1999) (Guilleret I., et al., 2002).

β. Activation de hTERT par le facteur de transcription c-myc

c-myc (myelocytomastosis) est un oncogène intervenant dans la prolifération, la croissance, la différenciation et l'apoptose cellulaire. Il est capable de reconnaître plus de 600 gènes pour réguler leur transcription (Patel J. H., et al., 2004b). Des altérations de sa structure ou de son expression ont été associées à un certain nombre de maladies chez l'homme. Sa surexpression est généralement observée dans la plupart des cancers (Depinho R. A., et al., 1991) et est associée à un augmentation de la prolifération cellulaire *in vivo* et en culture cellulaire. De plus, un niveau faible de la quantité de c-myc est associé à un arrêt de la division et de la prolifération cellulaire. Dans certaines conditions de culture non favorables, une surexpression de c-myc peut induire l'apoptose (Sears R. C., 2004).

Le gène *c-myc* code pour un facteur de transcription contenant des domaines d'activations au niveau de l'extrémité N terminale et un domaine bHLHZ (basic Helix Loop Helix Zipper) à son extrémité C terminale. c-myc présente deux sites de phosphorylation,

Thréonine 58 et Sérine 62, au niveau N terminal fortement conservés à travers les espèces et chez les membres de la famille c-myc. La phosphorylation de ces deux sites permet de réguler la stabilité de c-myc. Cette phosphorylation est induite par différentes kinases et est régulée par la cascade de signalisation Ras : Raf/MEK/ERK ainsi que par la voie (PI_3K)/Akt (Phosphatidylinositol-3-OH kinase) (Sears R. C., 2004). Myc forme un hétérodimère avec Max, une autre protéine bHLHZ, et ce complexe est capable de reconnaître la séquence 5'-CACGTG, appelée E-boxe. En plus de la formation de l'hétérodimère, Max peut former un hétérodimère avec des protéines des familles Mad et MNT. Contrairement à myc-Max, Mad-Max inhibe la transcription en se fixant à la séquence CACGTG (Grandori C., et al., 2000).

Au niveau du promoteur proximal de hTERT, nous retrouvons deux E-boxes en amont de l'ATG, expliquant la fixation du complexe Myc-Max et sa régulation par ces protéines (Takakura M., et al., 1999) (Horikawa I., et al., 1999) (Wu K. J., et al., 1999). Des études ont montré que l'une des stratégies utilisées par c-myc pour réguler la transcription de certains gènes consiste à recruter des complexes multi-protéiques contenant des histones acétyltransférases comme la GCN5 humaine (mGCN5)/PCAF ou la protéine TIP60. Ces protéines sont également capables d'acétyler d'autres protéines que les histones, impliquées dans la transcription. Récemment, J.H. Patel a démontré que GCN5 et TIP60 sont capables d'acétyler *c-myc* et que cette modification entraîne une augmentation de la stabilité de la protéine inhibant ainsi sa dégradation (Patel J. H., et al., 2004a).

χ. Les agents réprimants hTERT

La transcription de hTERT peut être réprimée par différents facteurs. En effet, la perte de l'activité télomérase dans la plupart des cellules somatiques correspond à une répression de la transcription de hTERT. Plusieurs chromosomes ont été décrits comme possédant des répresseurs de hTERT. En effet, le transfert des chromosomes 3 et 10 dans des cellules cancéreuses entraîne une diminution de la transcription de hTERT montrant que ces chromosomes possèdent des répresseurs transcriptionnels (Cong Y. S., et al., 2002).

Différentes protéines ont été décrites comme étant capables de réprimer hTERT. C'est le cas notemment de p53 (Kanaya T., et al., 2000) (Xu D., et al., 2000) (Rahman R., et al., 2004), Mad1 (Xu D., et al., 2001), pRB et le facteur de transcription E2F1 (Zheng L., et al., 2001), la protéine Wilm's Tumor 1 (WT1) (Oh S., et al., 1999), MZF-2 (Fujimoto K., et al., 2000), BRCA1 (Xiong J., et al., 2003) et un certain nombre d'agents de différenciation et antiprolifératifs comme l'interferon-α, (IFN-α) le Transforming Growth Factor β (TGF-β),

l'analogue synthétique de la vitamine D_3 (6,6-*trans*-16-ene-vitamin D_3) (Cong Y. S., et al., 2002).

Chez la femme, les œstrogènes peuvent activer la télomérase par une activation de l'activité transcriptionnelle de hTERT dans des tissus sensibles aux hormones. Ces mêmes observations ont été faites dans des cellules de cancer du sein MCF-7 (Kyo S., et al., 1999) (Misiti S., et al., 2000). De même, la progestérone est également capable de moduler négativement la transcription de hTERT. Cette hormone est un antagoniste des oestrogènes et est utilisée comme traitement thérapeutique contre les cancers oestrogène-dépendants (Wang Z., et al., 2000).

Les rétinoïdes sont des molécules de signalisation intervenant dans des processus de croissance et de différenciation cellulaire. Parmi elles, l'acide tout-trans rétinoïque (ATRA), une molécule naturelle et l'acide 9-cis-rétinoïque sont utilisés en chimiothérapie dans le but de moduler la prolifération et la différenciation cellulaire (Lansiaux A., et al., 2000). En présence de ces deux ligands, l'hétérodimérisation de deux récepteurs, RAR (Retinoic-Acid Receptors) et RXR (Retinoid-X Receptors), agit comme un facteur de régulation transcriptionnel de gènes comme hTERT (Pendino F., et al., 2001) (Pendino F., et al., 2003). Deux niveaux de régulation de hTERT par les rétinoïdes ont été identifiés (Pendino F., et al., 2001) : la première voie est associée à l'ATRA et induit une régulation négative rapide de la télomérase dans des cellules NB4. La seconde a été identifiée dans une lignée NB4-LR1 résistante à la maturation. Elle correspond à une régulation négative plus lente de la télomérase par l'ATRA, indépendamment de la maturation. Ces deux voies induisent un raccourcissement de la taille des télomères et une mort cellulaire après trois semaines de traitement.

δ. L'épissage alternatif de hTERT

Le gène hTERT subit un épissage alternatif et différents transcrits ont été identifiés chez l'homme (*Figure 14*).

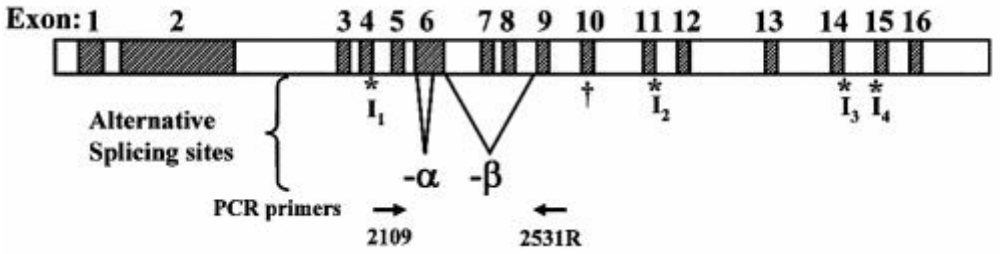


Figure 14. Représentation schématique du gène hTERT montrant les sites d'insertions (I_1 à I_4) et de délétions ($-\alpha$ et $-\beta$) de l'épissage alternatif de ce gène.

L'épissage alternatif de hTERT conduit à l'apparition d'une forme –α qui présente une délétion de 36 nucléotides à l'extrémité 5' de l'exon 6, une forme –β dans laquelle manque les exons 7 et 8 (182 pb), une forme –α et –β et des formes d'insertion comme I_1 dans laquelle 38 nucléotides sont insérés dans l'intron 4, I_3 avec une insertion de 159 nucléotides dans l'intron 14, I_3 avec une insertion dans l'intron 11 et I_4 avec une insertion d'une partie des exons 15 et 16 dans l'exon 14 (Cong Y. S., et al., 2002). Les formes –α et –β présentent donc des délétions dans la région RT et puisque cette région est indispensable au bon fonctionnement de hTERT, ces variants ne présentent pas d'activité catalytique. La forme –α correspond à un dominant négatif de hTERT. Les variants I_1 à I_4 présentent des insertions en aval de la région RT et forment un produit tronqué de la protéine ne présentant pas une activité biologique fonctionnelle.

La répartition des différentes formes de hTERT dans les cellules n'est pas homogène. Ainsi, sur 25 lignées étudiées présentant une activité télomérase endogène, environ 5% de l'ARNm total de hTERT se trouve sous la forme +α +β, 80 à 90% sous la forme +α –β, 5 à 15% sous la forme –α –β et moins de 1% sous la forme –α +β (Yi X., et al., 2001). En 2003, le groupe de Tsukada a découvert une troisième forme d'épissage alternatif (la forme –γ) dans lequel un fragment de 189 pb est tronqué, correspondant à la perte totale de l'exon 11. Ce variant altère également la région RT, inhibant l'activité catalytique de hTERT (Hisatomi H., et al., 2003).

b. La régulation de la transcription du gène hTR

Dans l'embryogenèse, le gène hTR est exprimé. Il est ensuite régulé négativement dans les cellules normales. Dans l'oncogenèse, hTR est de nouveau re-exprimé associé à une capacité accrue de la prolifération cellulaire (Zhao J. Q., et al., 2000).

Le promoteur proximal du gène hTR contient des sites consensus de reconnaissance par des facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse comme GATA-1, PU-1, PEA2/PEBP2, C/EBP et c-Ets2 (Zhao J. Q., et al., 1998). Le promoteur du gène hTR contient également 4 sites Sp1 et une boite CCAAT. Deux sites Sp1 en aval de la boite CCAAT entraînent une régulation négative de hTR alors que les deux autres sites Sp1 sont des régulateurs positifs. Le Facteur nucléaire-Y (NF-Y) est un régulateur fondamental de la transcription de hTR. Il est capable d'interagir avec la boite CCAAT et les facteurs fixant Sp1 près de la boite CCAAT, en coordination avec NF-Y, activent ou inhibent la transcription de hTR (Zhao J., et al., 2003).

Un autre mécanisme de régulation de la transcription de hTR a été décrit après la découverte, au niveau du promoteur de hTR, d'îlots CpG (CpG Island). Dans certaines cellules télomérase négative (ALT), le promoteur hTR est inhibé par la méthylation des îlots CpG (Hoare S. F., et al., 2001). Le promoteur hTR méthylé (silencieux) peut être réactivé avec un traitement des cellules par la 5AzaCytidine et l'inhibiteur d'histone deacetylase (TSA) (Framson P., et al., 1993). Ces différentes études suggèrent que la régulation du promoteur hTR peut être importante pour la régulation différentielle de l'expression du gène hTR dans les cellules normales et cancéreuses. En effet, une méthylation partielle a été observée dans 5% des cellules tumorales et dans 27% des cellules immortalisées. Ces cellules présentant une méthylation partielle du promoteur de hTR expriment néanmoins hTR (Hoare S. F., et al., 2001) (*Tableau 3*). Il existe, uniquement dans les cellules ALT, une corrélation entre hyperméthylation du promoteur et absence d'expression de hTR.

Un certain nombre de protéines sont capables de s'associer au motif H/ACA snoRNAs de la sous unité hTR afin d'activer la télomérase. Parmi ces protéines nous retrouvons Cbf5p/dyskerin, Nhp2p, Nop10p et Gar1p. Dans le syndrome de la dyskératose congénitale (DC), le gène de la dyskérine est altéré et il en résulte une instabilité de hTR et un raccourcissement des télomères (Fu D., et al., 2003). Cependant, cette instabilité limite l'activité maximale de la télomérase mais n'inhibe pas complètement son activité spécifique (Collins K., et al., 2002).

Cell line	Status	Origin	hTR			
			Expression[a]	Southern[b]	MSP[b]	Overall[c]
IMR-90	Mortal	Fetal lung fibroblasts	7	-[d]	U	U
WI38	Mortal	Fetal lung fibroblasts	7	U	U	U
HEK121	Mortal	Epidermal keratinocytes	12	-	-	-
KMST-6	Immortal ALT	Chemically transformed fibroblasts	0	P	M	M
SUSM-1	Immortal ALT	Chemically transformed fibroblasts	0	M	M	M
WI38-VA13/2RA	Immortal ALT	SV40-transformed WI38 cells	0	M	M	M
GM847	Immortal ALT	SV40-transformed fibroblasts	165	U	U	U
SK-LU-1	Immortal ALT	Lung adenocarcinoma	84	U	U	U
5637	Immortal tel+	Bladder carcinoma	96	U	U	U
A2780	Immortal tel+	Ovarian adenocarcinoma	149	P	P	P
A549	Immortal tel+	Lung carcinoma	51	U	U	U
C-33A	Immortal tel+	Cervical carcinoma	124	P	P*	P*
CaSki	Immortal tel+	Cervical carcinoma	479	U	U	U
COLO320-DM	Immortal tel+	Colorectal carcinoma	22	P	P	P
GLC4	Immortal tel+	Lung carcinoma (small cell)	161	P	P	P
H69	Immortal tel+	Lung carcinoma (small cell)	178	U	U	U
HeLa	Immortal tel+	Cervical adenocarcinoma	100	P	P	P
MCF7	Immortal tel+	Breast adenocarcinoma	131	P	P	P
ME180	Immortal tel+	Cervical carcinoma	153	U	U	U
SaOS	Immortal tel+	Osteosarcoma	117	U	U	U
SiHa	Immortal tel+	Cervical carcinoma	46	U	U	U

[a] Expression de *hTERC* par Northerns, donnée en % par rapport au taux de *hTERC* de la lignée HeLa.
[b] Niveau de méthylation du promoteur de *hTERC* par les techniques de Southern et MSP (methylation-specific PCR).
[c] Niveau de méthylation du promoteur de *hTERC* lorsque les deux méthodes sont prises en compte.
[d] -, non donné; U, non méthylé; M, hyperméthylé; P, méthylé partiellement; *, niveau très faible de méthylation.

Tableau 3. Expression de hTR et degré de méthylation dans différentes cellules {Hoare S. F., et al., 2001) .

C. Télomère et ALT

1. Introduction et historique

Certaines cellules de *S. cerevisiae* présentant une inhibition de la sous-unité d'ARN TLC1 ou ayant perdu le gène *EST1* (qui code pour une protéine s'associant à la sous-unité d'ARN) montrent un raccourcissement progressif des télomères et la plupart meurent. Une partie de cette population survit grâce à l'acquisition de répétitions subtélomériques par l'intermédiaire d'un mécanisme de recombinaison dépendant de RAD52 (Lundblad V., et al., 1993). Deux classes de survivants ont été décrites : le type I présente des duplications en tandem de l'élément subtélomérique Y' et des répétitions G-riches télomériques alors que le type II montre des télomères très hétérogènes et fonctionnerait par réarrangements et/ou par duplications en tandem des séquences télomériques riches en guanines (Teng S. C., et al., 1999) (*Figure 15*).

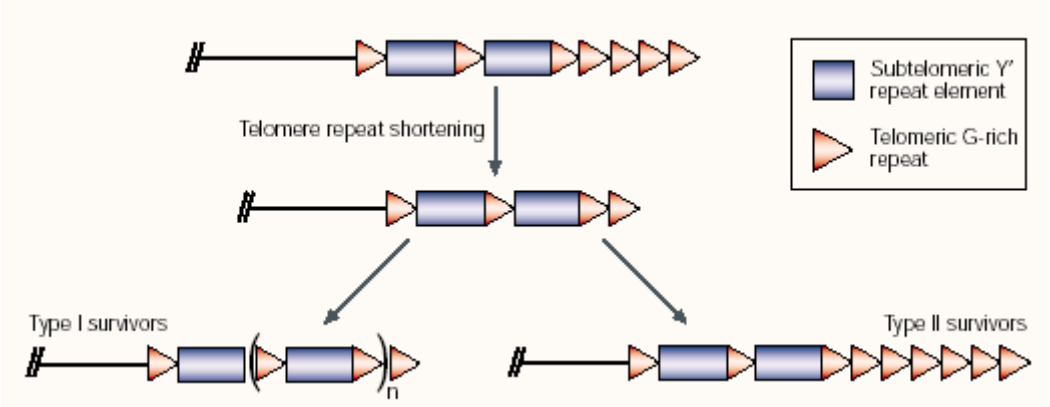


Figure 15. Les types I et II des survivants S. cerevisiae TLC - : représentation schématique des deux phénotypes chez les survivants S. cerevisiae déficients en télomérase. Les cellules du type I montrent une amplification de l'élément répété subtélomérique Y' (rectangles bleus) et les cellules du type II montrent une élongation des séquences G-riches télomériques par un mécanisme de recombinaison (triangles rouges) (d'après (Neumann A. A., et al., 2002).

En 1997, Bryan et Reddel décrivent qu'une lignée cellulaire immortalisée sur quatre ne présente pas d'activité télomérase. Ces cellules télomérase négative possèdent des télomères très longs et très hétérogènes, allant de moins de 1kb jusqu'à plus de 50kb avec une moyenne entre 20 et 25kb. Ces auteurs ont proposé qu'un nouveau mécanisme nommé ALT pour « Alternative Lengthening of Telomeres » utilisant des recombinaisons non réciproques entre répétitions télomériques permet le maintien de la taille des télomères de ces cellules (Bryan T. M., et al., 1997). Dans les télomères des cellules ALT, des répétitions riches en guanines précèdent des éléments subtélomériques, comme pour les survivants de type II. Ceci

suggère que les cellules ALT utilisent un mécanisme de recombinaison pour maintenir l'intégrité télomérique (Neumann A. A., et al., 2002).

Il existe chez l'homme un certain nombre de cancers (environ 10%) qui expriment le phénotype ALT. Parmi eux nous retrouvons des ostéosarcomes, sarcome des tissus mous, glioblastomes, carcinomes de cellules rénales, carcinomes adrenocorticaux, carcinomes à larges cellules de poumon (carcinome épidermoïde) et des carcinomes ovariens. De plus, environ 1/3 des cellules fibroblastiques immortalisées *in vitro* par l'antigène-T du virus SV40 possèdent le phénotype ALT (Bryan T. M., et al., 1997). Ce phénotype est plus souvent présent dans des lignées d'origine mésenchymateuse que d'origine épithéliale. Les cellules d'origine mésenchymateuse présentent des temps de division plus lents et moins de raccourcissements télomériques que les cellules d'origine épithéliale et peuvent ainsi réprimer la télomérase plus facilement (Reddel R. R., 2003).

A partir de 2000, plusieurs publications sont apparues et mettent en évidence ce mécanisme d'allongement des télomères. Il présente de nombreuses caractéristiques qui seront développées dans les paragraphes suivants.

2. *Les télomères dans les cellules ALT*

Dans les cellules télomérase positive, la taille des télomères est relativement homogène avec une moyenne inférieure à 10kb. A l'inverse, les cellules ALT présentent des télomères dont la taille est très hétérogène, caractéristique de ce phénotype (*Figure 16*).

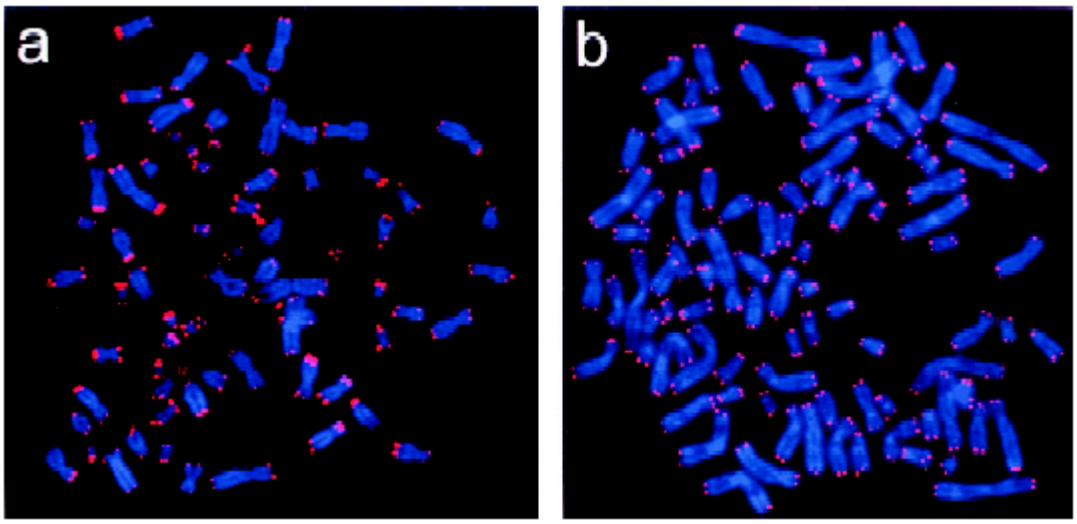


Figure 16. Visualisation des télomères dans les cellules a) ALT et b) télomérase positive par FISH montrant la taille très hétérogène dans les cellules ALT (d'après (Henson J. D., et al., 2002)).

Une autre caractéristique des télomères des cellules ALT correspond à la présence de répétitions d'ADN télomériques linéaires extrachromosomiques ECTR (Extrachromosomal telomeric repeat) (Tokutake Y., et al., 1998). Ces structures présentes dans le nucléoplasme sont associées à TRF1 et ne sont pas détectées dans les cellules normales télomérase négative, ni dans les cellules télomérase positive. Ces ECTR possèdent une taille de 2 à 4kb. Plusieurs rôles ont été proposés pour ces structures.

- Premièrement, les cellules ALT utilisent les ECTR pour maintenir la taille des télomères par recombinaison homologue (Cesare A. J., et al., 2004).
- Deuxièmement, il est possible que ces ECTR soient des produits générés par des mécanismes responsables du maintien de la taille des télomères en absence de télomérase, comme la recombinaison (Tokutake Y., et al., 1998).

Récemment, l'équipe de Toshinori Ide a proposé que la taille des télomères dans les cellules ALT soit en fait plus petite que ce qu'il a été décrit auparavant (Higaki T., et al., 2004). Par southern blot, en utilisant des gels d'électrophorèse neutres en champs inverses pulsés (PIF), ces auteurs observent que la taille des télomères varie de 2 à 9kb en fonction de la lignée cellulaire alors qu'en TRF, elle est d'environ 23kb. Ces auteurs proposent que cette différence de taille puisse être due à une association des extrémités télomériques avec des séquences d'ADN ECTR.

Dans les cellules ALT, la taille des télomères varie. Dans un premier temps, les télomères raccourcissent de 30 à 50kb par division, comme s'il n'existait pas de mécanisme de maintien de la taille des télomères (Martens U. M., et al., 2000). Dans certaines cellules, l'érosion continue jusqu'à une taille critique de moins de 200pb. Dans un deuxième temps, une augmentation rapide et hétérogène allant parfois jusqu'à plus de 23kb apparaît (Henson J. D., et al., 2002).

Chez la levure *S. cerevisiae*, un mécanisme de régulation négative de la taille des télomères appelé TRD (telomeric rapid deletion) a été décrit (Li B., et al., 1996). Ce mécanisme apparaît après la formation de la T-loop et se traduit par un raccourcissement rapide de la taille des télomères par des délétions intratélomériques et par la formation de séquences d'ADN linéaires (Bucholc M., et al., 2001). Chez l'homme, un mécanisme similaire associé à la recombinaison homologue a été décrit par l'équipe de Titia de Lange (Wang R. C., et al., 2004). Dans son modèle, la suppression du domaine basique de TRF2 ($TRF2^{\Delta B}$) induit la formation de jonctions de type « Holliday » au niveau de la D-loop. Le brin C va être clivé à deux endroits, l'un par la protéine XRCC3 (un paralogue de la protéine

RAD51) et l'autre par une nucléase qui n'a pas encore été déterminée. Ces coupures induisent la formation d'un télomère raccourci et d'une séquence télomérique circulaire.

Dans les cellules ALT, Des séquences d'ADN circulaires ont été décrites (Cesare A. J., et al., 2004) et pourraient être formées par ce mécanisme de recombinaison homologue au niveau de la T-loop (Wang R. C., et al., 2004).

3. Les protéines associées aux mécanismes ALT

En 1999, Yeager décrit que les cellules ALT présentent des structures spécifiques appelées APBs (ALT associated PML bodies). Ces structures possèdent la protéine PML (ProMyelocytic Leukemia), des fragments d'ADN télomérique (ECTR et des rolling circle (Yeager T. R., et al., 1999)) et les protéines associées aux télomères, TRF1 et TRF2. Ces structures APBs sont présentent de façon inégale dans le cycle cellulaire avec un taux relativement élevé en G2/M (Yeager T. R., et al., 1999) (Grobelny J. V., et al., 2001) (Grobelny J. V., et al., 2000).

La protéine PML a été décrite initialement dans la leucémie promyélocytique et correspond à un coactivateur de p53. Dans les cellules leucémiques promyélocytiques, elle forme une protéine de fusion avec le récepteur de l'acide rétinoïque α (RARα) et induit une résistance à l'apoptose en dérégulant les voies induites par PML (Son S. H., et al., 2005) (Bernardi R., et al., 2003). Les corps PML ont été identifiés dans différentes fonctions biologiques : ils peuvent réguler l'apoptose, la prolifération cellulaire, la sénescence, des fonctions de suppression de tumeurs et l'activité transcriptionnelle de gènes (Wang J., et al., 2004).

Au niveau des structures APBs, se trouvent également des protéines impliquées dans la recombinaison et dans la réplication. Parmi ces protéines, nous retrouvons RAD51 qui est une protéine RecA-like de transfert de brin d'ADN (Stavropoulos D. J., et al., 2002). RAD51 est impliquée dans la réparation des cassures doubles brins et simple brin de la recombinaison homologue. Associée à RAD51, RAD52 se lie à l'ADN double brin et aide au bon fonctionnement de RAD51. La protéine RPA est également associée à RAD51 et facilite le déroulement de l'ADN simple brin. Elle pourrait jouer un rôle essentiel dans la réplication, la réparation et la recombinaison de l'ADN (Yeager T. R., et al., 1999).

RAD51 est également associée aux protéines RAD50 et MRE11 du complexe MRN lors des mécanismes de réparation de l'ADN double brin (Henson J. D., et al., 2002). Le complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1) joue un rôle dans la réparation des cassures de l'ADN, via la recombinaison homologue et est localisé au niveau des structures APBs. *In*

vitro, MRE11 est une 3'-5' exonucléase et une endonucléase de l'ADN simple brin. La combinaison de ces fonctions avec l'activité hélicase de RAD50 pourrait avoir une activité 3'-5' exonucléase *in vivo* mais il n'est cependant pas clairement défini si MRE11 coopère directement avec la recombinaison homologue pour l'élongation des télomères (Bernardi R., et al., 2003). NBS1 intervient dans la phosphorylation et l'activation du complexe MRN. La localisation de NBS1 dans les structures APBs fait appel à la protéine nucléaire SP100 intervenant dans la régulation transcriptionnelle de gènes (Naka K., et al., 2002). Ce recrutement pourrait coïncider avec des synthèses d'ADN dans les corps APBs (Henson J. D., et al., 2002). La mutation de *NBS1* provoque le syndrome Nijmegen breakage (NBS), une maladie rare et récessive associée à des caractéristiques cliniques comme des microcéphalies, un faciès spécifique, retard de croissance, immunodéficiences, retard mental et prédisposition aux cancers lymphoïdes (Van Der Burgt I., et al., 1996).

NBS1 et MRE11 sont associés à TRF1 dans les corps APBs des cellules ALT, spécialement en S/G2 du cycle cellulaire, mais rarement dans les cellules télomérase positive. Ceci suggère que NBS1 pourrait être impliqué dans le maintien des télomères par le mécanisme alternatif des cellules ALT (Wu G., et al., 2000). Récemment, Jiang a montré que la surexpression de la protéine SP100 (une autre protéine associée aux structures APBs) réprime le mécanisme ALT en séquestrant le complexe MRN (Jiang W. Q., et al., 2005).

Des hélicases de la famille RecQ WRN et BLM sont également impliquées dans la réplication de l'ADN et dans le maintien de la taille des télomères (Bachrati C. Z., et al., 2003) (Khakhar R. R., et al., 2003). Ces protéines peuvent faciliter et arrêter la recombinaison homologue (*Figure 17*). L'accumulation de BLM dans les corps nucléaires PML (PML-NB) est facilitée par p53, alors que l'activité exonucléase de WRN est inhibée par cette protéine. Le rôle de l'association de PML avec BLM dans la recombinaison homologue n'est pas encore clairement défini. L'expression de BLM et sa localisation dans les structures PML-NB sont fortement régulées dans le cycle cellulaire, avec un pic d'expression en S/G2 et une localisation dans les PML-NB. En S/G2, les protéines de réparation et de recombinaison RAD51 et RPA sont associées à BLM dans les PML-NB. Ceci suggère que BLM pourrait intervenir dans les mécanismes de réparation de la recombinaison en G2 suite à des dommages à l'ADN et que PML pourrait être important dans l'organisation de BLM et RAD51 au niveau des sites de réparation (Bischof O., et al., 2001). *In vivo* BLM est capable d'interagir avec TRF1 et TRF2 dans les cellules ALT montrant à l'évidence que BLM influence spécifiquement la synthèse de l'ADN télomérique dans les cellules ALT (Bachrati C. Z., et al., 2003).

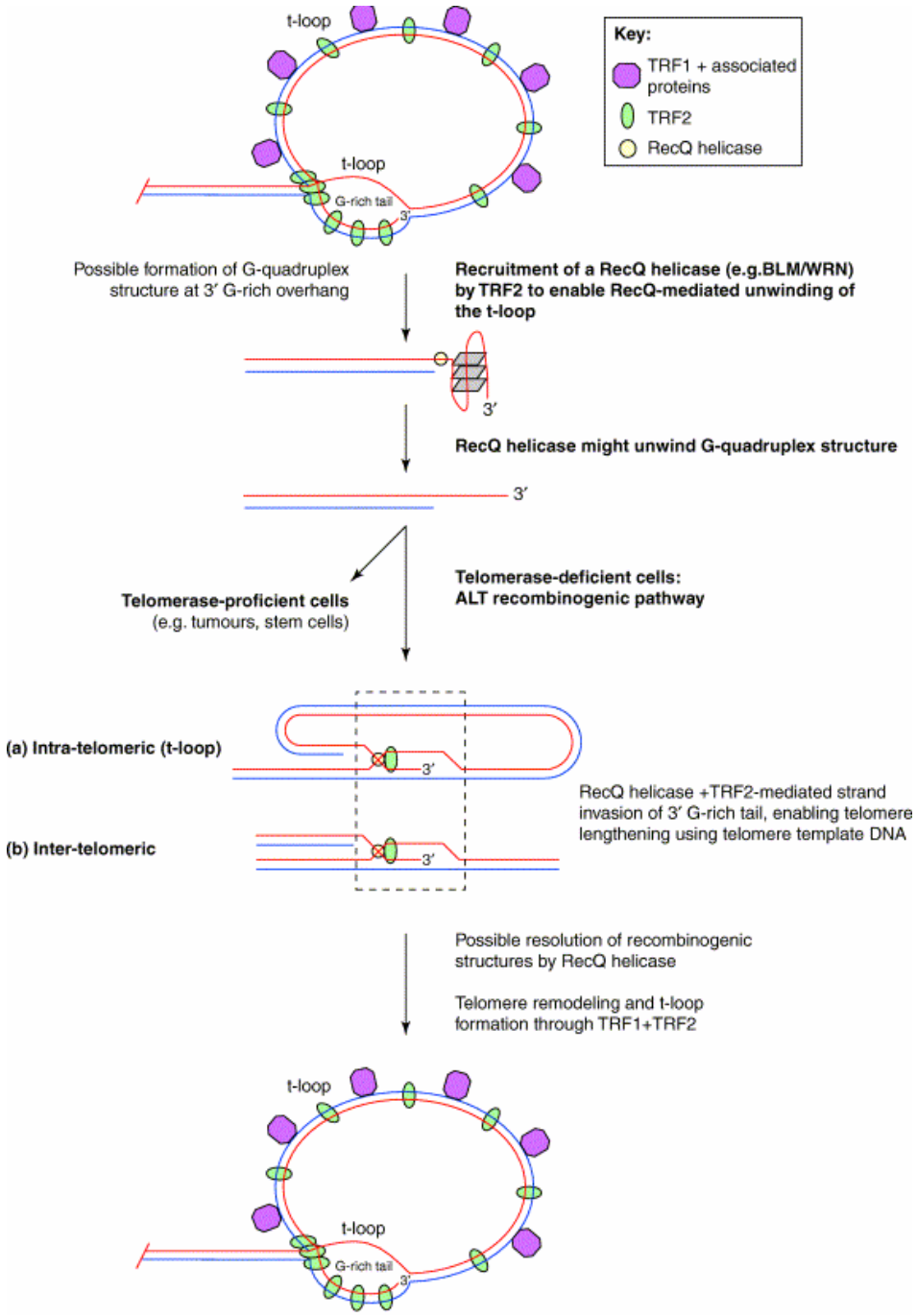


Figure 17. Différents rôles des hélicases de la famille RecQ dans le maintien des télomères. L'une des organisations potentielles des télomères est la structure en T-loop. Les hélicases de la famille RecQ peuvent êtres recrutées par TRF2 pour dérouler cette structure et inhiber la formation des G-quadruplexes. Dans les cellules ALT, les hélicases associées à TRF2 vont permettre le maintien de la taille des télomères en permettant les processus de recombinaison intra ou inter-télomérique.

Enfin, des protéines du DNA damage « checkpoint sont également associées aux structures APBs. Des sites contenant des dommages à l'ADN sont reconnus par un mécanisme (DNA damage checkpoint) entraînant un certain nombre de réponses cellulaires et notamment un arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Parmi les protéines du DNA damage, nous retrouvons ATM, la protéine kinase ATR et des homologues humains des protéines de levure, le complexe RAD9-HUS1-RAD1 et la protéine RAD17. En 2004, Nabetani a démontré que hRAD9, hHUS1, hRAD1 et hRAD17 sont colocalisés spécifiquement à l'ADN télomérique ainsi que dans les corps APBs des cellules ALT, suggérant ainsi que le « DNA damage checkpoint » intervient dans les cellules ALT au niveau des structures APBs (Nabetani A., et al., 2004).

D'autres protéines ont été colocalisées dans les structures PML-NB (PML nuclear bodies) mais n'ont pas encore été associées aux structures APBs. C'est le cas notamment de la protéine SUMO1, une protéine « ubiquitin-like » indispensable dans la formation des structures nucléaires NB (Takahashi Y., et al., 2004) (Bernardi R., et al., 2003) et p53 capable d'induire l'apoptose (Takahashi Y., et al., 2004) (De Stanchina E., et al., 2004).

4. La recombinaison dans les cellules ALT

a. La recombinaison inter-télomérique

La recombinaison inter-télomérique a été démontrée par Dunham en 2000 grâce à un « tag » inséré au niveau des télomères des cellules ALT (Dunham M. A., et al., 2000). Il peut ainsi suivre la localisation du tag par FISH. Lorsqu'il est positionné dans la séquence télomérique, le nombre de tag est augmenté en fonction du doublement de population (PD). A un PD de 23, le tag est présent dans 2 ou 3 télomères. Au PD 63, il est trouvé dans au moins 5 télomères dans toutes les cellules et dans la population clonale, 10 chromosomes différents sont marqués. Lorsque le tag est inséré en position subtélomérique, son nombre ne varie pas en fonction de l'augmentation des PDs et ne varie pas non plus dans des cellules télomérase positive. Ces auteurs proposent qu'un simple brin télomérique est capable d'envahir l'ADN double brin télomérique marqué et que ce double brin va servir d'amorce pour l'allongement du brin envahissant. Il en résulte une élongation du simple brin et la copie du tag (*Figure 18*).

Suite à la découverte de l'implication de la recombinaison dans les survivants *S. cerevisiae*, un modèle a été proposé au niveau des cellules ALT afin d'expliquer l'augmentation de la taille des télomères (*Figure 19*).

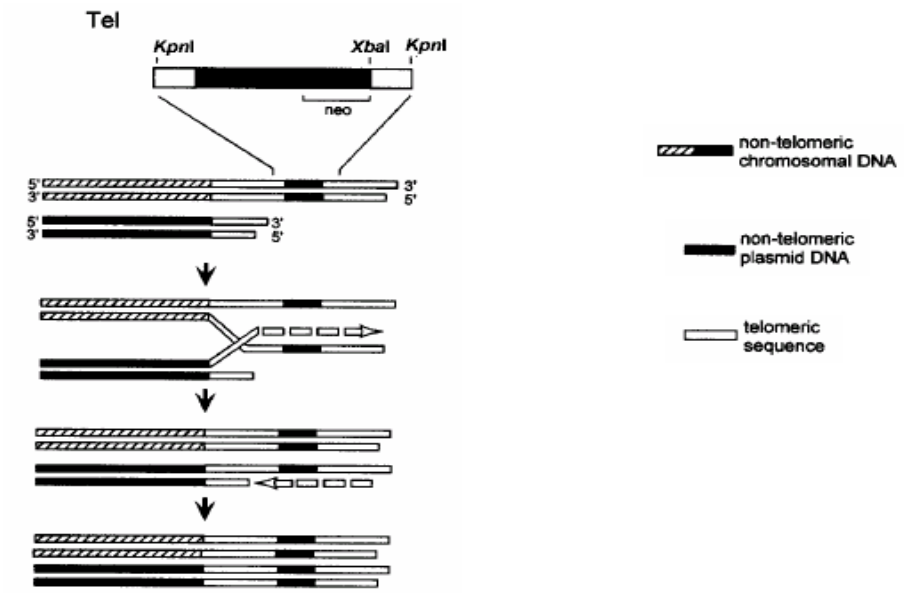


Figure 18. Détection de la recombinaison inter-télomérique. L'intégration d'un plasmide marqué en position télomérique résulte de la copie du tag dans d'autres télomères (d'après (Dunham M. A., et al., 2000).

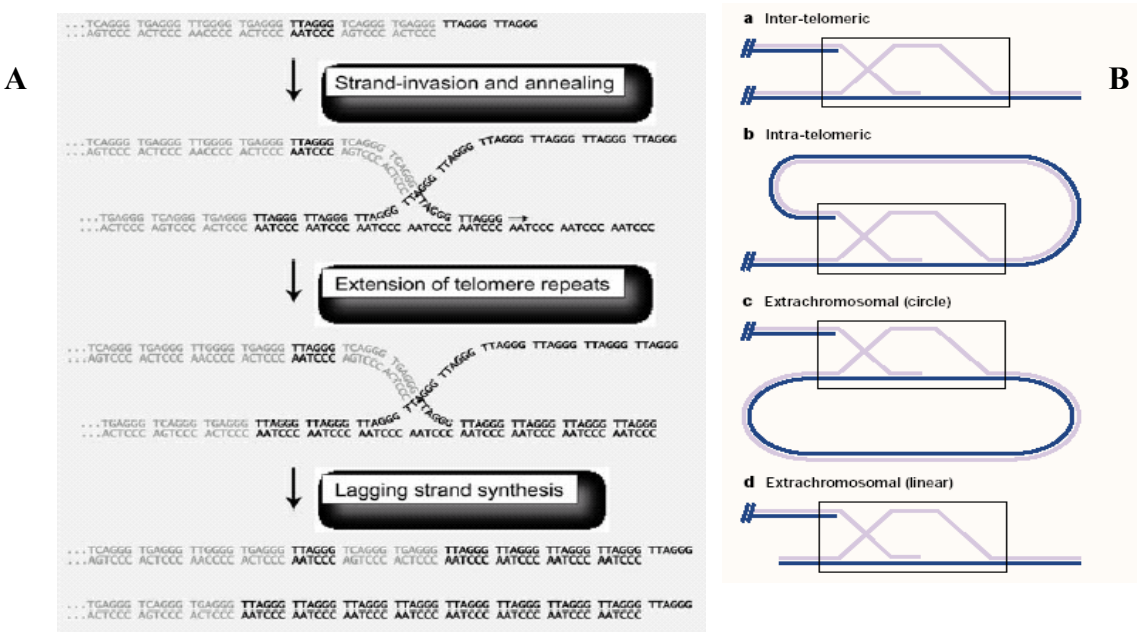


Figure 19. Elongation des télomères dans les cellules ALT. A) Il est proposé qu'un brin d'ADN télomérique puisse envahir un autre ADN télomérique et s'hybrider sur le brin complémentaire, servant d'amorce pour l'allonger. L'élongation de ce simple brin peut alors être effectuée et peut être converti par la suite en ADN double brin (d'après (Reddel R. R., 2003). B) Le brin « primer » peut être un autre télomère (a), une région proximal du même télomère (b), un ADN circulaire extrachromosomique (c) ou linéaire (d) (d'après (Neumann A. A., et al., 2002).

Dans ce modèle, un brin d'ADN d'un télomère court s'hybride au brin complémentaire d'un autre télomère et agit comme une amorce pour la synthèse de l'ADN. La nouvelle séquence synthétisée peut alors être convertie en double brin (*Figure 19A*). De plus, cette recombinaison peut se faire en utilisant comme amorce un autre télomère, une région proximale du même télomère ou des séquences télomériques extrachromosomiques circulaires (Rolling Circle) et linaires (ECTR) (*Figure 19B*).

b. Recombinaison, T-loop, cercle télomérique et ECTR

Dans les cellules ALT, une structure télomérique en boucle (la T-loop) peut contribuer au maintien de la longueur des télomères en permettant d'utiliser leurs propres séquences comme amorce. Lorsque l'ADN télomérique est coupé au niveau de la T-loop, des séquences d'ADN linéaire (ECTR) ou circulaire (rolling circle) sont formées et peuvent être utilisées comme amorce pour d'autres télomères (Cesare A. J., et al., 2004).

La présence de séquences d'ADN circulaires télomériques extrachromosomiques dans les noyaux des cellules ALT a été démontrée récemment par l'équipe de Griffith (Cesare A. J., et al., 2004). Chez *K. Lactis*, le maintien de la taille des télomères est effectuée par des mécanismes utilisant des « rolling circle » comme amorce pour la réplication (Tomaska L., et al., 2004). Griffith propose que les cellules ALT pourraient maintenir leur télomères par l'intermédiaire de mécanismes équivalent à ceux présents chez *K. lactis* en utilisant de l'ADN circulaire (Cesare A. J., et al., 2004).

Des ECTR ont été découvertes au niveau des structures APBs (Yeager T. R., et al., 1999). Ces ECTR linéaires peuvent être utilisées pour allonger les télomères par recombinaison homologue et peuvent également permettre le recrutement de certaines protéines associées aux corps APBs et intervenant dans la recombinaison. En effet, les structures APBs apparaissent en phase S/G2/M du cycle cellulaire, au moment où les mécanismes de recombinaison sont les plus actifs (Takata M., et al., 1998).

c. Les échanges entre chromatides sœurs

Le principe des recombinaisons homologues précédemment décrites est basé sur une extension télomérique par l'intermédiaire d'une polymérase, qui utilise une amorce pour fonctionner. Cette amorce peut être, comme nous l'avons décrit, un chromosome ou des fragments d'ADN extrachromosomiques. Récemment, Susan Bailey propose un autre mécanisme de recombinaison basé sur des échanges de chromatides sœurs. Ces échanges se produisent à des fréquences relativement élevées et sont dépendants du génotype. Ils

intéressent essentiellement des télomères de petites tailles, notamment les cellules proches de la sénescence. Un échange télomérique inégal entre deux cellules proche de la sénescence induit l'une de ces cellules à entrer en sénescence immédiatement alors que l'autre cellule va présenter des télomères plus longs et va pouvoir se multiplier beaucoup plus rapidement et pendant plusieurs cycles (Bailey S. M., et al., 2004). En utilisant une technique d'hybridation spécifique utilisée habituellement pour déterminer l'orientation des chromosomes (CO-FISH), Arturo Londono-Vallejo a montré que des échanges télomériques apparaissent à des fréquences élevées dans les cellules ALT. Bien que les télomères dans ces lignées soient de grande taille, ces échanges ne sont pas attribués à leur longueur puisque peu d'échanges télomériques ont été observés dans des cellules embryonnaires fibroblastiques de souris dans lesquelles la taille des télomères est équivalente à celle des cellules ALT (Londono-Vallejo J. A., et al., 2004).

5. Fréquence des recombinaisons homologues dans les cellules ALT

Le nombre important de recombinaisons télomériques dans les cellules ALT indique qu'il existe une dérégulation de ces mécanismes au niveau des télomères. Cependant, l'origine de cette modification n'est pas encore élucidée. Des recombinaisons homologues existent également dans d'autres régions chromosomiques dans les cellules ALT et télomérase positive intervenant dans le polymorphisme génétique. Récemment, l'équipe de Wright a décrit un protocole afin d'étudier les fréquences des recombinaisons dans des cellules ALT et télomérase positive. Cette technique est basée sur l'utilisation d'un système rapporteur (par l'intermédiaire de GFP) de recombinaison induite (pDR-GFP), transfecté de façon stable dans différentes cellules. Ils ont voulu savoir si la dérégulation des mécanismes de recombinaison homologue au niveau des télomères affecte également la fréquence des recombinaisons dans des régions internes des chromosomes et au niveau des séquences sub-télomériques. Les résultats montrent que la recombinaison dans des cellules ALT (SW26) et télomérase positive (SW39) apparaît à la même fréquence, dans les deux régions, interne chromosomique (3,4% ± 1,8% pour SW26 et 3,5% ± 1.4% pour SW39) et sub-télomérique (3.1% ± 1,7% pour SW26 et 1,9%±1.3% pour SW39). Ces données suggèrent que les cellules ALT possèdent une dérégulation des mécanismes de recombinaison homologue. Les auteurs ont proposé que dans les cellules télomérase positive, la recombinaison serait inhibée par des protéines reconnaissant la séquence télomérique TTAGGG. Des séquences variantes de TTAGGG (par exemple TGAGGG) sont présentes dans la région subtélomérique. Le raccourcissement des télomères provoque un pourcentage plus important de séquences mutées par rapport aux

séquences normales et donc une diminution de la quantité de protéines télomériques qui bloquent la recombinaison. L'invasion du télomère court dans un télomère plus long pourrait induire une élongation du télomère court par un processus de recombinaison (Bechter O. E., et al., 2003) (Bechter O. E., et al., 2004).

6. Expression de l'activité télomérase dans les cellules ALT

Des expériences de fusions de cellules normales et télomérase positive ainsi que de cellules normales et des cellules ALT ont montré une perte des activités télomérase ou ALT respectivement (Perrem K., et al., 1999) (Ishii Y., et al., 1999). De plus, des fusions entre des cellules télomérase positive et des cellules ALT montrent une suppression du phénotype ALT. Ces observations suggèrent qu'il existe des mécanismes répresseurs des deux mécanismes (Perrem K., et al., 1999). Des observations similaires ont déjà été faites chez *S. cerevisiae*. En effet, une expression ectopique de la télomérase dans les survivants de type I et II amène une inhibition des mécanismes de recombinaison, immédiatement pour les cellules de type I, et après plusieurs cycles de divisions pour les cellules de type II (Teng S. C., et al., 1999).

Suite à ces observations, des études de reconstitution de l'activité télomérase ont été réalisées afin de déterminer l'effet de cette double activité. Il est important de différencier les techniques de fusion cellulaire entre cellules ALT et cellules télomérase positive, et de reconstitution de l'activité télomérase dans les cellules ALT. Plusieurs équipes ont transfecté des cellules ALT avec le gène hTERT et le gène hTR. Ces cellules présentent une activité télomérase et une colocalisation de PML avec TRF2 au niveau des structures APBs, montrant que l'activité ALT était toujours présente. De plus, la taille des télomères dans ces cellules ALT et ALT + télomérase présente une hétérogénéité de taille allant de 5 à 48kb, caractéristique des cellules ALT. Ces différentes données montrent que les deux mécanismes d'élongation des télomères peuvent coexister dans des cellules ALT présentant une activité télomérase (Cerone M. A., et al., 2001) (Grobelny J. V., et al., 2001) (Perrem K., et al., 2001).

L'équipe de Woodring Wright a également transfecté hTERT et hTR dans des cellules ALT VA13 et confirme les travaux précédents. Cependant, ces auteurs ont sélectionné des clones issus de la population transfectée. Certains clones ont éliminé les télomères longs et ne présentent que des télomères courts dont la taille correspond à celles des cellules cancéreuses exprimant la télomérase. D'autres clones ont cependant conservé une taille de télomère élevée. Les clones présentant une diminution de la taille des télomères montrent également une diminution du pourcentage des cellules possédant des structures APBs d'environ 20 fois par rapport aux cellules VA13 parentales, alors que dans les clones présentant des tailles

élevées, le nombre de ces structures reste relativement élevé. Il en est de même en ce qui concerne le taux d'ECTR dans ces différents clones. Ces données montrent que l'activité télomérase peut inhiber les mécanismes de recombinaison. Cette inhibition peut être due à plusieurs facteurs. Ces auteurs proposent que la structure ribonucléoprotéique de la télomérase pourrait séquestrer des protéines nécessaires à l'initiation de la recombinaison. La télomérase pourrait également changer la structure des télomères inhibant la recombinaison, ou bien la télomérase pourrait protéger la structure télomérique et empêcher ainsi les mécanismes de recombinaison (Ford L. P., et al., 2001). Cependant, il est possible que l'apparition de clones capables d'inhiber l'activité ALT soit induite par certaines mutations des mécanismes de la recombinaison suite à la transfection et que cette perte ne soit pas le fruit d'une activité télomérase induite. En effet, l'équipe de Reddel a récemment démontré que la surexpression de SP100 induit une inhibition des mécanismes de recombinaison dans les cellules ALT (Jiang W. Q., et al., 2005).

D. La régulation des télomères

1. hTERT dans la protection des télomères

En 1999, Zhu suggère qu'en dehors de sa capacité à allonger les télomères, la télomérase aurait un rôle de protection des extrémités télomériques (Zhu J., et al., 1999) (Ouellette M. M., et al., 2000). Cette fonction de "capping" de la télomérase pourrait représenter un facteur important dans les mécanismes de résistance à l'apoptose. Ainsi, la perte de l'activité télomérase due à des inhibiteurs ou à l'aide d'un dominant négatif de TERT favorise la mort par apoptose (Kushner D. M., et al., 2000) (Kondo Y., et al., 2000) (Zhang X., et al., 1999). Inversement, son expression forcée ou sa sur-expression respectivement dans des cellules normales et dans des lignées cellulaires provoquent une résistance à l'apoptose provoquée par différents stimuli qui pourraient dépendre de la taille des télomères (Zhu H., et al., 2000) (Holt S. E., et al., 1999).

En 2002, l'équipe de Weinberg a réalisé des expériences de transfections dans des cellules GM847 avec un plasmide contenant un mutant de hTERT ($hTERT_{HA}$) et/ou un plasmide contenant l'oncogène h-Ras capable d'induire l'oncogenèse. Le mutant $hTERT_{HA}$ garde son activité enzymatique *in vitro* mais est incapable d'allonger les télomères. Les cellules exprimant h-Ras ou $hTERT_{HA}$ sont incapables d'induire la formation de tumeur dans des souris immunodéficientes. Par contre, les cellules contenant $hTERT_{HA}$-Ras ou hTERT-Ras sont capables d'induire la formation de tumeurs. Ces différentes données suggèrent que hTERT possède une activité non catalytique et que cette sous-unité est capable d'induire l'oncogenèse, indépendamment de l'élongation des télomères (Stewart S. A., et al., 2002)

2. TRF1 et les protéines de la coiffe télomérique associées

Le rôle de TRF1 a été déterminé en modifiant son expression dans des cellules exprimant la télomérase. La surexpression de TRF1 entraîne une diminution de la taille des télomères alors que la surexpression d'un dominant négatif de TRF1 entraîne une élongation des télomères (Smogorzewska A., et al., 2000, Van Steensel B., et al., 1997). Ces données montrent que TRF1 agit comme un régulateur négatif de la taille des télomères. Un certain nombre de protéines partenaires de TRF1 a été identifié et sont capables d'influencer cette régulation négative.

La Tankyrase 1 (TANK1) est une protéine de la famille des poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) qui module l'activité de TRF1. La poly(ADP-ribosyl)ation de TRF1 provoque l'inhibition de la fixation de ce facteur aux télomères (Smith S., et al., 1998). De

plus, une surexpression de TANK1 dans le noyau de cellules télomérase positive induit une augmentation de la taille des télomères (Smith S., et al., 2000).

L'activité enzymatique de TANK1 sur TRF1 est régulée par le facteur TIN2 (*Figure 20*) (Ye J. Z., et al., 2004a). TIN2 contribue également à l'accumulation de TRF1 au niveau des télomères. TRF1 régule négativement la télomérase en permettant la fixation de POT_1 sur le simple brin télomérique (brin G) (*Figure 20A*). L'inactivation de TIN2 permet l'activité poly(ADP) ribosyltransférase de TANK1 sur TRF1, ce qui diminue l'affinité de cette dernière pour l'ADN télomérique double brin, et empêche indirectement la fixation de POT_1 au simple brin télomérique. Le simple brin devient alors accessible à la télomérase (*Figure 20B*) (pour revue, voir (Riou J. F., et al., 2005))

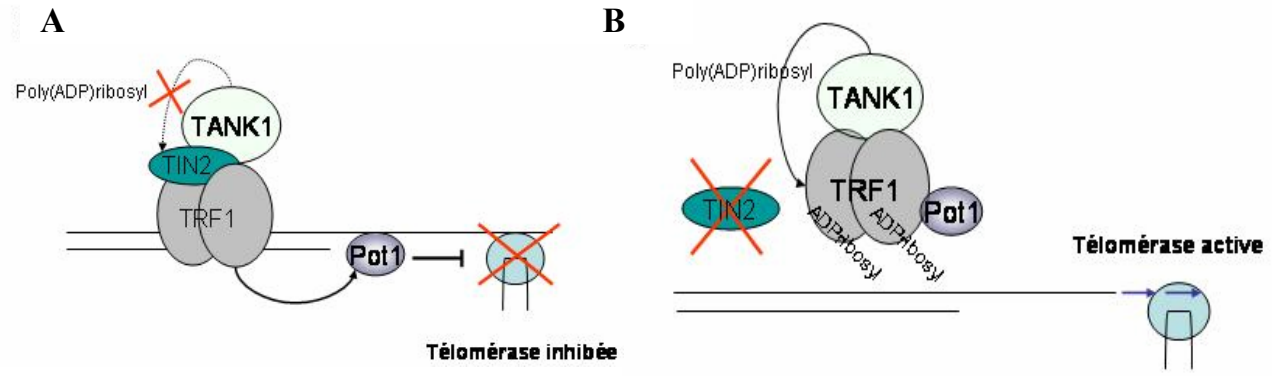


Figure 20. TIN2 fonctionne comme un régulateur de l'activité de la tankyrase. A) TIN2 fixe et protège TRF1 de l'inactivation par la tankyrase (TANK1). B) Lorsque TIN2 est inactivé, l'activité poly(ADP) ribosyltransférase de TANK1 diminue l'affinité de TRF1 pour l'ADN télomérique double brin, ce qui empêche la fixation de POT_1 au simple brin télomérique. Le simple brin devient alors accessible à la télomérase (Riou J. F., et al., 2005).

Très récemment, trois équipes différentes ont découvert une nouvelle protéine faisant l'intermédiaire entre POT_1 et TIN2 dans le mécanisme de régulation de la télomérase par TRF1. Ce facteur, PIP1 [POT_1 Interacting Protein 1 d'après T. De Lange (Ye J. Z., et al., 2004c)] ou PTOP [d'après Dan Liu (Liu D., et al., 2004b)] ou TINT1 [d'après l'équipe de Susan Smith (Houghtaling B. R., et al., 2004)] contribue au contrôle de la longueur des télomères en permettant le recrutement de POT_1.

PINX1 est également une protéine capable de se fixer à TRF1 et est capable d'inhiber l'activité de la télomérase *in vitro*. Il a été suggéré que PINX1 module l'activité de la télomérase dans le noyau par l'intermédiaire de TRF1 (ou de l'un de ces isoformes PIN2) (Zhou X. Z., et al., 2001). L'inhibition de PIN2/TRF1 par PINX1 entraîne des raccourcissements télomériques, une sensibilité accrue aux rayons ainsi que des perturbations

du cycle mitotique en G2/M dans les cellules ATM (Ataxia-telangiectasia mutated) (Zhou X. Z., et al., 2001) (Kishi S., et al., 2002). Très récemment, Banik Soma a démontré que PINX1 se lie *in vitro* à la sous unité catalytique de la télomérase (hTERT), au niveau du domaine de fixation à hTR, ainsi qu'à la sous unité d'ARN hTR elle-même et propose que PINX1 inhibe l'activité télomérase *in vivo* en se fixant au complexe hTERT-hTR (Banik S. S., et al., 2004).

3. TRF2 et les protéines de la coiffe télomérique associées

Le rôle de TRF2 est associé à la protection des extrémités chromosomiques en maintenant la structure des télomères (Van Steensel B., et al., 1998). De plus, l'utilisation d'un dominant négatif de TRF2 (TRF2 dans lequel les domaines basiques et Myb sont tronqués) induit des fusions télomériques en métaphase et en anaphase et induit également la sénescence des cellules (Van Steensel B., et al., 1998). En 1999, Karlseder et al. découvrent une nouvelle fonction de TRF2. Ils montrent que l'absence de TRF2 induit l'entrée des cellules en apoptose et que cette mort cellulaire est induite par la voie p53/ATM (Karlseder J., et al., 1999). Récemment, G. Yanez a montré que TRF2 est capable de reconnaître spécifiquement la jonction double brin/simple brin télomérique. Cette reconnaissance nécessite au moins une répétition TTAGGG sur le simple brin à proximité du double brin (Yanez G. H., et al., 2005).

TRF2 est capable d'interagir avec la protéine Rap1p (Repressor-Activator Protein 1) pour réguler la longueur des télomères (O'connor M. S., et al., 2004). Chez la levure, Rap1p fonctionne comme un régulateur négatif de la longueur des télomères en s'associant avec Taz1p (Park M. J., et al., 2002). Rap1p s'associe avec deux autres facteurs Rif1 et Rif2 (Rap1p interacting factor 1 et 2). Chez l'homme, hRap1 agit également comme un régulateur négatif de la longueur des télomères et affecte l'hétérogénéité de leur taille (Li B., et al., 2003). L'inhibition de hRap1 par ARN interférence induit une augmentation de la taille des télomères (O'connor M. S., et al., 2004). Récemment, l'équipe de E. Blackburn a découvert un homologue de Rif1 chez l'homme (hRif1). Cependant hRif1 ne semble pas être localisé aux télomères et n'affecte pas leur taille (Xu L., et al., 2004).

Des hélicases de la famille RecQ sont également associées à TRF2. Parmi elles, nous retrouvons WRN et BLM.

BLM interagit avec TRF2 afin d'augmenter la taille des télomères et pourrait également dérouler le simple brin télomérique permettant les mécanismes d'invasion du simple brin (Stavropoulos D. J., et al., 2002). BLM est nécessaire à la localisation nucléaire du complexe MRE11 (intervenant dans la réparation des cassures doubles brins et induisant la

formation de la T-loop *in vitro* (Zhu X. D., et al., 2000)) et interagit également avec p53 (Franchitto A., et al., 2002) (Sengupta S., et al., 2003). La mutation de BLM est à l'origine du syndrome de Bloom (BS), une maladie associée à des retards de croissance, des immunodéficiences, une sensibilité au soleil, des lésions de la peau et une prédisposition à certains cancers (leucémies). Les cellules BS présentent des hyper-recombinaisons entre les chromatides soeurs et des chromosomes homologues (German J., 1993).

La protéine WRN intervient dans des processus de réparation de l'ADN, recombinaison et transcription. Certaines évidences biochimiques et cellulaires montrent que WRN fonctionnerait comme une enzyme capable de dissocier les structures secondaires des télomères pour permettre une bonne réplication, réparation et l'activité télomérase (Lee J. W., et al., 2005). Parmi ces structures secondaires télomériques, ces hélicases sont capables de dérouler la D-loop ainsi que les structures de type G-quadruplexe (Van Brabant A. J., et al., 2000) (Orren D. K., et al., 2002) (Mohaghegh P., et al., 2001). L'équipe de J. Karlseder propose que WRN est nécessaire pour une bonne réplication du brin G-riche télomérique et réduit des dysfonctionnements du télomère ainsi que des instabilités génomiques (Crabbe L., et al., 2004).

La mutation de WRN est à l'origine du syndrome de Werner (WS), une maladie récessive caractérisée par un vieillissement prématuré, athérosclérose, ostéoporose, diabète, pathologies oculaires bilatérales et une prédisposition à certains types de tumeurs (sarcomes) (Dyer C. A., et al., 1998). Les cellules WS entrent en sénescence prématurément par défaut de la phase S du cycle cellulaire et présentent des hyper-recombinaisons (Brosh R. M., Jr., et al., 1999). Elles présentent des raccourcissements télomériques élevés et des défauts des mécanismes de réparation des télomères (Tahara H., et al., 1997).

De nombreuses autres protéines de réparation ou intervenant dans la recombinaison non homologue ont également été co-localisées à TRF2. Parmi ces protéines nous retrouvons DNA-PK, Ku70, Ku86, p53BP1, H2AX RAD17, RAD51D et ATM (Harrington L., 2004). Le gène *ATM* est un gène suppresseur de tumeur appartenant à la famille des PI3-kinases qui intervient dans la transduction du signal, la recombinaison méiotique et le contrôle du cycle cellulaire en phosphorylant différentes protéines (p53, BRCA1, NBS1 ou FANCD2). Lorsqu'il est muté il induit l'ataxie télangiectasie (AT). AT est une maladie inhérente, rare et de transmission autosomique présentant un phénotype clinique complexe : dégénérescences neuronales, télangiectasies oculaires, immunodéficiences, stérilité, instabilité génomique, vieillissement prématuré, diabète et prédisposition aux cancers. Des cellules AT présentent un raccourcissement accéléré des télomères, des fusions chromosomiques ainsi qu'une entrée en

sénescence prématurée. Ces symptômes sont normalement associés à p53, l'un des substrats de ATM. ATM jouerait donc un rôle dans la protection des télomères (Wong K. K., et al., 2003) (Qi L., et al., 2003).

L'anémie Fanconi (FA) est une maladie génétique récessive caractérisée par des anomalies du développement et une susceptibilité accrue aux leucémies myéloïdes ainsi qu'à certaines tumeurs solides. Les cellules FA présentent de nombreuses instabilités chromosomiques. Dans cette maladie, au moins 12 gènes interviennent : *FANCA, FANCB, FANCC, FANCD1/BRCA2, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCJ, FANCL et FANCM* (Surralles J., et al., 2004). Les protéines de ces différents gènes vont s'associer pour former un complexe via des mono-ubiquitinations. La protéine clé est FANCD2. Les cellules FA présentent un raccourcissement télomérique accru, une forte proportion de séquences TTAGGG extra-chromosomiques, ainsi que d'importantes fusions télomériques (Callen E., et al., 2002).

4. *POT_1 dans la régulation des télomères*

Récemment, Colleen Kelleher a réalisé des expériences *in vitro,* par des techniques de purification de la télomérase et de reconstitution de son activité, afin de déterminer si POT_1 a une influence directe sur l'activité télomérase. Il montre que POT_1 inhibe l'activité télomérase, apparemment en obstruant l'accès au niveau de l'extrémité 3'. Cette inhibition est dépendante de la quantité de POT_1 qui doit être stœchiométrique à la concentration des extrémités télomériques (Kelleher C., et al., 2005).

Des études utilisant des mutants de POT_1 ont été réalisées afin de déterminer le rôle de cette protéine dans la régulation des télomères. *In vivo*, la perte du simple brin G-riche des télomères par l'utilisation d'un dominant négatif de TRF2 entraîne la délocalisation de $hPOT_1$, confirmant ainsi la spécificité de fixation de $hPOT_1$ au simple brin télomérique. Cependant, des expériences en ChIPs montrent que le dominant négatif $POT_1(\Delta OB)$, qui ne peut pas se fixer à l'ADN simple brin, reste localisé aux télomères mais n'inhibe pas la télomérase. L'équipe de T. De Lange suggère que $POT_1(\Delta OB)$ reste fixé aux télomères par l'intermédiaire de TRF1 (Loayza D., et al., 2003). Ils ont proposé deux modèles pour expliquer ces résultats avec le dominant négatif $POT_1(\Delta OB)$. Dans un modèle linéaire, plus la taille du télomère est grande, plus le nombre de protéines TRF1 est important. POT_1 (fixé à TRF1) est alors augmentée et peut se fixer à l'extrémité 3' simple brin et inhiber l'activité télomérase. Lorsque POT_1 est remplacée par $POT_1(\Delta OB)$, elle ne peut plus se fixer au niveau de l'extrémité 3' simple brin et la télomérase peut allonger le télomère. (*Figure 21A*). Dans le

modèle de la T-loop, POT_1 fixe le simple brin de la D-loop et stabilise la T-loop. Si POT_1 est remplacée par $POT_1(\Delta OB)$, il n'y a plus fixation de POT_1 au niveau de la D-loop, la T-loop devient donc instable et la télomérase peut alors allonger le télomère. (*Figure 21B*). Dans des cellules télomérase positive exprimant $POT_1(\Delta OB)$, les télomères sont très rapidement allongés, passant d'une taille d'environ 6kb à 20kb après 40 PD (Population Doubling) (Loayza D., et al., 2003). La présence de $cPOT_1$ (chicken POT_1) au niveau du simple brin télomérique ainsi que sa contribution dans la stabilisation de la T-loop ont également été observées chez le poulet, montrant ainsi un rôle bien conservé de POT_1 dans l'évolution (Wei C., et al., 2004).

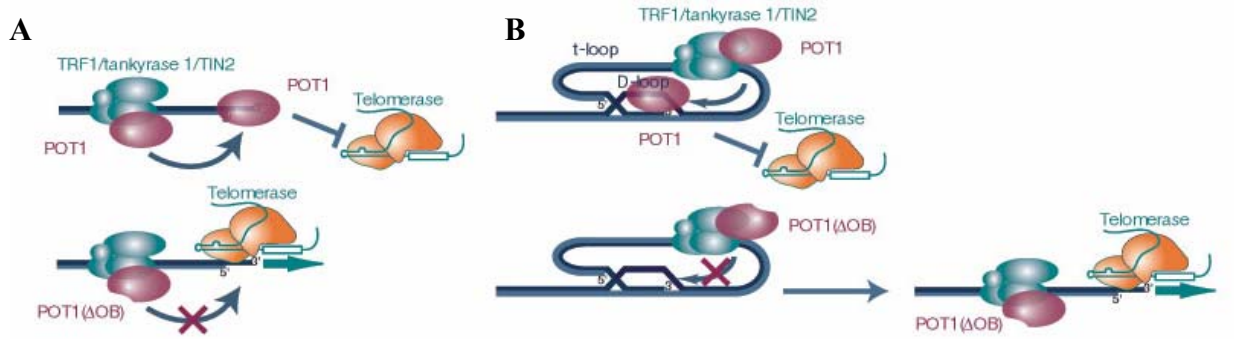


Figure 21. Modèle proposé par T. De Lange dans le rôle de POT_1 comme transducteur terminal du contrôle de la longueur des télomères par TRF1 (d'après (Loayza D., et al., 2003)).

Très récemment, il a été montré que la perte des fonctions de $hPOT_1$ par ARN interférences entraîne une diminution de la viabilité cellulaire caractérisée par un arrêt de la croissance cellulaire et une entrée en sénescence, un phénotype « cut-like » caractérisé par des fusions de la chromatine en interphase, des fusions chromosomiques en métaphase, des ponts anaphasiques, ainsi qu'une augmentation de la taille des télomères (Veldman T., et al., 2004).

Dans d'autres études, la surexpression de $hPOT_1$ induit une élongation des télomères par la télomérase (Colgin L. M., et al., 2003) (Armbruster B. N., et al., 2004). Il est donc possible que $hPOT_1$ possède, comme chez la levure, un double rôle dans la régulation des télomères (Lei M., et al., 2005). De plus, le gène $hPOT_1$ comporte 22 exons. 4 d'entre eux interviennent dans un épissage alternatif. Il a été découvert au moins 5 protéines distinctes de $hPOT_1$, chacune pouvant ainsi avoir un rôle différent dans la régulation des télomères (Baumann P., et al., 2002). De plus, il est possible que le rôle inhibiteur de $hPOT_1$ puisse être supprimé lorsque cette protéine est modifiée ou bien lorsqu'elle est associée à d'autres polypeptides (Kelleher C., et al., 2005).

5. *Interconnexion TRF1-TRF2-POT$_1$*

TRF1 et TRF2 sont des protéines indispensables dans la régulation des télomères. Ces deux protéines sont associées au double brin ainsi qu'à plusieurs facteurs formant des complexes télomériques. Nous avons vu que TIN2 module l'activité de TRF1. Des travaux récents montrent que TIN2 interagit également avec le complexe TRF2-hRap1 (Houghtaling B. R., et al., 2004) (Ye J. Z., et al., 2004b) (Kim S. H., et al., 2004) (Liu D., et al., 2004a). Par des techniques de co-immunoprécipitation, J Ye a montré que TRF1, TRF2 et TIN2 forment un complexe au niveau des télomères (Ye J. Z., et al., 2004b). Ces interactions sont réalisées par l'intermédiaire de TIN2 grâce à deux domaines de reconnaissance, TBD1 et 2 (TRF1 et TRF2 binding domain) (*Figure 22B*) (pour revue, voir (Riou J. F., et al., 2005)). Lorsque ces deux séquences sont mutées, la fixation de TRF1 et TRF2 au télomère double brin est inhibée et une réponse de type dommage à l'ADN est engagée. De même, la protéine POT$_1$ localisée au simple brin télomérique est régulée par le complexe TRF1-TIN2-TRF2 via la protéine PIP1. Des domaines de reconnaissance à POT$_1$ et TIN2 ont également été décrits au niveau de la protéine PIP1 (Houghtaling B. R., et al., 2004) (*Figure 22B*). Le modèle d'interaction TRF1-TRF2-TIN2-POT$_1$ permet de faire la connexion entre le télomère double brin et sa partie simple brin. De plus, ces interactions protéines - protéines permettent de relier les fonctions de modulation de l'activité télomérase (complexes TRF1/TIN2/PIP1/POT$_1$) avec les fonctions de modulation de la protection des télomères (complexes TRF2/TIN2/hRap1/MRE11/ERCC1/WRN) (*Figure 22A*).

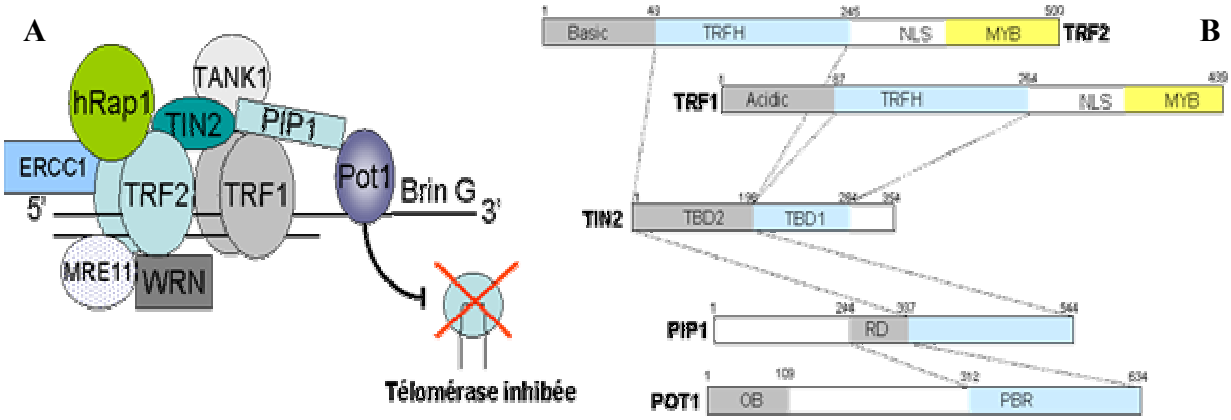


Figure 22. Interconnexion entre TRF1, TRF2 et POT$_1$. A : Représentation schématique des interactions entre TRF1 et TRF2 par l'intermédiaire de TIN2 et entre le complexe TRF1-TRF2 et POT$_1$ par l'intermédiaire de PIP1. B : Les domaines d'interaction du complexe TRF1/TRF2/TIN2/PIP1/POT$_1$. TRFH (TRF homology) ; PBR (PIP1 Binding Region) ; RD (POT$_1$ Recruitment Domain); OB: Oxytrichia Binding (domaine de fixation au simple Brin télomérique) (d'après (Riou J. F., et al., 2005)).

6. *Structure en T-loop et protection des télomères*

Jusqu'en 1999, les scientifiques pensaient que la protection des extrémités chromosomiques était réalisée par les télomères selon un modèle linéaire dans lequel, le capuchon télomérique était composé de l'extension simple brin associée à des protéines spécifiques (Ancelin K., et al., 2002) (Greider C. W., 1999) (*Figure 23*). Cependant, un autre modèle en boucle appelé « T-loop » (Telomeric Loop) a été proposé par Griffith JD en 1999 (*Figure 24*).

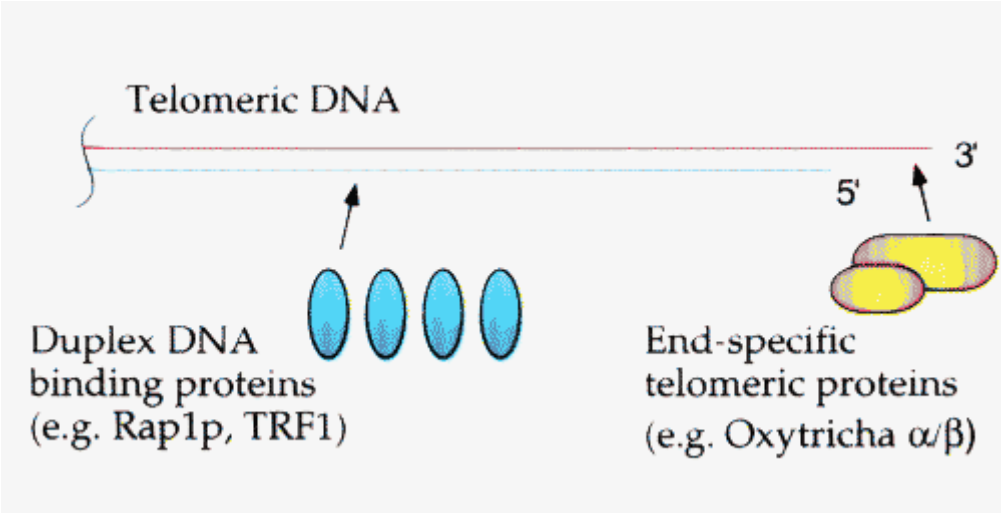


Figure 23. Le modèle linéaire de la structure télomérique (d'après (Greider C. W., 1999)).

Des études de microscopie électronique ont permis de visualiser une structure en boucle qu'il a défini comme la T-loop (Griffith J. D., et al., 1999). Cette T-loop correspondrait à une invasion du duplexe télomérique par le brin G télomérique. Suite à cette invasion, une partie de l'ADN double brin devient simple brin, formant une D-loop (Displacement loop). La formation de cette structure serait permise par une taille relativement longue du simple brin télomérique, et par l'association avec certaines protéines spécifiques. Il a été suggéré qu'au moins 100 nucléotides de l'extrémité simple brin participent à la formation de cette T-loop (Griffith J. D., et al., 1999) (Stansel R. M., et al., 2001). Selon T. De Lange, cette structure permettrait d'éviter la dégradation du télomère et les fusions télomériques (De Lange T., 2004).

A **B**

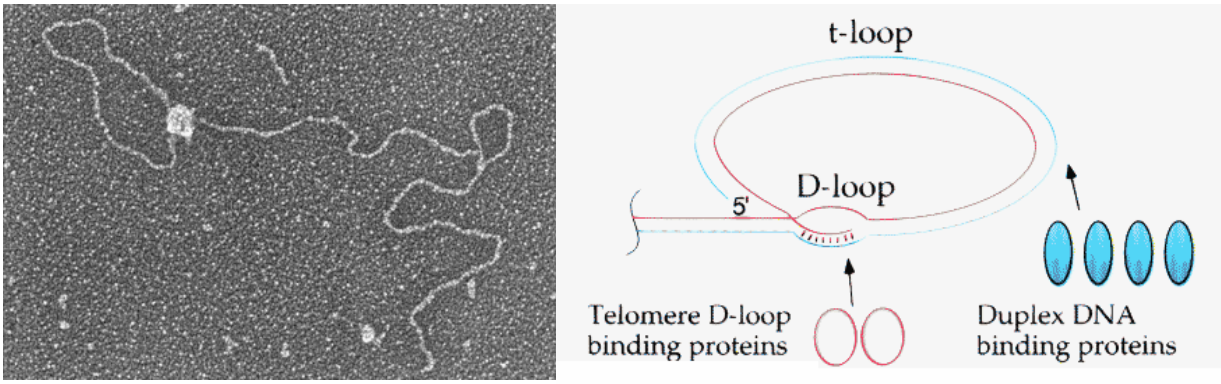


Figure 24. Le modèle T-loop. A : Image obtenue en microscopie électronique d'une T-loop en présence de TRF2 (Griffith J. D., et al., 1999). B : Le modèle de la structure télomérique en T-loop (Greider C. W., 1999).

Parmi les protéines associées à la T-loop, nous retrouvons TRF1 et TRF2. *In vitro*, TRF2 favorise la formation de la T-loop en induisant l'invasion du simple brin dans le duplexe télomérique et cette structure permet au télomère d'adopter une forme protégée.

La régulation des télomères est également liée à la protection du simple brin. Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la protection de l'extrémité télomérique (pour revue, voir (Riou J. F., et al., 2005)) (*Figure 25*). Il est possible que le simple brin puisse être replié et protégé par le complexe POT1-TIN2-TRF1 sans envahissement du duplexe par le simple brin (D-loop) (*Figure 25A*). Le modèle de la T-loop est également compatible avec la protection du simple brin par ce complexe. En effet, il serait associé, non plus à l'extrémité simple brin mais au brin G du duplexe envahi par le simple brin télomérique (*Figure 25B*).

Bien évidemment, ces différents modèles de protection - régulation du télomère et de son simple brin restent des suppositions et il est indispensable de déterminer réellement la structure tridimensionnelle du télomère associée aux différentes protéines pour comprendre réellement le rôle de chaque acteur. De plus, la D-loop, bien qu'elle soit décrite par de nombreux auteurs, reste à démontrer avec certitude pour valider le dernier modèle de protection du simple brin télomérique.

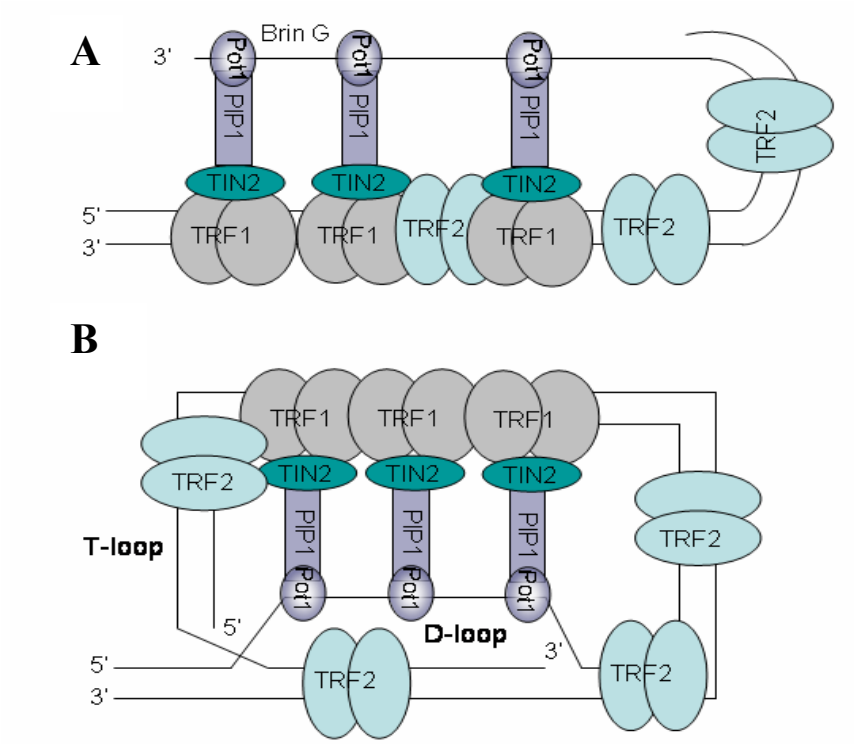


Figure 25. Modèle de protection du simple brin télomérique. A : Par repliement du simple brin. Les complexes TRF1-TRF2-TIN2-PIP1-POT1 permettent une fixation et une protection du simple brin télomérique sans invasion du double brin télomérique par le brin G. B : Par fixation au niveau du brin G déplacé de la D-loop. Les complexes TRF1-TRF2-TIN2-PIP1-POT1 permettent une stabilisation de la T-loop par une interaction de POT1 avec le brin G déplacé lors de l'envahissement du double brin par le simple brin (Riou J. F., et al., 2005).

7. La régulation des télomères chez la levure

Chez la levure *S. cerevisiae*, nous retrouvons un homologue des protéines TRF1 et TRF2, Rap1p. Rap1p agit comme un régulateur négatif de la longueur des télomères. Le groupe de J. Lingner a récemment publié des travaux chez la levure indiquant que le télomère oscille entre deux états, l'un est ouvert et accessible à la télomérase et l'autre non (Teixeira M. T., et al., 2004). En effet, les auteurs montrent que la télomérase allonge préférentiellement les télomères de petites tailles présents dans un état ouvert et que les plus longs sont dans un état fermé, inaccessible pour l'enzyme. Cette régulation se fait par l'intermédiaire de la protéine Rap1 et de façon proportionnelle à la quantité de protéine fixée au télomère. Ainsi les télomères longs possèdent un nombre plus important de protéines Rap1 et l'inhibition de la télomérase y serait d'autant plus forte. A l'inverse, lorsque le télomère raccourcit, l'inhibition de Rap1 est levée et le télomère devient accessible à la télomérase (Marcand S., et al., 1997). L'action de Rap1 est associée à deux autres protéines, Rif1 et Rif2 (Rap interacting Factor 1 et 2). Lorsque celles ci sont absentes, les télomères deviennent

accessibles à la télomérase (Wotton D., et al., 1997). Ces différentes protéines associées permettent donc la commutation des télomères en un état ouvert ou fermé (*Figure 26*).

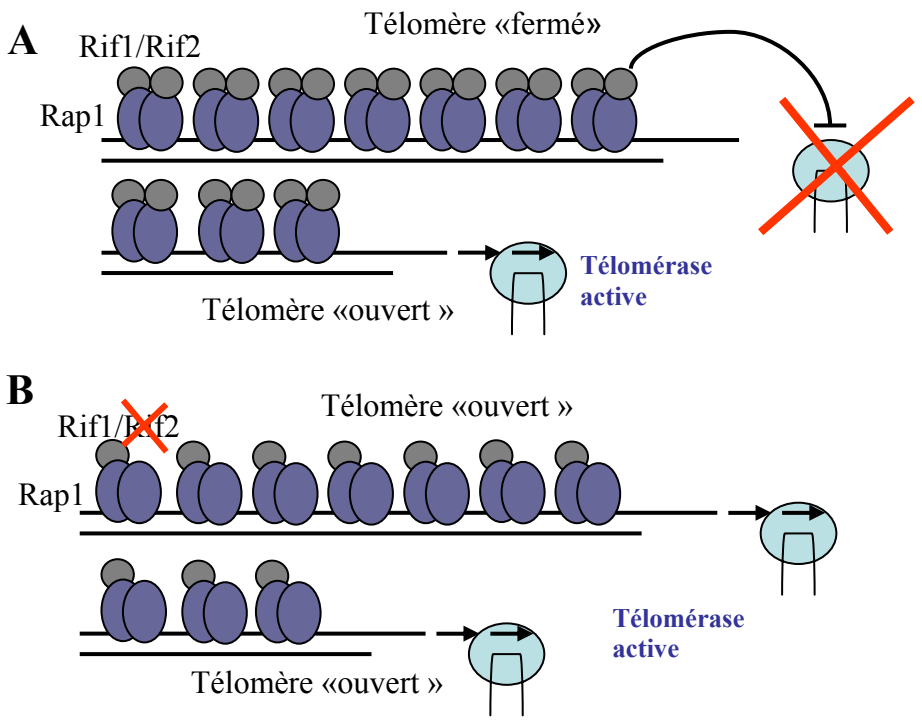


Figure 26. Modèle du commutateur binaire entre l'état ouvert et fermé du télomère pour le contrôle de l'élongation des télomères. a). Rap1 fixe le télomère et agit comme un régulateur négatif de l'activité télomérase d'une façon proportionnelle à sa fixation au télomère. Lorsque le télomère raccourcit, l'inhibition induite par Rap1 est levée et le télomère passe dans un état « ouvert » accessible à la télomérase. Dans ce modèle, seuls les télomères courts deviennent « ouverts », les télomères longs conservent une structure fermée, inaccessible à la télomérase. b). En absence de Rif1 ou 2, les télomères longs et courts adoptent une structure ouverte accessible à la télomérase et l'ensemble des télomères est allongé (d'après (Riou J. F., et al., 2005)).

8. La régulation des télomères chez l'homme

Chez l'homme, le télomère peut exister sous deux états. L'état protégé permet d'éviter les fusions télomériques, la dégradation par les nucléases, les recombinaisons homologues et l'activation des systèmes de réparation de l'ADN, alors que l'état déprotégé est favorable pour les mécanismes d'élongation des télomères (pour revue, voir (Riou J. F., et al., 2005)) (Smogorzewska A., et al., 2004). La régulation des télomères pourrait s'effectuer de la même manière que chez la levure par l'intermédiaire des protéines TRF1 et TRF2 (les homologues de Rap1 chez la levure), ainsi que par d'autres protéines associées comme TIN2, PIP1 et

POT1 (Smogorzewska A., et al., 2004). Récemment, B Houghtaling a proposé un modèle de régulation par TRF2 de l'extension des télomères en absence de TRF1. Lorsque TRF1, TRF2 et TIN2 sont associés au télomère, la télomérase est inactivée via PIP1 et POT1. En absence de TRF1, TIN2 et PIP1 restent localisées à TRF2 mais leur quantité n'est pas assez importante pour inhiber la télomérase. Le télomère peut donc être allongé. Lorsque le recrutement de TIN2-PIP1 à TRF2 est suffisant, la régulation négative par ce complexe est restaurée et la télomérase est inactivée (*Figure 27*).

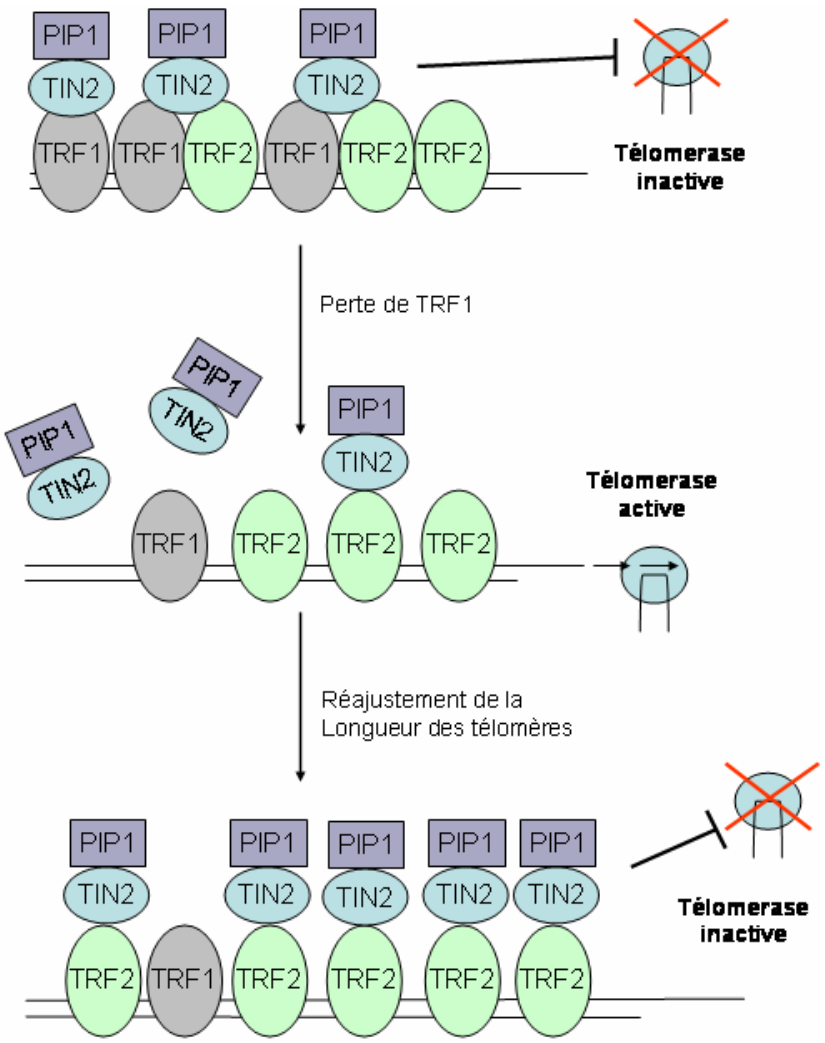


Figure 27. Modèle de l'extension des télomères en l'absence de trf1. L'interaction de TIN2 à Trf1 et Trf2 permet la régulation de l'activité télomérase via PIP1 et POT1 (non représenté sur le schéma). En l'absence de Trf1, le complexe TIN2-PIP1 reste associé au télomère par son interaction avec TRF2. Dans un premier temps, le télomère est accessible à la télomérase et lorsque le recrutement TIN2-PIP1 par Trf2 est suffisant (télomère réajusté à une plus grande longueur), la régulation négative de l'activité télomérase est restaurée (d'après (Riou J. F., et al., 2005)).

9. *La réponse aux dommages de l'ADN*

Lorsque le télomère perd ses fonctions, essentiellement suite à différents dommages de l'ADN, il induit un ensemble d'événements caractéristiques faisant intervenir certaines protéines spécifiques de la réponse aux dommages de l'ADN (DNA damage). Parmi elles, nous retrouvons des protéines de phosphorylation d'histones H2AX (γ-H2AX), des kinases induites par le "DNA damage" (ATM, ATR, DNA-PK, CHK1 et CHK2), le complexe RMN (Rad50-MRE11- NBS1) et les protéines BRCT (MDC1/NFBD1 et 53BP1). Lorsque ces complexes persistent, ils induisent la sénescence ou l'apoptose en présence de p53, ou bien des instabilités génomiques et l'apparition de cancer en absence de p53 (Rodier F., et al., 2005) (*Figure 28*). En effet, il a été montré que des cellules en prolifération n'expriment pas (ou très faiblement) γ-H2AX ou 53BP, alors que leurs proportions augmentent progressivement lorsque les cellules approchent de la sénescence. De plus, ces cellules en sénescence possèdent CHK1 et CHk2 phosphorylées. Cette phosphorylation par les protéines ATM ou ATR est nécessaire pour l'arrêt du cycle cellulaire induit par le dommage de l'ADN (D'adda Di Fagagna F., et al., 2003).

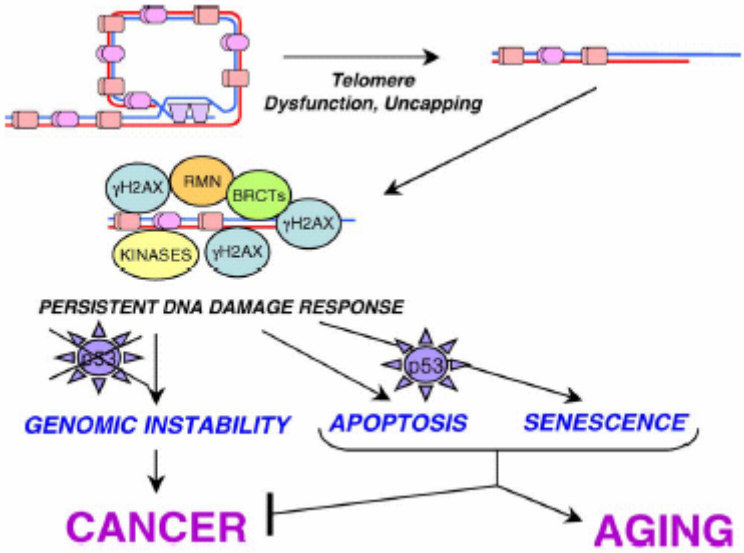


Figure 28. Les conséquences des dysfonctionnements télomériques (d'après (Rodier F., et al., 2005)).

Récemment, un modèle de l'activation de ATM par des dommages de l'ADN a été proposé. Ces altérations sont d'abord reconnues par le complexe MRN. Bien qu'il ne soit pas clairement défini comment MRN active ATM, il a été montré que 53BP1 intervient également dans cette voie. L'autophosphorylation et une conversion de la protéine en une forme monomérique la rendent active. ATM peut alors phosphoryler directement ou indirectement

de nombreuses cibles comme BRCA1, 53BP1, TRF1, et de nombreuses autres protéines intervenant dans l'apoptose, la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire ou la régulation et la traduction des gènes (Kurz E. U., et al., 2004).

E. Les structures G-quartets et G-quadruplexes

Les G-quartets (G-tétrades) ont été découverts en 1962 (Gellert M., et al., 1962). Ces structures ont été plus ou moins oubliées jusqu'à la fin des années 80, au moment où des auteurs ont proposé qu'elles puissent avoir des implications biologiques. Les G-quartets sont aujourd'hui amplement étudiées et de nombreuses publications ont décrit ces structures tant sur le plan chimique que sur leurs éventuels rôles biologiques (Williamson J. R., 1994) (Han H., et al., 2000) (Shafer R. H., et al., 2000) (Davies J. T., 2004).

1. Structure

Les G-quartets comprennent quatre guanines associées dans un plan cyclique par l'intermédiaire des atomes d'azote en N7, par des liaisons de type « hoogsteen ». Chaque guanine est un donneur et un accepteur de deux liaisons hydrogènes. Cette structure plane délimite en son centre une zone chargée électronégativement par les liaisons carboxyles et permet ainsi le recrutement de cations (*Figure 29A*). Les G-quadruplexes (G4) correspondent à un empilement hydrophobe de plusieurs G-quartets et il y a autant de G-quartet que de guanines adjacentes répétées selon un multiple de 4 (Riou J. F., et al., 2003). Un cation est localisé entre deux quartets et forme des interactions avec chaque guanine, limitant ainsi les répulsions des atomes d'oxygène. Ces interactions stabilisent donc la structure G-quadruplexe (*Figure 29B*).

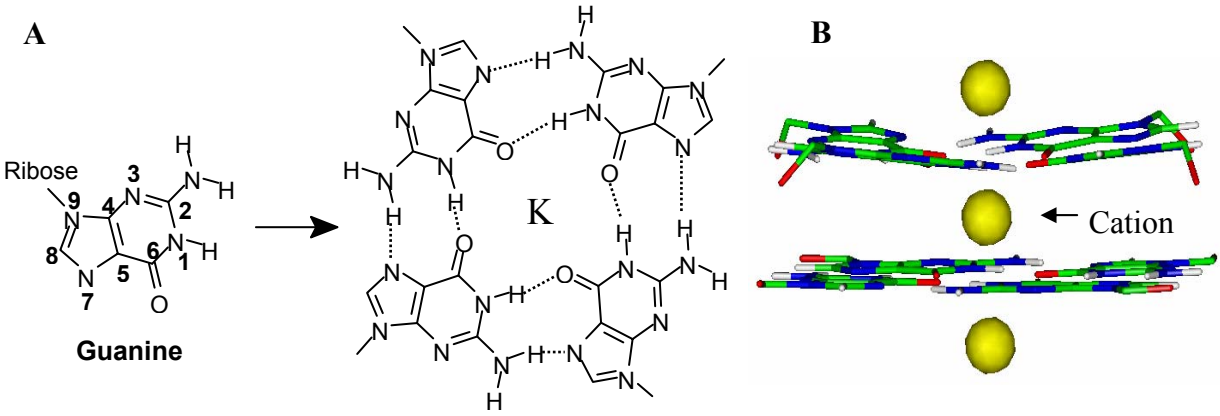


Figure 29. Les structures G-quartet et G-quadruplexe. A : Quatre résidus guanines forment une structure plane en G-quartet grâce à des liaisons hydrogènes « hoogsteen » impliquant les N7 des guanines, le G-quartet est stabilisé par un cation central. B : Plusieurs G-quartet peuvent s'empiler pour former un G-quadruplexe. La présence du cation entre les G-quartet favorise la stabilité du G-quadruplexe.

Alors que la stabilisation des hélices des acides nucléiques est relativement peu sensible au type de cation présent, celle des G-quadruplexes est fortement dépendante du cation central. Il existe ainsi un ordre préférentiel pour la stabilisation de cette structure : $K^+ > Rb^+ > Na^+ > Cs^+ > Li^+$. Cette différence peut être expliquée par la taille du cation et par les niveaux d'interaction entre l'acide nucléique et le cation. De façon intéressante, le potassium présent à des concentrations élevées dans le milieu intracellulaire, est très favorable pour la stabilité des G-quadruplexes (Guittat L., et al., 2004).

La forme du G-quadruplexe varie en fonction du cation central (Schultze P., et al., 1999). Sa structure peut faire intervenir un seul ou plusieurs brins d'acide nucléique. Des études de cristallographie et de résonance magnétique nucléaire ont montré que le G-quadruplexe peut être formé par le repliement intramoléculaire d'une molécule d'acide nucléique (*Figure 30A*), ou bien par l'association de 2 (structure en double épingles) (*Figure 30B*) ou 4 brins (tétramoléculaire) (*Figure 30C*) contenant des répétitions de guanines (Crnugelj M., et al., 2002) (Riou J. F., et al., 2003). En fonction de l'orientation des boucles externes, nous pouvons classer les G-quadruplexes de deux manières : parallèle ou antiparallèle.

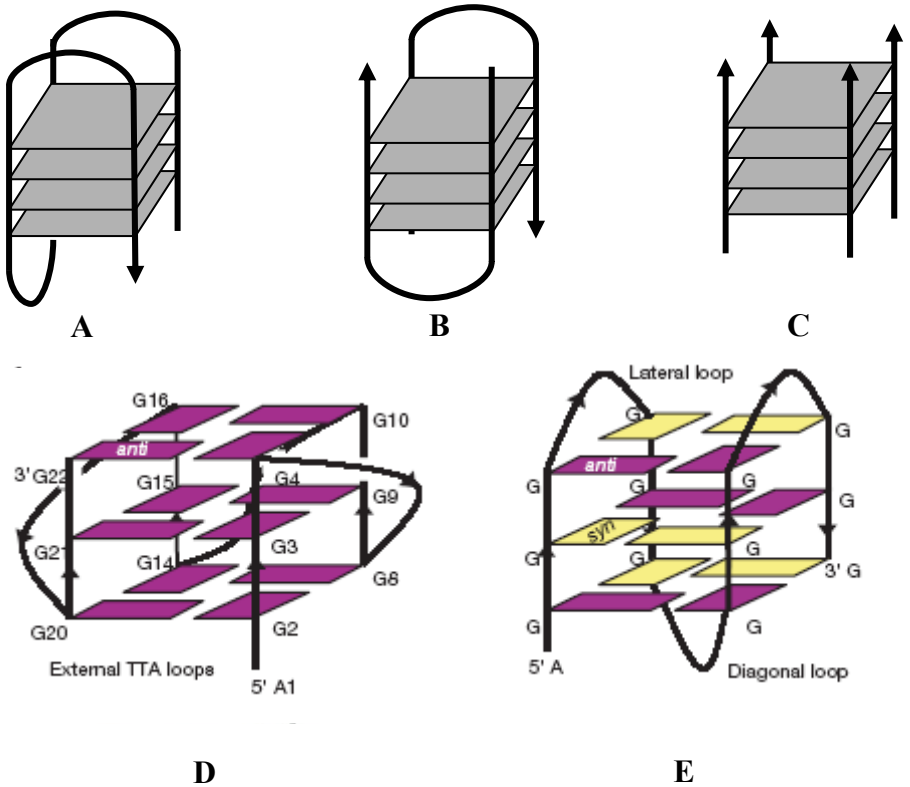


Figure 30. A : G-quadruplexe unimoléculaire. B : G-quadruplexe bimoléculaire antiparallèle. C : G-quadruplexe tétramoléculaire parallèle. D : G-quadruplexe intramoléculaire en présence de K^+. E : G-quadruplexe intramoléculaire en présence de Na^+.

La nature du cation central est importante pour la stabilité mais aussi pour le type de G-quadruplexe. Ainsi, le simple brin télomérique des vertébrés, en présence de Na^+, va adopter une structure antiparallèle présentant 3 boucles dans le prolongement des quartets terminaux dont une diagonale (*Figure 30E*). En présence de K^+, il peut adopter une structure dans laquelle les 3 boucles sont diagonales et externe aux plateaux de quartets (Parkinson G. N., et al., 2002) (Wang Y., et al., 1992) (*Figure 30D*). Des expériences récentes ont montré que le type de G-quadruplexe est directement dépendant de la taille et de la structure des boucles externes (Hazel P., et al., 2004).

Les G-quadruplexes se forment *in vitro* à partir d'oligonucléotides d'ADN ou d'ARN comprenant des séquences présentes au niveau télomérique, de promoteurs de gènes, de sites de recombinaison, de sites d'empaquetage et de domaines de dimérisation des ARN (Davies J. T., 2004).

La présence de structures G-quadruplexes n'a pas encore été démontrée *in vivo* chez l'homme. Néanmoins, les conditions physiologiques du milieu intracellulaire sont parfaitement compatibles avec la formation et la stabilité des structures G-quadruplexes. De plus, les cations les plus favorables pour la stabilité sont présents à de fortes concentrations intracellulaires. Il existe dans les noyaux des protéines capables de reconnaître ces structures et seront décrites ultérieurement.

La seule preuve directe de la présence de G-quadruplexes *in vivo* provient des travaux réalisés chez le cilié *Stylonychia laemmae*. L'équipe de Plückthun en 2001 a sélectionné des anticorps scFv capables de reconnaître spécifiquement des structures G-quadruplexes au niveau des télomères du cilié. Ces auteurs ont montré que les anticorps sont capables de se fixer au niveau du macronoyau haploïde (dans lequel un grand nombre de chromosomes, et donc de télomères, est présent) mais pas au niveau du micronoyau diploïde (intervenant dans la reproduction sexuée des cellules). Cette fixation est inhibée au moment de la réplication du macronoyau, ceci suggère qu'il existe des mécanismes capables de résoudre les structures G-quadruplexes (Schaffitzel C., et al., 2001). Ces expériences représentent la première preuve expérimentale de la présence de G-quadruplexes *in vivo*. Cependant, il n'est pas exclu que la formation de ces structures soit favorisée par la présence des anticorps et qu'en leurs absences, les G-quadruplexes ne soient pas présents *in vivo* (Riou J. F., et al., 2003).

2. *G-quadruplexe et télomère*

Les télomères, à l'extrémité des chromosomes eucaryotes, comprennent des séquences répétées G-riches. La séquence télomérique TTAGGG chez l'homme est capable de former un G-quadruplexe, aussi bien en solution qu'en structure cristallisée (Wang Y., et al., 1993) (Parkinson G. N., et al., 2002). Chez *Oxytricha* et chez *Tetrahymena*, nous retrouvons également des séquences G-riches (T_4G_4 et T_2G_4 respectivement) capables de former des G-quadruplexes (Haider S., et al., 2002) (Wang Y., et al., 1994).

En présence de K^+ ces séquences peuvent former des G-quadruplexes dimériques intermoléculaires ou intramoléculaires contenant tous les deux des angles de torsions glycosidiques et des boucles TTA qui se projettent vers l'extérieur. En présence de Na^+ les boucles TTA se retrouvent en position diagonale et latérale (Parkinson G. N., et al., 2002).

3. *Les autres G-quadruplexes potentiels du génome*

Outre les télomères, de nombreuses régions du génome sont potentiellement capables de former, *in vitro*, des structures en G-quadruplexes. C'est le cas notamment des régions de commutation (switch) des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH), des régions répétées du rDNA et du centromère, ainsi qu'au niveau de promoteurs de certains gènes tels que *Rb, c-myc, PDGF-A, c-myb, c-abl, c-ets, c-fes/fps, c-src, c-yes, c-vas* et *Ki-ras* (Riou J. F., et al., 2003) (Maiti S., et al., 2003).

a. Les régions « switch » des immunoglobulines

La découverte de séquences G-riches, au niveau des régions « switch » des chaînes lourdes des immunoglobulines capables de former des G-quadruplexes, a été réalisée par Sen et Guilbert en 1988. Ces régions « switch » de 1 à 10kb correspondent à des sites de recombinaison et présentent des répétitions riches en G-C d'une longueur de 20 à 50pb. Ces répétitions peuvent être GGGGT, GAGCT ou la séquence fortement conservée (G)GGGGAGCTGGGG retrouvée au niveau des séquences Sγ1, Sγ2b et Sγ3. Par des techniques de diffraction aux rayons X, ils ont mis en évidence que des oligonucléotides présentant les séquences répétées des régions « switch » sont capables de former une structure à 4 brins dont les guanines sont reliées par des liaisons de type Hoogsteen, des G-quartets (Sen D., et al., 1988).

b. Les régions répétées du rDNA et du centromère

90% du génome humain correspond à des séquences non codantes. Beaucoup d'entre elles sont répétitives et présentent une influence biologique importante. Ces structures satellites possèdent des répétitions en tandem de séquences riches en guanines. *In vitro* et potentiellement *in vivo*, ces séquences sont capables de former des structures de type G-quadruplexe pour les séquences G-riches, et i-motif pour les séquences C-riches. Ces séquences « i-motif » correspondent à des structures à 4 brins dans lesquelles des paires de bases de cytosine CC^+ sont intercalées et reliées par trois liaisons hydrogènes (Gehring K., et al., 1993). C'est le cas notamment du satellite III centromérique humain qui est capable de former 2 i-motifs monomériques en fonction du pH (Nonin-Lecomte S., et al., 2001). De même, le gène de l'insuline contient une région polymorphique présentant la séquence répétée d[$ACAG_4$(G/C)(T/C)G_4]. Cette séquence est également potentiellement capable de former un G-quadruplexe (Catasti P., et al., 1996). Au niveau des ADN ribosomaux, de nombreux résidus de guanines ont été décrits comme étant capables de former *in vitro* des G-quadruplexes (Hanakahi L. A., et al., 1999).

c. Les promoteurs de gènes

La présence de structures G-quadruplexes a déjà été décrite dans certains promoteurs de gènes tels que le promoteur de la β-globine du poulet, le promoteur PARP, le promoteur de *c-myc*, le locus de susceptibilité du diabète IDDM2, le promoteur du « progressive myoclonus epilepsy type 1 » et le promoteur du gène humain Rb (pour revue, voir (Guittat L., et al., 2004)).

Le gène *Rb* (retinoblastoma susceptibility gene) code pour une phosphoprotéine nucléaire qui agit comme un suppresseur de tumeur au niveau du cycle cellulaire. Cette protéine peut réguler l'expression de certains oncogènes comme *c-fos* (Kim S. J., et al., 1991). Les 100 premières paires de bases de la séquence codante de la protéine Rb chez la souris ainsi que les 100 paires de bases qui lui précèdent contiennent près de 84% de séquences G-C riches. En présence de Na^+, ces séquences en 5' de *Rb* chez la souris et chez l'homme sont capables de se tétramériser pour former des G-quadruplexes et le remplacement de l'azote N7 des guanines par un atome de carbone inhibe cette formation. (Murchie A. I., et al., 1992).

Le promoteur le plus connu contenant des structures G-quadruplexes est celui du gène *c-myc*. Comme nous l'avons vu, le gène *c-myc* est un oncogène intervenant dans la prolifération, la croissance, la différenciation et l'apoptose cellulaire. Il est capable d'activer

hTERT en se fixant au niveau de son promoteur, par l'intermédiaire des E-box. Au niveau du promoteur de *c-myc*, nous retrouvons 5 sites hypersensibles à la DNase (NHE pour nuclease hypersensitive element). L'un d'eux, NHE III_1, est l'élément de contrôle majeur de *c-myc*, il contrôle 85 à 90% de la transcription de *c-myc.* Le brin 5'→3' de cette séquence présente de nombreuses régions riches en guanines (Gazin C., et al., 1984) (Simonsson T., et al., 1998). Il est capable de former *in vitro* des structures en G-quartet en présence de K^+ (Simonsson T., et al., 1998) (Simonsson T., et al., 2000). Le brin 3'→5' riche en cytosine a été décrit comme étant capable de former des i-motifs inter et intramoléculaires (Simonsson T., et al., 2000) (Mathur V., et al., 2004). Des études utilisant la DNaseI ont montré que NHE III_1 intervient directement dans l'activation de la transcription de *c-myc* (Siebenlist U., et al., 1984) (Dyson P. J., et al., 1985) (Siebenlist U., et al., 1988). Cette région NHE III_1 est capable d'alterner entre des structures traditionnelles en double hélice et en G-quadruplexe ou i-motif (Simonsson T., et al., 2000) (Simonsson T., et al., 1998) (*Figure 31*).

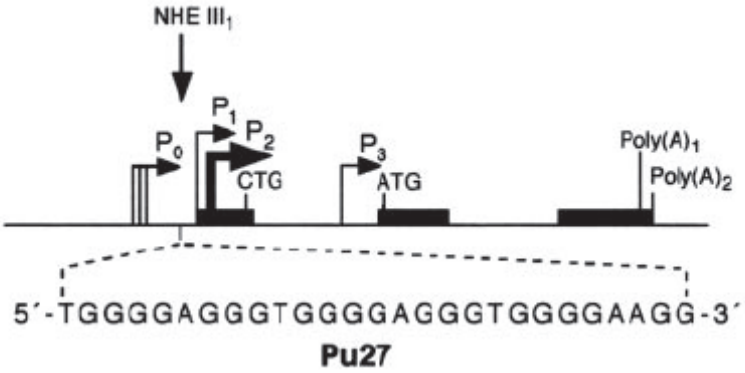
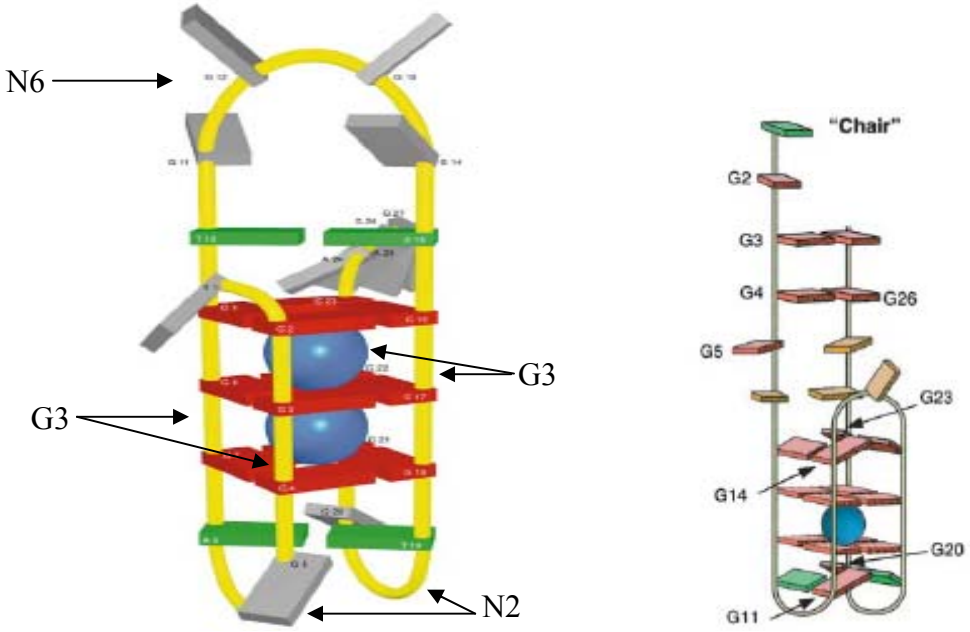


Figure 31. Structure du promoteur du gène c-myc. Elle montre une séquence de 27 nucléotides riche en guanine (d'après (Siddiqui-Jain A., et al., 2002)).

En 1998, Tomas Simonsson détermine une structure potentielle du G-quadruplexe de NHE III_1 en présence de K^+, en utilisant un oligonucléotide correspondant au 27-mer (Pu27). Il décrit la formule du Pu27 comme étant $G_3N_2G_3N_6G_3N_2G_3$ dans laquelle, les G3 correspondent à 3 guanines successives intervenant dans la structure G-quartet et les N_x correspondent aux boucles externes à 2, 6 et 2 nucléotides. Dans cette formule, 3 guanines se succèdent et vont former 3 G-quartets. Il propose ainsi une structure schématique du tétraplexe formée en présence de K^+ (Simonsson T., et al., 1998) (*Figure 32A*).

En 2002, l'équipe de Hurley a confirmé la structure de forme panier de la région NHE III_1 du gène *c-myc* par des techniques de DMS footprint (dimethyl sulfate footprint), et a proposé une deuxième forme de G-quadruplexe (la forme chaise), comprenant 2 empilements de G-quartet, deux boucles latérales de 2 bases et une boucle orthogonale de 3 bases (*Figure*

32B). Le quadruplexe de forme chaise est cinétiquement plus favorable que celui de la forme panier. Cette forme chaise est donc prédominante et plus stable (Siddiqui-Jain A., et al., 2002).



A **B**

Figure 32. Représentation schématique du G-quadruplexe panier (basket) (A) du Pu27 en présence de K^+ (d'après (Simonsson T., et al., 1998)) et de forme chaise (B) (d'après (Siddiqui-Jain A., et al., 2002)).

Cette même équipe a également déterminé des significations biologiques potentielles de ces deux G-quadruplexes intramoléculaires. Ils ont inséré le Pu27 ou un Pu27 muté (contenant 1 ou 2 mutations au niveau des guanines des G-quartets) dans un promoteur actif de luciférase et ont évalué la capacité des quadruplexes à inhiber la transcription de ce gène. Ils ont également déterminé la possibilité de former des G-quadruplexes par un protocole d'arrêt de la *Taq* polymérase. Ils concluent qu'une rupture de la structure G-quadruplexe de forme chaise induit une augmentation de l'activation de la transcription d'un facteur 3. Ceci montre que la formation de structures G-quadruplexes pourrait jouer un rôle répresseur de l'activation transcriptionnelle de *c-myc* (Siddiqui-Jain A., et al., 2002).

L'équipe de Hurley a ensuite étudié la régulation négative de la transcription de *c-myc* par un ligand de G-quadruplexe, le TMPyP4 reconnaissant NHE III_1 (Grand C. L., et al., 2002), dans deux lignées cellulaires cancéreuses de lymphome de Burkitt présentant différentes translocations au niveau de *c-myc*. La lignée Ramos conserve la région NHE III_1 pendant la translocation, alors que les cellules CA46 ont perdu cet élément (Bemark M., et al., 2000). Ces auteurs montrent qu'en présence de TMPyP4, la lignée Ramos contenant NHE III_1

présente une inhibition de la transcription de l'ARN de c-myc alors que la lignée CA46 ne présente pas de diminution (*Figure 33*). Il conclut que le TMPyP4 agit directement au niveau de NHE III_1 afin de réguler la transcription de *c-myc* (Siddiqui-Jain A., et al., 2002).

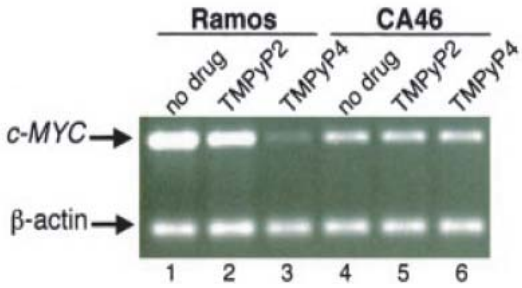


Figure 33. RT PCR de c-myc dans les lignées Ramos et Ca46 après traitement avec 100µM de TMPyP2 et TMPyP4 pendant 48 heures (selon (Siddiqui-Jain A., et al., 2002)).

D'après ces différents résultats et des études antérieures, Hurley propose un modèle pour l'activation et la répression de la transcription du gène *c-myc*. La structure G-quadruplexe chaise formée par le Pu27 et probablement les structures i-motifs du brin complémentaire, doivent être converties en simple brin avant que la transcription de *c-myc* puisse être activée. Les deux brins sont alors stabilisés par 2 facteurs, CNBP et hnRNP-K. hnRNP-K agit avec l'ARN polymérase II pour promouvoir sa fixation sur le promoteur. La transcription du gène *c-myc* peut alors être effectuée (Siddiqui-Jain A., et al., 2002). Cette interconversion entre formes structurées et non structurées nécessite des facteurs accessoires comme NM23-H2, capables de couper et de ressouder l'ADN (Postel E. H., et al., 2000) (*Figure 34*). Ce mode de régulation transcriptionnelle proposé pour le gène *c-myc* pourrait être appliqué à de nombreux gènes de croissance et de régulation (*c-myb, Ki-ras, PDGF-A*) impliquant des G-quadruplexes ou des i-motifs dont le principal avantage serait de permettre une réponse rapide et indépendante d'une modification de la structure du nucléosome (Riou J. F., et al., 2003) (Guittat L., et al., 2004).

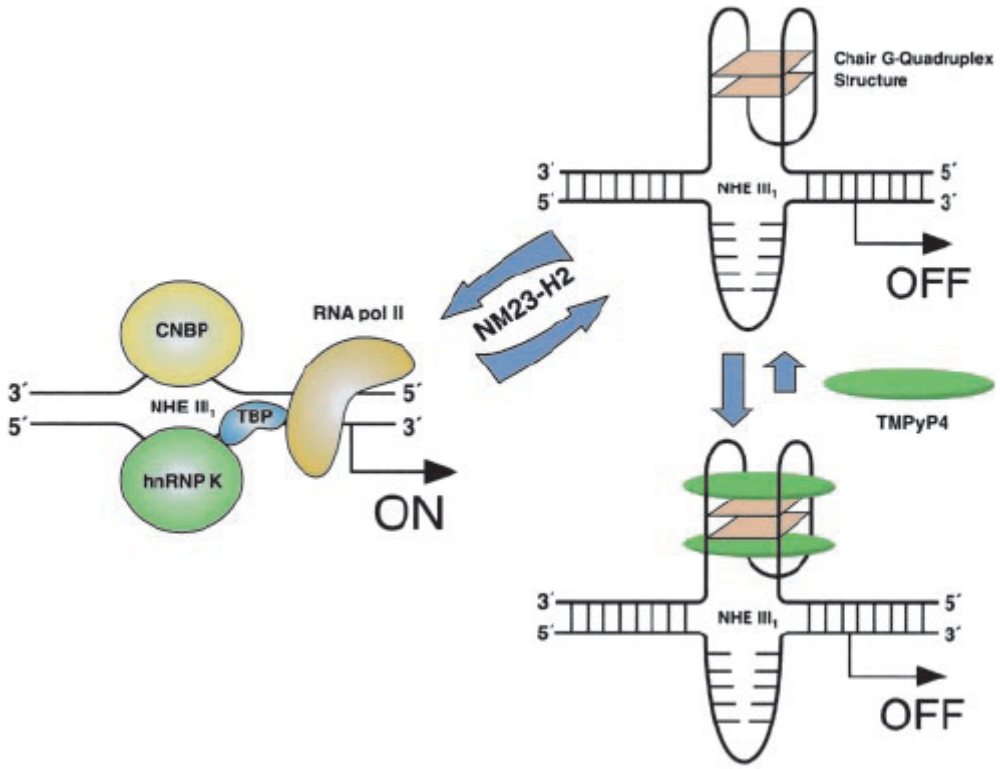


Figure 34. Modèle de l'activation et de la répression de la transcription de c-myc impliquant le site NHE III$_1$ (d'après (Siddiqui-Jain A., et al., 2002)).

En 2004, Cory Grand avait proposé que des mutations spécifiques G → A présentes dans le NHE III$_1$ d'environ 30% des tumeurs induisaient une déstabilisation du G-quadruplexe, et une augmentation de l'activité transcriptionnelle de *c-myc*. Dans ces cellules, le taux de NM23-H2 était réduit et la réintroduction d'un G-quadruplexe stable pouvait inverser ce phénotype (Grand C. L., et al., 2004). Cependant, les auteurs ont rétracté cet article précisant qu'une contamination de plasmide était à l'origine de ces hypothétiques mutations (Grand C. L., et al., 2005). Entre temps, K. Halder a étudié des mutations du brin sens C-riche et l'impact sur la formation de i-tétraplexes. Il propose que des modifications des séquences impliquées dans la formation de ces structures pourraient jouer un rôle fondamental dans des aberrations de la régulation de *c-myc* (Halder K., et al., 2005). Ceci montre que malgré la rétractation de Hurley sur la découverte de ces mutations, d'éventuels changements ponctuels de séquences impliqués dans la formation de tétraplexes pourraient avoir des incidences dans la régulation de la transcription de certains gènes.

4. Quadruplexe et ARN

Des observations en résonance magnétique nucléaire (RMN) et en structures cristallisées ont permis de mettre en évidence des G-tétrades, U-tétrades et A-tétrades dans des ARNs (Patel P. K., et al., 1999) (Pan B., et al., 2003a) (Pan B., et al., 2003b). Plusieurs ARNm contiennent des séquences riches en guanines (Mergny J. L., et al., 2002). L'exemple le mieux connu est celui du motif sc1. Ce motif (**GG**AA**GG**AGU**GG**CUG**GG**) est présent dans des régions 5'UTR et 3'UTR de gènes et est capable de former un G-quadruplexe unimoléculaire à deux plateaux (Riou J. F., et al., 2003). Ces ARNm sont reconnus par une protéine, FMRP (Fragile X mental retardation protein). Dans le syndrome mental du chromosome X fragile, cette protéine est absente, induisant un retard mental modéré et une morphologie particulière. Cette protéine contient 2 domaines KH de fixation aux répétitions d'ARN et une boite RGG en C-terminale. Le domaine KH est présent dans de nombreuses protéines intervenant dans la localisation des ARNs, le contrôle traductionnel des ARNs, l'épissage alternatif du pré-ARNm, le transport du transcrit vers le cytoplasme et la régulation de la stabilité des ARNm. La boite RGG est présente dans des protéines intervenant dans le métabolisme d'ARN. Des études ont montré que cette protéine FMRP est capable de reconnaître les ARNs en G-quadruplexe par l'intermédiaire de la boite RGG et d'induire des modifications de la traduction des ARNm reconnus (Darnell J. C., et al., 2001) (Darnell J. C., et al., 2004) (Schaeffer C., et al., 2001). Parmi les protéines présentant un motif sc1, nous retrouvons la sémaphorine 3F, l'histone H4, … (Riou J. F., et al., 2003).

De même, le facteur de croissance fibroblastique FGF-2 possède un site spécifique IRES (Internal Ribosome Entry Site) capable de former un G-quadruplexe. Il semblerait que cette structure secondaire de IRES pourrait jouer un rôle important dans ses fonctions, et notamment dans l'activité traductionnelle de la protéine (Bonnal S., et al., 2003).

Des G-quadruplexes ont également été observés chez le rétrovirus de l'immunodéficience humaine (VIH). Le génome d'ARN du VIH est enveloppé dans un virion sous forme de dimère, facilité par l'association de protéines gag. La dimérisation des deux brins identiques n'est pas possible sans séquences répétées inverses si la double hélice de Watson et Crick est maintenue. Cependant, en formant des G-quadruplexes, la dimérisation est possible (Marquet R., et al., 1991) (Sundquist W. I., et al., 1993).

5. *Protéines reconnaissant les G-quadruplexes*

De nombreuses protéines ont été décrites comme étant capables de reconnaître spécifiquement les G-quadruplexes et des rôles biologiques de ces interactions ont été proposés.

a. Hélicases et topoisomérases

BLM et WRN sont des hélicases ATP dépendantes de la famille RecQ chez l'homme. Chez la levure, la protéine Sgs1 est également une protéine de cette famille. Un défaut de Sgs1 peut entraîner des erreurs de réplication, transcription ainsi qu'un niveau élevé de recombinaison et un vieillissement prématuré (Lee S. K., et al., 1999). La fonction potentielle de ces protéines est de dissocier les G-quadruplexes qui apparaissent pendant la réplication et la transcription (Sun H., et al., 1998) (Sun H., et al., 1999) (Fry M., et al., 1999) (Weisman-Shomer P., et al., 2000b). Dans les cellules ALT, WRN et BLM sont relocalisées au niveau du télomère et pourraient résoudre les structures G-quadruplexes et T-loop au moment de la recombinaison (Riou J. F., et al., 2003). Chez la souris, la protéine RTEL est une protéine DNA helicase-like, analogue à la protéine DOG-1 chez *C. elegans* (Flanary B., 2004). Elle présente un rôle essentiel dans la stabilité génétique, la survie cellulaire, le développement embryonnaire et est proposé comme étant un régulateur de la taille des télomères (Flanary B., 2004). De plus, cette protéine pourrait être requise pour résoudre les structures en G-quadruplexe qui peuvent apparaître pendant la réplication, la transcription, les mécanismes de réparation de l'ADN et de la recombinaison (Ding H., et al., 2004). Des protéines topoisomérases sont également capables de reconnaître les structures G4. Les topoisomérases II et III vont s'associer à BLM WRN et Sgs1 pour relaxer les G-quadruplexes (Wu L., et al., 2002) (Wu L., et al., 2000) (Watt P. M., et al., 1996). La topoisomérase I possède également une activité de fixation des structures G-quadruplexes (Arimondo P. B., et al., 2000). Des oligonucléotides formant des G-quadruplexes sont capables de se lier et d'inhiber l'activité de clivage de la topoisomérase I (Marchand C., et al., 2001). D'autres hélicases ont été décrites associées à des quadruplexes. C'est le cas notamment BACH1, l'homologue humain de DOG-1. Il a été décrit un modèle de régulation de la réplication du brin G-riche de l'ADN par DOG1 en déroulant les structures G-quadruplexes (Cheung I., et al., 2002).

b. Nucléoline et hnRNP

hnRNP est un complexe protéique comprenant, entre autres, la protéine hnRNP-A1. Cette protéine intervient dans l'épissage des ARNm, ainsi que dans la régulation de la taille des télomères en se fixant aux séquences télomériques par l'intermédiaire de son fragment protéolytique UP1 (Labranche H., et al., 1998) (Fukuda H., et al., 2002). Elle est également capable de reconnaître des séquences G-riches hypervariables de l'ADN minisatellite chez la souris (Riou J. F., et al., 2003). La nucléoline est une protéine nucléolaire qui possède une activité hélicase. Elle est capable de fixer la topoisomérase I (Haluska P., Jr., et al., 1998). La nucléoline et des protéines de hnRNP sont capables de s'associer pour former un complexe LR1 et de jouer un rôle important au niveau des régions « switch » des immunoglobulines ainsi que dans les processus de recombinaison (Dempsey L. A., et al., 1999). Ces protéines sont également capables de reconnaître des G-quadruplexes au niveau de l'ADN ribosomal (Hanakahi L. A., et al., 1999).

c. Les autres protéines reconnaissant les G-quadruplexes

La nucléase GQN1 (G quartet nuclease 1) est très sélective des G-quadruplexes et interviendrait dans des processus de recombinaison des immunoglobulines (Riou J. F., et al., 2003). Les protéines de fixation au télomère, RAP1 et TBP, sont capables d'induire la formation de structures G4 (Giraldo R., et al., 1994b) (Giraldo R., et al., 1994a) (Fang G., et al., 1993). La protéine qTBP42 chez l'homme et son homologue murin CBF-A sont capables de stabiliser les quadruplexes télomériques et de déstabiliser le tétraplexe d(CGG)n (Weisman-Shomer P., et al., 2002). La protéine en doigt de zinc Gq1 peut de fixer spécifiquement les G-quadruplexes intramoléculaires formés par la séquence télomérique humaine (GGTTAG). Il a été décrit que cette protéine arrête l'action de l'ADN polymérase sur des séquences télomériques, probablement en formant et en stabilisant un complexe protéines/G-quadruplexe (Patel S. D., et al., 2004). Des protéines virales (g5p, NCp) ainsi que certains anticorps sont également capables de reconnaître des G-quadruplexes (Guittat L., et al., 2004).

F. Inhiber l'activité télomérase et lutte contre le cancer

La découverte du complexe télomère – télomérase a engendré un intérêt majeur dans la communauté scientifique. Outre les cellules germinales, les cellules souches et quelques rares exceptions comme par exemple les kératinocytes et les lymphocytes (Masutomi K., et al., 2003), la télomérase est inactive (ou plutôt moins active) dans les cellules somatiques en comparaison avec la plupart des cellules cancéreuses. C'est pourquoi l'inhibition de l'activité télomérase est un atout majeur dans la lutte contre le cancer. Ces stratégies ont pour but d'induire un raccourcissement prématuré des télomères et un arrêt de la prolifération anarchique des cellules. Les cellules cancéreuses prolifèrent plus rapidement que les cellules normales. L'utilisation de telles stratégies va donc viser préférentiellement les cellules cancéreuses. Les cellules ALT, qui ne présentent pas d'activité télomérase, seront normalement épargnées dans cette stratégie anti-télomérase. Cependant certaines stratégies visent préférentiellement des protéines associées qui sont présentes aussi bien dans les cellules télomérase positive que dans celles télomérase négative (*Figure 35*). C'est le cas notamment des protéines du capuchon télomérique intervenant dans la protection du télomère. Cibler les protéines de protection du télomère est relativement peu exploité à ce jour puisque le capuchon télomérique est une notion relativement récente et régulièrement, des nouvelles protéines sont décrites comme étant capables de se fixer et de protéger le télomère. Très récemment, l'équipe de Tsuruo a décrit que la Tankyrase 1 peut servir de cible thérapeutique spécifique dans l'inhibition de l'accessibilité de la télomérase au télomère. L'inhibition de TANK1 par des agents inhibiteurs de PARP dans des cellules tumorales humaines entraîne un raccourcissement des télomères et une mort cellulaire (Seimiya H., et al., 2005). D'autres stratégies vont cibler préférentiellement le substrat de la télomérase, l'extrémité simple brin télomérique.

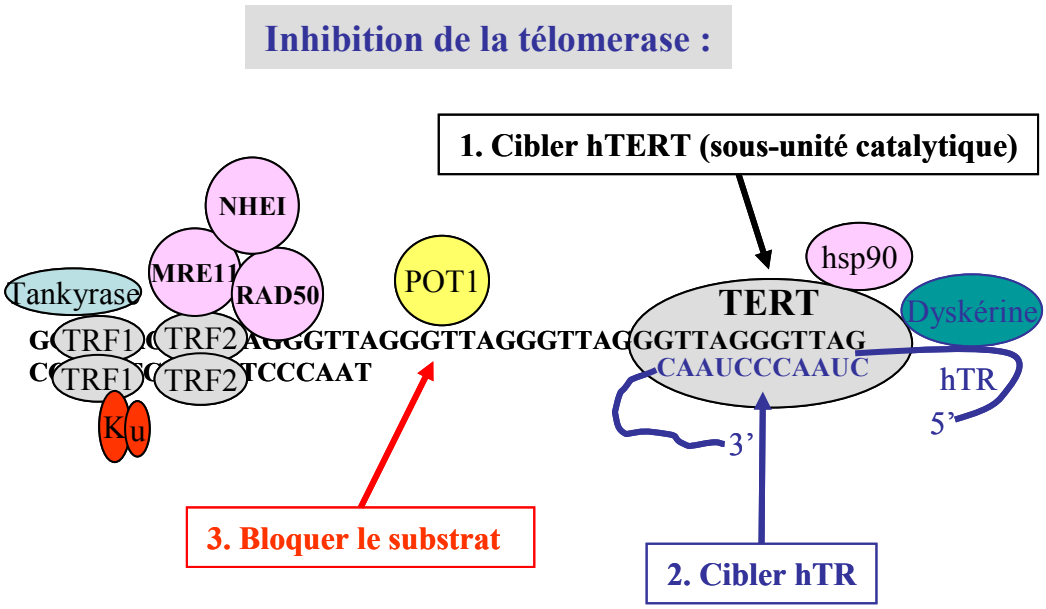


Figure 35. Représentation schématique des différentes stratégies d'inhibition de l'activité télomérase.

1. Les stratégies visant la télomérase

Inhiber la télomérase a pour but d'inhiber l'élongation des télomères, résultant en un raccourcissement de la taille de l'extrémité chromosomique, un arrêt de la prolifération cellulaire et une entrée des cellules cancéreuses en sénescence et/ou en apoptose. Il existe plusieurs possibilités pour inhiber la télomérase, inhiber la sous-unité ribosomale hTR, inhiber la sous-unité catalytique hTERT ou inhiber l'association du complexe hTERT / hTR (pour revue, (Guittat L., et al., 2005)).

a. La sous-unité hTR

L'utilisation de ribozymes est l'une des stratégies utilisée pour inhiber hTR. Les ribozymes sont des courtes séquences d'ARN capables d'interagir avec les ARNm et d'induire des coupures spécifiques de cet ARN, dégradant ainsi la sous-unité hTR. Cette approche expérimentale a été décrite sur plusieurs lignées cellulaires et a permit d'induire une inhibition de l'activité télomérase (Folini M., et al., 2000) (Yokoyama Y., et al., 1998).

La deuxième stratégie consiste en l'utilisation de séquences complémentaires de l'ARN capable de former un hétéroduplexe et d'induire une diminution de la traduction, ou de bloquer l'activité de l'ARN et également d'induire sa dégradation. Dans cette voie, plusieurs oligonucléotides ont été modifiés afin d'augmenter la stabilité du duplexe et d'induire sa dégradation et ont été décrits comme étant capables d'inhiber la télomérase (Shammas M. A., et al., 1999) (Pitts A. E., et al., 1998) (Glukhov A. I., et al., 1998).

De plus, l'utilisation d'ARNi (ARN interférence) dirigés contre hTR a également permis d'induire une inhibition de l'activité télomérase (Kosciolek B. A., et al., 2003).

L'utilisation d'un dominant négatif de hTR a également permis d'inhiber l'activité télomérase. Cet hTR MuA induit l'apparition d'une télomérase mutée, incapable d'allonger les télomères. Ces expériences ont permis d'induire un arrêt de la prolifération cellulaire et des disfonctionnements télomériques dans les cellules transfectées (Marusic L., et al., 1997).

b. La sous unité hTERT

Parmi les stratégies dirigées contre hTERT, nous retrouvons celles décrites pour inhiber hTR, les ribozymes, les ARN complémentaires et les ARNi (Yokoyama Y., et al., 2000) (Schindler A., et al., 2001) (Zhang Y., et al., 2002) (Masutomi K., et al., 2003). Il existe d'autres approches d'inhibition de hTERT. Des protocoles d'immunothérapie dirigés contre hTERT ont été décrits. Cette stratégie est basée sur la télomérase comme antigène potentiel capable d'être reconnu par des lymphocytes T cytotoxiques (Adotevi O., et al., 2004). Certaines équipes se sont focalisées sur la découverte d'inhibiteurs nucléotidiques et non-nucléotidiques, ainsi que des inhibiteurs de la régulation de hTERT pour inhiber l'activité télomérase. De nombreuses molécules ont déjà été décrites dans cette voie (Guittat L., et al., 2005).

De nombreux inhibiteurs de la sous-unité catalytique hTERT ont été également étudiés. Parmi eux, deux classes ont été citées, les inhibiteurs catalytiques nucléotidiques et non –nucléotidiques. Dans cette dernière catégorie, le BIBR1532 (acide 2-[(E)-3-naphtalene-2-yl-but-2-enoylamino]-benzoïque) est l'un des plus puissant décrit à ce jour, il agit comme un inhibiteur semi-compétitif et interfère avec la processivité de la télomérase (Pascolo E., et al., 2002) (Barma D. K., et al., 2003) (El-Daly H., et al., 2005).

Il est également possible d'inhiber l'activité télomérase par l'utilisation de dominants négatifs de hTERT. Cette stratégie a permis d'inhiber la croissance cellulaire, d'induire un raccourcissement télomérique et de provoquer l'entrée en apoptose des cellules transfectées (Hahn W. C., et al., 1999) (Cerone M. A., et al., 2001) (Perrem K., et al., 2001) (Zhang R. G., et al., 2002) (Roth A., et al., 2003) (Nakajima A., et al., 2003) (Seimiya H., et al., 2005) (Misawa M., et al., 2002).

c. Le complexe hTR – hTERT

Récemment, Brian Keppler a décrit une nouvelle stratégie d'inhibition de la télomérase en bloquant l'association entre la sous-unité catalytique hTERT et la sous-unité

ribosomale hTR. Il a sélectionné des séquences oligonucléotidiques capables de s'hybrider soit au niveau des régions paires P3/P1 (l'oligonucléotide hTRas009), soit au niveau des domaines CR4 – CR5 (hTRas010) de hTR. hTRas009 et hTRas010 sont deux 2'-*O*-méthyl RNA oligonucléotides. hTRas009 inhibe d'environ 50% la fixation entre le domaine pseudoknot de hTR (nucléotides 46 – 209) et hTERT, alors que hTRas010 inhibe de plus de 90% la fixation entre les fragments CR4 – CR5 de hTR (nucléotides 243 – 328) et hTERT. Ces inhibitions s'accompagnent d'une diminution de l'activité télomérase (Keppler B. R., et al., 2004).

2. *Les stratégies visant les G-quadruplexes et le télomère*

Cette stratégie consiste, non plus à viser la télomérase pour inhiber la taille des télomères, mais à inhiber la reconnaissance de la télomérase sur son substrat, le télomère. Les télomères sont capables d'adopter une structure en G-quadruplexe. La stabilisation de ces structures par des ligands permettrait d'inhiber la reconnaissance de la télomérase et d'empêcher l'élongation des télomères (Mergny J. L., et al., 1998a) (*Figure 36*).

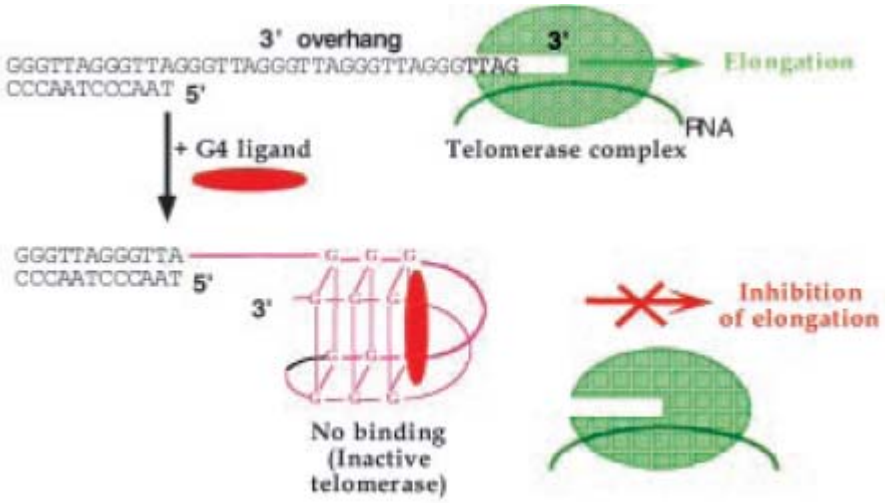


Figure 36. Mécanisme de l'inhibition de la télomérase par stabilisation de G-quadruplexe par des ligands spécifiques (Mergny J. L., et al., 1998a).

Cette stratégie est intéressante puisqu'elle permettrait de viser également les cellules ALT en inhibant les mécanismes de recombinaison.

Des G-quadruplexes peuvent se former dans d'autres parties du génome, comme au niveau du promoteur du gène *c-myc*. Différentes études ont déjà montré l'intérêt de l'inhibition de l'expression de *c-myc*. Par exemple, l'utilisation d'oligonucléotides antisens

dirigés contre *c-myc* ont permis d'induire une différenciation de myélocytes et de cellules leucémiques myéloïdes (Canelles M., et al., 1997). Pour ces différentes raisons, *c-myc* est devenue une cible d'intérêt pour la recherche d'agents thérapeutiques dans la lutte contre le cancer.

De nombreuses classes de molécules capables de reconnaître le G-quadruplexe télomérique et d'inhiber l'activité télomérase ont été décrites, parmi lesquelles nous retrouvons des porphyrines, pérylènes, amidoanthracene-9,10-diones, amidofluorenones 2,7-disubstitués, acridines, dérivés de l'éthidium, triazines, fluoroquinoanthroxazines, indoloquinolines, acridinium pentacycliques, télomestatine, des dérivés de 2,6-pyridine-dicarboxamide etc.… (Riou J. F., 2004) (pour revue, voir (Kerwin S. M., 2000) (Cuesta J., et al., 2003) (Guittat L., et al., 2004) (Guittat L., et al., 2005). Dans ce chapitre, seuls les ligands utilisés dans cette thèse seront décrits.

a. TMPyP4

Le TMPyP4 est une 5,10,15,20-tetra(N-methyl-2-pyridyl)porphine de la famille des porphyrines cationiques (*Figure 37*). Le TMPyP4 est capable de reconnaître les structures G-quadruplexes parallèles (Han H., et al., 2001). Cette molécule a cependant une préférence pour les G-quadruplexes intermoléculaires (Kim M. Y., et al., 2003). Elle est capable d'inhiber l'activité télomérase dans des cellules tumorales de seins MCF7 (Izbicka E., et al., 1999) et de myélome U266, ARH77 et ARD (Shammas M. A., et al., 2003) et d'induire des ponts anaphasiques dans des embryons d'oursins (Kim M. Y., et al., 2003). De plus, le TMPyP4 est capable de reconnaître la séquence G-riche du promoteur de *c-myc* et de stabiliser ces G-quadruplexes. Il en résulte une diminution du transcrit de *c-myc* et une inhibition de l'expression de la sous-unité reverse transcriptase hTERT de la télomérase (Grand C. L., et al., 2002) (Siddiqui-Jain A., et al., 2002).

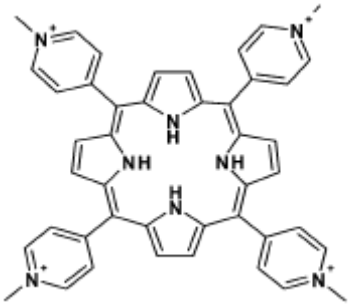


Figure 37. Formule de la porphyrine TMPyP4.

b. BRACO19

Le BRACO19 est une acridine 3,6-dusbstituée synthétisée par le groupe de Neidle et capable de fixer les structures G-quadruplexes (*Figure 38*) (Harrison R. J., et al., 1999). Cette molécule est capable d'induire un arrêt de la prolifération cellulaire, une diminution de l'activité télomérase, un raccourcissement de la taille des télomères et une entrée en sénescence après traitements de cellules de cancer du sein à des concentrations subcytotoxiques. *In vivo*, le BRACO19 est également capable d'induire un effet antitumoral (Gowan S. M., et al., 2002) (Burger A. M., et al., 2005). De plus, l'inhibition de la croissance cellulaire induit par le BRACO19 dans des cellules de cancer de prostate DU145 apparaît très rapidement par inhibition de l'activité télomérase et cette sénescence s'accompagne d'une régulation positive de la protéine P21 (cyclin-dependant kinase) ainsi qu'une augmentation de l'expression de $P16^{INK4a}$, un inhibiteur de la progression du cycle cellulaire via une inhibition des cyclines et de p21. Ces cellules traitées présentent également une augmentation du nombre de fusions télomériques, traduisant une diminution de la protection du télomère (Incles C. M., et al., 2004).

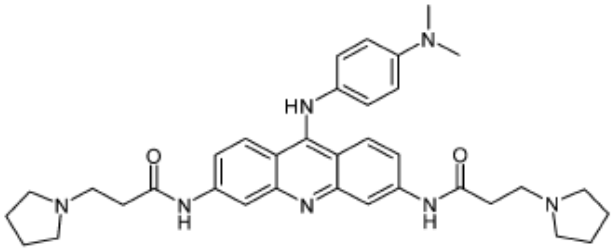
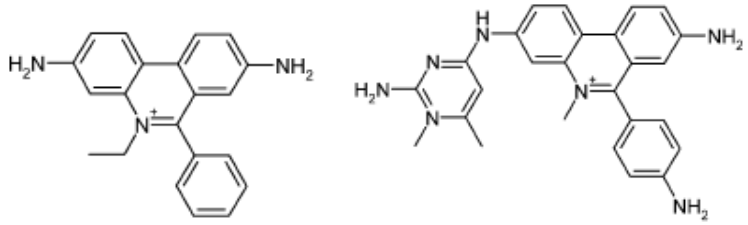


Figure 38. Formule de l'acridine BRACO19.

c. L'éthidium et son dérivé le 9944

L'éthidium (*Figure 39A*) est une molécule capable de s'intercaler entre des paires de bases adjacentes de l'ADN double brin (Lepecq J. B., et al., 1967). Cette molécule ne présente pas d'activité inhibitrice de la télomérase à des concentrations inférieures à celles inhibant la *taq* polymérase (Rosu F., et al., 2003a). Le 9944 est un dérivé de l'éthidium (*Figure 39B*). Il a été synthétisé par le groupe Aventis-Pharma S.A. et est capable de reconnaître spécifiquement des G-quadruplexes (Koeppel F., et al., 2001). Cette molécule est capable d'inhiber l'activité télomérase *in vitro*. En test TRAP-G4 (voir matériels et méthodes), le 9944 présente une concentration inhibitrice de 50% (CI50) de 0.12µM avec une sélectivité vis-à-vis de l'inhibition de la *taq* polymérase du control interne ITAS de 18.3 (Rosu F., et al., 2003a). De plus, Lorsqu'il est fixé au niveau d'un G-quadruplexe, le 9944 est capable d'émettre une

fluorescence permettant ainsi le marquage des G-quadruplexes par ce ligand (Koeppel F., et al., 2001). Enfin, le 9944 présente une forte sélectivité vis-à-vis de la séquence télomérique (G_3T_2A) (Rosu F., et al., 2003a).

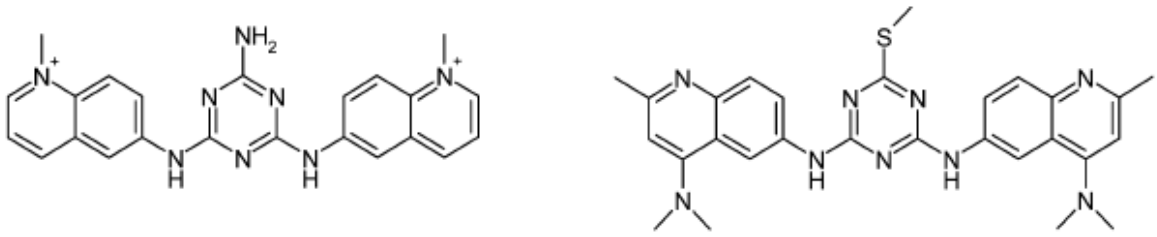


A **B**

Figure 39. Structure de l'éthidium (A) et de son dérivé le 9944 (B).

d. Les dérivés de triazine 12459 et 115405

Ces deux molécules ont été synthétisées par Aventis-Pharma S.A. et sont composées de résidus de quinolines sur un squelette de triazine (*Figure 40*). En test TRAP, le 12459 et le 115405 sont des inhibiteurs efficaces de l'activité télomérase *in vitro* avec des CI50 de 130nM et 41nM respectivement et sont également sélectifs puisque l'inhibition de la *taq* polymérase apparaît à des CI50 de 8400nM et 610nM (Riou J. F., et al., 2002). En test TRAP-G4, le 12459 présente une sélectivité d'environ 25 fois en comparant l'inhibition de l'activité télomérase et l'inhibition de l'ITAS (Gomez D., et al., 2002). Ces ligands induisent également l'apoptose dès 24h à 2µM pour le 115405 et à 72h avec 20µM pour le 12459. A des doses subtoxiques, ces ligands induisent la sénescence dans des cellules A549 et entraînent une diminution de la taille des télomères (Riou J. F., et al., 2002). Le 12459 induit l'apoptose en utilisant la voie de la caspase-3, et induit également une surexpression de la protéine Bax pro-apoptotique et une inhibition de la protéine Bcl-2 anti-apoptotique ainsi qu'un clivage de l'effecteur final apoptotique de la voie caspase-3, PARP(Douarre C., et al., 2005).



A **B**

Figure 40. Structure des triazines 12459 (A) et 115405 (B).

e. La télomestatine

La télomestatine est un composé naturel extrait de *Steptomyces anulatus* par Kazuo Shin-ya en 2001 et présente une forte activité inhibitrice da la télomérase (Shin-Ya K., et al., 2001). Sa structure plane permet une bonne stabilisation des structures G-quadruplexes (*Figure 41*). La télomestatine est une des molécules les plus performantes dans l'inhibition de l'activité télomérase avec une CI50 de 5nM et présente une forte affinité pour la séquence $d[T_2AG_3]_4$ (Kim M. Y., et al., 2002) (Rosu F., et al., 2003b). A des concentrations croissantes en présence de la séquence télomérique *in vitro*, la télomestatine induit la stabilisation d'un G-quadruplexe intramoléculaire de forme panier. Elle est cependant moins efficace pour des G-quadruplexes intermoléculaires (Kim M. Y., et al., 2002) (Kim M. Y., et al., 2003).

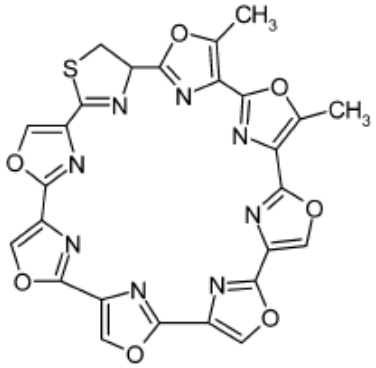


Figure 41. Structure de la télomestatine.

Des études d'interaction de cette molécule avec la séquence télomérique ont été réalisées et ont permis d'établir un modèle dans lequel, la télomestatine se fixe au niveau des boucles diagonales et latérales du G-quadruplexe télomérique humain (*Figure 42*) (Kim M. Y., et al., 2002). De plus, la télomestatine est capable d'induire un arrêt de la prolifération de cellules ALT et télomérase positive en présence de concentrations subtoxiques (Kim M. Y., et al., 2003), et d'induire une mort cellulaire par apoptose (Shammas M. A., et al., 2004). Les dysfonctionnements de la télomérase par la télomestatine induisent une activation des voies de réponse du « DNA damage » par activation de l'expression de ATM et de l'activité kinase de Chk2. Ils s'accompagnent également d'une augmentation de l'expression des inhibiteurs de cyclin-dependent kinase P^{21CIPI} et P^{27KIPI} (Tauchi T., et al., 2003). Il a également été décrit que la télomestatine est capable d'induire une augmentation de la sensibilité de cellules leucémiques myéloïdes aux molécules donorubicine et cytosine-arabinoside utilisées en chimiothérapie (Sumi M., et al., 2004).

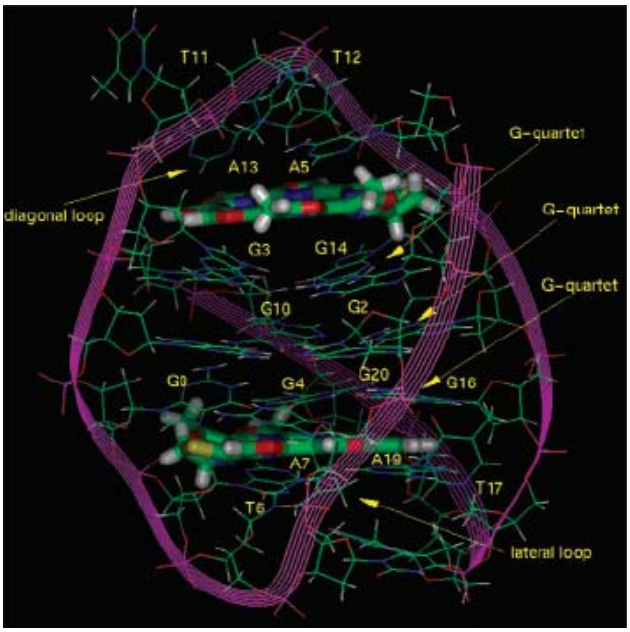


Figure 42. Structure du modèle le plus stable de l'interaction de la télomestatine avec la séquence télomérique humaine (Kim M. Y., et al., 2002).

f. Le dérivé du 2,6-pyridine-dicarboxamide : A003129307A (307A)

Le 307A est une molécule dérivée du 2,6-pyridine-dicarboxamide dans laquelle sont insérés deux groupements de quinoléine (*Figure 43*). Elle a été synthétisée par les laboratoires Aventis-Pharma S.A., dans le cadre de l'ACI : Molécule et Cibles Thérapeutique, impliquant notre laboratoire. Avec le A003164360A elle fait partie des deux dérivés du 2,6-pyridine-dicarboxamide les plus actifs pour inhiber l'activité télomérase et les plus sélectifs vis-à-vis des G-quadruplexes télomériques. Elle induit une forte stabilisation du G-quadruplexe télomérique puisqu'elle présente un ΔTm de 21°C (Guittat L., 2004). En culture cellulaire, le 307A inhibe la prolifération cellulaire à de très faibles concentrations, induit l'apoptose précocement dans des lignées cellulaires télomérase positive de gliome et présente un effet antiprolifératif dans des cellules ALT (Pennarun G., et al., 2005).

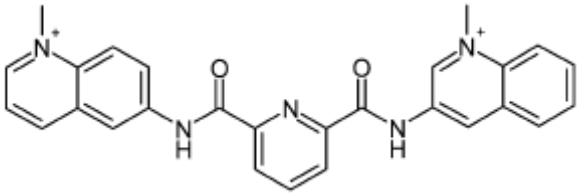


Figure 43. Structure du 2,6-pyridine-dicarboxamide 307A.

G. Conclusion et présentation des objectifs du travail

Le complexe télomère – télomérase présente un rôle très important dans les processus cellulaires. Nous savons aujourd'hui qu'il intervient dans la régulation de l'intégrité télomérique et qu'un dérèglement peut induire la formation de tumeurs. Le télomère est fortement régulé par de nombreuses protéines indispensables à sa protection, son maintien et sa réparation et des mutations de ces protéines peuvent induirent des pathologies sévères et parfois létales. Dans les cellules somatiques, à chaque cycle de division cellulaire, la taille des télomères raccourcit et au bout d'une taille critique, les cellules entrent en sénescence et/ou initient un programme apoptotique. A l'inverse, dans les cellules cancéreuses, la taille de ces télomères est maintenue par la surexpression de l'enzyme télomérase ou par des mécanismes de recombinaison génétique, il en résulte une prolifération anarchique des cellules formant une tumeur.

La séquence télomérique présente de nombreuses répétitions riches en guanines capables d'adopter des structures secondaires en G-quadruplexe. Bien que la présence de telles structures n'a pas encore été démontrée directement *in vivo* chez l'homme, de nombreuses preuves indirectes nous montrent qu'elles ne sont pas incompatibles avec les conditions physiologiques cellulaires et même qu'elles peuvent jouer des rôles indispensables dans des processus biologiques. Ces G-quadruplexes peuvent également se former à d'autres endroits du génome comme au niveau du promoteur de *c-myc*, jouant un rôle de régulation transcriptionnelle de gènes.

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la régulation de la taille des télomères, nous nous sommes intéressés à l'action de certains ligands décrits comme étant capables de reconnaître les structures G-quadruplexes télomériques. Nous avons étudié leurs actions sur d'autres G-quadruplexes présents dans le génome (*c-myc*, promoteur du gène *hTERT*), ainsi que leurs rôles potentiels dans la stabilisation de G-quadruplexes d'ARN. Nous avons également étudié l'effet de la présence de G-quadruplexes dans la séquence codante de la protéine POT_1. Nous avons voulu déterminer si la présence de telles structures pourrait moduler la transcription et la traduction de cette protéine. Dans une deuxième partie, nous avons cherché à déterminer l'action des ligands de l'ADN G-quadruplexe sur la croissance cellulaire, dans des cellules présentant un phénotype ALT, en réactivant l'expression de la télomérase. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'effet de ces ligands sur la taille du simple brin télomérique dans ces lignées.

II. Matériels et Méthodes

A. Culture cellulaire

1. *Les lignées cellulaires*

a. Les lignées Ramos et CA46

Les lignées Ramos (RA 1) et CA46, obtenues auprès de l'ATCC (American Type Culture collection) (N° CRL-1596 et CRL-1648), ont été isolées à partir d'un lymphome de Burkitt humain. Ces deux lignées cellulaires croissent en suspension et présentent des translocations différentes au niveau de *c-myc* et du locus Ig. (Facchini L. M., et al., 1998) (Simonsson T., et al., 2002).

b. Les lignées A549 et JFD11

La lignée cellulaire A549 provient de l'ATCC (N° CCL-185) et correspond à un carcinome pulmonaire humain. Ces cellules sont adhérentes et de type épithélial. Le clone JFD11 dérive de la lignée A549 et a été sélectionné pour sa résistance au 12459 par mutagenèse. Les cellules A549 ont été en contact avec 300µg/ml de l'agent mutagène EMS puis sélectionnées en présence de 10µM de 12459 pendant 30 jours. Les cellules ont été clonées en agar, puis chaque clone a été de nouveau cultivé en présence de 10µM de 12459 (Gomez D., et al., 2003a). Cette lignée se caractérise par une forte activité télomérase.

c. Les lignées MRC_5V_1, MRC_5V_1-MIGR1, MRC_5V_1-hTERT et MRC_5V_1-DN-hTERT

Ces 4 lignées cellulaires nous ont été fournies par Frédérique Megnin-Chanet de l'institut Curie Recherche, INSERM U350 (ORSAY).

- La MRC_5V_1 dérive de la lignée adhérente fibroblastique normale de poumon MRC5. Elle a été immortalisée par le virus SV40 et présente le phénotype ALT.
- Les clones MRC_5V_1-hTERT et MRC_5V_1-DN-hTERT ont été transfectés par un plasmide Mig-R1 contenant le gène hTERT ou un dominant négatif (DN) de hTERT.
- Le clone MIGR1 a été transfecté par le plasmide seul et correspond au contrôle de transfection.

Les différents clones exprimant la GFP ont été triés par FACS et ces populations ont été, dans un deuxième temps, clonées à l'autoclone à 1 cellule par puit. La lignée parentale

MRC_5V_1 n'a pas été transfectée mais a été clonée comme les lignées transfectées (Frédérique Megnin-Chanet, communication personnelle).

d. Les lignées WI38, VA13, VA13-33.3 et JW10

La lignée WI38 provient de l'ATCC (N° CCL-75) et correspond à des cellules normales, adhérentes et fibroblastiques de poumon.

Les lignées VA13, VA13-33.3 et JW10 nous ont été fournies par Silvia Bacchetti (Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Instituto Regina Elena, Roma, Italy).

- La lignée VA13 (ATCC N° CCL-75.1) dérive de la lignée WI38 immortalisée par le virus SV40 ; ces cellules sont de phénotype ALT et ont une morphologie épithéliale (Cerone M. A., et al., 2001).
- Le clone VA13-33.3 provient de la lignée VA13 dans lequel le gène hTR et un dominant négatif de hTERT ont été transfectés.
- Le clone JW10 dérive de la lignée VA13 et a été transfecté par les gènes hTR et hTERT. Ce clone présente les phénotypes ALT et télomérase positive (Cerone M. A., et al., 2001).

2. *Conditions de cultures*

a. Généralités

Les lignées cellulaires Ramos et CA46 sont cultivées *in vitro* dans du milieu RPMI 1640 + GlutaMAX ™ I (*GIBCO™*). Les autres lignées cellulaires sont cultivées en présence de D-MEM + 4,5g/L Glucose + GlutaMAX ™ I – Pyruvate (*GIBCO™*). Chaque milieu est complémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (*GIBCO™*) et contient également 100U/ml de Pénicilline G et de Streptomycine sulfate (*GIBCO™*). Les lignées cellulaires sont cultivées à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité et contenant 5% de CO_2.

b. Entretien des lignées

L'entretien des cellules se fait dans des boites de cultures de $25cm^2$ (*Nunc*) à raison de 5×10^4 cellules par ml. Les cellules adhérentes sont préalablement rincées deux fois avec du PBS 1X (*GIBCO™*) puis détachées par action de 500µl de Trypsine-EDTA (1X) (*GIBCO™*) pendant 2 à 5 min à 37°C. L'évaluation de la concentration cellulaire est réalisée après homogénéisation et comptage à l'aide d'un hématimètre de Malassez en microscopie optique à contraste de phase.

c. Conservation des cellules

La congélation des cellules est réalisée dans des cryotubes de 2ml : le culot cellulaire est repris dans du milieu contenant 70% de RPMI 1640 ou de D-MEM, 20% de SVF et 10% de dimethyl sulfoxide (DMSO) (*SIGMA*®), à raison de 1 à 2×10^6 cellules/ml.

B. Prolifération et viabilité cellulaire

1. Mesure de la viabilité cellulaire

La toxicité des ligands de G-quadruplexe sur les cellules est évaluée selon le test d'exclusion du bleu Trypan (*Sigma*) (Bhuyan B. K., et al., 1976). Pour cela, un volume de colorant à 0,4% est ajouté à un volume de suspension cellulaire. Le bleu Trypan est activement exclu des cellules vivantes alors qu'il pénètre dans le cytoplasme des cellules mortes. En microscopie optique, les cellules mortes sont colorées en bleu alors que les cellules vivantes restent incolores.

2. Détermination de la prolifération et de la viabilité cellulaire par mesure de la réduction du MTT

Grâce à l'action des déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes, le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT) est réduit en cristaux bleus de formazan et permet d'apprécier la viabilité cellulaire (Mosmann T., 1983). Après traitement des cellules en présence ou en absence de ligands de G-quadruplexe, on ajoute 100µl de milieu de culture contenant le MTT (5µg/ml) dans chaque puits et on incube la plaque pendant 3 heures à 37°C, 5% de CO_2. La formation des cristaux bleus de formazan est visualisée au microscope optique. Le milieu de culture est éliminé et un même volume de DMSO (*Sigma*) est ajouté dans chaque puits. La plaque est alors soumise à une forte agitation permettant la dissolution des cristaux de formazan. L'absorbance est déterminée à 570nm dans un lecteur de microplaques et les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité des cellules traitées par rapport à celles non traitées.

C. Analyse de l'expression des gènes par RT-PCR

1. Extraction et dosage des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux est réalisée à l'aide du réactif TRIzol® selon une technique dérivée de la méthode de Chomczynski et Sacchi (Chomczynski P., et al., 1987). Ce réactif contient du thiocyanate de guanidinium, agent chaotropique et puissant inhibiteur de

RNase, associé au phénol/chloroforme qui permet la déprotéinisation. Cette technique repose sur une solubilité différentielle des constituants ADN, ARN et précipité protéique. Un culot cellulaire d'environ 5×10^6 cellules est remis en suspension dans 1ml de TRIzol®, incubé 5 min à température ambiante avant d'ajouter 200µl de chloroforme. Les tubes sont alors agités vigoureusement au vortex, jusqu'à l'obtention d'une solution homogène, puis laissés 10 min à température ambiante. Une centrifugation (12000×g pendant 15 min à 4°C) permet la séparation du mélange en trois phases : une phase organique rose contenant l'ADN, une interphase contenant les protéines et une phase aqueuse contenant les ARN. La phase aqueuse est alors transférée dans un tube propre contenant 500µl d'isopropanol, puis agité vigoureusement et incubé 10 min à température ambiante. Le précipité d'ARN est obtenu par centrifugation (12.000×g pendant 10 min à 4°C). Le surnageant est éliminé et le culot d'ARN est lavé par addition de 1ml d'éthanol 75%. Les tubes sont alors agités puis centrifugés (7500×g pendant 5 min à 4°C). Après élimination du surnageant, les ARN sont séchés rapidement pendant 5 à 10 min à température ambiante, puis repris dans 50µl d'H_2O traitée au DiEthyl Pyro Carbonate (DEPC) (*Sigma*), un puissant inhibiteur de RNAses. Les échantillons sont alors stockés à -80°C. Le dosage des ARN est réalisé par spectrophotométrie à 260nm (*Ultrospec 3000 pro, Amersham*).

2. Transcription inverse

1µg d'ARN est incubé en présence de transcriptase inverse (RT, reverse transcriptase). Cette enzyme permet, à partir d'une séquence d'ARN, de synthétiser une séquence d'ADNc simple brin. La reverse transcription est réalisée en présence de « Random Primer » grâce au kit « Reverse Transcription System » (*Promega*).

3. Réaction de polymérisation en chaîne

10µl d'ADNc sont amplifiés par PCR selon les conditions de cycles suivantes : une étape initiale de dénaturation de 2 min à 94°C est suivie de 30 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 58°C, 30 sec à 72°C, et terminée par 5 min à 72°C. Les produits d'amplification PCR peuvent être conservés à 4°C. Les amorces sens et antisens utilisées sont présentées dans le *Tableau 4*.

Amorces	*Séquences*	**Taille du fragment amplifié**
myc sens 713	**5'-TGG-TGC-TCC-ATG-AGG-AGA-CA-3'**	**356 pb**
myc antisens 1069	**5'-GCC-TCT-TGA-CAT-TCT-CCT-CG-3'**	
hTR sens	**5'-TCT-AAC-CCT-AAC-TGA-GAA-GGG-CGT-AG-3'**	**126 pb**
hTR antisens	**5'-GTT-TGC-TCT-AGA-ATG-AAC-GGT-GGA-AG-3'**	
hTERT 2109 sens	**5'-AGG-CTG-CAG-AGC-AGC-GTG-GAG-AGG-3'**	**422 pb**
hTERT 2531 antisens	**5'-GCC-TGA-GCT-GTA-CTT-TGT-CAA-3'**	
β2m sens	**5'-ACC-CCC-ACT-GAA-AAA-GAT-GA-3'**	**114 pb**
β2m antisens	**5'-ATC-TTC-AAA-CCT-CCA-TGA-TG-3'**	

Tableau 4. Séquences des oligonucléotides utilisés pour l'amplification des gènes.

4. Analyse des produits de PCR

20µl de chacun des échantillons issus de la PCR sont additionnés de 4µl de tampon d'échantillon (25% de bleu de bromophénol ; 0,25% de Xylène cyanol FF ; 15% de Ficoll ; H_2O) puis déposés sur un gel d'acrylamide 6% (19 : 1) en tampon TBE 1X. La migration s'effectue à 100V durant 90 min. Les gels sont colorés au SYBR-Green (0,01%) (*Roche*) pendant 15 min ; la fluorescence est mesurée à l'aide du Phosphorimager (*Typhoon 9210, Amersham*) et analysée grâce au logiciel ImageQuant (*Molecular® Dynamics*).

D. Le test de PCR stop assay

1. Principe

La stabilisation des structures G-quadruplexes par des ligands spécifiques a été évaluée par le test de « PCR stop assay », utilisant deux oligonucléotides sens et antisens qui s'hybrident partiellement au niveau de la dernière répétition de guanine. Ces oligonucléotides sont allongés et amplifiés par polymérisation en chaîne (PCR), en présence de concentrations croissantes de ligands. A titre d'exemple, le schéma du test pour les oligonucléotides Pu22myc / AntiPu22 (RevPu22) est représenté dans la *Figure 44*.

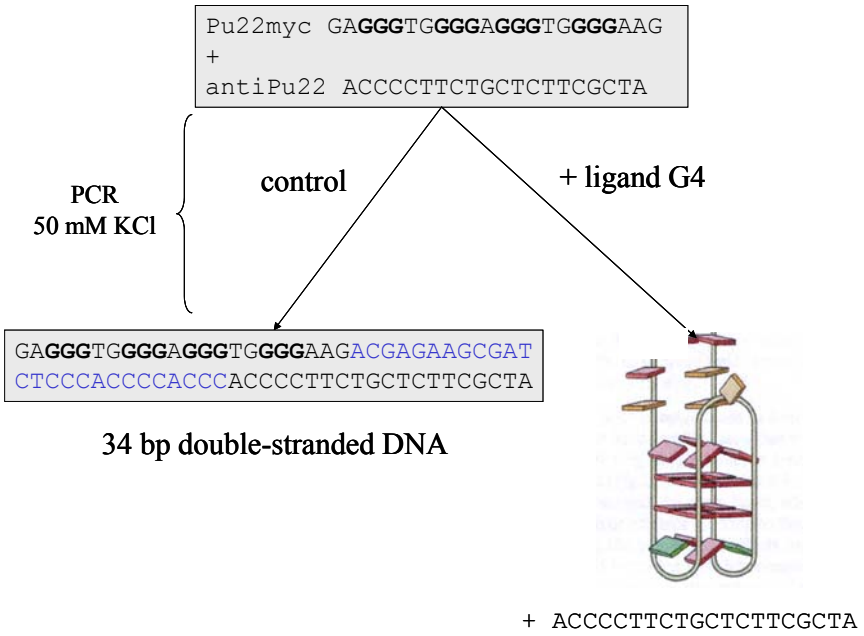


Figure 44. Principe du test de PCR stop assay pour le couple d'oligonucléotide Pu22mu / AntiPu22. L'extension par la Taq polymérase résulte d'une amplification d'un fragment de 34 pb. En présence de ligand, le Pu22myc se stabilise en G-quadruplexe, l'hybridation et l'amplification PCR sont inhibées.

2. *Les oligonucléotides*

Tous les oligonucléotides ont été synthétisés et purifiés par *Eurogentec* et leurs séquences sont présentées dans le *Tableau 5*.

3. *Les tampons*

La nature des sels joue un rôle dans la stabilisation des G-quadruplexes, c'est pourquoi, nous avons optimisé les conditions d'amplification pour chaque couple d'amorce, afin d'éviter les hybridations secondaires. Le couple d'oligonucléotide Pu22myc / antiPu22 est amplifié dans un tampon 10mM Tris, pH 8,3 ; 50mM KCl ; 1,5mM $Mg(OAc)_2$. Les autres couples d'oligonucléotides sont amplifiés dans un tampon 10mM Tris, pH 8,3 ; 25mM LiCl ; 25mM KCl et 1,5mM $Mg(OAc)_2$. D'autres tampons ont été testés : un tampon LiCl contenant 50mM de LiCl, et un tampon NaCl contenant 50mM de NaCl.

Amorces	*Séquences*	*Taille des fragments amplifiés*
Pu22myc	**5'-GAG-GGT-GGG-GAG-GGT-GGG-GAA-G-3'**	**34 pb avec AntiPu22**
Pu22mu	**5'-GAG-GGT-GAA-GAG-GGT-GGG-GAA-G-3'**	**34 pb avec AntiPu22**
AntiPu22	**5'-ATC-GCT-TCT-CGT-CTT-CCC-CA-3'**	**-**
21G	**5'-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-3'**	**30 pb avec Anti21G**
21Gmu3	**5'-GGC-TTA-CGG-TTA-GCG-TTA-GGG-3'**	**30 pb avec Anti21G**
21GmuTS	**5'-ACT-CGT-CGA-GCA-GAG-TTA-GGG-3'**	**30 pb avec Anti21G**
Anti21G	**5'-TCT-CGT-CTT-CCC-TAA-3'**	**-**
TS	**5'-AAT-CCG-TCG-AGC-AGA-GTT-3'**	**30 pb avec AntiTS**
AntiTS	**5'-CCT-TTT-CGT-CTT-AAC-TCT-3'**	**-**
G4TERT1	**5'-GGG-GTG-AAA-GGG-GCC-CTG-GGC-TTG-GG-3'**	**40 pb avec AntiG4TERT1**
G4TERT1mu	**5'-AGG-ATG-AAA-GGA-GCC-CTG-AGC-TTG-GG-3'**	**40 pb avec AntiG4TERT1**
AntiG4TERT1	**5'-TCT-CGT-CTT-CCA-ATC-CCA-3'**	**-**
G4TERT2	**5'-GGG-GGC-CTT-GGG-GCT-CGG-CAG-GGG-TGA-AAG-GGG-3'**	**45 pb avec AntiG4TERT2**
G4TERT2mu	**5'-GAG-AGC-CTT-GAA-GCT-CGG-CAG-GAG-TGA-AAG-GGG-3'**	**45 pb avec AntiG4TERT2**
AntiG4TERT2	**5'-ACT-GCT-TCT-CGT-CCC-CTT-TC-3'**	**-**
VNTR6-1	**5'-GGG-GTA-GGT-GGG-GAT-CTG-TGG-GAT-TGG-3'**	**36 pb avec AntiVNTR6-1**
VNTR6-1mu	**5'-AGG-ATA-GGT-GAA-GAT-CTG-TGG-GAT-TGG-3'**	**36 pb avec AntiVNTR6-1**
AntiVNTR6-1	**5'-TCT-CGT-CTT-CCA-ATC-CCA-3'**	**-**
G4-1b	**5'-GGG-GTT-TGG-GGT-TTG-GGG-TTT-GGG-GAA-G-3'**	**40 pb avec AntiG4-1b**
G4-1b mu	**5'-GGG-GTT-TGA-AGT-TTG-GAG-TTT-GGG-GAA-G-3'**	**40 pb avec AntiG4-1b**
AntiG4-1b	**5'-ATC-GCT-TCT-CGT-CTT-CCC-CA-3'**	**-**

Tableau 5. Séquences des oligonucléotides utilisés lors du test de « PCR stop assay ».

4. Protocole

Toutes les réactions sont réalisées dans un volume final de 25µl, contenant 7,5pmol de chaque oligonucléotide ; le tampon *Taq* polymérase 1X (*Ozyme*) ; 100U/ml de *Taq* polymérase ; 1mM de chaque dNTP et la concentration indiquée de ligand. Le mélange est incubé dans un thermocycleur avec les conditions de cycles suivantes : 94°C pendant 2 min, et 30 cycles de 94°C pendant 30s, 58°C pendant 30s et 72°C pendant 30s. Les produits d'amplification sont analysés dans un gel non dénaturant d'acrylamide à 12% dans du TBE 1X et révélés avec du SYBR Green I (0,01%). La fluorescence est mesurée à l'aide du Phosphorimager (*Typhoon 9210, Amersham*). Les résultats représentent une moyenne ± écartype de plusieurs expériences indépendantes.

E. Le test RT stop assay

1. Principe

Ce test a été mis au point afin de déterminer la capacité des ligands à stabiliser des G-quadruplexes à partir d'oligonucléotides d'ARN. Il est basé sur une hybridation partielle des amorces d'ARN sens et d'ADN antisens au niveau de la dernière répétition de guanine. L'enzyme reverse transcriptase va allonger l'amorce antisens par complémentarité de l'amorce sens. En présence de ligand, l'amorce sens va se stabiliser en G-quadruplexe, induisant une inhibition de l'élongation de l'amorce antisens. Les deux amorces sont ensuite déshybridées. Une migration sur gel d'acrylamide à 12% permet de quantifier l'élongation de l'oligonucléotide antisens.

2. Oligonucléotides

Les oligonucléotides d'ARN nous ont été fournis par Jean Louis MERGNY (Muséum National d'Histoire Naturelle) et correspondent aux séquences représentées dans le *Tableau 6*. Les amorces d'ADN antisens antiVNTR6-1, antiG4TERT1 et antiG4TERT2 ont été présentées dans le *Tableau 5*.

Amorces	*Séquences*	*Taille des fragments amplifiés*
U-VNTR6-1	**5'-GGG-GUA-GGU-GGG-GAU-CUG-UGG-GAU-UGG-3'**	**36 pb avec AntiVNTR6-1**
U-TERT1	**5'-GGG-GUG-AAA-GGG-GCC-CUG-GGC-UUG-GG-3'**	**40 pb avec AntiG4TERT1**
U-TERT2	**5'-GGG-GGC-CUU-GGG-GCU-CGG-CAG-GGG-UGA-AAG-GGG-3'**	**45 pb avec AntiG4TERT2**

Tableau 6. Séquences des amorces d'ARN utilisées lors du test RT stop assay.

3. Protocole

Chaque réaction est réalisée dans un volume final de 20µl, contenant 0,25µM de chaque amorce ; le tampon RT 1X [10mM Tris-HCl (pH 8,8) à 25°C ; 50mM KCl ; 0,1% Triton® X-100] ; 1µM de chaque dNTP ; 5mM de $MgCl_2$; 400U/ml d'enzyme reverse transcriptase et la concentration indiquée de ligand. Les produits d'élongation sont analysés dans un gel non dénaturant d'acrylamide à 12% dans du TBE 1X et révélés avec du SYBR Green I (Roche). La fluorescence est mesurée à l'aide du Phosphorimager (*Typhoon 9210, Amersham*). Les résultats représentent une moyenne ± écartype de 3 expériences indépendantes.

F. Insertion d'un G-quadruplexe dans une séquence codante

1. *Amplification de G4-POT$_1$*

Nous possédons dans notre laboratoire une construction plasmidique pET22b-POT$_1$ contenant l'ADNc du fragment N-terminal de hPOT$_1$ inséré entre les sites *NcoI* (5'-C↓CATGG-3' / 3'-GGTAC↑C-5') et *XhoI* (5'-C↓TCGAG-3' / 3'-GAGCT↑C-5'). La synthèse des séquences G4-POT$_1$ est réalisée par PCR. Les oligonucléotides utilisés sont présentés dans le

Tableau 7.

Amorces	*Séquences*	*Taille des fragments amplifiés*
G4-1	**5'-CGT-CCA-TGG-GGT-TTG-GGG-TTT-GGG-GTT-TGG-GGG-CTT-TGG-TTC-CAG-CAA-C -3'**	**600 pb avec XstopPOT$_1$**
G4-2	**5'-CGT-CCA-TGG-TTG-GGT-TAG-GGT-TAG-GGT-TAG-GGT TGT-TGG-TTC-CAG-CAA-CA-3'**	**600 pb avec XstopPOT$_1$**
XstopPOT$_1$	**5'-GAT-CTC-GAG-CTA-GTG-GTG-GTG-GTG-GTG-3'**	**-**

Tableau 7. Séquences des amorces utilisées pour la synthèse des G4-POT$_1$. La séquence en rouge correspond à l'enzyme de restriction NcoI et celle en verte, à XhoI. Les séquences soulignées correspondent aux régions télomériques des ciliés (G4-1) et humaines (G4-2) susceptibles de former un G-quadruplexe.

Les deux couples d'amorces G4-1 / XstopPOT$_1$ et G4-2 / XstopPOT$_1$ ont été amplifiés de façons différentes. Pour G4-1, une PCR classique avec un gradient de température a été réalisée afin de déterminer la meilleure température d'hybridation. Les conditions de PCR sont les suivantes : 94°C pendant 2 min, puis 30 cycles de 94°C pendant 1 min, un gradient de températures de 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56 et 58°C pendant 1 min, 72°C pendant 1 min. L'amplification par l'amorce G4-2 a été réalisée dans le même mélange réactionnel mais les conditions de cycles sont différentes. Pour ces amorces, une PCR par « touch down » a été utilisée. Cette méthode consiste à démarrer les cycles à une température d'hybridation élevée (68°C) et de réduire de 0,6°C à chaque cycle suivant. L'intérêt de cette méthode est de réaliser une hybridation la plus spécifique possible dès les premiers cycles, et de favoriser son amplification en baissant la température. Les autres conditions restent inchangées.

2. *Insertion des G4-POT$_1$ dans le plasmide pET22b et clonage*

Après amplification, les fragments G4-POT$_1$ sont soumis à une hydrolyse par les enzymes de restriction *XhoI* et *NcoI*. Pour cela, 10µl des produits d'amplification PCR sont incubés en présence de 10 unités de chaque enzyme et le tampon 2 NEB 1X (50 mM NaCl ; 10 mM Tris-HCl ; 10 mM $MgCl_2$; 1 mM dithiothreitol ; pH 7.9 à 25°C). La digestion

enzymatique est réalisée toute la nuit à 37°C. Après la digestion, les ADN sont précipités à l'éthanol en présence de 0,3M d'acétate de sodium pH5,2 et solubilisés dans du tampon TE (10mM tris-HCL pH 8 ; 1mM EDTA). Le plasmide pET22b est linéarisé dans des conditions identiques par les enzymes de restriction *XhoI* et *NcoI*.

Le fragment G4-POT_1-*XhoI*/*NcoI* purifié est ensuite ligé au plasmide pET22b, pendant 3h à 37°C en présence de T4 DNA ligase (*Ozyme*).

Le clonage est réalisé dans des bactéries *E. coli* DH5α rendues compétentes par le chlorure de rubidium. Les bactéries sont décongelées dans la glace pendant 15 min et 10µl de la réaction de ligation sont ajoutés. Le mélange est incubé dans la glace pendant 5 min, puis à 42°C pendant 1 min afin de réaliser un choc thermique, et de nouveau remis dans la glace. 900µl de milieu LB liquide non sélectif sont ajoutés et les bactéries sont incubées pendant 1 heure à 37°C. Les bactéries sont alors centrifugées à 12000xg pendant 3 min, étalées dans des boites de pétri sur du milieu LB agar contenant 100µg/ml d'ampicilline et incubées à 37°C pendant 12 heures.

Dans le but de vérifier si les plasmides amplifiés contiennent les ADNc G4-POT_1, 10 clones de chaque boite contenant les plasmides pET22b-G4-1-POT_1 ou pET22b-G4-2-POT_1 sont récupérés et mis en culture dans 100ml de milieu LB liquide contenant 10% d'ampicilline à 37°C pendant 12 heures. Les plasmides sont ensuite extraits par le Kit Qiagen Plasmid Midi Kit (*Qiagen*®). Une Coupure enzymatique par *XhoI* et *NcoI* est réalisée. 20µl du mélange est analysé dans un gel d'agarose à 1% dans du TBE contenant 0,01% de bromure d'éthidium. L'ADN est visualisé à l'aide d'une lampe à Ultra Violet.

3. Séquençage des plasmides G4-1-POT_1

Parmi les différents clones isolés, les plasmides pET22b-G4-1.6-POT_1, pET22b-G4-1.7-POT_1 et pET22b-G4-2.7-POT_1 ont été sélectionnés pour réaliser un séquençage afin de vérifier la séquence de l'insert. Le séquençage est réalisé entre les sites T7sens et T7antisens. La première étape consiste en une PCR entre ces deux séquences. Pour chaque plasmide, deux tubes sont utilisés, le premier contient l'amorce T7sens et le deuxième l'amorce T7antisens. La réaction est réalisée dans un volume final de 20µl : 8µl de pré-mix (contenant les dNTP non marqués et les dNTP marqués par des fluorochromes, le tampon et la *Taq polymérase*) ; 0,2pM d'amorce T7sens ou T7antisens ; 2,5 unités de *Taq* polymérase et 200ng de plasmide. Les étapes de PCR sont les suivantes : 96°C pendant 4 min, puis 25 cycles de 96°C pendant 10 sec, 50°C pendant 5 sec et 60°C pendant 4 min. Les fragments d'ADN amplifiés sont

précipités dans de l'éthanol à 95% pendant 15 min à température ambiante, centrifugés à 12000xg pendant 20 min, lavés dans de l'éthanol 70% et de nouveau centrifugés à 12000xg pendant 10 min. Le culot d'ADN est repris par 10µl de formamide et 50µl de tampon d'échantillon. La migration est réalisée avec un séquenceur *Applied Biosystems*™ 377 pendant 9 heures dans un gel d'acrylamide. Les séquences sont analysées avec le logiciel *ABI PRISM*™.

4. Amplification PCR des plasmides pET22b-G4-POT$_1$

Dans but de vérifier si les séquences G4-POT$_1$ dans le plasmide pET22b sont capables de se stabiliser en G-quadruplexe, des PCR de la séquence N-terminale de POT$_1$ contenant les séquences riches en guanines ou non ont été réalisées. Les amorces utilisées sont représentées dans le *Tableau 8*.

Amorces	*Séquences*	*Taille des fragments amplifiés*
LacpET22	**5'-GGA-ATT-GTG-AGC-GGA-TAA-CA -3'**	**293 pb pour POT$_1$ seul**
R139	**5'-GTC-TGG-TCC-ACA-ATA-GTT-AC -3'**	
S188	**5'-GTG-GAA-ACT-ATG-AAG-CCC-TTC-C-3'**	**320 pb avec R530**
S312	**5'-CCA-GCT-CTG-GCT-TTG-CAT-CTT-T-3'**	**218 pb avec R530**
R530	**5'-CAA-GAG-CTG-ACA-AGT-CAG-GTC-A-3'**	**-**
TS	**5'-AAT-CCG-TCG-AGC-AGA-GTT-3'**	**36 pb**
NT	**5'-ATC-GCT-TCT-CGG-CCT-TTT-3'**	
TSNT	**5'-AAT-CCG-TCG-AGC-AGA-GTT-AAA-AGG-CCG-AGA-AGC-GAT-3'**	

Tableau 8. Séquences des amorces utilisées pour l'amplification PCR des plasmides pET22b-G4-POT$_1$.

Le volume final de la réaction est de 25µl et comprend 1ng de plasmide ; 1µM d'amorce sens et antisens ; le tampon *Taq* polymérase 1X ; 1mM de chaque dNTP ; 2,5 unités de *Taq polymérase* et la concentration indiquée de ligand de G-quadruplexe. Pour le contrôle TSNT, $1{,}5.10^{-15}$mol/réaction et 25pmol/réaction de TS et de NT sont ajoutés. Les échantillons sont transférés dans le thermocycleur et vont subir une dénaturation à 94°C pendant 2 min, puis 30 cycles d'amplification dans les conditions suivantes : 94°C pendant 30 sec, 52°C pendant 30 sec, 72°C pendant 30 sec. Le dernier cycle est suivi d'une étape de 2 min à 72°C. Les échantillons sont analysés dans un gel d'acrylamide à 6%.

5. *Synthèse protéique des G4-POT$_1$ dans E. coli*

Nous avons vérifié si les plasmides construits sont capables de transcrire et de traduire le gène POT$_1$. Pour répondre à cette question, nous avons utilisé une souche bactérienne *E. coli* BL21 [F^- *OmpT hsdS$_B$ ($r_B^- m_B^-$) gal dcm rne131 (DE3)*] qui exprime l'ARN polymérase du bactériophage T7 en présence d'IPTG. Ces bactéries présentent également la mutation *rne131* qui augmente la capacité d'expression du transgène. Lorsque ces souches sont transformées par un vecteur d'expression (comme le plasmide pET22b) qui contient un promoteur fort (celui du bactériophage T7), la synthèse de la protéine d'intérêt peut atteindre une proportion de 40% à 50% des protéines totales.

La transfection, l'amplification bactérienne et le clonage en milieu LB-agar sont réalisés dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la souche DH5α à partir de 5µl de plasmide pour 20µl de bactéries. Après amplification des clones, 100µl d'une pré-culture d'un clone transformé par pET22b-G4-POT$_1$ sont ensemencés dans 5ml de milieu LB liquide contenant 10% d'ampicilline de milieu et incubés à 37°C pendant 3 heures (jusqu'à obtention d'une DO d'environ 0,6). 1ml est prélevé pour le contrôle sans induction. Les 4ml restants sont incubés à 37°C en présence de 40µl d'IPTG (100mM) pendant 3 heures. 400µl des clones non induits et 50µl des clones induits par IPTG sont centrifugés à 12000xg pendant 3 min. Chaque culot cellulaire est repris dans 25µl de tampon Laemmli. Le mélange est incubé à 95°C pendant 3 min afin de lyser les bactéries et analysé à 200V pendant 1h30 dans un gel SDS d'acrylamide/bis-acrylamide (37,5 : 1) à 12%. Les protéines sont révélées au bleu de Coomassie.

6. *Traduction in vitro par le test TnT® couplé à des lysats de réticulocytes (PROMEGA)*

Ce test comprend un système couplé de transcription et de traduction protéique à partir de gènes clonés sous le contrôle du promoteur T7. Le volume réactionnel est de 25µl et se compose de 12,5µl de lysat de réticulocyte, 1µl de tampon TnT®, 0,5µl de TnT® T7 ARN polymérase, 0,5µl (20µM) de mélange d'acides aminés sans méthionine, 1µl de méthionine [^{35}S] à 10µCi/µl, 0,5µl (20 unités) de RNasin®, un inhibiteur de ribonucléase, 500ng d'ADN plasmidique et les ligands de G-quadruplexe à la concentration indiquée. Le mélange réactionnel est incubé à 30°C pendant 90min. En fin de réaction, 5µl de tampon de Laemmli sont ajoutés, les protéines sont dénaturées à 95°C pendant 2 min puis analysées dans un gel

d'acrylamide/bis-acrylamide (ratio 37,5 : 1) à 12%. Le gel est ensuite séché puis mis en autoradiographie (*hyperfilm™ MP*) pendant 3 jours.

7. Transcription par le système Riboprobe® (PROMEGA)

Ce système permet réaliser *in vitro* la transcription du fragment N-terminal du gène POT_1 inséré dans le plasmide pET22b. Il fournit tous les éléments indispensables à cette transcription. 500ng de plasmides sont incubés en présence de 4µl de tampon 5X optimisé pour la transcription ; 10mM de DTT ; 20 unités de RNasin® ; 0,5mM de ATP ; 0,5mM de CTP ; 0,5mM de GTP ; 0,12µM de UTP ; 5µCi de [α^{32}P]UTP et 15 unités de T7 ARN polymérase. Le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 1 heure. La réaction est arrêtée avec 20µl de tampon de charge ARN (50% glycérol ; 1mM EDTA ; 0,4% bleu de bromophénol) et 60µl de tampon d'échantillon d'ARN contenant 38µl de formamide déionisé ; 14µl de formaldéhyde 37% et 8µl de tampon MOPS 10X (2M MOPS ; 500mM acétate de sodium ; 50mM EDTA). 20µl sont directement déposés dans un gel d'agarose 1,2% dénaturant et 20µl sont incubés à 70°C pendant 10 min pour subir une dénaturation thermique avant la migration. Elle s'effectue à 80V pendant 1h30. Le gel est ensuite séché puis mis en autoradiographie (*hyperfilm™ MP*) pendant 24 heures.

G. Action de ligands de G-quadruplexe sur la sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire est évaluée sur différentes lignées en utilisant des concentrations subtoxiques de ligands de G-quadruplexe. Les cellules sont ensemencées à raison de 75000 cellules/ml dans 5ml de milieu de culture en présence de 0,5µM de télomestatine ou 5µM de 307A. Tous les 4 jours, les cellules sont trypsinées, comptées et réensemencées à 75000 cellules/ml en présence de ligand. Ces opérations sont renouvelées jusqu'à l'obtention d'un plateau de sénescence. Les doublements de population (pd) sont calculés selon la formule : $[pd = (\log X - \log Y) / \log 2]$ dans laquelle X est le nombre de cellules finales et Y le nombre de cellules ensemencées. A chaque passage, le pd est ajouté au pd du passage précédent. Il est donc possible de savoir au bout de combien de jours et après combien de doublements de population la sénescence est atteinte.

H. Les tests TRAP et TRAP-G4 (Telomeric Repeat Amplification Protocol)

1. Principe

Le test TRAP est utilisé dans le but de déterminer *in vitro* l'activité de la télomérase dans des tissus ou dans des extraits cellulaires (Cathers B. E., et al., 1999). Il est basé sur l'amplification PCR d'un couple d'oligonucléotides TS et CXext capable de s'hybrider au niveau des deux derniers nucléotides en 3' de l'amorce TS et des deux premiers nucléotides en 3' de l'amorce CXext. L'ajout d'extrait protéique contenant la télomérase va permettre à cette enzyme d'allonger l'oligonucléotide TS, en ajoutant à chaque cycle de PCR une séquence TTAGGG. Après migration en gel d'acrylamide, on obtient une échelle d'ADN, chaque bande étant caractérisée par l'ajout d'une séquence répétée de TTAGGG. Le milieu réactionnel contient également un autre couple d'oligonucléotides TS et NT capable d'amplifier une 3ème amorce TSNT. L'amplification du TSNT correspond au contrôle interne de PCR (ITAS), qui lorsqu'il est inhibé, correspond à une inhibition de la *Taq polymérase* et non plus de la télomérase (*Figure 45*).

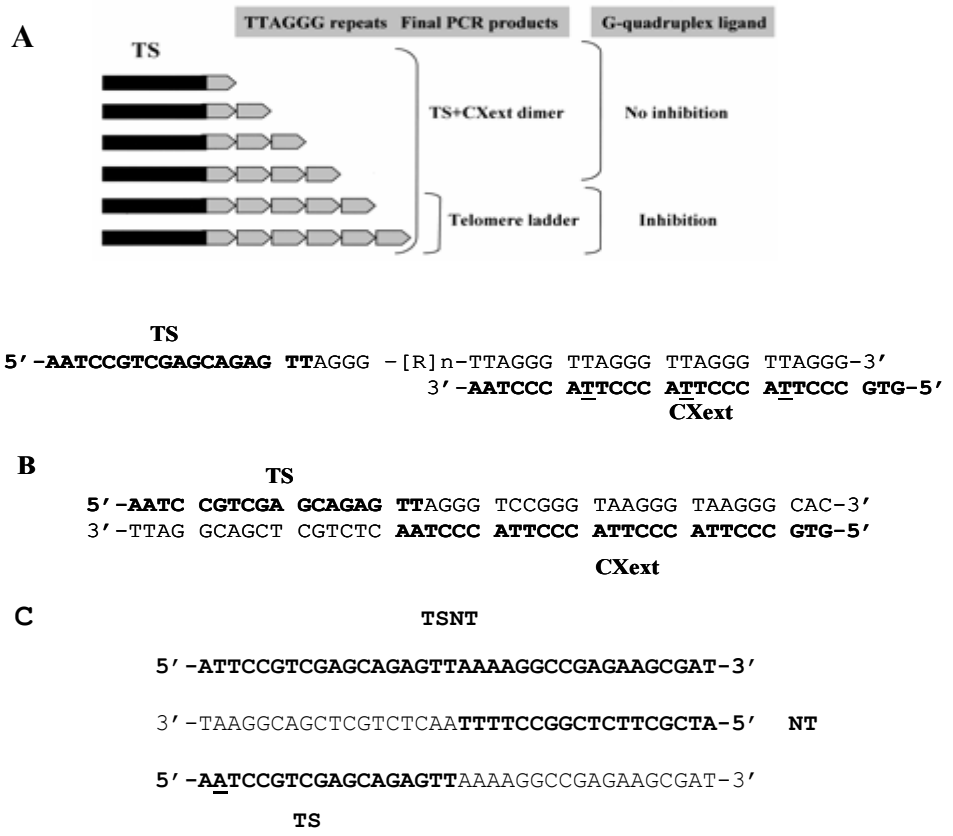


Figure 45. Représentation schématique de l'amplification PCR des fragments allongés par la télomérase TS-[R]n-/CXext (A), du dimère TS/CXext (B) et des couples d'oligonucléotides du contrôle interne ITAS (C).

L'analyse des hybridations des séquences montre que certaines complémentarités ne sont pas respectées et correspondent aux nucléotides soulignés dans la *Figure 45*. Elles ont été sélectionnées volontairement afin d'éviter la formation de dimères entre les oligonucléotides TS et CXext.

Le test TRAP-G4 dérive du test TRAP et est utilisé dans le but de déterminer l'activité inhibitrice de ligands de G-quadruplexes (Gomez D., et al., 2002). En effet, la formation d'un G-quadruplexe par les ligands nécessite 4 séquences répétées TTAGGG. Hors dans le test TRAP, il faut attendre 4 cycles de PCR pour voir apparaître cette répétition (*Figure 45A*). La détermination de la CI50 des ligands G-4 peut donc être faussement estimée par technique. La modification de l'amorce TS du test TRAP par un oligonucléotide susceptible de former un G-quadruplexe intramoléculaire et également capable d'être allongé par la télomérase est une alternative pour compenser cette erreur (*Figure 46*). L'oligonucléotide TSG4 comporte 4 répétitions de 3 guanines adjacentes capables de former un G-quadruplexe. L'hybridation de cette amorce avec le CXext se fait entre les 2 thymines en 3' du TSG4 et les 2 adénines en 3' du CXext.

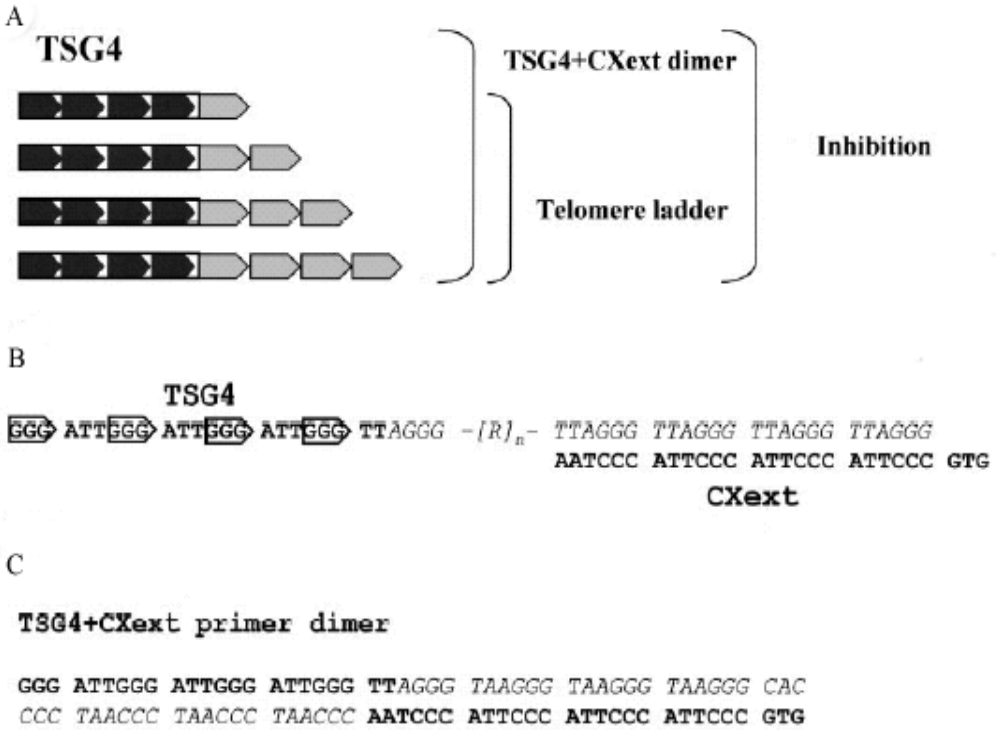


Figure 46. Représentation schématique du principe du test TRAP-G4. A : En présence de TSG4, un ligand de G-quadruplexe peut inhiber aussi bien le dimère TSG4/CXext que le produit d'élongation par la télomérase. B : amplification PCR du couple TSG4/CXext allongé par la télomérase et C : du dimère TSG4/CXext.

2. *Préparation des extraits protéiques*

Les extraits protéiques sont réalisés à partir de cellules A549. 10^5 – 10^6 cellules en culture sont trypsinées et remises en suspension dans du PBS. Après centrifugation à 1000xg pendant 5 min, les cellules sont resuspendues dans 200µl de tampon de lyse contenant 0,5% de CHAPS (*Sigma*) ; 1mM de $MgCl_2$; 10mM de Tris-HCl pH 7,5 ; 1mM d'EDTA ; 1mM de DTT ; 5mM de β-mercaptoethanol, pendant 30 min dans la glace. Les extraits sont ensuite centrifugés à 12000xg pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et la quantité de protéines est quantifiée par spectrophotocolorimétrie par la technique de Bradford.

3. *Protocole du test TRAP*

Le milieu réactionnel de 50µl comprend 20mM de Tris-HCl pH8,3 ; 50µM de dNTP ; 1,5mM de $MgCl_2$; 63mM de KCl ; 1mM d'EGTA ; 0,005% de Tween 20 ; 20µg/ml de BSA ; 1 unité de *Taq polymérase* ; 0,4µM d'oligonucléotides TS, NT et CXext ; 20aM de TSNT et la quantité indiquée d'extrait protéique. Une étape d'élongation de TS est réalisée pendant 15 min à 30°C puis l'amplification PCR est effectuée (1 min 90°C, 30 cycles de 30s à 92°C, 30s à 50°C et 1 min à 72°C). 15µl de chaque tube sont analysés dans un gel d'acrylamide à 12%. Le gel est ensuite agité dans une solution de SYBR-Green (0,01%) et scanné au Typhoon.

4. *Protocole du test TRAP-G4*

Pour le test TRAP-G4, les concentrations des amorces utilisées sont différentes du test TRAP. En effet, pour cette technique, nous utilisons 0,07µM d'amorces TSG4, 0,36µM de TS, 0,45µM de CXext, 0,15µM de NT et 20aM de TSNT. De plus, la température d'hybridation de la PCR est de 52°C. Le reste du protocole est inchangé par rapport au test TRAP.

I. Restriction des fragments télomériques (TRF)

1. *Principe du TRF*

Le but de ce test est de digérer l'ADN génomique par deux enzymes de restriction, Hinf I (5'-G↓ANTC-3' / 3'-CTNA↑G-5') et RSA I (5'-GT↓AC-3' / 3'-CA↑TG-5'). Les télomères ne seront pas digérés. Une hybridation du télomère sur la partie simple brin avec une sonde brin C radioactive permet de le marquer. La taille du télomère peut être évaluée après migration dans un gel d'agarose 0,8% en présence d'un marqueur de poids moléculaire (Gomez D., et al., 2003b).

2. *Protocoles*

a. Préparation de la sonde brin C radiomarquée

La sonde radiomarquée est préparée en incubant, pendant 1 heure à 37°C, 20pmol d'oligonucléotides brin C ; 80µCi de $\gamma[^{32}P]$ ATP ; et 1µl de T4 PNK (polynucleotide kinase). La réaction est réalisée dans un volume final de 30µl de T4 PNK 1X (70 mM Tris-HCl ; 10 mM $MgCl_2$; 5 mM dithiothreitol ; pH 7.6 à 25°C). Les amorces radiomarquées sont ensuite purifiées sur colonnes *Quiagen* (nucleotide removal kit).

b. Préparation des ADN

10^5–10^6 cellules sont trypsinées, lavées deux fois au PBS et sédimentées par centrifugation à 1000xg pendant 5 min. Les ADN sont extraits à partir de colonnes *Qiagen* (DNA extraction kit), puis quantifiés par spectrophotométrie. Les concentrations sont ensuite évaluées par migration de 5µl de suspension d'ADN dans un gel d'agarose 0,8%. Le gel est scanné au Typhoon et les ADN sont quantifiées, ce qui permet un réajustement des volumes d'échantillons pour travailler à concentrations constantes.

c. Hybridation

L'hybridation est réalisée dans un volume final de 30µl de tampon 2 NEB 1X avec 3µg d'ADN précédemment extrait ; 0,5pmol de sonde brin C et 1µl de chaque enzyme Hinf I et RSA I. Le mélange est incubé à 50°C pendant 12 heures puis migré dans un gel d'agarose 0,8% dans du TBE contenant 0,01% de bromure d'éthidium, pendant 1h30 à 80V. Le gel est séché pendant 30 min à 42°C. Le gel est scanné au Typhoon pour quantifier les ADN et exposé dans une cassette avec un écran photosensible pendant au moins 24 heures. L'écran est ensuite scanné au phosphorimager et le signal radioactif est quantifié.

J. Expérience d'hybridation en solution

1. *Principe*

Ce test d'hybridation en solution non dénaturante est utilisé dans le but de détecter le simple brin télomérique (Gomez D., et al., 2003b). Cette technique est basée sur l'hybridation d'une sonde brin C (5'-CCC-TAA-CCC-TAA-CCC-TAA-CCC-TAA-3') radiomarquée sur la partie simple brin télomérique. Plus le simple brin est long, plus le nombre de brin C peut s'hybrider et plus fort serra le marquage. Si le simple brin est raccourci ou présente une conformation en G-quadruplexe, la quantité de sonde fixée sera diminuée.

2. *Protocoles*

Les extractions d'ADN et la préparation de la sonde brin C radiomarquée sont réalisées selon les protocoles utilisés pour le test TRF. L'hybridation est réalisée dans un volume final de 30µl de tampon 2 NEB 1X (50 mM NaCl ; 10 mM Tris-HCl ; 10 mM $MgCl_2$; 1 mM dithiothreitol ; pH 7.9 à 25°C) ou de tampon d'hybridation (50mM NaCl, 10mM tris HCl pH 8; 1mM EDTA). 3µg d'ADN précédemment extrait sont incubés à 50°C pendant 12 heures en présence de 0,5 pmol de sonde brin C. Le tout est analysé dans un gel d'agarose 0,8% dans du TBE contenant 0,01% de bromure d'éthidium, pendant 1h30 à 80V. Le gel est séché pendant 30 min à 42°C, scanné au Typhoon pour quantifier les ADN totaux et exposé ensuite dans une cassette avec un écran photosensible pendant au moins 24 heures pour quantifier au phosphorimager le signal radioactif. Le résultat est exprimé en % de signal radioactif par rapport à la quantité totale d'ADN analysée.

III. Résultats et Discussions

A. Action de ligands G4 sur les complexes réplication, transcription et traduction

Les télomères sont essentiels pour le maintien de l'intégrité et de la stabilité du génome. Dans 85% des cellules cancéreuses ou immortalisées, la télomérase est surexprimée et permet l'allongement des télomères (Mceachern M. J., et al., 2000). Ces télomères présente des séquences riches en guanines capables de former des G-quadruplexes (G4) au niveau du simple brin. L'une des stratégies d'inhibition de l'élongation des télomères consiste à stabiliser ces structures G-quadruplexes par des ligands dans le but d'inhiber l'activité de la télomérase (Mergny J. L., et al., 2002). Des séquences riches en guanines potentiellement capables de former des G-quadruplexes existent également dans de nombreuses régions du génome, au niveau de promoteurs ou de régions régulatrices d'oncogènes comme *c-myb, c-Fos, c-ABL* et *c-myc* (Simonsson T., 2001).

Des répétitions de la séquence d(CGG) retrouvées dans la région 5' non codante du premier exon du gène FMR1 est à l'origine du syndrome de l'X fragile (Weisman-Shomer P., et al., 2000a) (Weisman-Shomer P., et al., 2003). Ces répétitions sont potentiellement capables de former une structure en G-quadruplexe, ce qui induit un blocage de la transcription du gène FMR1. La formation potentielle de structures G-quadruplexes permet donc de réguler la transcription de certains gènes.

Ces séquences riches en guanines sont différentes de celles retrouvées au niveau des télomères et les propriétés pharmacologiques des différents ligands de l'ADN G-quadruplexe n'ont été étudiées que sur les séquences télomériques et myc. Nous avons étudié l'activité et la sélectivité de ces ligands décrits comme étant capables de stabiliser le G-quadruplexe télomérique, sur la région NHE III_1 du promoteur du gène *c-myc*, ainsi que sur l'intron 6 du gène hTERT, intervenant dans le processus d'épissage alternatif de son pré-ARNm.

Enfin, les structures G-quadruplexes ont surtout été décrites au niveau de régions non codantes. Nous avons voulu étudier l'effet biologique de séquences capables de former des G-quadruplexes, insérées dans la région codante d'une protéine POT_1 au niveau de l'ATG, en déterminant les effets des ligands G4 sur la transcription et la traduction de cette protéine chimère.

1. *Ligands G4 et promoteur du gène c-myc*

a. But du travail

c-myc est un oncogène intervenant dans la prolifération, la croissance, la différenciation et l'apoptose cellulaire. Une surexpression de ce gène a été décrite dans de nombreux cancers (Patel J. H., et al., 2004b). Par des expériences de transfection, c-myc est capable d'immortaliser des fibroblastes normaux (en association avec d'autres oncogènes) et d'induire une transformation maligne de cellules normales (Facchini L. M., et al., 1998). Différentes études ont déjà montré l'intérêt de l'inhibition de l'expression de *c-myc*. Par exemple, l'utilisation d'oligonucléotides antisens dirigés contre *c-myc* ont permis d'induire une différenciation de myélocytes et de cellules leucémiques myéloïdes (Canelles M., et al., 1997). Pour ces différentes raisons, *c-myc* est devenu une cible d'intérêt pour la recherche d'agents thérapeutiques dans la lutte contre le cancer.

Dans un premier temps, nous avons voulu vérifier les résultats de Hurley et coll. décrivant que le TMPyP4 est capable d'inhiber la transcription du gène *c-myc* dans des modèles cellulaires (Siddiqui-Jain A., et al., 2002). Nous avons testé différents ligands de l'ADN G-quadruplexe décrits comme étant capables de stabiliser le G-quadruplexe télomérique (Kerwin S. M., 2000) (Cuesta J., et al., 2003), sur la transcription du gène *c-myc*. Dans une deuxième étape, et afin de déterminer la capacité de ces ligands à former et stabiliser ce G-quadruplexe, nous avons mis au point un test basé sur l'inhibition de l'amplification PCR de 2 oligonucléotides qui s'hybrident partiellement. L'une de ces amorces correspond à la séquence riche en guanine du promoteur de *c-myc*.

b. Action des ligands G4 sur la transcription de *c-myc* dans les lignées Ramos et CA46

Les lignées RAMOS et CA46 sont des modèles cellulaires permettant d'étudier la stabilisation des G-quadruplexes du promoteur de *c-myc* (Siddiqui-Jain A., et al., 2002). En effet, ces deux lignées présentent des translocations différentes au niveau de la région NHE III_1. Les cellules RAMOS ont conservé cette région NHE III_1 alors que les cellules CA46 ont perdu cette partie du promoteur lors de la translocation (*Figure 47*).

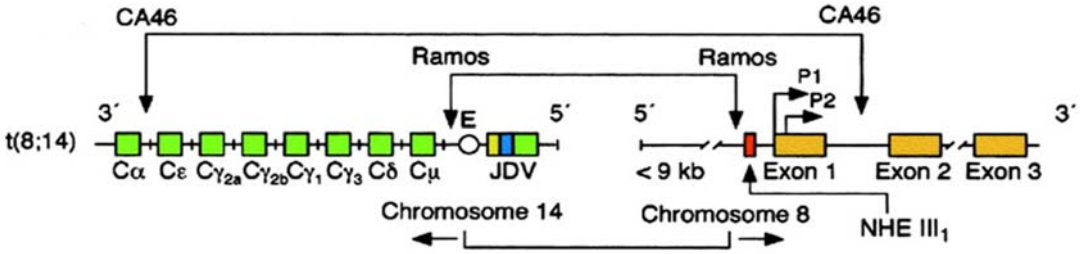


Figure 47. Localisation des translocations des lignées Ramos et CA46.

Dans la lignée CA46, le gène *c-myc* n'est donc plus sous le contrôle de la région NHE III_1 de son promoteur et ces cellules vont donc servir de contrôle dans l'étude de l'action pharmacologique de ligands de G-quadruplexes. La lignée RAMOS possède toujours la région NHE III_1 et permettra d'évaluer l'effet des ligands sur l'activité transcriptionnelle de *c-myc* contrôlée par cet élément.

Nous avons utilisé le TMPyP4 dans des conditions de temps et de traitement (48h, 100µM), précédemment décrites (Siddiqui-Jain A., et al., 2002), comme contrôle positif de l'inhibition de la transcription de *c-myc*. Nous avons également étudié l'effet du 12459, de la télomestatine et du 307A à 10µM pendant 48h. La concentration de 10µM a été choisie puisque des expériences préliminaires réalisées dans notre laboratoire ont montré qu'à cette concentration les molécules sont relativement peu cytotoxiques alors que des concentrations supérieures induisent une cytotoxicité plus importante. Le transcrit de *c-myc* des cellules traitées est analysé par RT PCR, comparativement au transcrit de la β2-microglobuline servant de contrôle (*Figure 48*).

Lors de la première expérience (*Figure 48*), nous avons observé que le TMPyP4 est capable d'inhiber la transcription de *c-myc* dans la lignée RAMOS (NHE III_1+), mais pas dans la lignée CA46 (NHE III_1-). Ces données reproduisent les résultats publiés précédemment (Siddiqui-Jain A., et al., 2002). Par contre les ligands 307A, télomestatine et 12459 n'ont aucun effet sur la transcription de *c-myc* dans ces 2 lignées. Nous avons effectué 3 expériences supplémentaires et indépendantes afin de valider ou d'infirmer ces résultats (*Figure 49*).

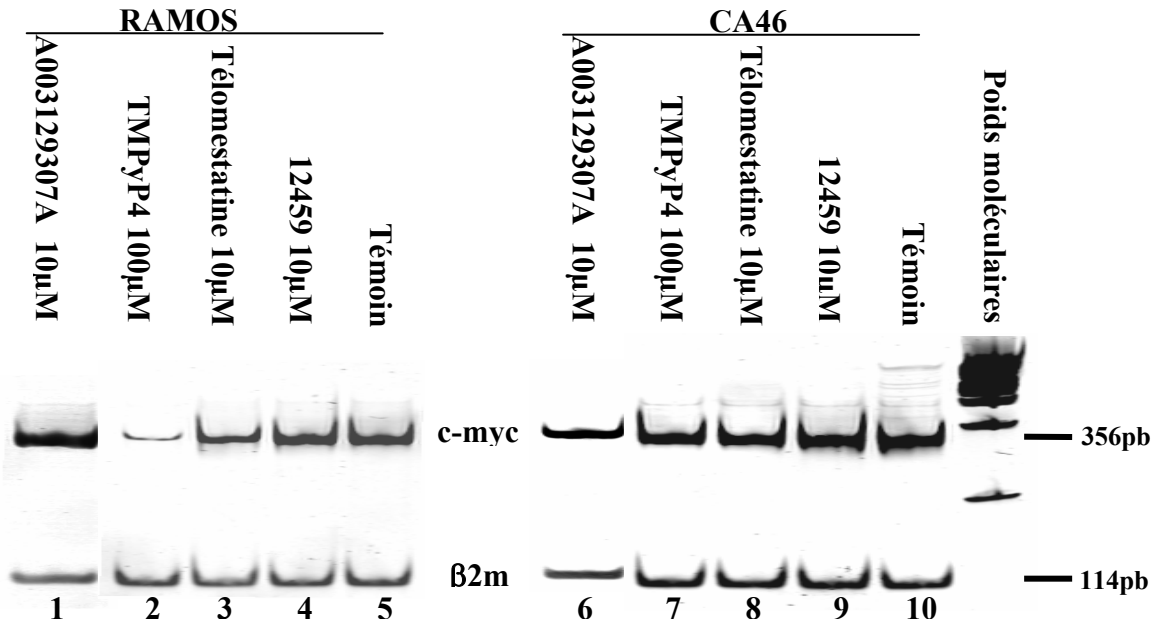


Figure 48. Analyse des transcrits de c-myc et de la β2-microglobuline dans les lignées RAMOS (lignes 1 à 5) et CA46 (lignes 6 à 10) après 48h de traitements par les ligands 307A à 10µM (lignes 1 et 6), TMPyP4 à 100µM (lignes 2 et 7), télomestatine à 10µM (lignes 3 et 8), 12459 à 10µM (lignes 4 et 9) et en absence de ligand (lignes 5 et 10).

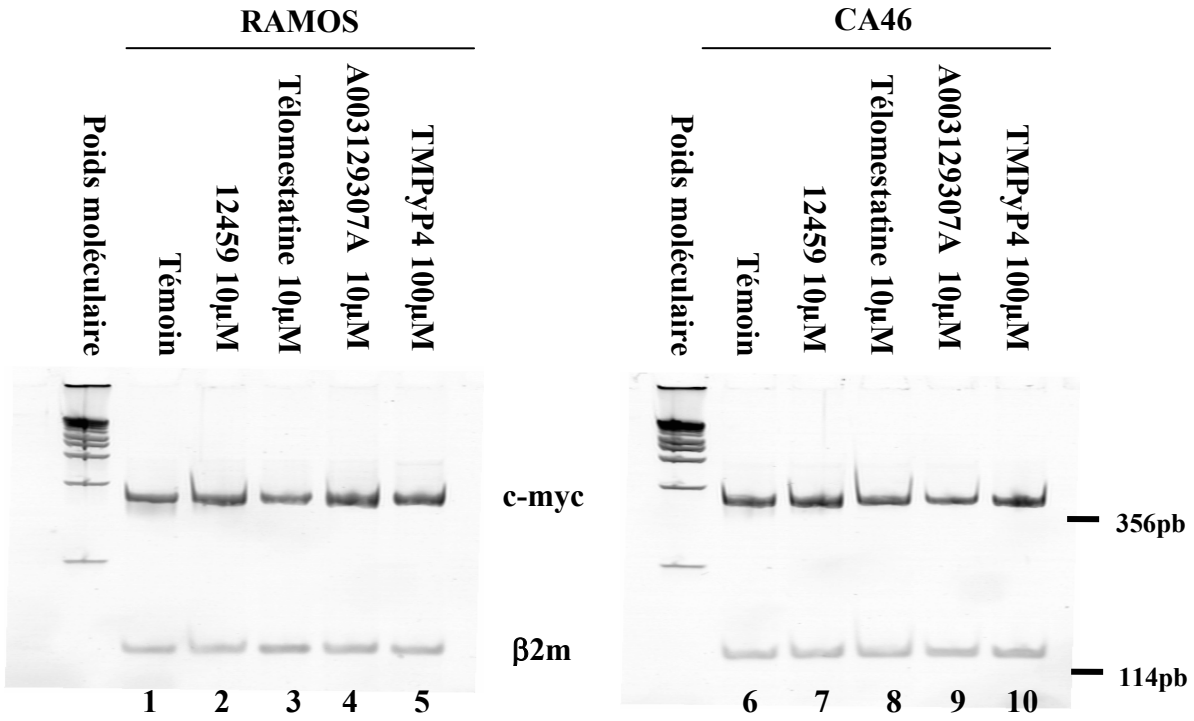


Figure 49. Analyse des transcrits de c-myc et de la β2-microglobuline dans les lignées RAMOS (lignes 1 à 5) et CA46 (lignes 6 à 10) après 48h de traitements par les ligands 12459 à 10µM (lignes 2 et 7), télomestatine à 10µM (lignes 3 et 8), 307A à 10µM (lignes 4 et 9), TMPyP4 à 100µM (lignes 5 et 10) et en absence de ligand (lignes 1 et 6). Cette expérience a été réalisée 3 fois avec les mêmes résultats.

Dans chacune de ces trois expériences supplémentaires, nous n'avons pas observé de diminution de la transcription de *c-myc* dans la lignée RAMOS en présence de TMPyP4 à 100µM. Ces résultats suggèrent que le TMPyP4 ne présente pas une action significative et reproductible sur la transcription de *c-myc* dans nos conditions expérimentales. De même, les ligands 12459, télomestatine et 307A à la concentration de 10µM n'ont aucune action sur la transcription de *c-myc* dans ces deux lignées.

Une étude de la viabilité induite par ces ligands montre que ces molécules ont un effet sur les lignées RAMOS et CA46 dans nos conditions expérimentales, à l'exception du 12459 pour la lignée CA46 (*Tableau 9*). Nous pouvons donc écarter l'hypothèse d'une absence totale de pénétration des drogues dans les cellules.

	RAMOS	*CA46*
témoin	**100%**	**100%**
12459	**65%**	**100%**
télomestatine	**88%**	**45%**
TMPyP4	**72%**	**63%**
307A	**90%**	**68%**

Tableau 9. Viabilité cellulaire par numération au bleu trypan des lignées RAMOS et CA46 en présence ou non des ligands 12459, télomestatine, TMPyP4 et 307A.

Les résultats obtenus dans ces expériences montrent que les ligands télomestatine, 12459 et 307A ne sont pas actifs à 10µM sur la transcription du gène *c-myc*. Pour le TMPyP4 utilisé à la concentration de 100µM, les résultats ne sont pas reproductibles, puisqu'une expérience confirme les travaux de Hurley alors que 3 autres l'infirment. L'hypothèse d'une absence totale de pénétration des différents ligands peut être écartée, puisque le 307A et la télomestatine agissent sur la viabilité cellulaire dans ces lignées. Mais, il se peut qu'une concentration pharmacologiquement active de ces ligands sur la région NHE III_1 ne soit pas atteinte.

Il est possible que l'inhibition de la transcription de *c-myc* observée dans les travaux de Hurley et dans notre première expérience corresponde à un effet cytotoxique et non spécifique du TMPyP4 sur la lignée RAMOS. Dans ce cas, le TMPyP4 à 100µM inhiberait l'activité transcriptionnelle de *c-myc* de façon indépendante de la région NHE III_1. Avant de poursuivre ce travail cellulaire, nous avons voulu déterminer l'activité et la sélectivité *in vitro* du TMPyP4 sur le G-quadruplexe de *c-myc* par rapport au G-quadruplexe télomérique.

c. Le test de PCR stop assay (*figure 44*).

Hurley a initialement décrit que le G-quadruplexe de *c-myc* (Pu27myc : 5'-TGGGGA**GGG**TG**GGG**A**GGG**TG**GGG**AAGG-3') est capable de former deux structures différentes, une forme panier et une forme chaise prédominante et plus stable (Siddiqui-Jain A., et al., 2002). Nous avons utilisé une séquence plus courte de l'élément NHE III_1, l'oligonucléotide Pu22myc (5'-GA**GGG**TG**GGG**A**GGG**TG**GGG**AAG-3') uniquement capable de former le G-quadruplexe de forme chaise. Nous avons également utilisé un oligonucléotide muté (Pu22mu : 5'-GAGGGTG**AA**GAGGGTGGGGAAG-3') dans lequel deux guanines, intervenant dans 2 plateaux de quartet différents, sont remplacées par deux adénines, ce qui empêche la formation du G-quadruplexe.

Un oligonucléotide complémentaire (RevPu22 : 3'-***ACCCCTTC***TGCTCTTCGCTA-5') est capable de s'hybrider partiellement aux amorces P22myc et Pu22mu par l'intermédiaire des 8 premiers nucléotides en 3'. Les couples d'amorces Pu22myc/RevPu22 et Pu22mu/RevPu22 peuvent être amplifiés par PCR, formant un fragment double brin de 34pb.

En présence de concentrations croissantes de ligands, le Pu22myc va former un G-quadruplexe qui empêche l'hybridation de l'oligonucléotide RevPu22, ce qui inhibe l'amplification PCR. Les activités relatives de stabilisation du quadruplexe de *c-myc* par différents ligands pourront être étudiées en comparant les CI50 des ligands évalués dans cet essai. Nous pouvons également déterminer un indice de sélectivité pour ces ligands en utilisant le rapport des CI50 de Pu22mu/Pu22myc, qui détermine l'activité de stabilisation du G-quadruplexe par rapport à l'inhibition non spécifique de l'hybridation ou de l'élongation par la *Taq* polymérase.

d. Publication 1 : Stabilisation of the *c-myc* gene promoter quadruplex by specific ligands' inhibitors of telomerase.

α. Résumé en français

Une structure G-quadruplexe parallèle a récemment été identifiée dans la région NHE III_1 du promoteur du gène *c-myc* et fonctionne comme un répresseur transcriptionnel. Différents ligands capables d'interagir avec le G-quadruplexe télomérique et de bloquer l'activité télomérase ont été évalués dans une nouvelle technique d'arrêt de la PCR sur le quadruplexe de *c-myc* (Pu22myc). Les résultats indiquent que la porphyrine cationique TMPyP4, décrite comme étant capable de stabiliser le quadruplexe de c-myc et d'induire une inhibition transcriptionnelle, inhibe efficacement la PCR mais avec une faible sélectivité

comparée avec un oligonucléotide (Pu22mu) présentant des mutations dans les répétitions de guanines et incapable de former un G-quadruplexe. D'autres ligands présentent des propriétés inhibitrices potentielles avec des CI50 inférieures au micromolaire. Le ligand 307A, un dérivé du 2,6-pyridine-dicarboxamide présente la meilleure sélectivité comparée à l'oligonucléotide Pu22mu (>90 fois). La comparaison avec le G-quadruplexe télomérique en utilisant le test TRAP-G4 et le test d'arrêt de PCR indique que les ligands 307A, télomestatine et TMPyP4 sont aussi puissants sur les séquences c-myc et télomériques, alors que d'autres ligands montrent des sélectivités différentes (de 2 à 6 fois) contre l'une de ces séquences. Ce travail montre à l'évidence que des ligands de G-quadruplexe décrits comme étant des inhibiteurs de la télomérase stabilisent le quadruplexe intramoléculaire du promoteur de c-myc et peuvent potentiellement êtres utilisés pour inhiber la transcription du gène c-myc dans des cellules tumorales.

β. Publication

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
ELSEVIER
Biochemical and Biophysical Research Communications 323 (2004) 802–808
BBRC
www.elsevier.com/locate/ybbrc

Stabilization of the *c-myc* gene promoter quadruplex by specific ligands' inhibitors of telomerase☆

Thibault Lemarteleur[a], Dennis Gomez[a], Rajaa Paterski[a], Eliane Mandine[b], Patrick Mailliet[b], Jean-François Riou[a,*]

[a] *Laboratoire d'Onco-Pharmacologie, JE 2428, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51096 Reims, France*
[b] *Aventis Pharma SA, Centre de Recherche de Paris, 94403, Vitry sur Seine, France*

Received 21 June 2004
Available online 11 September 2004

Abstract

A parallel G-quadruplex structure was recently identified in the NHE III_1 element of the *c-myc* gene promoter that functioned as a transcriptional repressor. Different series of telomeric G-quadruplex interacting ligands reported to block telomerase activity were evaluated in a new PCR stop assay on the *c-myc* quadruplex (Pu22myc). Results indicated that the cationic porphyrin TMPyP4 previously described to stabilize *c-myc* quadruplex and to cause transcription inhibition efficiently inhibited the assay but with a narrow selectivity when parallel experiments were performed with an oligonucleotide (Pu22mu) containing mutations in the guanine repeat which is unable to form a quadruplex. Other ligands presented potent inhibitory properties with IC_{50} in the submicromolar range. 307A, a new 2,6-pyridin-dicarboxamide derivative was found to present the highest selectivity as compared to Pu22mu oligonucleotide (>90-fold). Comparison with telomeric G-quadruplex using TRAP-G4 and PCR stop assays also indicated that ligands 307A, telomestatin, and TMPyP4 are equipotent against both *c-myc* and telomeric sequences while other ligands displayed some partial selectivity (2- to 6-fold) towards one of these sequences. This work provides evidence that G-quadruplex ligands reported as telomerase inhibitors efficiently stabilized *c-myc* promoter intramolecular quadruplex and may also potentially be used to inhibit *c-myc* gene transcription in tumor cells.
© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: G-quadruplex; c-myc; Telomerase inhibitor; PCR stop assay

Ligands that stabilize the telomeric G-rich single-strand DNA overhang into G-quadruplex can be considered as potential antitumor agents that block telomere replication [1–4]. Several classes of small molecules that bind to telomeric G-quadruplex DNA and inhibit telomerase activity have been described, such as porphyrins [5,6], perylenes [7], amidoanthracene-9,10-diones [8], 2,7-disubstituted amidofluorenones [9], acridines [10,11], ethidium derivatives [12,13], disubstituted triazines [14], fluoroquinoanthroxazines [15] indoloquinolines [16], dibenzophenanthrolines [17], and telomestatin [18,19] (for a review see [20,21]). Some of these derivatives have been shown to impair telomerase function in cancer cells, leading to the appearance of the so-called replicative senescence which is associated with both telomere length shortening and terminal growth arrest [14,22–24]. Further indirect evidence that G-quadruplex ligands targeted telomere replication arises from mutant cell lines resistant to these ligands that presented telomere capping alterations,

☆ *Abbreviations:* TRAP, telomere repeat amplification protocol; ITAS, internal telomerase assay standard; DMSO, dimethyl sulfoxide; NHE III_1, nuclease hypersensitive element III_1.

* Corresponding author. Fax: +33 326 91 37 30.
E-mail address: jf.riou@univ-reims.fr (J.-F. Riou).

0006-291X/$ - see front matter © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bbrc.2004.08.150

overexpression of hTERT, and telomere shortening cross-resistance for different classes of ligands [25,26].

Due to the peculiar features of the quadruplex structure, as compared to classical double-stranded B-DNA, a selective recognition of telomeric G-quadruplex by small molecule ligands should be possible [4,27,28]. Some partial selectivity was obtained with triazine [14] or ethidium derivatives [13] and was significantly enhanced with the natural product telomestatin [19,29,30] and a new series of 2,6-pyridin-dicarboxamide derivatives [31].

Although G-quadruplex structures have been extensively studied in the telomeric single-stranded overhang, G-quadruplexes were also found in the promoter or regulatory regions of important oncogenes such as *c-myc*, *c-myb*, *c-Fos*, and *c-ABL* [3,32,33] and in the intron of the hTERT gene itself [34]. Two other regions of the genome are G-rich and have considerable potential to form G-quadruplex DNA: rDNA and mammalian immunoglobulin heavy chain switch regions [3]. A recent study demonstrated that the quadruplex present in the NHE III_1 region of the *c-myc* promoter functioned as a transcriptional repressor element [35,36]. *C-myc* transcription can be inhibited by ligand-mediated G-quadruplex stabilization [35,36] and transfection of the oligonucleotide encompassing this quadruplex into a Burkitt's lymphoma cell line resulted in cell growth decrease [37].

The *c-myc* NHE III_1 element can form two different intramolecular G-quadruplex structures (basket and chair) but only one, initially identified as the chair form, seems to be biologically relevant to cause transcription inhibition, and is stabilized by the cationic porphyrin TMPyP4 [36]. This initial chair model was recently revised to a parallel structure presenting 3 adjacent lateral loops [38].

Due to the important function of c-MYC as an oncogene linked to cell proliferation and differentiation, and able to trigger the apoptotic response, the strategy to find new chemical entities able to selectively interfere with *c-myc* expression has emerged [3,36]. Therefore, *c-myc* quadruplex may represent, besides telomeric quadruplex, another attractive molecular target for selective ligands.

Since the cationic porphyrin TMPyP4 is able to stabilize both telomeric and *c-myc* G-quadruplexes, we have examined in the present study whether other G-quadruplex ligands previously reported to block telomerase activity (Fig. 1) also stabilized the *c-myc* quadruplex. By using a specific PCR stop assay, we have shown that all previously reported ligands presented potent inhibitory properties against the *c-myc* quadruplex, suggesting that they may also potentially be used to inhibit *c-myc* gene transcription in tumor cells. Differences of potency and selectivity between *c-myc* and telomeric sequences for these compounds are discussed.

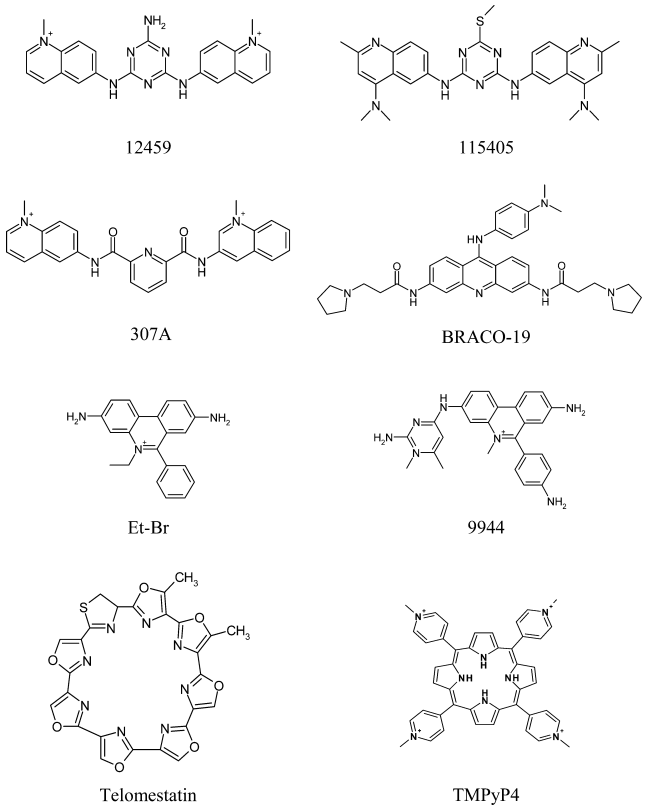


Fig. 1. Chemical structure of the different G-quadruplex ligands.

Materials and methods

Oligonucleotides and compounds. All oligonucleotides were synthesized and purified by Eurogentec, Seraing, Belgium. Triazine derivatives 12459 and 115405 were synthesized according to patent WO 0140218. Derivative 307A was described in [31] and detailed chemical synthesis will be presented elsewhere. Telomestatin was purified according to [18]. BRACO-19 and 9944 were synthesized according to [22]. Other compounds were commercially available (Sigma). Solutions of compounds were prepared in 10 mM DMSO, except telomestatin, which was prepared at 5 mM in MeOH/DMSO (50:50). Further dilutions were made in water.

PCR stop assay. The stabilization of G-quadruplex structures by specific ligands was investigated by a PCR-stop assay using a test oligonucleotide and a complementary oligonucleotide that partially hybridize to the last G-repeat of the test oligonucleotide. Sequences of the test oligonucleotides (Pu22myc and Pu22mu) and the corresponding complementary sequence (RevPu22) used here are presented in Fig. 2.

Assay reaction were performed in a final volume of 25 μl, in a 10 mM Tris, pH 8.3, buffer with 50 mM KCl, 1.5 mM $Mg(OAc)_2$, 7.5 pmol of each oligonucleotide, 1.5 U *Taq* polymerase and the indicated amount of the ligand. Reaction mixtures were incubated in a thermocycler with the following cycling conditions: 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. Amplified products were resolved on a 12% non-denaturing polyacrylamide gels in 1× TBE and stained with SYBR Green I (Roche). Fluorescence was scanned with a phosphorimager (Typhoon 9210, Amersham). Results represent means ± SD of 3 independent experiments, except as indicated.

For 21G, PCR stop assay was performed in the presence of 21G (5′-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3′) and Rev21G (5′-TCTC

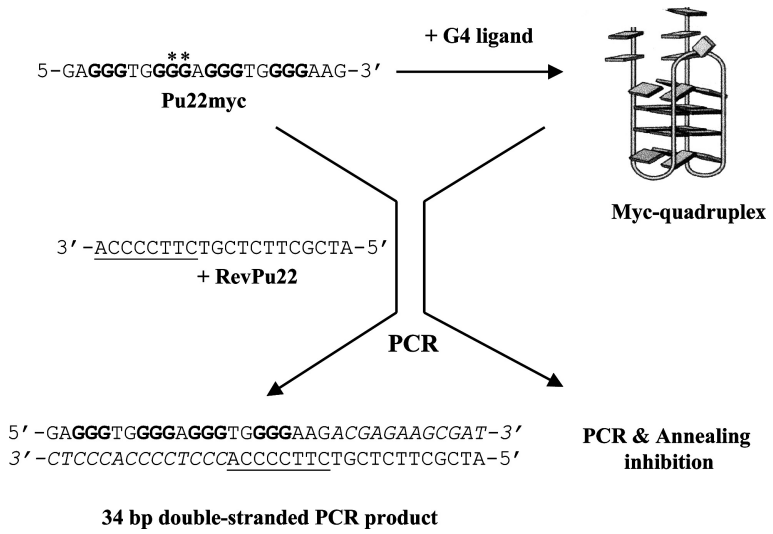


Fig. 2. Principle of the Pu22myc PCR stop assay. Test oligomer (Pu22myc or Pu22mu) was amplified with a complementary oligomer (RevPu22) overlapping the last G-repeat. *Taq* polymerase extension resulted in the formation of a final 34 base pair double-stranded PCR product. In the presence of a ligand that stabilizes Pu22myc into a G-quadruplex structure, annealing of oligomer and therefore *Taq* polymerase extension is inhibited. Underlined sequence corresponds to overlap between the 2 oligomers. Asterisks in Pu22myc corresponded to the mutations that replace guanine by adenine in Pu22mu.

GTCTTCCCTAA-3′) oligonucleotides in identical conditions but with 25 mM KCl and 25 mM LiCl instead of NaCl.

Inhibition of telomerase. TRAP-G4 was performed as previously described [39]. PCR was performed in a final 50 μl reaction volume composed of a 45 μl reaction mix containing 20 mM Tris–HCl (pH 8.0), 50 μM dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, 63 mM KCl, 1 mM EGTA, 0.005% Tween 20, 20 μg/ml bovine serum albumin, 3.5 pmol primer TSG4 (5′-GGGATTGGGATTGGGATTGGGTT-3′), 18 pmol primer TS (5′-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3′), 22.5 pmol primer CXext (5′-GTGCCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3′), 7.5 pmol primer NT (5′-ATCGCTTCTCGGCCTTTT-3′), 0.01 attomol TSNT internal control (5′-ATTCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCG AGAAGCGAT-3′), 2.5 U *Taq* DNA polymerase, and 100 ng telomerase extract from A549 cells. Compounds or distilled water was added under a volume of 5 μl. Reaction mixtures were incubated in a thermocycler with the following cycling conditions: 15 min at 30 °C, 1 min at 90 °C, followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. Amplified products were resolved on a 12% non-denaturing polyacrylamide gels in 1× TBE and stained with SYBR Green I (Roche). Fluorescence was scanned with a phosphorimager (Typhoon 9210, Amersham). Results represents means ± SD of 3 independent experiments, except as indicated.

Results and discussion

The oligonucleotide Pu22myc corresponded to the NHE III_1 sequence that is able to form the biologically relevant chair G-quadruplex but not the basket one, according to [36]. The induction of Pu22myc G-quadruplex by specific ligands was investigated using a PCR-stop assay. In the presence of the ligand, the Pu22myc oligomer was stabilized into a G-quadruplex structure that blocked hybridization with a complementary strand overlapping the last G repeat (Fig. 2). In that case, 5′ to 3′ extension with *Taq* polymerase was inhibited and the final double-stranded DNA PCR product was not detected. Oligomer Pu22myc was incubated in the presence of the complementary strand oligomer for 30 PCR cycles with increasing concentrations of the different G-quadruplex ligands previously reported to inhibit telomerase activity and with the newly synthesized 2,6-pyridin-dicarboxamide derivative 307A [31] (see chemical structures in Fig. 1). As an example, a typical PCR experiment with 307A is presented in Fig. 3A. The final double-stranded DNA product was inhibited in a dose-dependent manner by 307A. The IC_{50} value which indicates the concentration of 307A required to achieve 50% inhibition of the reaction was found to be 0.33 μM (Table 1).

To further demonstrate that inhibition induced by 307A was due to G-quadruplex stabilization of the Pu22myc oligomer, a parallel experiment with an oligomer that contains two mutations in one of the guanine repeats (Pu22mu, 5′-GAGGGTGAAGAGGGTGGG GAAG-3′) was performed. In that case, no inhibition was observed at the highest concentration evaluated, corresponding to 30 μM (Fig. 3B). Results from triplicate determinations were presented in Table 1 and indicated that all derivatives, except Et-Br, presented potent inhibitory properties of the Pu22myc PCR stop assay. The derivatives 307A and 12459 were found to be the most active compounds in the assay with IC_{50} around 0.35 μM, suggesting that these compounds are the best stabilizers of the *myc* quadruplex.

The non-specific PCR inhibition by using the Pu22mu oligomer also indicated important variations between these compounds (Table 1). The triazine derivative 115405, the porphyrin derivative TMPyP4, and

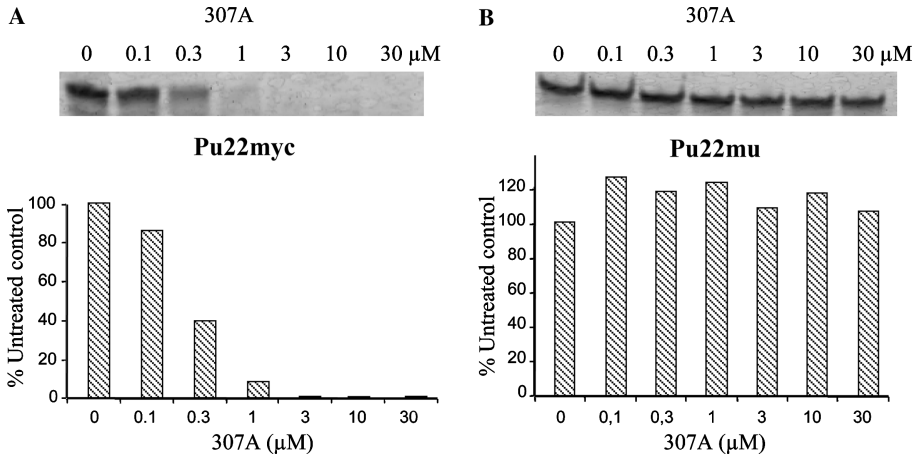


Fig. 3. Effect of 307A on the formation of the PCR-stop assay with G-quadruplex forming Pu22myc oligomer (A) or with control mutated Pu22mu oligomer (B). Increasing concentrations of 307A (0.1–30 μM) were added to G-quadruplex forming Pu22myc oligomer or to mutated Pu22mu oligomers, as indicated, according to Materials and methods. Top panel presented the 34 bp double-stranded PCR product and lower panel presented the quantification of the fluorescence determined by using a Typhoon Phosphorimager.

Table 1
Effects of the different ligands on the Myc and telomeric quadruplexes measured by the PCR-stop assay and the TRAP-G4 assay

Compound	IC_{50} (μM)		Myc selectivity[c]	IC_{50} (μM)		TRAP selectivity[d]	IC_{50} (μM)	Telomeric/myc selectivity[f]
	Pu22myc[a]	Pu22mu[a]		TRAP-G4[a]	ITAS[a]		21G[a]	
115405	0.65 ± 0.15	1.5 ± 0.5	2.4	0.16 ± 0.01	0.47 ± 0.09	2.9	0.12 ± 0.05	0.18
9944	0.57 ± 0.2	9.33 ± 0.9	16.3	0.14 ± 0.04	3.2 ± 1.2	22.5	0.22 ± 0.02	0.38
TMPyP4	0.45 ± 0.1	1.9 ± 0.08	4.2	0.67 ± 0.1	1.23 ± 0.5	1.8	0.34 ± 0.04	0.75
307A	0.33 ± 0.1[e]	>30	>90	0.30 ± 0.04	45 ± 4	150	0.33 ± 0.02	1.0
Telomestatin	0.70 ± 0.3	3.67 ± 1.5	5.2	0.65 ± 0.35	40[b]	61	0.76 ± 0.16	1.08
12459	0.35 ± 0.14	14.0 ± 3.1	40	0.73 ± 0.17	12 ± 4	16.4	0.65 ± 0.18	1.85
BRACO-19	0.87 ± 0.4	20.0 ± 0.1	22.9	0.88 ± 0.4[e]	6[b]	6.8	4.42 ± 0.98[e]	5.08
Et-Br	>30	>30	NA	10[b]	15[b]	1.5	ND	NA

[a] Mean ± SD of triplicates.
[b] Mean of duplicates.
[c] Myc selectivity index corresponded to the ratio IC_{50} Pu22mu/IC_{50} Pu22myc.
[d] TRAP selectivity index corresponded to the ratio IC_{50} ITAS/IC_{50} TRAP-G4.
[e] Mean ± SD of quadruplicates.
[f] Corresponded to the ratio IC_{50} 21G/IC_{50} pu22myc.

telomestatin presented IC_{50}'s for the Pu22mu PCR with values in a narrow range to those for Pu22myc PCR (selectivity indexes ranging from 2.4 to 5.2). The ethidium derivative 9944 and the acridine derivative BRACO-19 displayed higher selectivities equal to 16.3 and 22.9, respectively. For 12459, selectivity index was increased to a value of 40 and the 2,6-pyridin-dicarboxamide derivative 307A presented the highest selectivity index (>90), since no inhibition of the Pu22mu PCR was observed at 30 μM (Table 1 and Fig. 3B).

Since the compounds studied here were previously reported as telomerase inhibitors, we wanted to determine whether there existed significant differences between their ability to stabilize telomeric G-quadruplex and their ability to stabilize the *myc* quadruplex.

These compounds were therefore analyzed for their ability to inhibit telomerase activity by using the TRAP-G4 assay [39]. The inclusion in the assay of the TSG4 oligomer, together with the internal ITAS, allows discriminating between G4-based telomerase inhibition of the enzyme and non-specific inhibition of *Taq* polymerase. A typical experiment for such assay is presented for derivative 307A (Fig. 4). G-quadruplex-related inhibitory properties (IC_{50}TRAP-G4) could be quantified by integrating the fluorescent signal from TSG4 PCR product, while *Taq* polymerase inhibitory properties (IC_{50}*Taq*) were obtained by integrating ITAS PCR product. For 307A, IC_{50}TRAP-G4 was equal to 0.3 μM, a concentration far below that necessary to block *Taq* polymerase (IC_{50}*Taq* = 45 μM) (Table 1).

Detailed results obtained for the compounds are summarized in Table 1. Except Et-Br, that presented poor TRAP-G4 inhibitory properties (IC_{50}*Taq* = 10 μM), all compounds were found to be active at the sub-micromolar range. Interestingly, results indicated equipotent activities in TRAP-G4 and Pu22myc PCR stop assays

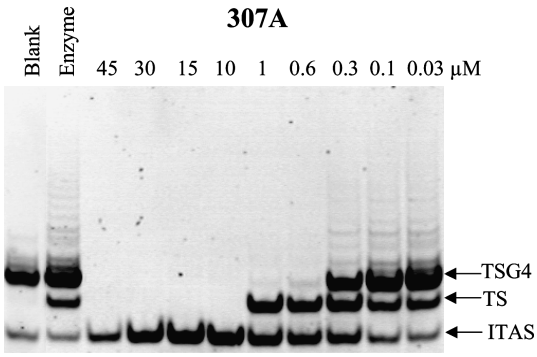


Fig. 4. Inhibition of telomerase activity by derivative 307A in the TRAP-G4 assay. 307A, at the indicated concentrations, was added to 100 ng telomerase extract in the conditions of the TRAP-G4 assay (see Materials and methods). "Enzyme," telomerase extract without compound. "Blank," TRAP-G4 assay without telomerase extract. Arrows indicate the positions of TSG4 and ITAS PCR products. 307A inhibits telomere ladder and TSG4 band formation at lower concentrations than ITAS formation. IC_{50}'s for TSG4 and ITAS bands were calculated after scanning of the SYBR green I fluorescence in a Typhoon Phosphorimager and are reported in Table 1.

for BRACO-19, 307A and telomestatin. However, TMPyP4 and 12459 were found to be about twofold more potent to inhibit Pu22myc assay than to block telomerase activity and conversely 9944 and 115405 were fourfold more potent to inhibit TRAP-G4 than Pu22-myc assays.

In order to determine whether these differences might be attributed to the nature of these assays or to the sequences of these quadruplexes, we have developed a PCR-stop assay with the minimal telomeric sequence able to form an intramolecular G-quadruplex (21G) and assayed the series of compounds. Detailed results are presented in Table 1 and indicated concordant findings between TRAP-G4 and 21G PCR stop assays for 307A, telomestatin, 12459, 115405, and 9944. Significant differences were found for TMPyP4 that was more active in the PCR stop assay and for BRACO19 that was found more active in the TRAP-G4 assay. Hence, 21G PCR stop assay showed that 115405 is about fivefold more potent to inhibit telomeric sequence and that BRACO-19 presented a fivefold preference for the *c-myc* sequence. In the TRAP-G4 assay, the TSG4 oligonucleotide used as a primer for telomerase corresponded to a modified telomeric repeat in which GGGTTA was replaced by GGGATT. The introduction of this sequence modification was necessary to impair potential annealing with CXext primer [39]. Interestingly, our results indicated that a modification in the sequence forming the lateral loops of the telomeric quadruplex may introduce considerable variations in the pharmacological activity of some of these ligands. In agreement, PCR-stop assay experiments using different hTERT intron 6 sequences able to form G-quadruplexes displayed important variations for inhibition with 12459, telomestatin or BRACO-19 [34].

Comparative analysis of the selectivity indexes between the two assays revealed a rather good correlation, within a twofold variation range, for all derivatives except telomestatin. Telomestatin was significantly less potent (about 11-fold) to inhibit PCR amplification of the ITAS in the TRAP-G4 assay than to inhibit PCR amplification of the Pu22mu in the PCR stop assay. Such a difference might be due to the nature of the oligomers used in these assays. Pu22mu or ITAS inhibition represented either non-specific *Taq* polymerase extension inhibition or oligonucleotide hybridization inhibition. It is interesting to remark that the overlap between the Pu22mu and the RevPu22 oligomers corresponded to the short dsTGGGGAAG motif that contained a track of guanines. Similar narrow selectivity was also observed for telomestatin but not for 12459 when two complementary oligomers containing the short dsTGGG or dsTTAGGG overlapping motif were used in the PCR assay (result not shown). Telomestatin was also reported to stack with the terminal plateau of guanines to stabilize the telomeric parallel G-quadruplex [4,10,27] and to present a high selectivity for quadruplex toward double-stranded DNA, as determined by mass spectrometry [30] or by fluorescence experiments.[1] This suggested that non specific inhibition of the PCR stop assay might result from an interaction of telomestatin with guanines in single-stranded DNA that impaired hybridization of the overlapping oligomers.

In contrast to telomestatin, the new 2,6-pyridindicarboxamide derivative 307A was found to present the highest selectivity in both Pu22myc and TRAP-G4 assays. This derivative is structurally related to the triazine derivative 12459 that also displayed noticeable selectivity index in these assays. The ethidium derivative 9944 also achieved significant selectivity, in agreement with previous determinations performed by dialysis competition and mass spectroscopy experiments on different DNA structures [13]. At the opposite, TMPyP4 is a potent ligand to stabilize both telomeric and *myc* quadruplexes but with a poor selectivity regarding its non specific inhibition of Pu22mu and ITAS.

The PCR stop assay experiments reported here allowed one to classify G-quadruplex ligands in three different categories: (i) telomeric and *c-myc* equipotent ligands which include 307A, telomestatin, and TMPyP4, (ii) ligands with a preference for telomeric quadruplex such as 115405 and 9944, and (iii) ligands with a preference for *c-myc* quadruplex such as BRACO-19 and 12459. Some variation was observed for BRACO-19 using the TRAP-G4 assay, in which equipotent activity was found as compared to the *c-myc* sequence.

[1] D. Gomez, R. Paterski, T. Lemarteleur, K. Shin-ya, J.L. Mergny, and J.F. Riou, Interaction of telomestatin with the single-strand telomeric overhang, J. Biol. Chem (2004), in press.

These results indicated that G-quadruplex based telomerase inhibitors might present a more complex profile of biological activity than initially expected. TMPyP4 was also shown to destabilize intermolecular quadruplex from the 5′ untranslated region of the FMR1 gene [40] and 12459 to stabilize quadruplexes from a splicing regulatory element in hTERT intron 6 [34]. Although it could be speculated that the mode of interaction of the ligand with the quadruplex or the nature of the quadruplex might be critical for their biological properties, these differences remain to be clearly demonstrated. We think that the obtention of highly selective ligands that discriminate intermolecular quadruplexes from other DNA structures is a critical step to achieve the therapeutic index required for their further development in clinic. Such compromise between activity and selectivity was obtained for the 2,6-pyridin-dicarboxamide derivative 307A.

Finally, our results indicated that G-quadruplex ligands selected or designed against telomeric G-quadruplex might also potentially be used to concomitantly inhibit *c-myc* gene transcription in tumor cells.

Acknowledgments

We thank E. De Lomos and T. Caufield for the synthesis of 2,6-pyridin-carboxamide derivatives, J.L. Mergny, F. Boussin, and all members of the Action Concertée Incitative "Molécules et Cibles Thérapeutiques" for helpful discussions. This work was supported by an Action Concertée Incitative, "Molécules et Cibles Thérapeutiques" grant from the French Ministry of Research, and by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC #4691). T.L. is supported by doctoral fellowship grants from l' Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC) and l'Association Régionale pour l'Enseignement et la Recherche Scientifique et technologique (ARERS).

References

[1] P.J. Perry, J.R. Arnold, T.C. Jenkins, Telomerase inhibitors for the treatment of cancer: the current perspective, Expert. Opin. Invest. Drugs 10 (2001) 2141–2156.

[2] P. Alberti, L. Lacroix, L. Guittat, C. Helene, J.L. Mergny, Nucleic acids as targets for antitelomerase agents, Mini. Rev. Med. Chem. 3 (2003) 23–36.

[3] E.M. Rezler, D.J. Bearss, L.H. Hurley, Telomere inhibition and telomere disruption as processes for drug targeting, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 43 (2003) 359–379.

[4] S. Neidle, G. Parkinson, Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery, Nat. Rev. Drug. Discov. 1 (2002) 383–393.

[5] H. Han, D.R. Langley, A. Rangan, L.H. Hurley, Selective interactions of cationic porphyrins with G-quadruplex structures, J. Am. Chem. Soc. 123 (2001) 8902–8913.

[6] H. Han, C.L. Cliff, L.H. Hurley, Accelerated assembly of G-quadruplex structures by a small molecule, Biochemistry 38 (1999) 6981–6986.

[7] O.Y. Fedoroff, M. Salazar, H. Han, V.V. Chemeris, S.M. Kerwin, L.H. Hurley, NMR-based model of a telomerase-inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA, Biochemistry 37 (1998) 12367–12374.

[8] P.J. Perry, S.M. Gowan, A.P. Reszka, P. Polucci, T.C. Jenkins, L.R. Kelland, S. Neidle, 1,4- and 2,6-disubstituted amidoanthracene-9,10-dione derivatives as inhibitors of human telomerase, J. Med. Chem. 41 (1998) 3253–3260.

[9] P.J. Perry, M.A. Read, R.T. Davies, S.M. Gowan, A.P. Reszka, A.A. Wood, L.R. Kelland, S. Neidle, 2,7-Disubstituted amidofluorenone derivatives as inhibitors of human telomerase, J. Med. Chem. 42 (1999) 2679–2684.

[10] R.J. Harrison, J. Cuesta, G. Chessari, M.A. Read, S.K. Basra, A.P. Reszka, J. Morrell, S.M. Gowan, C.M. Incles, F.A. Tanious, W.D. Wilson, L.R. Kelland, S. Neidle, Trisubstituted acridine derivatives as potent and selective telomerase inhibitors, J. Med. Chem. 46 (2003) 4463–4476.

[11] M.A. Read, A.A. Wood, J.R. Harrison, S.M. Gowan, L.R. Kelland, H.S. Dosanjh, S. Neidle, Molecular modeling studies on G-quadruplex complexes of telomerase inhibitors: structure-activity relationships, J. Med. Chem. 42 (1999) 4538–4546.

[12] F. Koeppel, J.F. Riou, A. Laoui, P. Mailliet, P.B. Arimondo, D. Labit, O. Petitgenet, C. Helene, J.L. Mergny, Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes, Nucleic Acids Res. 29 (2001) 1087–1096.

[13] F. Rosu, E. De Pauw, L. Guittat, P. Alberti, L. Lacroix, P. Mailliet, J.F. Riou, J.L. Mergny, Selective interaction of ethidium derivatives with quadruplexes: an equilibrium dialysis and electrospray ionization mass spectrometry analysis, Biochemistry 42 (2003) 10361–10371.

[14] J.F. Riou, L. Guittat, P. Mailliet, A. Laoui, E. Renou, O. Petitgenet, F. Megnin-Chanet, C. Helene, J.L. Mergny, Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 2672–2677.

[15] M.Y. Kim, W. Duan, M. Gleason-Guzman, L.H. Hurley, Design, synthesis, and biological evaluation of a series of fluoroquinoanthroxazines with contrasting dual mechanisms of action against topoisomerase II and G-quadruplexes, J. Med. Chem. 46 (2003) 571–583.

[16] V. Caprio, B. Guyen, Y. Opoku-Boahen, J. Mann, S.M. Gowan, L.M. Kelland, M.A. Read, S. Neidle, A novel inhibitor of human telomerase derived from 10H-indolo[3,2- b]quinoline, Bioorg. Med. Chem. Lett. 10 (2000) 2063–2066.

[17] J.L. Mergny, L. Lacroix, M.P. Teulade-Fichou, C. Hounsou, L. Guittat, M. Hoarau, P.B. Arimondo, J.P. Vigneron, J.M. Lehn, J.F. Riou, T. Garestier, C. Helene, Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001) 3062–3067.

[18] K. Shin-Ya, H.R. Park, K. Wierzba, K.I. Matsuo, T. Ohtani, R. Ito, Y. Hayakawa, H. Seto, Telomestatin, a novel telomerase inhibitor of microbial origin, Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 1250 (2002).

[19] M.Y. Kim, H. Vankayalapati, K. Shin-Ya, K. Wierzba, L.H. Hurley, Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 2098–2099.

[20] S.M. Kerwin, G-Quadruplex DNA as a target for drug design, Curr. Pharm. Des. 6 (2000) 441–478.

[21] J. Cuesta, M.A. Read, S. Neidle, The design of G-quadruplex ligands as telomerase inhibitors, Mini. Rev. Med. Chem. 3 (2003) 11–21.

[22] S.M. Gowan, J.R. Harrison, L. Patterson, M. Valenti, M.A. Read, S. Neidle, L.R. Kelland, A G-quadruplex-interactive potent

small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity, Mol. Pharmacol. 61 (2002) 1154–1162.

[23] M.A. Shammas, R.J. Shmookler Reis, M. Akiyama, H. Koley, D. Chauhan, T. Hideshima, R.K. Goyal, L.H. Hurley, K.C. Anderson, N.C. Munshi, Telomerase inhibition and cell growth arrest by G-quadruplex interactive agent in multiple myeloma, Mol. Cancer Ther. 2 (2003) 825–833.

[24] T. Tauchi, K. Shin-Ya, G. Sashida, M. Sumi, A. Nakajima, T. Shimamoto, J.H. Ohyashiki, K. Ohyashiki, Activity of a novel G-quadruplex-interactive telomerase inhibitor, telomestatin (SOT-095), against human leukemia cells: involvement of ATM-dependent DNA damage response pathways, Oncogene 22 (2003) 5338–5347.

[25] D. Gomez, N. Aouali, A. Renaud, C. Douarre, K. Shin-Ya, J. Tazi, S. Martinez, C. Trentesaux, H. Morjani, J.F. Riou, Resistance to senescence induction and telomere shortening by a G-quadruplex ligand inhibitor of telomerase, Cancer Res. 63 (2003) 6149–6153.

[26] D. Gomez, N. Aouali, A. Londono-Vallejo, L. Lacroix, F. Megnin-Chanet, T. Lemarteleur, C. Douarre, K. Shin-ya, P. Mailliet, C. Trentesaux, H. Morjani, J.-L. Mergny, J.-F. Riou, Resistance to the short term antiproliferative activity of the G-quadruplex ligand 12459 is associated with telomerase overexpression and telomere capping alteration, J. Biol. Chem. 278 (2003) 50554–50562.

[27] G.R. Clark, P.D. Pytel, C.J. Squire, S. Neidle, Structure of the first parallel DNA quadruplex-drug complex, J. Am. Chem. Soc. 125 (2003) 4066–4067.

[28] G.N. Parkinson, M.P. Lee, S. Neidle, Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA, Nature 417 (2002) 876–880.

[29] M.Y. Kim, M. Gleason-Guzman, E. Izbicka, D. Nishioka, L.H. Hurley, The different biological effects of telomestatin and TMPyP4 can be attributed to their selectivity for interaction with intramolecular or intermolecular G-quadruplex structures, Cancer Res. 63 (2003) 3247–3256.

[30] F. Rosu, V. Gabelica, K. Shin-ya, E. De Pauw, Telomestatin-induced stabilization of the human telomeric DNA quadruplex monitored by electrospray mass spectrometry, Chem. Commun. (Camb) (2003) 2702–2703.

[31] P. Mailliet, E. De Lomos, T. Caulfield, E. Mandine, O. Petitgenet, E. Renou, C. Belmokhtar, J.L. Mergny, L. Guittat, D. Gomez, J.F. Riou, Identification of a new series of 2,6-pyridin-dicarboxamide derivatives as highly selective G-quadruplex ligands and potent inhibitors of telomerase., 94th AACR Meeting. LB28. July 11–14, Washington DC, USA, 2003.

[32] T. Simonsson, G-quadruplex DNA structures—variations on a theme, Biol. Chem. 382 (2001) 621–628.

[33] T. Simonsson, P. Pecinka, M. Kubista, DNA tetraplex formation in the control region of c-myc, Nucleic Acids Res. 26 (1998) 1167–1172.

[34] D. Gomez, T. Lemarteleur, L. Lacroix, P. Mailliet, J.L. Mergny, J.F. Riou, Telomerase downregulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing, Nucleic Acids Res. 32 (2004) 371–379.

[35] C.L. Grand, H. Han, R.M. Munoz, S. Weitman, D.D. Von Hoff, L.H. Hurley, D.J. Bearss, The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo, Mol. Cancer Ther. 1 (2002) 565–573.

[36] A. Siddiqui-Jain, C.L. Grand, D.J. Bearss, L.H. Hurley, Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 11593–11598.

[37] T. Simonsson, M. Henriksson, c-myc suppression in Burkitt's lymphoma cells, Biochem. Biophys. Res. Commun. 290 (2002) 11–15.

[38] C.L. Grand, T.J. Powell, R.B. Nagle, D.J. Bearss, D. Tye, M. Gleason-Guzman, L.H. Hurley, Mutations in the G-quadruplex silencer element and their relationship to c-MYC overexpression, NM23 repression, and therapeutic rescue, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 (2004) 6140–6145.

[39] D. Gomez, J.L. Mergny, J.F. Riou, Detection of telomerase inhibitors based on G-quadruplex ligands by a modified telomeric repeat amplification protocol assay, Cancer Res. 62 (2002) 3365–3368.

[40] P. Weisman-Shomer, E. Cohen, I. Hershco, S. Khateb, O. Wolfovitz-Barchad, L. Hurley, M. Fry, The cationic porphyrin TMPyP4 destabilizes the tetraplex form of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)n, Nucleic Acids Res. 31 (2003) 3963–3970.

χ. *Résultats complémentaires*

Les conditions de PCR utilisées avec les oligonucléotides Pu22myc et Pu22mu (tampon 50mM KCl ; 10mM tris pH 8,3 ; 1,5mM $Mg(OAc)_2$) ne nous ont pas permis d'effectuer cet essai avec les oligonucléotides 21G/anti21G et 21Gmu3/anti21G (*Figure 50*).

21G 5'-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-3'
3'-AAT-CCC-TTC-TGC-TCT-5' anti21G

21Gmu3 5'-GG**C**-TTA-**C**GG-TTA-G**C**G-TTA-GGG-3'
3'-AAT-CCC-TTC-TGC-TCT-5' anti21G

Figure 50. Séquences et hybridation des oligonucléotides 21G et 21Gmu3 avec l'amorce anti21G. Les nucléotides en « gras » du 21Gmu3 correspondent aux 3 mutations.

En effet, la *Figure 51* montre que les couples 21G/anti21G et 21Gmu3/anti21G vont présenter plusieurs bandes significatives de tailles différentes.

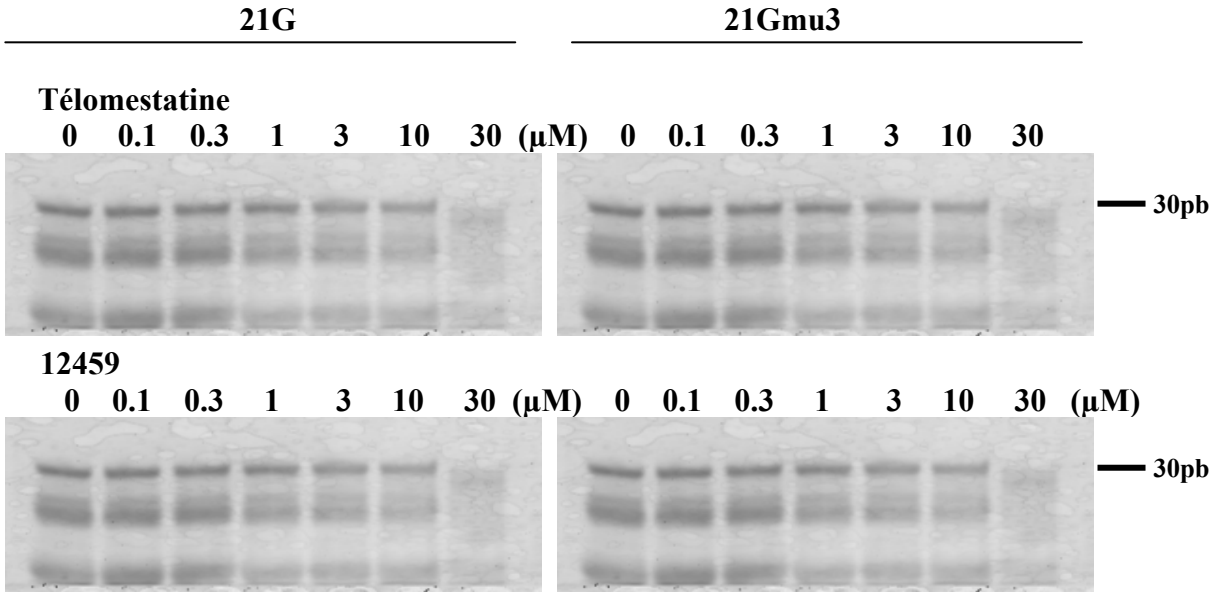


Figure 51. PCR stop assay des couples d'oligonucléotides 21G/anti21G et 21Gmu3/anti21G en présence des ligands télomestatine et 12459 dans le tampon Taq polymérase (50mM KCl).

Ces bandes supplémentaires correspondent à des amplifications non spécifiques pour lesquelles, des hybridations sur des séquences répétitives internes donnent des formes plus courtes. Nous avons supposé qu'elles sont dues à la nature du tampon utilisé au moment de l'amplification PCR. Il est intéressant de noter que l'hybridation entre les amorces 21G et Anti21G ou 21Gmu3 et Anti21G fait intervenir 6 nucléotides au lieu de 8 pour les oligonucléotides Pu22myc et antiPu22. Il est donc possible que le nombre de nucléotides ainsi

que leur nature (le % de GC étant différent) intervenant dans l'hybridation partielle des 2 amorces puissent modifier la température d'hybridation et donc l'amplification PCR. De plus, ces différentes formes ne sont pas dépendantes de la formation d'un G-quadruplexe intramoléculaire car en présence de télomestatine ou de 12459, les oligonucléotides 21Gmu3/anti21G et 21G/anti21G montrent une inhibition de l'amplification PCR pour la même concentration de ligands (30µM).

Ces données indiquent que nos conditions expérimentales ne sont pas favorables pour ces couples d'amorces. Nous avons donc testé d'autres conditions ioniques compatibles avec la formation de G-quadruplexes. 3 tampons différents ont été testés (tampons NaCl, LiCl et LiCl/KCl) en présence d'un gradient de températures d'hybridation allant de 50 à 65°C (*Figure 52*).

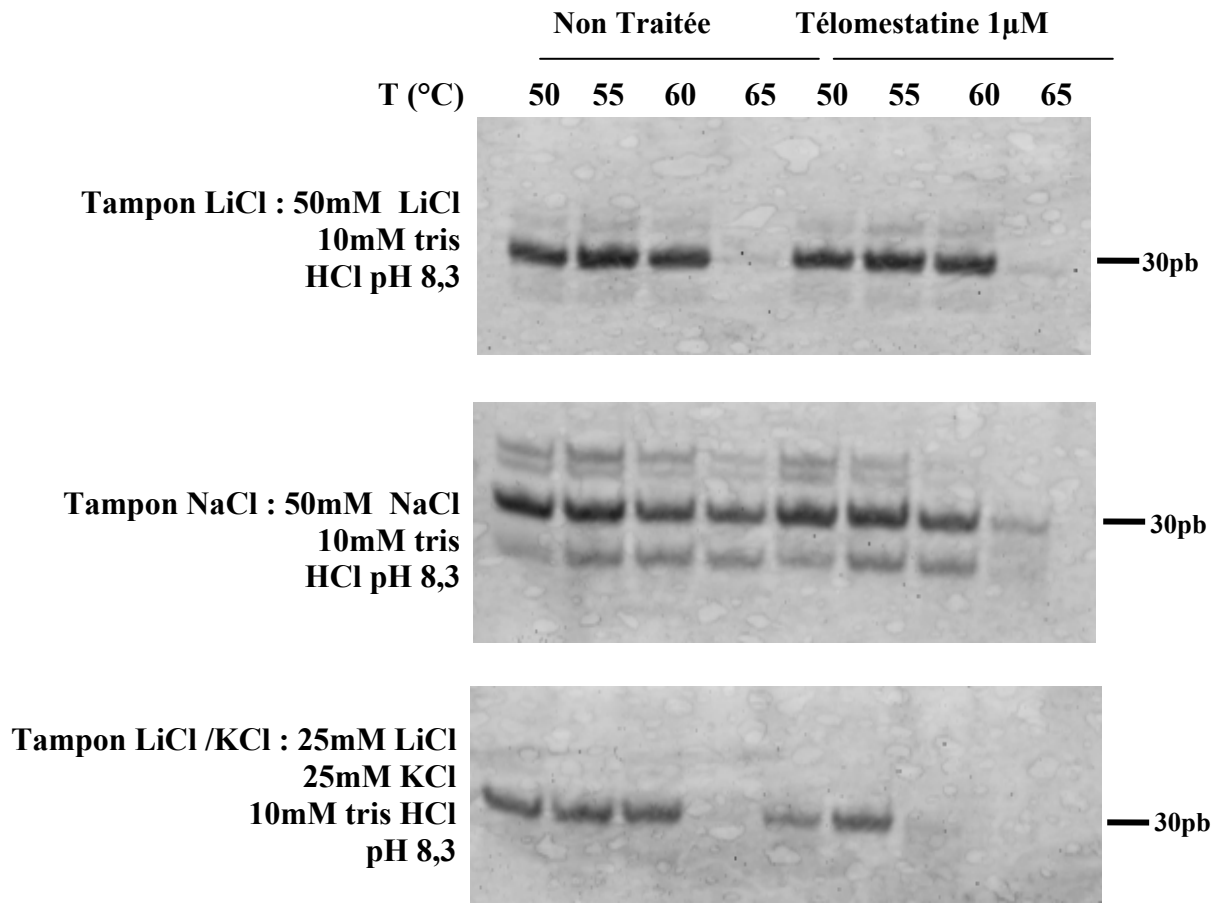


Figure 52. PCR stop assay du couple d'oligonucléotide 21G/anti21G, en présence ou non de 1µM de télomestatine, avec un gradient de température d'hybridation et en présence de 3 tampons différents.

En présence du « Tampon LiCl », nous observons une bande prédominante caractéristique de l'amplification du couple 21G/anti21G ainsi que deux bandes supplémentaires de faible intensité. A 65°C, nous observons une inhibition de l'amplification de la PCR résultant d'un arrêt de l'hybridation des oligonucléotides à cette température. De plus, dans ces conditions de tampon, nous n'observons pas d'inhibition de l'amplification PCR pour la télomestatine (1µM), à des températures d'hybridation inférieures ou égales à 60°C. Ceci suggère que le « Tampon LiCl » n'est pas utilisable dans cet essai.

En utilisant le « Tampon NaCl », aucune inhibition d'amplification PCR n'est observée en présence de 1µM de télomestatine jusqu'à 60°C. Par contre à 65°C, elle est inhibée par la télomestatine alors qu'elle ne l'est pas en absence de ligand. Cependant le profil électrophorétique montre une bande prédominante de 30pb ainsi que 3 autres de tailles variables suggérant que ce tampon ne convient pas non plus pour notre test.

Enfin, avec le « Tampon LiCl/KCl », nous observons une seule bande caractéristique de l'amplification du couple 21G/anti21G jusqu'à 60°C. Cette amplification est inhibée à 65°C. En présence de 1µM de télomestatine, nous observons une inhibition de l'amplification PCR à 60°C. Ces conditions de « Tampon LiCl » et de température nous permettent donc l'utilisation du test PCR pour la séquence télomérique.

Avant de réaliser d'autres expériences, la température d'hybridation a davantage été optimisée en utilisant un gradient de températures dans lequel les écarts sont plus réduits (de 56°C à 62°C avec une variation de 2°C) (*Figure 53*).

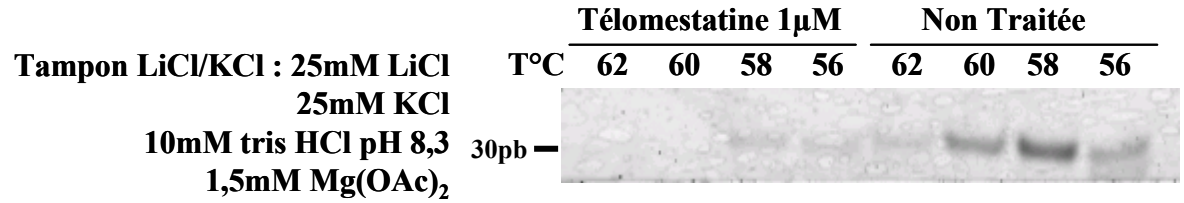


Figure 53. PCR stop assay du couple d'oligonucléotides 21G/anti21G, en présence ou non de 1µM de télomestatine, avec un gradient de températures d'hybridation de 56 à 62°C.

En absence de ligand, la meilleure amplification PCR est observée à 58°C. A cette même température et en présence de 1µM de télomestatine, l'inhibition de l'amplification PCR est presque totale. Cette température d'hybridation est donc la mieux adaptée au test « PCR stop assay » pour l'oligonucléotide 21G.

Afin de déterminer la sélectivité des ligands G4 dans le test PCR avec la séquence télomérique, nous avons utilisé deux autres oligonucléotides, l'un est muté au niveau de 3 guanines qui sont remplacées par 3 cytosines (21Gmu3 : 5'-GG**C**-TTA-**C**GG-TTA-G**C**G-

TTA-GGG-3'), l'autre présente une séquence modifiée (21GmuTS : 5'-ACT-CGT-CGA-GCA-GAG-*TTA-GGG*-3'). Ce dernier est caractérisé par la fusion d'une séquence non télomérique issue de TS (contrôle interne du test TRAP-G4 (ITAS)) et d'un motif TTAGGG.

Les résultats des essais de sélectivité obtenus pour ces deux couples d'oligonucléotides donnent des valeurs similaires pour le 307A, la télomestatine et le Braco19 (*Tableau 10*). Cependant, si nous comparons ces valeurs avec celles obtenues pour les tests Pu22myc et TRAPG4, nous observons d'importantes variations pour les différents ligands (*Tableau 11*). Par exemple, pour le ligand 307A, la sélectivité avec les oligonucléotides 21Gmu3 et 21GmuTS est de l'ordre de 17 à 18, alors qu'avec le Pu22myc, elle est supérieure à 90. De même, en présence de télomestatine, la sélectivité du test PCR varie de 5,2 à 8,2 alors qu'en test TRAPG4, elle est de 61.

	21Gmu3/anti21G		*21GmuTS/anti21G*	
Ligands	**CI50**	**Sélectivité/21G**	**CI50**	**Sélectivité/21G**
12459	**7,25 ± 0,75**	**11,2**	_	_
307A	**5,75 ± 0,25**	**17,4**	**6,0 ± 0,8**	**18,2**
télomestatine	**4,68 ± 0,22**	**6,2**	**6,25 ± 0,25**	**8,2**
BRACO 19	**7***	**1,6**	**7,5 ± 0,5**	**1,7**

Tableau 10. Effet de différents ligands sur les couples 21Gmu3/anti21G et 21GmuTS/anti21G et sélectivité vis-à-vis du couple 21G/anti21G en présence de 25mM de LiCl, 25mM de KCl et à 58°C (* réalisée une seule fois).

	21Gmu3/anti21G	*21GmuTS/anti21G*	*Pu22myc/AntiPu22*	*TRAP-G4*
Ligands	**Sélectivité/21G**	**Sélectivité/21G**	**Sélectivité**	**Sélectivité**
12459	**11,2**	_	**40**	**16,4**
307A	**17,4**	**18,2**	**>90**	**150**
télomestatine	**6,2**	**8,2**	**5,2**	**61**
BRACO 19	**1,6**	**1,7**	**22,9**	**6,8**

Tableau 11. Comparaison des sélectivités des tests PCR stop assay pour les séquences 21Gmu3, 21GmuTS et Pu22myc et du test TRAP-G4.

Afin de savoir si la séquence d'hybridation intervient dans cette variation de sélectivité, nous avons aussi utilisé un autre couple d'amorces, TS (5'-AAT-CCG-TCG-AGC-AGA-GTT-3')/antiTS (5'-CCT-TTT-CGT-CTT-AAC-TCT-3') utilisé dans le contrôle interne du test TRAP-G4. Avec ce couple d'oligonucléotides, les valeurs de sélectivité (*Tableau 12*) sont augmentées par rapport aux 21Gmu3 et 21GmuTS et se rapprochent de celles obtenues avec l'ITAS du test TRAP-G4, pour le 307A et le 12459 (*Tableau 11*). Pour la télomestatine, la sélectivité est augmentée mais n'atteint pas celle de l'ITAS. Par contre, le BRACO19 présente une sélectivité similaire avec les amorces TS, 21Gmu3 et 21GmuTS.

	TS/antiTS		*21Gmu3/anti21G*	*21GmuTS/anti21G*
Ligands	**CI50**	**Sélectivité**	**Sélectivité**	**Sélectivité**
12459	**18 ± 0**	**27,7**	**11,2**	**-**
115405	**0,2± 0**	**1,6**	**-**	**-**
307A	**20 ± 0**	**60,6**	**17,4**	**18,2**
9944	**1,3 ± 0,3**	**5,9**	**-**	**-**
télomestatine	**13,3 ± 2,3**	**17,5**	**6,2**	**8,2**
BRACO19	**8,5 ± 1**	**1,9**	**1,6**	**1,7**
TMPyP4	**1,6 ± 0**	**4,7**	**-**	**-**

Tableau 12. Effet de différents ligands sur les couples TS/antiTS et sélectivité vis-à-vis du couple 21G/anti21G.

Dans la suite de notre travail (voir chapitre 2 : Ligands G4 et épissage alternatif de hTERT), trois autres amorces mutées ont été utilisées pour évaluer la sélectivité des ligands (G4TERT1mu : 5'-AGG-ATG-AAA-GGA-GCC-CTG-AGC-T***TG-GG***-3', G4TERT2mu : 5'-GAG-AGC-CTT-GAA-GCT-CGG-CAG-GAG-T***GA-AAG-GGG***-3', et VNTR6-1mu : 5'-AGG-ATA-GGT-GAA-GAT-CTG-***TGG-GAT-TGG***-3'). La *Figure 54* montre l'ensemble des sélectivités obtenues pour les ligands 12459, télomestatine et 307A, en fonction des amorces mutées ou modifiées utilisées.

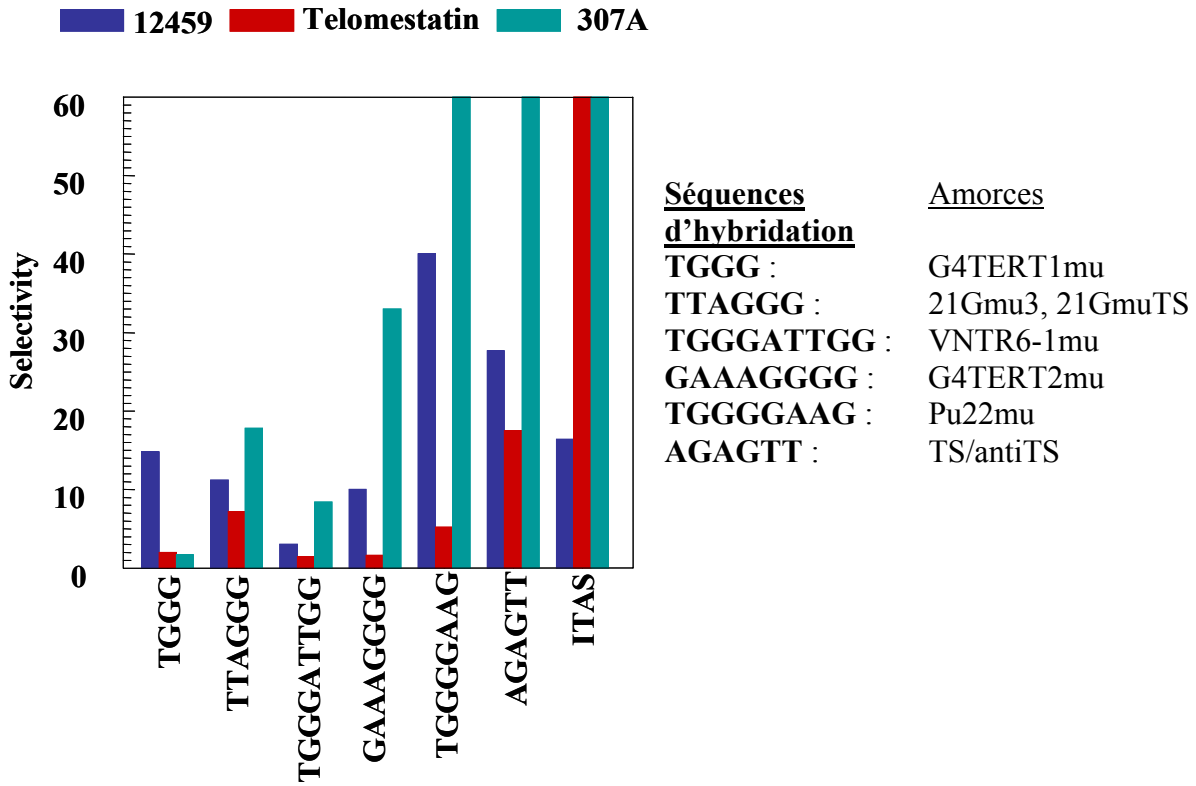


Figure 54. Sélectivité des ligands 12459, télomestatine et 307A avec les différentes amorces et les séquences d'hybridations utilisées dans le test de « PCR stop assay ».

Pour le ligand 307A, la sélectivité est diminuée lorsque nous avons une succession de 3 résidus de guanines dans la séquence d'hybridation, à l'exception du Pu22mu. Par des techniques de dialyse à l'équilibre, Lionel Guittat a montré que le 307A fixe plus fortement le G-quadruplexe télomérique humain présentant des répétitions de 3 guanines, que des G-quadruplexes présentant une succession de 2 ou 4 guanines associées, et que cette molécule est également capable de reconnaître plus faiblement des séquences simples brins (Guittat L., 2004). Il est donc possible que la fixation au simple brin soit influencée par la composition en guanines des séquences d'hybridation.

Pour la télomestatine, la sélectivité est diminuée lorsqu'une succession de 3 ou 4 guanines est présente. Cependant, elle reste relativement faible avec le couple d'amorce TS/antiTS. Il est possible que la taille de la séquence d'hybridation entre les deux amorces modifie également cette sélectivité.

Par contre, pour le ligand 12459, la sélectivité ne semble pas être dépendant des répétitions de guanines ni du nombre de nucléotides intervenant dans l'hybridation des amorces.

La nature de la séquence influe donc sur la sélectivité des différents ligands étudiés dans le test PCR. Afin de confirmer cette hypothèse, plusieurs couples d'amorces dérivées du 21G, présentant différentes modifications de séquences et évitant les répétitions de guanines dans la région d'hybridation pourraient être utilisés (à titre d'exemple : *Figure 55*).

5'-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-TTA-GGG-CCG-TCG-3' (21G-X)

(anti21G-X) 3'-GGC-AGC-TCT-CGT-CTT-CCC-TAA-5'

5'-GG**C**-TTA-**C**GG-TTA-G**C**G-TTA-G**C**G-CCG-TCG-3' (21G-muX)

(anti21G-X) 3'-GGC-AGC-TCT-CGT-CTT-CCC-TAA-5'

Figure 55. Exemple de séquences pouvant être utilisées afin d'éviter la reconnaissance de séquences particulières par les ligands.

Le couple d'oligonucléotides 21G-X/anti21G-X est capable de former un G-quadruplexe. En présence de ligands, l'hybridation des amorces ne devrait pas être inhibée mais la stabilisation du G-quadruplexe empêcherait l'amplification PCR. Pour le couple 21Gmu-X/anti21G-X, les mutations empêchent la formation d'un G-quadruplexe et les ligands n'agiraient pas sur cette séquence.

Le test de « PCR stop assay » est aussi fortement dépendant des conditions ioniques et de la température utilisée. Non seulement les cations modifient la stabilité des G-quadruplexes, le potassium étant le plus favorable à sa formation et le lithium le moins

favorable, mais aussi modifient l'hybridation des amorces entre elles, ce qui provoque une amplification non spécifique. De plus cet essai peut être compliqué par l'apparition de formes parallèles et antiparallèles du G-quadruplexe étudié, en fonction des conditions ioniques et des ligands utilisés. Le groupe de L. Hurley a décrit que la séquence myc peut adopter 4 conformations de G-quadruplexes différentes en présence du ligand TMPyP4 (Seenisamy J., et al., 2004) (Seenisamy J., et al., 2005). Des travaux du groupe de J.L.Mergny ont montré que la fixation du dérivé 307A s'effectue de façon préférentielle sur la forme parallèle du G-quadruplexe télomérique (J.L. Mergny, communication personnelle). De plus, le ligand 979A totalement inactif en FRET sur le quadruplexe télomérique, montre un T_m de 8°C sur le G-quadruplexe de myc en présence NaCl et est faiblement actif en présence de KCl (Tm : 1°C) (R. Paterski, résultats non publiés).

Ces résultats indiquent que les conditions ioniques et la nature du ligand influent sur la stabilisation et la structure du G-quadruplexe. Ces considérations montrent que la mise au point des conditions expérimentales du test de « PCR stop assay » est un élément critique pour l'évaluation et la comparaison des données obtenues avec les différents ligands.

e. Discussion et conclusion

La comparaison de l'effet de différents ligands sur les séquences 21G et Pu22myc est possible grâce à la mise en œuvre du test de « PCR stop assay » dans des conditions expérimentales précises. Nous avons obtenu une activité comparable (variant au plus d'un facteur 2) des ligands télomestatine, 307A, TMPyP4 et 12459 sur ces quadruplexes (*Figure 56*).

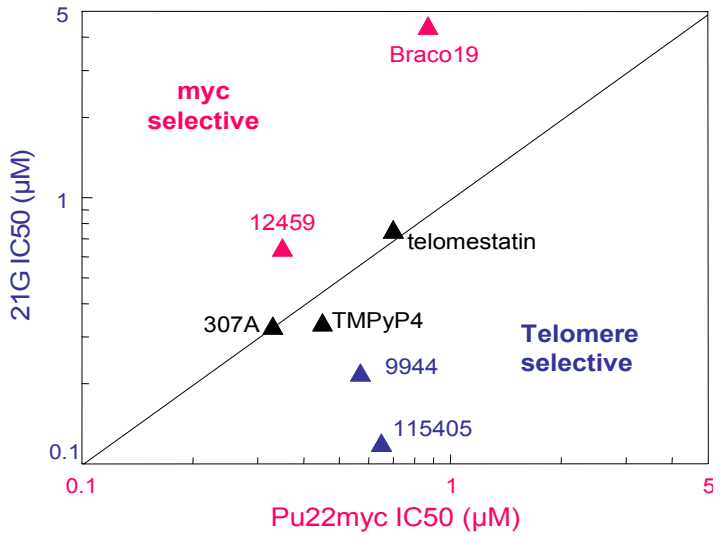


Figure 56. Comparaison des CI50 des ligands 115405, 12459, 307A, 9944, BRACO19, télomestatine et TMPyP4 sur les séquences Pu22myc et 21G.

Les variations les plus importantes sont obtenues pour le BRACO19 (plus sélectif pour la séquence myc), et les ligands 115405 et 9944 (plus sélectifs pour la séquence 21G).

Nous avons également observé une sélectivité comparable (comparaison ITAS contre Pu22mu) pour les ligands 115405, 9944 et 307A (*Figure 57*). Des variations de sélectivité (au plus d'un facteur 3) ont été observées pour les ligands TMPyP4, BRACO19 et 12459 (plus sélectif contre la séquence Pu22mu). Par contre, une variation de sélectivité importante est observée pour la télomestatine (plus sélectif contre l'ITAS). Nous avons supposé que la taille et la structure de la séquence d'hybridation entre les amorces pourraient intervenir dans la sélectivité de ce ligand.

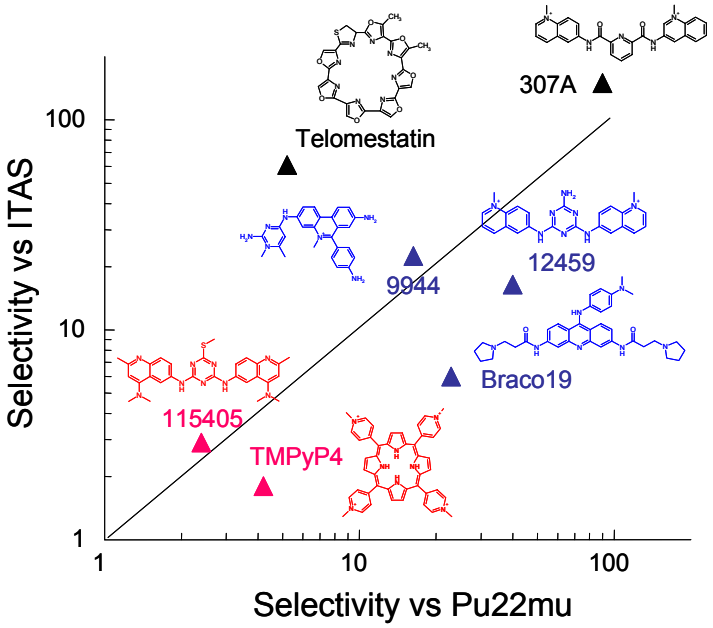


Figure 57. Comparaison des sélectivités des ligands 115405, 12459, 307A, 9944, BRACO19, télomestatine et TMPyP4 contre les séquences Pu22mu et ITAS.

Ces données indiquent que l'on peut obtenir une variation de l'effet des ligands sur différentes structures de G-quadruplexes. Des études de dialyse à l'équilibre ou de FRET permettent aussi de constater ces variations. En effet, des travaux réalisés dans le laboratoire de J.L. Mergny montrent (en dialyse à l'équilibre) une fixation plus importante du dérivé 307A sur la séquence télomérique humaine (5'-AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3') que sur le G-quadruplexe télomérique de *Tetrahymena* (5'-GGGGTTGGGGTTGGGGTTGGGG-3') (Guittat L., 2004). Un travail récent de l'équipe de L. Hurley décrit un nouvel analogue de porphyrine (Se2SAP) (*Figure 58*) dont la sélectivité sur le G-quadruplexe de myc est augmenté d'un facteur 40 par rapport au TMPyP4 (Seenisamy J., et al., 2005).

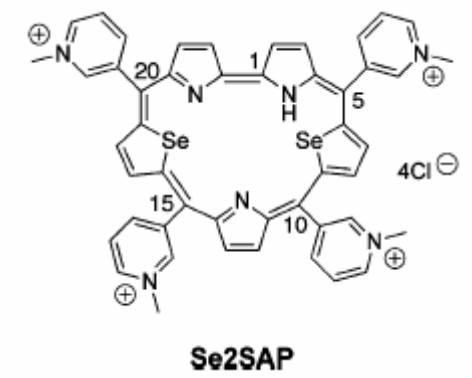


Figure 58. Formule de l'analogue de porphyrine Se2SAP.

Il est donc envisageable de sélectionner, à l'aide de ces différents essais (« PCR stop assay, dialyse à l'équilibre, FRET) des ligands présentant un profil d'activité déterminé vis-à-vis d'une collection de structures de G-quadruplexes (collection désignée sous le terme de Quadrome par l'équipe de L. Hurley, (Pharmaceuticals Cylene, 2005)). Cependant, le(s) degré(s) de sélectivité requis pour obtenir une activité biologique telle qu'une action anticancéreuse sont à l'heure actuelle inconnus et restent à déterminer. L'étude biologique de la stabilisation des structures G-quadruplexes autres que la séquence télomérique (et myc) apparaissent comme un pré requis pour pouvoir déterminer le seuil de sélectivité nécessaire. Nos travaux montrent que les 2 ligands les plus sélectifs vis-à-vis des formes d'ADN non-quadruplexes (double brin, simple brin), le 307A et la télomestatine, présentent une activité équipotente vis-à-vis des G-quadruplexes myc et télomériques. Néanmoins, l'absence d'effet probant des ligands que nous avons étudié sur l'activité transcriptionnelle de *c-myc* suggère la mise en œuvre d'études complémentaires extensives.

2. Ligands G4 et épissage alternatif de hTERT

a. But du travail

Le 12459 est l'un des dérivés de triazine le plus sélectif capable d'interagir avec les structures G-quadruplexes. En test TRAP-G4, il présente une sélectivité élevée (environ 25 fois) si l'on compare l'inhibition de la télomérase avec l'inhibition de la *Taq* polymérase (Gomez D., et al., 2002). Dans la lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome pulmonaire A549, un traitement de 10µM de 12459 pendant 48h est capable d'inhiber l'activité télomérase, d'induire un raccourcissement de la taille des télomères et de provoquer l'entrée en apoptose de ces cellules (Riou J. F., et al., 2002). Les mécanismes précis de l'inhibition de la télomérase par le 12459 dans la lignée A549 n'ont pas été élucidés. Nous avons cherché à

savoir si ce ligand était capable de moduler la transcription du gène hTERT codant la sous-unité catalytique de la télomérase.

b. Publication 2 : Telomerase downregulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing.

α. Résumé en français

Le ligand 12459, un agent puissant dérivé de la triazine capable d'interagir avec les G-quadruplexes, a été décrit comme étant capable de réguler négativement l'activité télomérase dans la lignée cellulaire humaine de carcinome de poumon A549. Nous montrons ici que cette activité inhibitrice est induite par une altération du complexe d'épissage de hTERT. Il apparaît une quasi disparition du transcrit actif (+α+β) et une surexpression de la forme inactive –β de hTERT. L'intron 6 formant le transcrit –β de hTERT contient plusieurs répétitions de séquences riches en guanines capables de former un G-quadruplexe. En utilisant un test spécifique d'arrêt de PCR, nous montrons que le 12459 est capable de stabiliser la formation de cette structure en G-quadruplexe. Le niveau de l'épissage de hTERT dans des clones de la lignée cellulaire A549 sélectionnés pour leur résistance au 12459 a été analysé. Ces clones résistants sont capables de maintenir le transcrit actif de hTERT en présence de 12459 suggérant la présence de mécanismes capables d'outrepasser les altérations de l'épissage induites par le 12459. Contrairement au 12459, la télomestatine et le BRACO19, deux autres agents capables d'interagir avec les G-quadruplexes, n'ont pas d'effet sur l'épissage de hTERT dans la lignée A549, sont cytotoxiques pour les clones résistants A549 et présentent une faible efficacité pour stabiliser les G-quadruplexes de hTERT. Ces résultats nous permettent de proposer que le 12459 modifie la machinerie de l'épissage de hTERT par l'intermédiaire d'une stabilisation de quadruplexes localisés dans l'intron 6 du gène hTERT. Les différences de sélectivités entre le 12459, le BRACO 19 et la télomestatine pour les quadruplexes de hTERT pourraient êtres importantes pour expliquer leurs activités respectives et leur inactivité en vers l'épissage de hTERT.

β. Publication

Published online January 16, 2004

Nucleic Acids Research, 2004, Vol. 32, No. 1 ***371–379***
DOI: 10.1093/nar/gkh181

Telomerase downregulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing

Dennis Gomez[1], Thibault Lemarteleur[1,2], Laurent Lacroix[3], Patrick Mailliet[4], Jean-Louis Mergny[3] and Jean-François Riou[1,*]

[1]Onco-Pharmacologie and [2]EA3306, IFR53, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51096 Reims, France, [3]Laboratoire de Biophysique, INSERM U565, CNRS UMR 5153, Muséum National d'Histoire Naturelle USM 0503, 75005, Paris, France and [4]Aventis Pharma SA, Centre de Recherche de Paris, 94403, Vitry sur Seine, France

Received August 23, 2003; Revised November 13, 2003; Accepted November 26, 2003

ABSTRACT

Ligand 12459, a potent G-quadruplex-interacting agent that belongs to the triazine series, was previously shown to downregulate telomerase activity in the human A549 lung carcinoma cell line. We show here that the downregulation of telomerase activity is caused by an alteration of the hTERT splicing pattern induced by 12459, i.e. an almost complete disappearance of the active (+α,+β) transcript and an over-expression of the inactive –β transcript. Spliced intron 6 forming the –β hTERT transcript contained several tracks of G-rich sequences able to form G-quadruplexes. By using a specific PCR-stop assay, we show that 12459 is able to stabilize the formation of these G-quadruplex structures. A549 cell line clones selected for resistance to 12459 have been analyzed for their hTERT splicing pattern. Resistant clones are able to maintain the active hTERT transcript under 12459 treatment, suggesting the appearance of mechanisms able to bypass the 12459-induced splicing alterations. In contrast to 12459, telomestatin and BRACO19, two other G-quadruplex-interacting agents, have no effect on the hTERT splicing pattern in A549 cells, are cytotoxic against the A549-resistant clones and display a lower efficiency to stabilize hTERT G-quadruplexes. These results lead us to propose that 12459 impairs the splicing machinery of hTERT through stabilization of quadruplexes located in the hTERT intron 6. Differences of selectivity between 12459, BRACO19 and telomestatin for these hTERT quadruplexes may be important to explain their respective activity and inactivity against hTERT splicing.

INTRODUCTION

Telomeres are essential to maintain the stability of chromosome ends and are synthesized by a specialized enzyme called telomerase. Telomerase is over-expressed in a large number of tumors and is involved in cell immortalization and tumorigenesis, whereas it is not expressed in most somatic cells (1). Such differential expression provided the initial rationale for the evaluation of telomerase inhibitors as potential anticancer agents (2). Folding of the telomeric G-rich single strand into a quadruplex DNA has been found to inhibit telomerase activity. Stabilization of G-quadruplexes can then be considered an original strategy to achieve antitumor activity (3–6).

The 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine derivatives are potent telomerase inhibitors that bind to telomeric G-quadruplex (7). In this series, 12459 (Fig. 1a) is one of the most selective G-quadruplex-interacting compounds that displayed a 25-fold selectivity when telomerase inhibition was compared with the *Taq* polymerase inhibition by using the TRAP-G4 assay (8). 12459 also presented strong affinities for different G-quadruplex structures when compared with other forms of nucleic acids (L.Guittat and J.L.Mergny, unpublished results). In addition, 12459 is able to induce both telomere shortening and apoptosis in the human lung adenocarcinoma A549 cell line, as a function of its concentration and time exposure (7). 12459 was also shown to downregulate telomerase activity in A549 cells after a short-term exposure to the ligand (7). We present evidence that short-term treatment of A549 cells with 12459 induces a downregulation of telomerase activity caused by an alteration of the hTERT splicing pattern, in which the inactive –β transcript becomes over-expressed. Since the hTERT spliced intron 6 contains several repeated GGG motifs able to form G-quadruplexes and analogous to reported splicing enhancer elements, we have determined that 12459 could stabilize these quadruplexes by using a specific PCR-stop assay and compared its activity with that of two other G-quadruplex ligands, telomestatin and BRACO19. The biological effect of 12459 against hTERT splicing was found to be strongly decreased in A549 clones selected for resistance

*To whom correspondence should be addressed at UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France. Tel: +33 326 91 80 13; Fax: +33 326 91 37 30; Email: jf.riou@univ-reims.fr

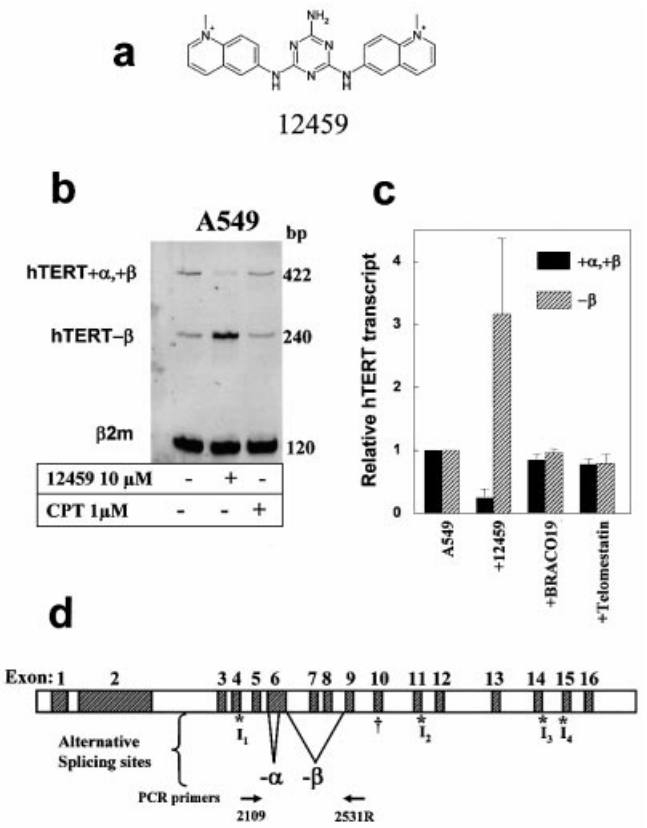


Figure 1. hTERT transcriptional alterations induced by a G-quadruplex ligand in A549 cells. (**a**) Chemical structure of 12459. (**b**) Ligand 12459 induced an hTERT splicing pattern alteration. RT–PCR of hTERT in parental A549 cells. As indicated, cells were treated with 10 μM 12459 for 48 h or 1 μM camptothecin (CPT) for 24 h before RNA extraction and RT–PCR analysis according to Yi *et al*. (14) that allowed the detection of active (+α,+β) and inactive (–β) hTERT transcripts (representative of three independent experiments). β_2-Microglobulin transcript (β2m) is used as a control for mRNA expression. The size of the PCR products (bp) is indicated on the right. (**c**) A549 cells were treated with either 10 μM 12459, telomestatin or BRACO19 for 48 h. Quantification of RT–PCR experiments (from three independent RNA extractions) for the active +α,+β and the inactive –β hTERT transcripts. Data were normalized relative to the β_2-microglobulin transcript and to the transcript level obtained in untreated A549 cells. (**d**) Genomic organization of the hTERT gene. Exons 1–16 and alternative splicing insertions (I_1–I_4, indicated by asterisks) and deletions (–α and –β, indicated by solid lines) are marked (14). A cross marks the location of the termination codon for the variant containing the β deletion. The location of the PCR primers used to determine the splicing patterns is shown at the bottom.

to 12459. Our data provide evidence of a potential correlation between the ability of these ligands to impair hTERT splicing and their potency to stabilize quadruplexes located in the hTERT intron 6. We propose as a hypothesis that 12459 might modulate hTERT splicing through an interaction with hTERT pre-mRNA.

MATERIALS AND METHODS

Oligonucleotides and compounds

All oligonucleotides were synthesized and purified by Eurogentec, Seraing, Belgium. Triazine derivative 12459 was synthesized according to patent WO 0140218. Telomestatin was purified according to Shin-ya *et al*. (9). BRACO19 was synthesized according to Gowan *et al*. (10). Other compounds were commercially available (Sigma). Solutions of compounds were prepared in 10 mM dimethylsulfoxide (DMSO), except telomestatin, which was prepared at 5 mM in MeOH/DMSO (50:50). Further dilutions were made in water.

UV melting experiments

All measurements were performed as described previously (11,12) on G4TERT1, G4TERT2 VNTR6-1 and mutant oligonucleotides (sequences shown in Table 1). Melting profiles were recorded at 295 nm in a 10 mM pH 7.0 sodium cacodylate buffer containing 0.1 M NaCl (or LiCl or KCl) using quartz cuvettes with a 1 cm pathlength.

Cell culture conditions and selection of resistant clones

A549 human cell lung carcinoma cell line was from the American Type Culture Collection. These cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with Glutamax (Invitrogen), supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics. JFD9, JFD10, JFD11 and JFD18 clones derived from the parental A549 cell line were selected for resistance to 10 μM 12459 after ethyl methanesulfonate (EMS) mutagenesis treatment (13). Clones were cultured in the same medium as the A549 cell line in the absence of 12459.

The MTT survival assay (4 days) in the presence of various cytotoxic compounds was performed in 96-well plates, each point in quadruplicate, as recommended by the manufacturer (Sigma). Due to an interference of 12459 with the coloration induced by MTT, the survival assay for this compound was performed in 6-well plates, each point in triplicate. The number of viable cells was counted after trypan blue dye exclusion in a hematocytometer.

A 48 h survival assay in the presence of 12459, telomestatin and BRACO19 was performed in 25 cm^2 culture flasks, in duplicate. Cells were seeded at 75 000 cells and treated 4 h later with various concentrations of compounds. After 48 h, cells were trypsinized and the number of viable cells was counted after trypan blue dye exclusion in a hematocytometer.

For apoptosis determination, A549 cells were seeded on 4-well cover slides and treated with 12459. Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and stained with Hoechst 33342 at 1 μg/ml. Cells with apoptotic nuclei were counted in different part of the slide by fluorescence microscopy. Results corresponded to the mean of three separate determinations (±SD) relative to control untreated cells.

RNA preparation and RT–PCR assays

Total RNA was isolated from 1×10^6 cells using Tri-Reagent (Sigma) as recommended by the manufacturer. A 1 μg aliquot of total RNA was reverse transcribed in a 20 μl reaction volume using random hexamers, AMV reverse transcriptase and the reaction buffer provided in the Reverse Transcription kit (Promega). The volume of the sample was adjusted to 200 μl with diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water at the end of the reaction. A 10 μl aliquot of cDNA was used for PCR amplifications. hTERT was amplified using the forward TERT2109 primer (5′-GCCTGAGCTGTACTTTGTCAA-3′)

Table 1. List of the oligomers used in the PCR-stop assay

Oligomer name	Sequence
G4TERT1	5′-**GGGG**TGAA**GGGG**CCCT**GGG**CTT**GGG**-3′
G4TERT1mu	5′-A**GG**ATGAAA**GG**A**G**CCCT**G**A**G**CTT**GGG**-3′
TERT1rev[a]	5′-TCTCGTCTTCCAATCCCA-3′
G4TERT2	5′GGGGGCCTTGGGGCTCGGCAGGGGTGAAAGGGG-3′
G4TERT2mu	5′-**GA**G**A**GCCTT**G**AA**G**CTC**GG**CA**GG**A**G**TGAAA**GGGG**-3′
TERT2rev[a]	5′-ATCGCTTCTCGTCCCCTTTC-3′
VNTR6-1	5′-**GGGG**TA**GG**T**GGGG**ATCTGT**GGG**ATT**GG**-3′
VNTR6-1mu	5′-A**GG**ATA**GG**T**G**AA**G**ATCTGT**GGG**ATT**GG**-3′
VNTR6-1rev[a]	5′-TCTCGTCTTCCAATCCCA-3′

[a]Complementary oligomers were used with either the corresponding G4 or mutated oligomers.
Underlined text corresponded to sequence complementary to the test oligomer and bold text corresponded to G-repeats. TERT1rev and VNTR6-1rev correspond to the same oligomer sequence.

and the reverse TERT2531R primer (5′-AGGCTGCAGAGC-AGCGTGGAGAGG-3′) according to Yi *et al*. (14), with the following cycling conditions: 94°C for 2 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 30 s. Amplification of β_2-microglobulin was performed as a control using the same PCR conditions with forward primer (5′-ACCCCCACTGAAAAAGATGA-3′) and reverse primer (5′-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3′). Amplified products were resolved on 6% non-denaturing polyacrylamide gels in 1× TBE and stained with SYBR Green I (Roche). Quantification was performed by a CDD camera (Bioprint) and a BioCapt software analysis, relative to the signal of β_2-microglobulin. Results represent the mean value of three independent RNA extractions.

PCR-stop assay on G-quadruplex oligonucleotides

The stabilization of G-quadruplex structures by specific ligands was investigated by a PCR-stop assay using a test oligonucleotide and a complementary oligonucleotide that partially hybridizes to the last G-repeat of the test oligonucleotide. Sequences of the test oligonucleotides and their corresponding complementary sequences used here are presented in Table 1.

Assays were performed in a final volume of 25 µl, in a 10 mM Tris pH 8.3 buffer with 25 mM LiCl, 25 mM KCl, 1.5 mM $Mg(OAc)_2$, 7.5 pmol of each oligonucleotide, 2.5 U of *Taq* polymerase and the indicated amount of the ligand. Reaction mixtures were incubated in a thermocycler with the following cycling conditions: 94°C for 2 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 30 s. Amplified products were resolved on a 12% non-denaturing polyacrylamide gel in 1× TBE and stained with SYBR Green I (Roche). Fluorescence was scanned with a phosphorimager (Typhoon 9210, Amersham). Results represent the mean ± SD of four independent experiments, except as indicated.

RESULTS

12459 altered hTERT alternative RNA splicing in A549 cells

Short-term treatment with 12459 (10 µM, 48 h) was initially found to downregulate telomerase activity in A549 cells extracts, but the precise mechanism of such an effect was not elucidated (7). We examined whether 12459 could alter hTERT transcription in parental A549 cells. The expression of the hTERT transcript was investigated by RT–PCR analysis. hTERT presents a complex splicing pattern that includes an active +α,+β transcript and several inactive species including the major –β, transcript and the minor –α and –α,–β transcripts (Fig. 1d) (14,15). Surprisingly, we have found that 12459 had no effect on the global transcription level of hTERT but markedly altered its splicing pattern, leading to an almost complete disappearance of the active transcript (+α,+β) and to an increase of the inactive one (Fig. 1b). The effect of 12459 on hTERT splicing was detectable after 24 h and became maximal at 48 h (Fig. 2). Further prolongation of the treatment to 72 h did not increase the effect on hTERT splicing (Fig. 2). Such downregulation of the active hTERT transcript would probably account for the short-term downregulation of the telomerase enzymatic activity reported earlier (7). Telomestatin and BRACO19 (10 µM, 48 h), two other potent telomerase inhibitors that were shown to stabilize G-quadruplex (10,16), did not significantly downregulate hTERT transcription nor alter its splicing pattern (Fig. 1c), suggesting that the splicing alteration is specific for the triazine derivative. A possible explanation for the (+α,+β) hTERT transcript downregulation might be the selective death of cells expressing the active transcript or a consequence of the cell growth inhibition induced by 12459. This seems unlikely since the onset of apoptosis induced by 12459 appeared with a delay at 96 h (13) and the kinetics of the splicing alteration reached a plateau at 48 h (Fig. 2). In addition, camptothecin at a concentration and time exposure (1 µM, 24 h) that generated >30% apoptosis did not alter transcription and splicing of hTERT (Fig. 1b). Cell growth experiments (48 h) with 10 µM 12459, telomestatin or BRACO19 produced 52, 62 or 68% growth inhibition, respectively, against A549 cells. Since growth inhibition is similar between 12459 and two other G-quadruplex ligands that did not induce splicing, we concluded that splicing alteration is independent of the antiproliferative effect of these ligands.

hTERT intron 6 contains G-rich elements able to form G-quadruplexes *in vitro*

Interestingly, the splicing alteration induced by 12459 might be related to the presence of G-rich elements identified in two regions within intron 6 of the hTERT gene and thought to

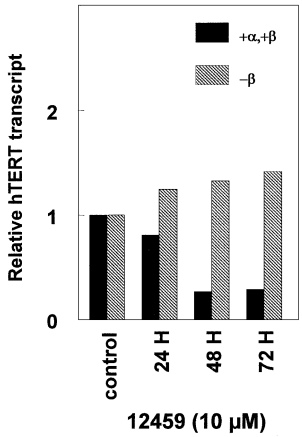


Figure 2. Kinetics of 12459-induced hTERT splicing pattern alteration in A549 cells. Quantification of RT–PCR experiments for the active α,+β and the inactive –β hTERT transcripts. As indicated, cells were treated with 10 μM 12459 for 24, 48 and 72 h before RNA extraction and RT–PCR analysis. Data were normalized relative to the β_2-microglobulin transcript and to the transcript level obtained in untreated A549 cells (control).

affect the mRNA splicing of the –β form of hTERT (17). The first element is a stretch of six G-repeats located at the 5′ end of intron 6, and the second is the repeat unit of a 1–2 kb VNTR (variable number of tandem repeat). DNA oligonucleotides synthesized from these sequences (G4TERT1, G4TERT2 and VNTR6-1, see Fig. 3a) displayed the characteristic features of G-quadruplexes as shown by UV absorbance. An inverted transition is observed at 295 nm upon heating; it corresponds to the melting of the quadruplex (12). As expected for these structures, the T_m of the quadruplexes depends on the nature of the monocation added to the buffer. For all oligonucleotides, the highest T_m is obtained with KCl followed by NaCl. G4TERT1, G4TERT2 and VNTR6-1 quadruplexes exhibit a T_m of 61, >75 and 55°C, respectively in KCl, as compared with 49, 52 and 36°C, respectively, in NaCl. Little or no signal is observed in 0.1 M LiCl for the three different oligonucleotides, arguing against the formation of stable quadruplexes under these conditions. Parallel experiments with control oligomers that contains mutations in the guanine repeats were also performed; the results are shown in Figure 3b for oligonucleotides G4TERT1mu, G4TERT2mu and VNTR6-1mu (sequences presented in Table 1) in 0.1 M NaCl. These controls are theoretically unable to form unimolecular G-quadruplexes. In agreement with this assumption, no transition at 295 nm is observed in NaCl (Fig. 3b, diamonds) or KCl (not shown).

12459 is more efficient than telomestatin in stabilizing the formation of hTERT intron 6 G-quadruplexes

The role of 12459 in the formation of G-quadruplex structures from the hTERT intron 6 was investigated using a PCR-stop assay. In the presence of the ligand, DNA oligomers from hTERT intron 6 sequences were stabilized into G-quadruplex structures that blocked hybridization with a complementary strand overlapping the last G-repeat (Fig. 4a and Table 1). In that case, 5′ to 3′ extension with *Taq* polymerase was inhibited and the final double-stranded DNA PCR product was not detected. Oligomers G4TERT1, G4TERT2 or VNTR6-1 were incubated with increasing concentrations of 12459 in the presence of their complementary strand for 30 PCR cycles. The final double-stranded DNA product was inhibited in a dose-dependent manner by 12459 (Fig. 4b). The IC_{50} values which indicate the concentration of 12459 required to achieve 50% inhibition of the reaction were found to be 1.75, 2 and 6.25 μM for G4TERT1, G4TERT2 and VNTR6-1, respectively (Table 2). To further demonstrate that inhibition induced by 12459 was due to G-quadruplex stabilization of the oligomer, parallel experiments with oligomers that contain mutations in the guanine repeats (G4TERT1mu, G4TERT2mu and VNTR6-1mu, see Table 1) were performed. In that case, IC_{50} was increased to 26, 20 and 20 μM, for G4TERT1mu, G4TERT2mu and VNTR6-1mu, respectively (Table 2), and represented either non-specific *Taq* polymerase extension inhibition or oligonucleotide hybridization inhibition. IC_{50} differences for 12459 were observed between the quadruplex-forming oligomers (from 1.75 to 6.25 μM) while non-specific inhibition against all the mutated oligomers remained constant and above 10 μM. PCR inhibition by 12459 was found to be more efficient with G4TERT1 or G4TERT2 oligomers than with VNTR6-1 oligomer.

A comparison of 12459 with telomestatin and BRACO19 was made under the same experimental conditions. For telomestatin, inhibition of the double-stranded DNA product was detected with IC_{50} equal to 5, 6 and 6.25 μM for G4TERT1, G4TERT2 and VNTR6-1, respectively (Table 2). Thus, except for VNTR6-1, telomestatin was found to be less efficient than 12459 in converting these oligomers into a G-quadruplex structure. The non-specific inhibition of the PCR by telomestatin gave an IC_{50} equal to 10, 10 and 9 μM against G4TERT1mu, G4TERT2mu and VNTR6-1mu, respectively (Table 2). Thus, telomestatin also presented a higher non-specific effect than 12459 in this assay. For BRACO19, inhibition of double-stranded DNA product was only detected for G4TERT1 with an IC_{50} equal to 5.7 μM, and no inhibition was found up to 30 μM against G4TERT2 and VNTR6-1 (Table 2). Therefore, BRACO19 was also less efficient than 12459 in converting the hTERT sequences into G-quadruplex. Again, the non-specific inhibition for BRACO19 against G4TERT1mu was higher than 12459. TMPyP4 was also evaluated in this assay and presented potent inhibitory properties, with the IC_{50} ranging from 1.3 to 2.3 μM against these G-quadruplex-forming oligomers. However, control experiments with mutated oligomers indicated identical IC_{50} values, suggesting that TMPyP4 had no selectivity in this assay, as compared with other G-quadruplex ligands evaluated here (Table 2).

These results provide evidence that 12459 stabilizes the G-quadruplex DNA structures that may be formed with a sequence found in the hTERT intron 6 with a marked preference for the sequence located at the 5′ end of intron 6. In addition, differences in the efficiency for stabilizing this quadruplex were observed between 12459, telomestatin and BRACO19. It is interesting to note that the stabilizing effect of all these compounds was also evaluated on the human telomeric $A(GGGTTA)_3GGG$ quadruplex, using a FRET-based melting assay that we have previously described (11). 12459, telomestatin and TmPyP4 (1 μM ligand) stabilized the F21T quadruplex by 8, 17 and 22°C, respectively. This indicates that the stabilization depends on the quadruplex

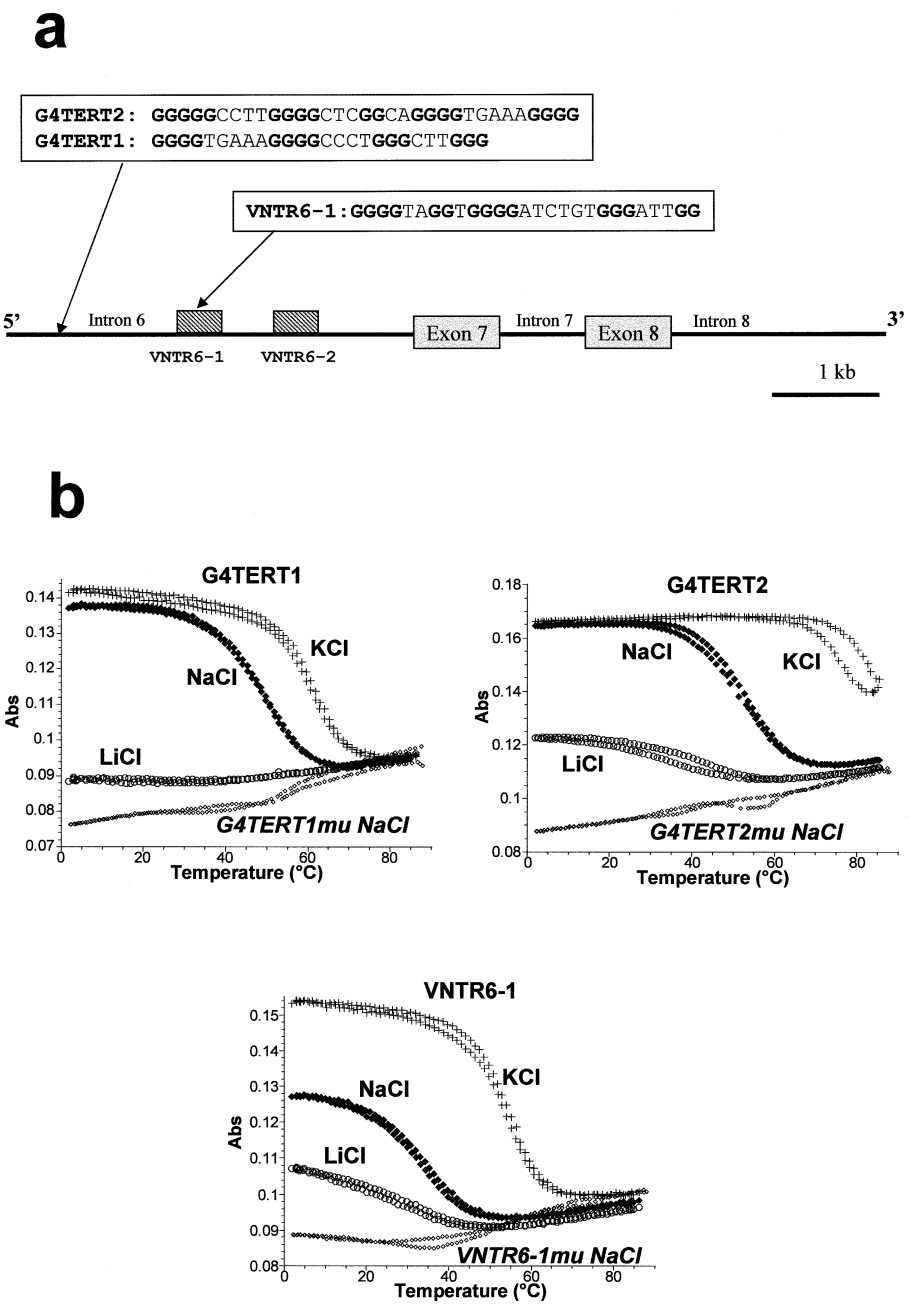


Figure 3. G-quadruplex stabilization of sequences from the hTERT intron 6. (**a**) Schematic representation of the –β deletion of hTERT that encompassed intron 6, exon 7, intron 7, exon 8 and intron 8 according to Leem *et al.* (17). G4TERT1 and G4TERT2 are located in the 5′ part of intron 6. VNTR6-1 represented a fragment of a 38 base repeat that extended 1.0–1.8 kb in the mid-part of intron 6. (**b**) UV melting behavior of G4TERT1, G4TERT2 and VNTR6-1 oligonucleotides and mutated sequences (3 μM) in 10 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.0) and 100 mM KCl, NaCl or LiCl, as indicated. Denaturation of the quadruplexes is shown by a decrease in absorbance at 295 nm (12). G4TERT1 in KCl, –0.01 offset; G4TERTa in LiCl, –0.004 offset; G4TERT2 in KCl, –0.01 offset; G4TERT2mu in NaCl, –0.03; G4TERT1mu in NaCl, –0.017.

sequence: 12459 which is the least stabilizing compound on the human telomeric motif is the most active compound in the PCR-stop assay.

12459-resistant clones presented resistance to the 12459-induced hTERT downregulation

We have established A549 clones selected for resistance to the short-term effect of 12459 (13). Clones JFD10 and JFD18 displayed hTERT transcript over-expression and an increased telomerase activity leading to an increase in telomere length. Two other 12459-resistant clones, JFD9 and JFD11, did not over-express the hTERT transcript. Telomerase activity was also found to contribute to the resistance to 12459 since transfection of a DN-hTERT cDNA into JFD18 cells restored sensitivity to 12459 (13). To further demonstrate that there is a link between the ability of 12459 to modulate hTERT RNA alternative splicing and the biological effect of 12459 against telomerase activity, we have analyzed 12459-resistant clones

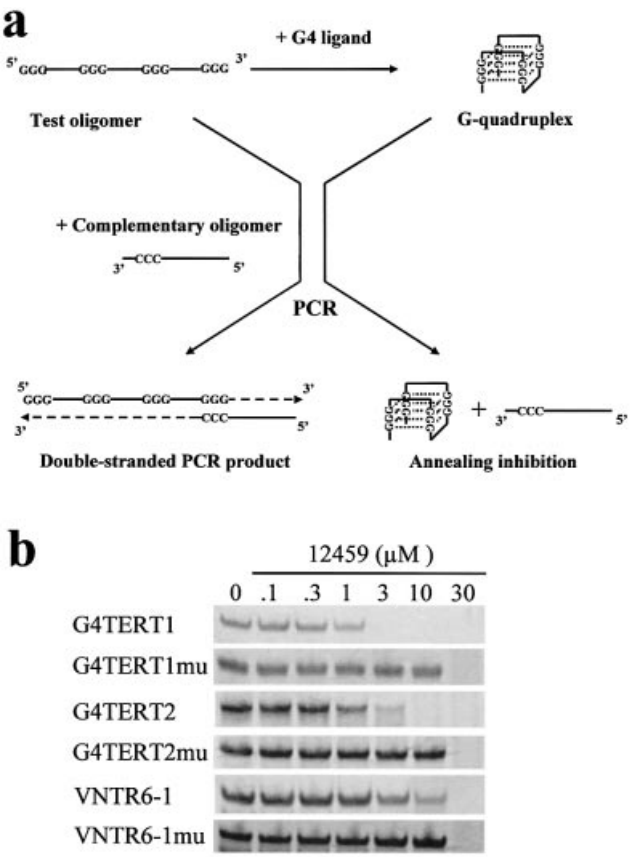


Figure 4. Effect of 12459 on the formation of hTERT intron 6 quadruplex by a PCR-stop assay. (**a**) Principle of the assay. Test oligomer was amplified with a complementary oligomer overlapping the last G-repeat. *Taq* polymerase extension resulted in the formation of a final double-stranded PCR product. In the presence of a ligand that stabilizes oligomer into a G-quadruplex structure, annealing of oligomer and, therefore, *Taq* polymerase extension is inhibited. Note that the diagram represents a G-quadruplex formed with three G-quartets, as an example. (**b**) Effect of increasing concentrations of 12459 on the PCR-stop assay with G-quadruplex-forming oligomers (G4TERT1, G4TERT2 and VNTR6-1) or with control mutated oligomers (G4TERT1mu, G4TERT2mu and VNTR6-1mu). The sequence of oligomers is indicated in Table 1.

for the hTERT splicing pattern alteration induced by 12459. Interestingly, 12459 treatment of the resistant clones JFD10 and JFD18 induced a different hTERT splicing pattern from that of the parental A549: the active (+α,+β) transcript was reproducibly maintained at a level at least comparable with that of untreated parental A549 cells, equal to 1.2-fold for JFD10 and 2.5-fold for JFD18 (Fig. 5a and c). In agreement with this observation, we have previously shown that JFD10 and JFD18 cells were resistant to the downregulation of the telomerase activity induced by 12459 treatment, in contrast to A549-treated cells (13). Analysis of other resistant clones, including JFD9, and JFD11 that did not overexpress hTERT mRNA (13), indicated that the level of the active +α,+β transcript is weakly affected by the 12459 treatment and is maintained at a level comparable with that of untreated parental A549 (Fig. 5b and d). These data suggested a common phenotype aiming at the maintenance of an active hTERT transcript level under treatment with 12459. Resistance to 12459 also produced two phenotypic classes of clones. In the first, active hTERT transcript is upregulated (i.e. JFD10, JFD18, etc.) and presented a qualitative alteration of the hTERT splicing pattern induced by 12459. In the second, active hTERT transcript is normal, as compared with A549 (i.e. JFD9, JFD11, etc.) and presented a qualitative alteration of the effect of 12459 on hTERT splicing. Interestingly, telomestatin, BRACO19 and camptothecin, that did not downregulate hTERT or alter splicing, were not found to be cross-resistant in the JFD18 clone (13). These results support the notion that the 12459-induced splicing alteration of hTERT is a key element in the short-term downregulation of telomerase activity in A549 cells.

DISCUSSION

G-quadruplex structures have been extensively studied in the telomeric single-stranded overhang, and two different forms of telomeric quadruplexes have been structurally characterized (3). G-quadruplexes could also be formed from duplex telomeric DNA under appropriate ionic and pH conditions (18) or in the presence of specific ligands (19). G-quadruplexes were also found in the promoter or regulatory regions of important oncogenes such as c-*myc*, c-*myb*, c-*Fos* and c-*ABL* (20), and a recent study demonstrated that the c-*myc* quadruplex formed in the promoter region functions as a transcriptional repressor element (21). c-*myc* transcription can be inhibited by ligand-mediated G-quadruplex stabilization. Two other regions of the genome are G-rich and have considerable potential to form G-quadruplex DNA: rDNA and mammalian immunoglobulin heavy chain switch regions (20).

We report here that the hTERT intron 6 contains two G-rich sequences able to form G-quadruplexes. 12459 ligand is also capable of promoting the stabilization of these G-quadruplexes, as evidenced by a specific PCR-stop assay. Interestingly, 12459 is unable to downregulate total hTERT transcription, unlike TMPyP4 ligand that blocks c-*myc* gene transcription, but rather modifies the hTERT alternative RNA

Table 2. Effects of 12459, BRACO19, TMPyP4 and telomestatin on the formation of hTERT intron 6 G-quadruplexes measured by the PCR-stop assay

Compound	IC_{50} (μM) on test oligomers G4TERT1[a]	G4TERT1mu[b]	G4TERT2[b]	G4TERT2mu[b]	VNTR6-1[a]	VNTR6-1mu[b]
12459	1.75 ± 0.37	26	2	20	6.25 ± 1.8	20
Telomestatin	5.0 ± 1.7	10	6	10	6.25 ± 0.37	9
BRACO19	5.7 ± 1.1	7.7	>30	>30	>30	>30
TMPyP4	1.38 ± 0.28	1.39	1.8	1.8	2.37 ± 0.82	2.3

[a]Mean ± SD of quadruplicates.
[b]Mean of duplicates.

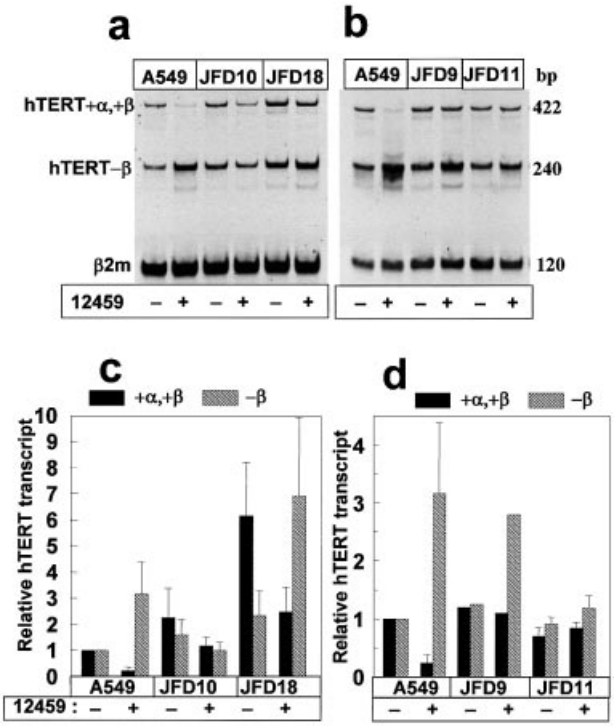


Figure 5. hTERT splicing pattern alteration in 12459-resistant clones. (**a**) RT–PCR of hTERT in parental A549 and resistant clones (JFD10 and JFD18). As indicated, cell lines were treated with 10 μM 12459 for 48 h before RNA extraction and RT–PCR analysis (representative of four independent experiments). (**b**) RT–PCR of hTERT in parental A549 and resistant clones (JFD9, JFD11). As indicated, cell lines were treated with 10 μM 12459 for 48 h before RNA extraction and RT–PCR analysis according to Yi *et al*. (14). The size of the PCR products (bp) is indicated on the right. (**c**) Quantification of four independent RT–PCR experiments (from independent RNA extractions) for the active +α,+β and the inactive –β hTERT transcripts on A549, JFD10 and JFD18. Cells were treated with 12459 (10 μM, 48 h) as indicated. Data were normalized relative to the β_2-microglobulin transcript (β2m). (**d**) Quantification of the RT–PCR experiments (three independent RNA extractions, except for JFD9 with one single experiment) for the active +α,+β and the inactive –β hTERT transcripts on A549, JFD9 and JFD11. Cells were treated with 12459 (10 μM, 48 h) as indicated. Data were normalized relative to the β_2-microglobulin transcript).

splicing in A549 cells, thus suggesting that 12459 affects hTERT mRNA processing rather than hTERT DNA transcription. The effect of 12459 leads to an almost complete downregulation of the active +α,+β hTERT transcript and to an increase of the inactive –β hTERT transcript, explaining the downregulation of telomerase activity previously observed in A549 cells (7,13).

Some genes are known to encode G-rich mRNA capable of forming G-quadruplex RNA. RNA quadruplexes were found in several mRNAs that are bound to the fragile X mental retardation protein that plays a role in the regulation of RNA translation (22). The human fibroblast growth factor-2 internal ribosome entry site (IRES) also contains an intramolecular G-quadruplex motif that contributes to the IRES activity (23). It is thus tempting to speculate that an enhanced stabilization of an intron 6 RNA quadruplex by 12459 could modulate the binding of factors participating in branch site selection. Interestingly, the GGG repeat observed in the 5′ end of hTERT intron 6 (encompassing G4TERT1 and G4TERT2 oligomers) displayed strong similarity to an intronic GGG repeat that was shown to enhance the splicing of an alternative intron of the chicken β-tropomyosin pre-mRNA (24) and in the human growth hormone (25) (Fig. 6). Mutations in these motifs were found to cause exon skipping. A possible explanation for the –βhTERT splicing would be that these G-rich sequences bind to a splicing factor involved in the negative control of the hTERT exon 7 and 8 skipping, during alternative splicing. In that case, the stabilization of this region into G-quadruplex by 12459 would impair the binding of this factor and would provoke the alternative splicing. At the molecular level, G-quadruplex formation might be analogous to a mutation in these motifs to mask or modify protein-binding sites and cause exon skipping. It is interesting to note that hnRNPA1/UP1 that played an important role in RNA metabolism and the control of telomere length is also known to bind to G-quadruplex-forming sequences and to destabilize G-quadruplexes (26,27). On the other hand, we cannot exclude that 12459 induces a direct effect on the splicing machinery, independent from any interaction with hTERT intron 6. A detailed analysis of the action of 12459 by *in vitro* experiments aiming to reconstitute the splicing of hTERT would be necessary to understand the effect of this ligand.

Interestingly, two other potent G-quadruplex ligands, BRACO19 and telomestatin, did not alter splicing and transcript levels of hTERT, suggesting that the splicing alteration is specific for the triazine derivative. A recent study with distamycin, a well known minor groove binder of AT-rich DNA tracts, demonstrated that this compound also bind specifically to the terminal quartet of quadruplex DNA (28). Distamycin inhibits G-quadruplex binding by the RGG domain of nucleolin. In contrast, distamycin does not inhibit G-quadruplex DNA binding by BLM helicase or by RBD domains of nucleolin. A recent report from L. Hurley's group suggested a link between the selectivity of telomestatin for intramolecular G-quadruplex or TMPyP4 for intermolecular G-quadruplex and the ability of these compounds to mediate different biological effects against telomerase-positive or -negative (ALT) tumor cell lines (19). In addition, TMPyP4 was shown to stabilize G-quadruplex from the telomere sequence but to destabilize G′2 quadruplex from the 5′-untranslated region of the first exon of the *FMR1* gene (29). These data demonstrated that the mode of interaction of the ligand with the quadruplex or the nature of the quadruplex are critical for biochemical or biological properties of the ligand. Our results indicated that 12459 is ~3-fold more potent than telomestatin in stabilizing the oligomers G4TERT1 and G4TERT2 that correspond to parts of the GGG repeat from the 5′ end of hTERT intron 6 putatively involved in alternative splicing. In contrast, the oligomer corresponding to the G-rich VNTR6-1 repeat was stabilized with equal efficiency by 12459 and telomestatin but at 3-fold higher IC_{50}. Similarly, BRACO19 displayed important differences compared with 12459 in stabilizing these oligomers into G-quadruplex. On the other hand, 12459, telomestatin and BRACO19 were found to be equally potent in stabilizing the telomeric quadruplex in the TRAP-G4 assay (8) with an IC_{50} equal to 0.7, 0.65 and 0.8 μM, respectively. Therefore, significant quantitative differences in the stabilization of different G-quadruplex species were found between these three ligands.

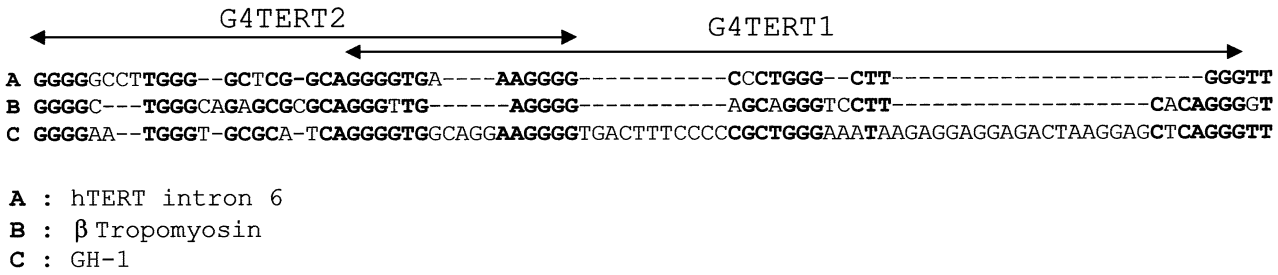


Figure 6. Sequence alignment of the G-repeats from the 5′ end of hTERT intron 6 (**A**) with intronic repeats from the chicken β-tropomyosin pre-mRNA (**B**) and human growth hormone (**C**). Oligomers G4TERT1 and G4TERT2 derived from the hTERT intron 6 sequence are indicated by arrows.

Since G4TERT1 and G4TERT2 are preferentially stabilized by 12459 as compared with VNTR6-1, and with higher efficiency when compared with telomestatin and BRACO19, this constitutes a basis for a future investigation of the effect of these ligands in the stabilization of an RNA quadruplex in hTERT intron 6 that might explain their biological differences regarding hTERT splicing.

Unlike other G-quadruplex ligands, 12459 may contribute to the impairment of telomerase activity by two different mechanisms. The first corresponded to the induction of quadruplex formation in telomeric overhang repeats that inhibited telomerase activity and therefore telomere stabilization, as reported with different classes of ligands including telomestatin and BRACO19 (3). The second corresponded to the findings of our present study relative to the hTERT active transcript downregulation mediated by the 12459-induced hTERT splicing alteration. This new mechanism was also found to be specific for the triazine derivative. Interestingly, all 12459-resistant clones were also found to be resistant for the effect of 12459 against hTERT splicing through either quantitative or qualitative alterations, suggesting that the maintenance of an active hTERT transcript is a critical determinant in the resistance to this compound. Additional experiments on the JFD18 clone demonstrated that hTERT functions contribute to the resistance to 12459 (13). Furthermore, telomestatin and BRACO19 that did not impair hTERT splicing in A549 cells were not found to be cross-resistant in JFD18 and JFD10 clones presenting quantitative alterations of the hTERT expression and 12459-induced hTERT splicing. A possible explanation for this lack of resistance for telomestatin might be related to the lower efficiency of telomestatin in stabilizing G4TERT1 and/or G4TERT2 quadruplexes and its inability to impair the splicing machinery. However, we could not exclude that telomestatin and 12459 induced specific and unrelated antiproliferative pathways other than telomerase inhibition or hTERT splicing that could explain their resistance differences. Experiments aiming to analyze differences in the splicing machinery between A549 and 12459-resistant clones would provide interesting clues to the answers to these questions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank J. Tazi, A. Londono-Vallejo and E. Mandine for helpful discussion, and K. Shin-ya for the gift of telomestatin. This work was supported by an Action Concertée Incitative, 'Molécules et Cibles Thérapeutiques' grant from the French Ministry of Research and by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC 4691 to J.F.R., 4321 to J.L.M). T.L. is supported by a grant from l'Association Régionale pour l'Enseignement et la Recherche Scientifique et technologique (ARERS).

REFERENCES

1. McEachern,M.J., Krauskopf,A. and Blackburn,E.H. (2000) Telomeres and their control. *Annu. Rev. Genet.*, **34**, 331–358.
2. Sharma,S., Raymond,E., Soda,H., Sun,D., Hilsenbeck,S.G., Sharma,A., Izbicka,E., Windle,B. and Von Hoff,D.D. (1997) Preclinical and clinical strategies for development of telomerase and telomere inhibitors. *Ann. Oncol.*, **8**, 1063–1074.
3. Neidle,S. and Parkinson,G.N. (2003) The structure of telomeric DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 275–283.
4. Mergny,J.L., Riou,J.F., Mailliet,P., Teulade-Fichou,M.P. and Gilson,E. (2002) Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 839–865.
5. Neidle,S. and Parkinson,G. (2002) Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. *Nature Rev. Drug Discov.*, **1**, 383–393.
6. Rezler,E.M., Bearss,D.J. and Hurley,L.H. (2002) Telomeres and telomerases as drug targets. *Curr. Opin. Pharmacol.*, **2**, 415–423.
7. Riou,J.F., Guittat,L., Mailliet,P., Laoui,A., Renou,E., Petitgenet,O., Megnin-Chanet,F., Hélène,C. and Mergny,J.L. (2002) Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 2672–2677.
8. Gomez,D., Mergny,J.L. and Riou,J.F. (2002) Detection of telomerase inhibitors based on G-quadruplex ligands by a modified telomeric repeat amplification protocol assay. *Cancer Res.*, **62**, 3365–3368.
9. Shin-ya,K., Wierzba,K., Matsuo,K., Ohtani,T., Yamada,Y., Furihata,K., Hayakawa,Y. and Seto,H. (2001) Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 1262–1263.
10. Gowan,S.M., Harrison,J.R., Patterson,L., Valenti,M., Read,M.A., Neidle,S. and Kelland,L.R. (2002) A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting *in vitro* and *in vivo* antitumor activity. *Mol. Pharmacol.*, **61**, 1154–1162.
11. Mergny,J.L. and Maurizot,J.C. (2001) Fluorescence resonance energy transfer as a probe for G-quartet formation by a telomeric repeat. *Chembiochem. Eur. J. Chem. Biol.*, **2**, 124–132.
12. Mergny,J.L., Phan,A.T. and Lacroix,L. (1998) Following G-quartet formation by UV-spectroscopy. *FEBS Lett.*, **435**, 74–78.
13. Gomez,D., Aouali,N., Londono-Vallejo,A., Lacroix,L., Megnin-Chanet,F., Lemarteleur,T., Douarre,C., Shin-ya,K., Mailliet,P., Trentesaux,C. *et al.* (2003) Resistance to the short-term antiproliferative activity of the G-quadruplex ligand 12459 is associated with telomerase overexpression and telomere capping alteration. *J. Biol. Chem.*, **278**, 50554–50562.
14. Yi,X., Shay,J.W. and Wright,W.E. (2001) Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 4818–4825.
15. Wick,M., Zubov,D. and Hagen,G. (1999) Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene*, **232**, 97–106.

16. Kim,M.Y., Vankayalapati,H., Shin-Ya,K., Wierzba,K. and Hurley,L.H. (2002) Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 2098–2099.
17. Leem,S.H., Londono-Vallejo,J.A., Kim,J.H., Bui,H., Tubacher,E., Solomon,G., Park,J.E., Horikawa,I., Kouprina,N., Barrett,J.C. *et al.* (2002) The human telomerase gene: complete genomic sequence and analysis of tandem repeat polymorphisms in intronic regions. *Oncogene*, **21**, 769–777.
18. Phan,A.T. and Mergny,J.L. (2002) Human telomeric DNA: G-quadruplex, i-motif and Watson–Crick double helix. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4618–4625.
19. Kim,M.Y., Gleason-Guzman,M., Izbicka,E., Nishioka,D. and Hurley,L.H. (2003) the different biological effects of telomestatin and TMPyP4 can be attributed to their selectivity for interaction with intramolecular or intermolecular g-quadrplex structures. *Cancer Res.*, **63**, 3247–3256.
20. Rezler,E.M., Bearss,D.J. and Hurley,L.H. (2003) Telomere inhibition and telomere disruption as processes for drug targeting. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **43**, 359–379.
21. Siddiqui-Jain,A., Grand,C.L., Bearss,D.J. and Hurley,L.H. (2002) Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 11593–11598.
22. Darnell,J.C., Jensen,K.B., Jin,P., Brown,V., Warren,S.T. and Darnell,R.B. (2001) Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell*, **107**, 489–499.
23. Bonnal,S., Schaeffer,C., Créancier,L., Clamens,S., Moine,H., Prats,A.C. and Vagner,S. (2003) A single IRES containing a G-quartet RNA structure drives FGF-2 gene expression at four alternative translation initiation codons. *J. Biol. Chem.*, **278**, 39330–39336.
24. Sirand-Pugnet,P., Durosay,P., Brody,E. and Marie,J. (1995) An intronic (A/U)GGG repeat enhances the splicing of an alternative intron of the chicken β-tropomyosin pre-mRNA. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3501–3507.
25. Cogan,J.D., Prince,M.A., Lekhakula,S., Bundey,S., Futrakul,A., McCarthy,E.M. and Phillips,J.A.,3rd (1997) A novel mechanism of aberrant pre-mRNA splicing in humans. *Hum. Mol. Genet.*, **6**, 909–912.
26. Fukuda,H., Katahira,M., Tsuchiya,N., Enokizono,Y., Sugimura,T., Nagao,M. and Nakagama,H. (2002) Unfolding of quadruplex structure in the G-rich strand of the minisatellite repeat by the binding protein UP1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 12685–12690.
27. Dallaire,F., Dupuis,S., Fiset,S. and Chabot,B. (2000) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and UP1 protect mammalian telomeric repeats and modulate telomere replication *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 14509–14516.
28. Cocco,M.J., Hanakahi,L.A., Huber,M.D. and Maizels,N. (2003) Specific interactions of distamycin with G-quadruplex DNA. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2944–2951.
29. Weisman-Shomer,P., Cohen,E., Hershco,I., Khateb,S., Wolfovitz-Barchad,O., Hurley,L. and Fry,M. (2003) The cationic porphyrin TMPyP4 destabilizes the tetraplex form of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)n. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3963–3970.

χ. *Commentaires*

Dans ces travaux, nous montrons que le ligand 12459 n'inhibe pas totalement la transcription du gène hTERT, mais modifie l'épissage alternatif de son pré-ARNm dans la lignée A549.

Ce gène hTERT subit un épissage alternatif complexe pour former un transcrit actif +α+β, ainsi que des transcrits inactifs –α, –β et –α–β {Ulaner, 1998 #2252 (*Figure 59*).

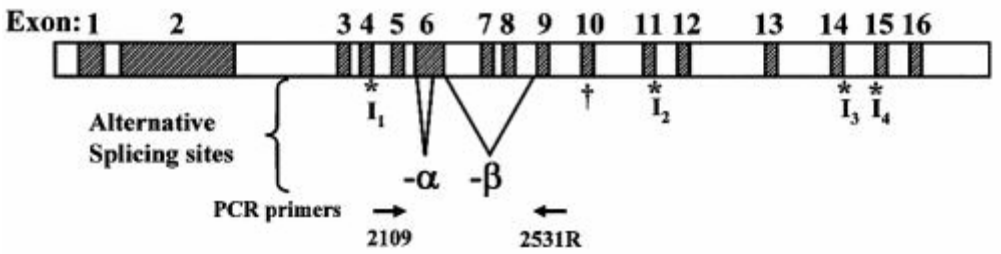


Figure 59. Organisation génomique du gène hTERT représentant les exons 1 à 16 ainsi que les insertions (I_1 à I_4) et les délétions (–α et –β) de l'épissage alternatif.

Dans nos expériences, nous observons une inhibition presque totale du transcrit actif +α+β et une augmentation du transcrit inactif -β. Ces données permettent d'expliquer la régulation négative de l'activité télomérase par le 12459, le raccourcissement de la taille des télomères et l'entrée en apoptose, observés dans les cellules A549 {Riou, 2002 #4039}.
La télomestatine et le BRACO19, deux autres ligands inhibiteurs de la télomérase, n'inhibent pas la transcription de hTERT, ni son épissage alternatif dans les mêmes conditions expérimentales (10µM, 48h). Ces données suggèrent que la modification de l'épissage alternatif du gène hTERT est spécifique du dérivé de triazine 12459.

Le séquençage du gène hTERT a montré que l'intron 6 présente des régions riches en guanines, G4TERT1, G4TERT2 et VNTR6-1 (Leem S. H., et al., 2002) (*Figure 60*), et présente de fortes homologies de séquences avec certaines régions intervenant dans l'épissage alternatif de l'ARNm de la β-tropomyosine chez le poulet. Nous avons cherché à déterminer le rôle du 12459 dans la formation des structures G-quadruplexes de l'intron 6 du gène hTERT par le test de « PCR stop assay ». Nous avons également évalué les effets du BRACO19, de la télomestatine et du TMPyP4 dans cet essai. Pour cela, nous avons utilisé 3 amorces dans lesquelles nous retrouvons les séquences riches en guanines G4TERT1, G4TERT2 et VNTR6-1 de l'intron 6 du gène hTERT (*Tableau 13*). Pour chaque oligonucléotide, nous avons déterminé la sélectivité des ligands avec des séquences mutées (G4TERT1mu, G4TERT2mu et VNTR6-1mu) (*Tableau 13*). Les CI50 obtenues par ces expériences sont présentées dans le *Tableau 14*.

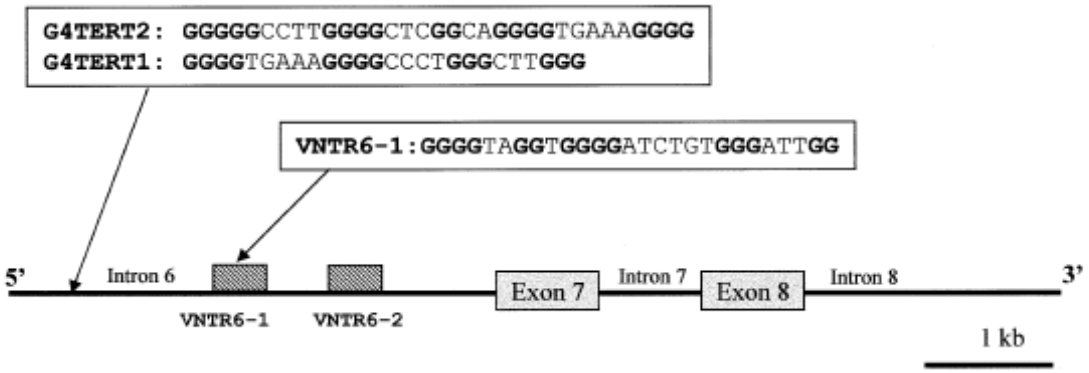


Figure 60. Séquences des régions G4TERT 1, G4TERT2 et VNTR6-1 de l'intron 6 du gène hTERT (Leem S. H., et al., 2002).

G4TERT1	**5'-GGG-GTG-AAA-GGG-GCC-CTG-GGC-TTG-GG-3'**	**40 pb avec AntiG4TERT1**
G4TERT1mu	**5'-AGG-ATG-AAA-GGA-GCC-CTG-AGC-TTG-GG-3'**	**40 pb avec AntiG4TERT1**
AntiG4TERT1	**5'-TCT-CGT-CTT-CCA-ATC-CCA-3'**	**-**
G4TERT2	**5'-GGG-GGC-CTT-GGG-GCT-CGG-CAG-GGG-TGA-AAG-GGG-3'**	**45 pb avec AntiG4TERT2**
G4TERT2mu	**5'-GAG-AGC-CTT-GAA-GCT-CGG-CAG-GAG-TGA-AAG-GGG-3'**	**45 pb avec AntiG4TERT2**
AntiG4TERT2	**5'-ACT-GCT-TCT-CGT-CCC-CTT-TC-3'**	**-**
VNTR6-1	**5'-GGG-GTA-GGT-GGG-GAT-CTG-TGG-GAT-TGG-3'**	**36 pb avec AntiVNTR6-1**
VNTR6-1mu	**5'-AGG-ATA-GGT-GAA-GAT-CTG-TGG-GAT-TGG-3'**	**36 pb avec AntiVNTR6-1**
AntiVNTR6-1	**5'-TCT-CGT-CTT-CCA-ATC-CCA-3'**	**-**

Tableau 13. Séquences des oligonucléotides utilisées et taille des fragments amplifiés dans le test de « PCR stop assay »

	Valeurs des CI_{50} (µM)					
Ligands	G4TERT1[a]	G4TERT1mu[b]	G4TERT2[b]	G4TERT2mu[b]	VNTR6-1[a]	VNTR6-1mu[b]
12459	1.75 ± 0.37	26	2	20	6.25 ± 1.8	20
Télomestatine	5.0 ± 1.7	10	6	10	6.25 ± 0.37	9
BRACO19	5.7 ± 1.1	7.7	>30	>30	>30	>30
TMPyP4	1.38 ± 0.28	1.39	1.8	1.8	2.37 ± 0.82	2.3

[a] Moyenne ± écartype de "quadruplicates".
[b] Moyenne de "duplicates".

Tableau 14. Effets du 12459, télomestatine, BRACO19 et TMPyP4 sur la formation des G-quadruplexes de l'intron 6 du gène hTERT mesuré par « PCR stop assay ».

Le ligand 12459 est plus actif que la télomestatine et le BRACO19 sur ces séquences (à l'exception de la télomestatine sur la séquence VNTR6-1 pour laquelle nous obtenons la même CI50). De plus, le 12459 est également plus sélectif vis-à-vis des séquences mutées, que la télomestatine et le BRACO19. Enfin, le TMPyP4 est un ligand actif sur ces 3 séquences mais n'est pas sélectif.

Ces résultats montrent que le 12459 stabilise les structures G-quadruplexes de l'intron 6 du gène hTERT, avec une préférence marquée pour les séquences G4TERT1 et 2. Nous avons émis l'hypothèse que les faibles activités ou sélectivités des ligands télomestatine, BRACO19 et TMPyP4 ne permettent pas d'induire des modifications de l'épissage alternatif de l'intron 6 du gène hTERT.

Afin de confirmer que cette modulation de l'épissage alternatif est bien due à l'action du 12459, nous avons réalisé les mêmes expériences dans des clones A549 résistants à ce ligand. Nous n'observons pas de modification de l'épissage de hTERT dans ces lignées résistantes et le profil d'épissage est identique à celui de la lignée parentale A549 en absence de traitement. Ces données laissent penser que l'épissage alternatif du gène hTERT pourrait être due à une stabilisation des G-quadruplexes de ces séquences.

Ces résultats montrent qu'un ligand stabilise les séquences quadruplexes de l'intron 6 de hTERT dans un modèle cellulaire unique. Nous avons voulu savoir si ces résultats pouvaient être étendus à d'autres lignées cellulaires et à d'autres ligands beaucoup sélectifs tel que le dérivé 307A.

Enfin, puisque l'épissage alternatif s'adresse au pré-ARNm, nous avons tenté d'évaluer directement l'effet de ces ligands sur la formation d'un G-quadruplexe ARN en modifiant l'essai « stop-PCR ».

δ. Résultats complémentaires

- <u>Action du ligand 307A sur les séquences G4TERT1, G4TERT2 et VNTR6-1 de l'intron 6 du gène hTERT</u>

Dans les expériences de « PCR stop assay » avec la séquence Pu22myc, nous avons observé que le 307A est le ligand le puissant et le plus sélectif. Nous avons donc testé cette molécule sur les G-quadruplexes de l'intron 6 du gène hTERT.

307A	*CI50 (µM)*	*CI50 (µM) des séquences mutées*	*coefficient de sélectivité*
G4TERT1	**1,54 ± 0,25**	**2,6 ± 0,3**	**1,7**
G4TERT2	**0,90 ± 0,05**	**>30**	**>33**
VNTR6-1	**3,58 ± 0,12**	**>30**	**>8,4**

Tableau 15. Effet du 307A sur la stabilisation des G-quadruplexes de l'intron 6 de hTERT par « PCR stop assay ».

Les résultats présentés dans le *Tableau 15* indiquent que le 307A possède une activité supérieure à celle observée avec le 12459 sur les G-quadruplexes de hTERT. Ce ligand est également très sélectif pour les régions G4TERT2 et VNTR6-1. Cependant sa sélectivité pour G4TERT1 est faible. Comme nous l'avons discuté dans le chapitre précédent, la séquence G4TERT1 comporte 3 guanines adjacentes à son extrémité 3', ce qui peut expliquer ce résultat.

Ces expériences *in vitro* suggèrent que le 307A est un bon candidat pour moduler l'activité d'épissage de hTERT.

- <u>Action des ligands sur l'épissage du gène hTERT dans les lignées RAMOS et CA46</u>

Nous avons examiné si les ligands 12459, télomestatine, TMPyP4 et 307A sont capables de moduler l'épissage du gène hTERT dans les lignées leucémiques RAMOS et CA46 en utilisant les mêmes conditions expérimentales que pour la lignée A549. Le transcrit de hTERT des cellules traitées est analysé par RT PCR, comparativement au transcrit de la β2-microglobuline servant de contrôle (*Figure 61*).

Comme pour la lignée A549, 10µM de télomestatine pendant 48h ne modifie pas l'épissage alternatif du gène hTERT. De même, 10µM 307A et 100µM TMPyP4 n'ont pas d'effet sur le transcrit de hTERT dans les lignées RAMOS et CA46. Par contre, le 12459 qui inhibait la transcription de la forme active de hTERT au profit d'une forme inactive –β dans la lignée A549, n'induit pas de modification de l'épissage alternatif de hTERT dans les lignées RAMOS et CA46. Les mêmes résultats ont été obtenus dans une autre lignée leucémique humaine HL60 (Dennis Gomez, communication personnelle).

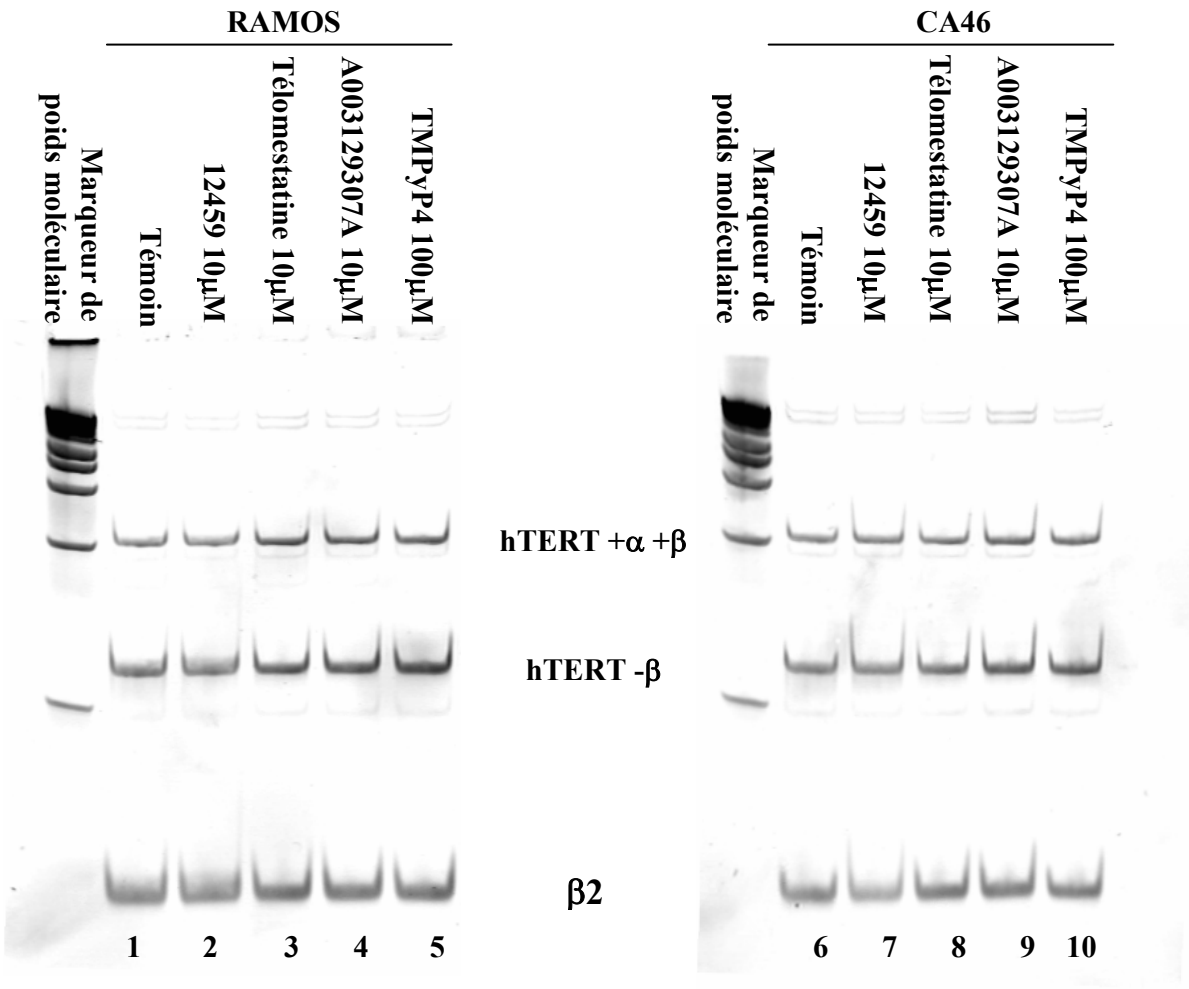


Figure 61. Effet des ligands sur l'épissage de hTERT et l'expression de la β2-microglobuline dans les lignées RAMOS et CA46, déterminés par RT-PCR.

De ces expériences, nous concluons que la modulation de l'épissage de hTERT par le 12459 est un événement spécifique de la lignée A549.

Il est possible que la spécificité de cet épissage induit par le 1249 dans la lignée A549 soit due à des altérations de l'expression ou du mode d'action d'un certain nombre de protéines impliquées dans la sélection des sites d'épissage tels que EWS et TLS (Theoleyre O., et al., 2004)ou des protéines capables d'interagir avec des facteurs d'épissage (hnRNPA1, hnRNPC1/C2, PSF ou des protéines de la famille SR) (Theoleyre O., et al., 2004) (Gabut M., et al., 2005).

- <u>Stabilisation des G-quadruplexes des séquences d'ARN U-G4TERT1, U-G4TERT2 et U-VNTR6-1</u>

Nous avons voulu déterminer si les ligands G4 sont capables de fixer et de stabiliser les G-quadruplexes des séquences d'ARN de l'intron 6 du gène hTERT. Le test PCR n'est pas

utilisable puisque la *taq* polymérase n'est pas capable de polymériser de l'ARN. Un nouveau test basé sur l'hybridation d'oligonucléotides d'ARN (U-VNTR6-1, U-TERT1 et U-TERT2) (*Tableau 16*) avec un oligonucléotide d'ADN complémentaire a donc été mis au point. L'élongation du couple d'amorces est réalisée par la reverse transcriptase (RT), qui est capable d'allonger l'oligonucléotide d'ADN en utilisant l'amorce d'ARN (*Figure 62*).

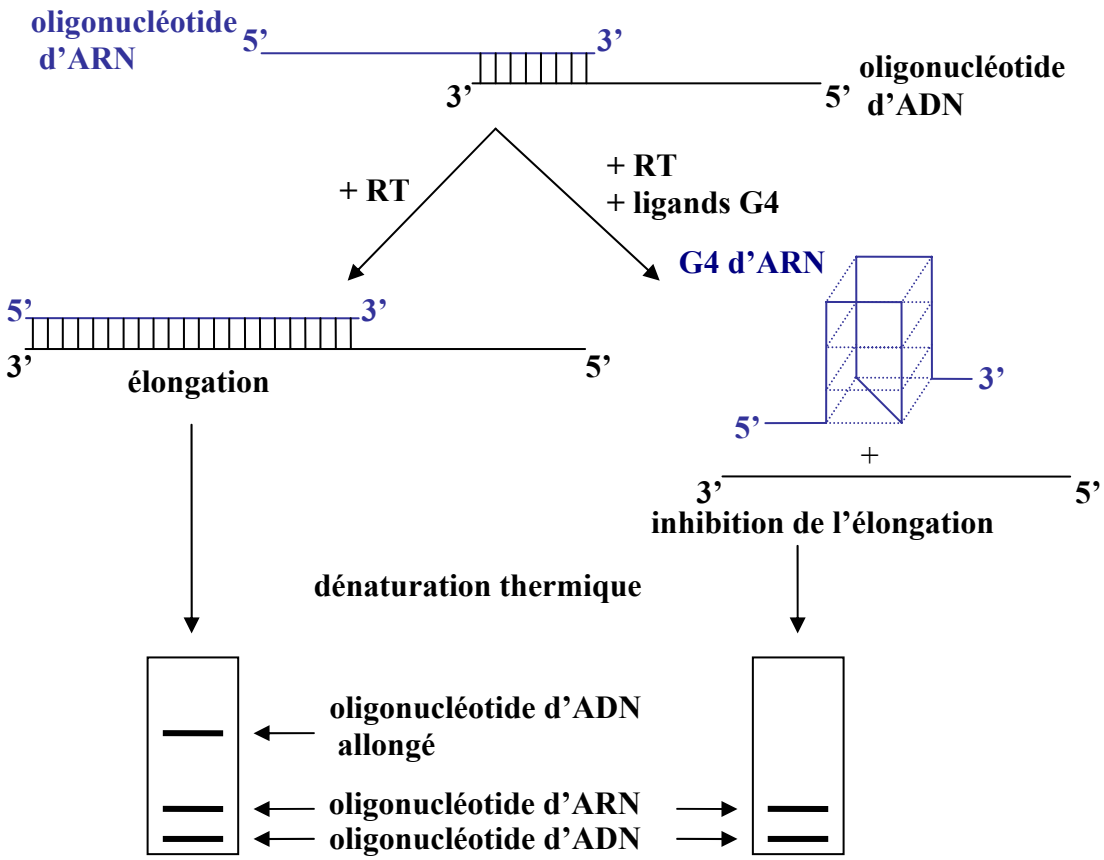


Figure 62. Représentation schématique du protocole « RT stop assay ».

Amorces	*Séquences*	*Taille des amorces*	*Taille des amorces allongées*
U-VNTR6-1	5'-GGG-GUA-GGU-GGG-GAU-CUG-UGG-GAU-UGG-3'	27b	-
AntiVNTR6-1	5'-TCT-CGT-CTT-CCA-ATC-CCA-3'	18b	36b
U-TERT1	5'-GGG-GUG-AAA-GGG-GCC-CUG-GGC-UUG-GG-3'	26b	-
AntiG4TERT1	5'-TCT-CGT-CTT-CCA-ATC-CCA-3'	18b	40b
U-TERT2	5'-GGG-GGC-CUU-GGG-GCU-CGG-CAG-GGG-UGA-AAG-GGG-3'	33b	-
AntiG4TERT2	5'-ACT-GCT-TCT-CGT-CCC-CTT-TC-3'	20b	45b

Tableau 16. Séquences des amorces d'ARN utilisées lors du test RT stop assay.

La reverse transcriptase allonge l'oligonucléotide d'ADN en formant une séquence de 36b pour U-VNTR6-1, de 40b pour U-G4TERT1 et de 45b pour U-G4TERT2. En présence de ligands, la stabilisation d'un G-quadruplexe d'ARN provoque l'inhibition de l'hybridation entres les séquences d'ADN et d'ARN et donc une absence d'élongation par la reverse transcriptase. Les activités de stabilisation des G-quadruplexes d'ARN par différents ligands peuvent être étudiées en déterminant les CI50 des amorces d'ADN allongées.

Différents ligands de G-quadruplexes ont donc été testés afin de déterminer leur propension à stabiliser un G-quadruplexe d'ARN. A titre d'exemple, la *Figure 63* montre le « RT stop assay » du couple d'oligonucléotides U-VNTR6-1/antiVNTR6-1 en présence de télomestatine, de 12459 et de 307A. Les valeurs des CI50 obtenues sont indiquées dans le *Tableau 17*.

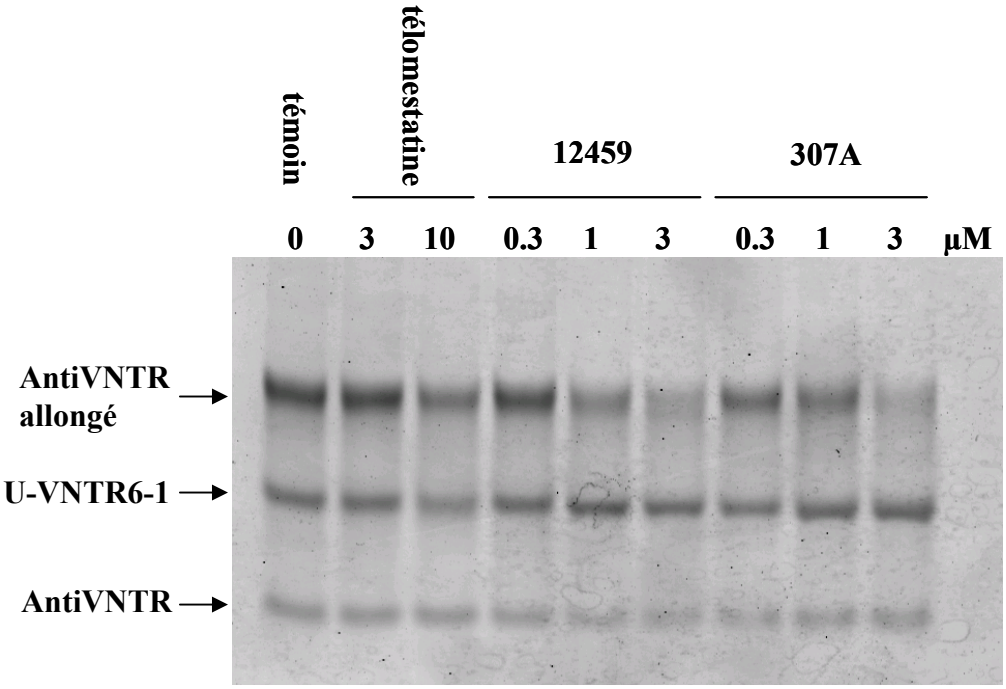


Figure 63. « RT stop assay » du couple d'oligonucléotides U-VNTR6-1/antiVNTR en présence des ligands télomestatine, 12459 et 307A. antiVNTR6-1 présente une taille de 18 nucléotides, U-VNTR6-1 : 27 nucléotides et antiVNTR6-1 allongé : 36 nucléotides.

Nos résultats indiquent que ces ligands bloquent également le « RT stop assay », ce qui traduirait une activité de ces molécules sur des formes G-quadruplexes d'ARN. Le 12459 est plus actif que la télomestatine sur ces trois séquences. Le BRACO19 parait être aussi actif que le 12459 sur les G-quadruplexes d'ARN (à l'exception de U-TERT2 pour laquelle nous observons un facteur 2) mais les expériences pour ce ligand ont été réalisées une seule fois et doivent être confirmées par des manipulations supplémentaires. Les dérivés 307A et 360A de

la série des pyridines dicarboxamides sont également actifs et présentent les valeurs de CI50 les plus faibles pour U-VNTR6-1 et U-TERT2.

	U-VNTR6-1	*U-TERT1*	*U-TERT2*
	CI50 ± écartype		
télomestatine	**4,2 ± 1,1**	**5,9 ± 0,5**	**3,0 ± 0,6**
12459	**0,83 ± 0,08**	**2,9 ± 0,5**	**2,57 ± 0,09**
307A	**1,0 ± 0,4**	**3,4 ± 0,2**	**1,1 ± 0,6**
360A	**0,45 ± 0,2**	**3,6 ± 0,4**	**1,2 ± 0,2**
*BRACO19**	**0,9**	**2,8**	**4,6**

Tableau 17. Effets des ligands télomestatine, 12459, 307A, 360A et BRACO19 pour les couples d'oligonucléotides U-VNTR6-1/antiVNTR, U-TERT1/antiTERT1 et U-TERT2/antiTERT2 dans le « RT stop assay ». (*) : Réalisée une seule fois.

c. Discussion et conclusion

La comparaison des tests de « PCR stop assay » et « RT stop assay » pour les séquences ADN et ARN indiquent que les ligands de G-quadruplexes sont plus actifs sur la séquence U-VNTR6-1 que sur son homologue ADN, avec une différence remarquable pour le 307A, le 12459 et le BRACO19 (*Figure 64*). Pour les 2 autres séquences, les rapports ADN/ARN des CI50 sont au plus d'un facteur 2, soit en faveur de l'ADN, soit en faveur de l'ARN (sauf pour le BRACO19 qui est plus puissant pour stabiliser les G-quadruplexes d'ARN). Ces données montrent que les ligands G4 sont aussi capables de stabiliser des G-quadruplexes d'ARN mais qu'il existe une forte variabilité entre l'ADN et l'ARN, en fonction de la séquence primaire capable de former un G-quadruplexe.

La faible activité du 12459 vis-à-vis du G-quadruplexe d'ADN de VNTR6-1 en comparaison avec celles obtenues pour les séquences G4TERT1 et G4TERT2 pourrait nous faire penser que ces deux dernières séquences interviendraient préférentiellement dans l'épissage alternatif de hTERT. Cependant, les résultats obtenus sur les G-quadruplexes d'ARN montrent qu'à l'inverse, ce ligand est plus actif pour la séquence VNTR6-1. La relation entre l'effet *in vitro* sur les G-quadruplexes ARN et sur l'épissage de hTERT reste à déterminer, d'autant plus que nous n'avons pas observé de modulation de l'épissage par le 12459 ou le 307A sur des modèles cellulaires autres que A549.

Des études de fluorescence confirment que la séquence U-VNTR6-1 forme un G-quadruplexe (Lacroix L., résultats non publiés). De plus, l'addition de 12459 stabilise la formation de ce G-quadruplexe. Les résultats sont moins clairs pour U-TERT1 et U-TERT2 et il n'est pas exclu que ces séquences d'ARN forment des structures secondaires autres qu'un

G-quadruplexe. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour confirmer nos résultats avec le test « RT stop assay ».

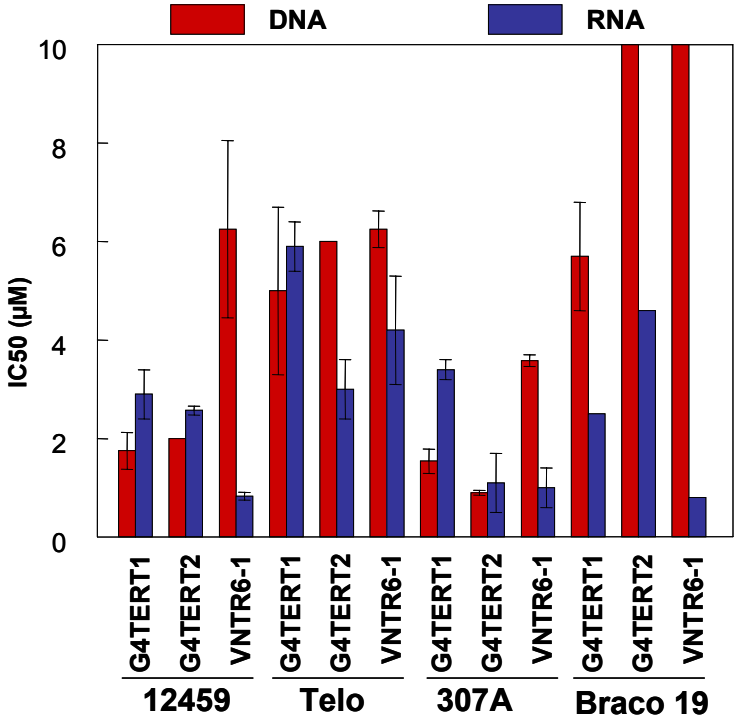


Figure 64. Comparaison des CI50 obtenues par les tests de « PCR stop assay » et « RT stop assay »

Des G-quadruplexes d'ARN ont déjà été décrits *in vitro* (Patel P. K., et al., 1999) (Pan B., et al., 2003a) (Pan B., et al., 2003b) et des travaux mettent en évidence leurs rôles potentiels dans plusieurs processus cellulaires, comme par exemple les structures IRES du facteur de croissance fibroblastique FGF-2 (Bonnal S., et al., 2003), ou chez le rétrovirus de l'immunodéficience humaine VIH (Marquet R., et al., 1991) (Sundquist W. I., et al., 1993). Des études de cinétique ont montré des différences importantes dans la stabilité des G-quadruplexes d'ADN et d'ARN (Mergny J. L., et al., 2005). En effet, le G-quadruplexe tétramoléculaire d'ARN r-UG_4U présente une plus forte stabilité que son homologue d'ADN d-TG_4T, résultant d'une association beaucoup plus rapide (350 fois plus à 30°C) et d'une dissociation plus faible (1000 fois moins à 60°C). Par contre, des G-quadruplexes bimoléculaires et intramoléculaires d'ARN sont moins stables que leurs homologues d'ADN en présence de sodium (Mergny J. L., et al., 2005). JL Mergny propose que cette différence puisse être expliquée par une difficulté plus importante d'adopter une conformation en *syn* pour des résidus nucléosidiques intervenant dans la formation de G-quadruplexes antiparallèles.

Enfin, nos résultats représentent la première mise en évidence que des ligands de l'ADN G-quadruplexe peuvent également stabiliser des G-quadruplexes d'ARN. Ces données pourraient ouvrir de nouvelles voies d'études thérapeutiques dans la recherche de médicaments pour de nombreuses pathologies (par exemple : stabiliser les G-quadruplexes d'ARN du virus VIH afin d'inhiber sa multiplication virale).

3. Effet de l'insertion d'un G- quadruplexe dans une séquence codante

a. But du travail

De nombreuses régions du génome (rDNA, promoteurs) possèdent des séquences G-riches susceptibles de former des G-quadruplexes (Riou J. F., et al., 2003) (Maiti S., et al., 2003). Une analyse bioinformatique indique l'existence de motifs répétés de guanines dans les parties codantes de certains gènes, comme par exemple dans des promoteurs de gènes ou en amont du gène, voir au niveau du site d'initiation de la traduction ATG. Nous avons donc cherché à savoir si la présence d'un G-quadruplexe est capable de moduler la synthèse protéique en présence de ligands.

Nous avons inséré des répétitions de guanines dans la partie codante de l'ADNc de POT_1 et étudié l'expression de la protéine chimère à l'aide du vecteur d'expression pET22b, soit chez *E*. coli, soit *in vitro* par un système de transcription / traduction couplées utilisant un lysat de réticulocyte de poulet.

b. Construction d'ADNc chimères de POT_1

La première étape consiste à synthétiser et à produire le gène POT_1 chimérique possédant des séquences G-riches capables de former des G-quadruplexes. Nous possédions dans notre laboratoire une construction plasmidique pET22b-POT_1 contenant l'ADNc du fragment N-terminal de $hPOT_1$ entre les sites Nco I et Xho I. A l'aide d'amorces spécifiques, nous avons introduit deux types de G-quadruplexes entre ces deux sites (*Figure 65*). G4-1 correspond à la répétition de TTTGGGG présentant des similarités de séquence avec les télomères de certains ciliés (*Tetrahymena, Glaucoma* : TTGGGG, *Paramecium* : TTGGG, *Euplode* : TTTTGGGG...) (Wikipedia) (Lebel C., et al., 2004) et G4-2 correspond à la séquence télomérique humaine TTAGGG. L'insertion de ces séquences en aval de l'ATG dans le même cadre de lecture que POT_1 permet l'obtention de 2 protéines chimères dont 8 acides aminés de la partie N-terminale varient par rapport à POT_1.

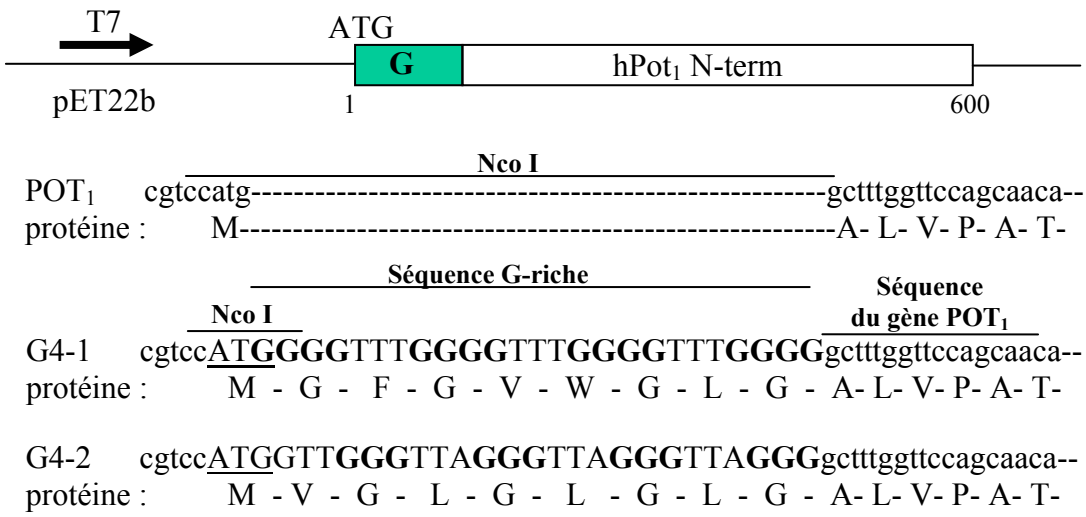


Figure 65. Représentation schématique de la construction des plasmides pET22b-G4-POT$_1$.

Pour G4-1, l'amplification est effectuée à l'aide d'un gradient de température et est optimale à 40°C (*Figure 66*).

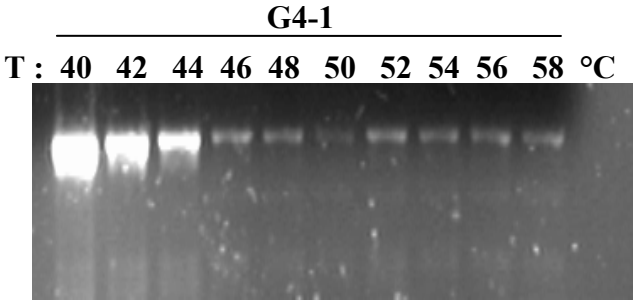


Figure 66. Gradient de température d'hybridation des amorces G4-1 dans l'amplification du gène POT$_1$.

Pour G4-2, le gradient de température ne nous a pas permis d'amplifier l'ADNc. Une technique de PCR par « touch down » a été utilisée et consiste à démarrer les cycles à une température d'hybridation élevée (68°C) et de réduire de 0,6°C à chaque cycle suivant. Cette méthode nous a permis d'obtenir l'ADNc G4-2-POT$_1$ (*Figure 67*).

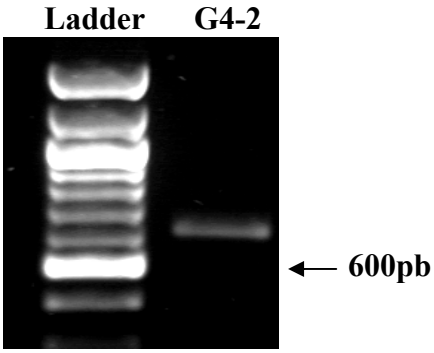


Figure 67. PCR « Touch Down » du gène POT$_1$ par l'amorce G4-2.

Nous avons ensuite introduit les ADNc G4-1-POT$_1$ et G4-2-POT$_1$ dans le vecteur pET22b au niveau des sites Nco I et Xho I et sélectionné les clones positifs pour chaque séquence (*Figure 68*).

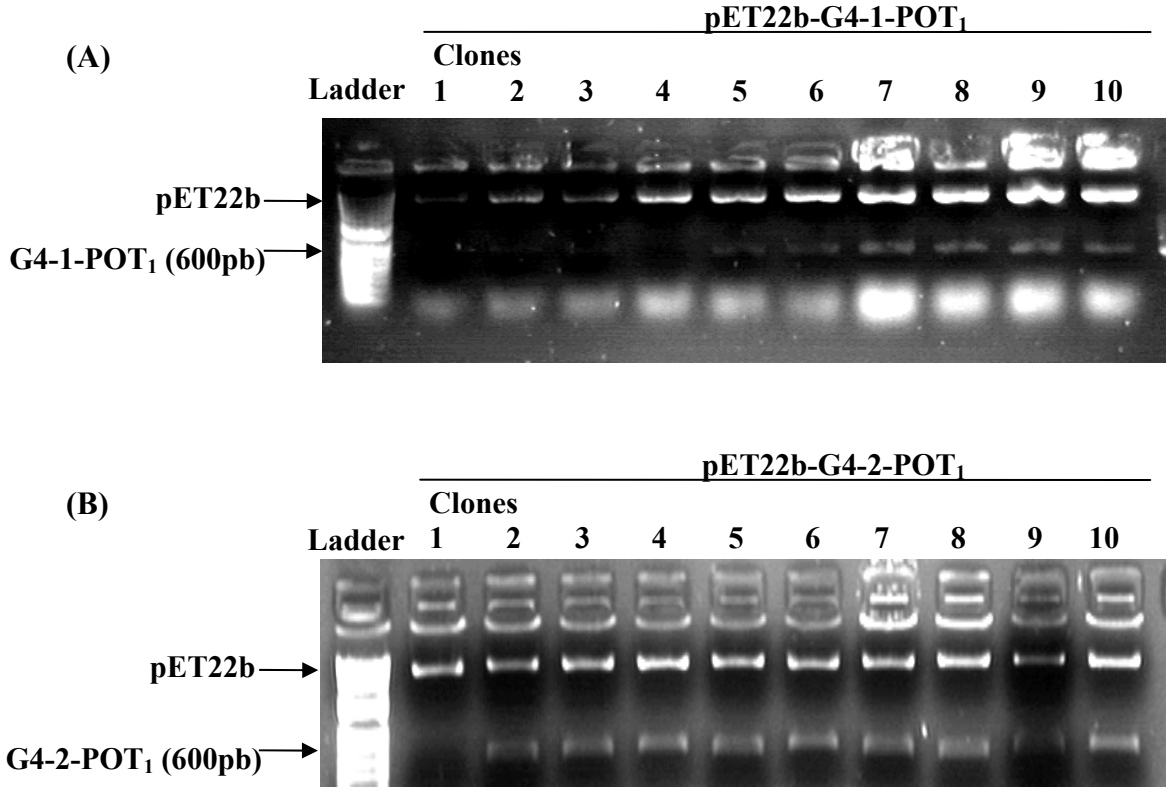


Figure 68. Contrôle de l'insertion de G4-1-POT$_1$ (A) et G4-2-POT$_1$ (B) dans le plasmide pET22b après coupure enzymatique par Xho I et Nco I. Les clones G4-1-POT$_1$ N°6 à 10 et G4-2-POT$_1$ N° 2 à 10 sont positifs.

Un certain nombre de ces clones ont été séquencés (*Figure 69*), ce qui nous permet de confirmer l'insertion de la séquence G-quadruplexe et l'absence de mutation dans 2 clones G4-1-POT$_1$ et 1 clone G4-2-POT$_1$.

G4-1.6-POT$_1$: CCAT**GGGG**TTT**GGGG**TTT**GGGG**TTT**GGGG**GCTTTGGTTCC----

G4-1.7-POT$_1$: CCAT**GGGG**TTT**GGGG**TTT**GGGG**TTT**GGGG**GCTTTGGTTCC----

G4-2.7-POT$_1$: CCATGGTT**GGG**TTA**GGG**TTA**GGG**TTA**GGG**TTGTTGGTTCC----

Figure 69. Résultats de la séquence des plasmides G4-1.6-POT$_1$, G4-1.7-POT$_1$ et G4-2.7-POT$_1$.

c. Synthèse protéique de G4-POT$_1$ dans *E.coli*

Afin de vérifier que nos clones étaient fonctionnels pour la formation d'une protéine chimère, nous avons transfecté les plasmides dans la bactérie BL21 et induit l'expression protéique par l'IPTG (1mM, 3h). L'analyse sur gel de l'expression protéique (coloration au bleu de Coomassie) (*Figure 70*) montre la formation d'une bande d'environ 20KDa dans les conditions d'induction qui correspond au fragment N-terminal de la protéine POT$_1$. Les clones G4-1.7 et G4-2.7 présentent l'expression de la protéine chimère, ce qui n'est pas le cas pour le clone G4-1.6. Ces données montrent que les constructions G4-1.7-POT$_1$ et G4-2.7-POT$_1$ sont en phase avec le cadre de lecture et peuvent être utilisés pour la suite de notre travail.

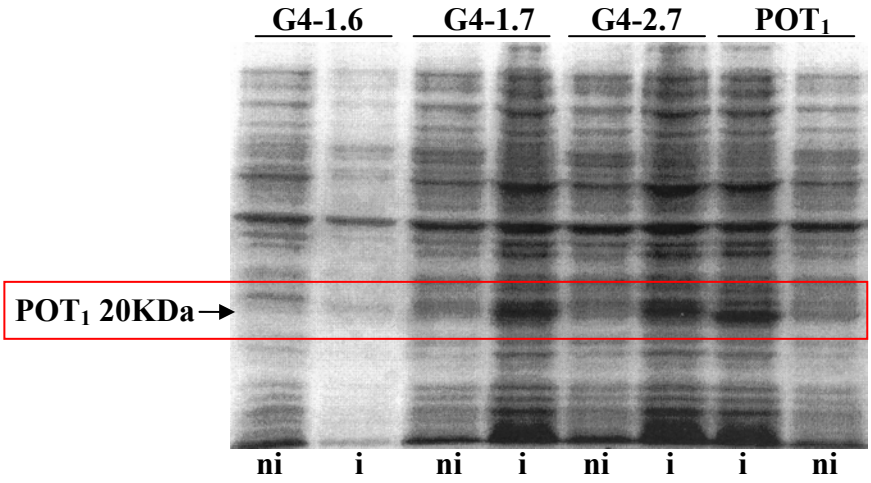


Figure 70. Mise en évidence de la synthèse de la protéine POT$_1$ dans les bactéries E. coli transfectées par les plasmides pET22b-G4-1-POT$_1$, pET22b-G4-2-POT$_1$ et pET22b-POT$_1$ (i : induit par IPTG. ni : non induit par IPTG).

d. Amplification PCR des plasmides pET22b-G4-POT$_1$

La première étape a été de vérifier si les séquences G4-1 et G4-2 insérées sont capables de former un G-quadruplexe. Pour cela, nous avons réalisé des PCR de la séquence N-terminale des constructions contenant ou non les G-quadruplexes en présence de ligands. La *Figure 71* résume la position des différentes amorces utilisées par rapport aux séquences insérées pour réaliser ces expériences de PCR.

Le couple d'oligonucléotides Lac/R139 est utilisé pour amplifier la région contenant les séquences insérées alors que les couples S188/R530 et S312/R530 vont servir de contrôles. Enfin, le contrôle interne de PCR du test TRAP (TSNT) est aussi utilisé comme contrôle pour comparer l'amplification des séquences G4-1, G4-2 et POT$_1$ entre elles (*Figure 72*).

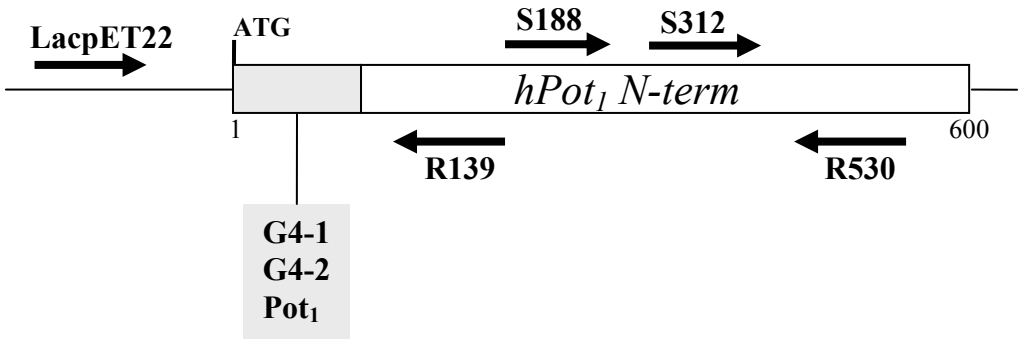
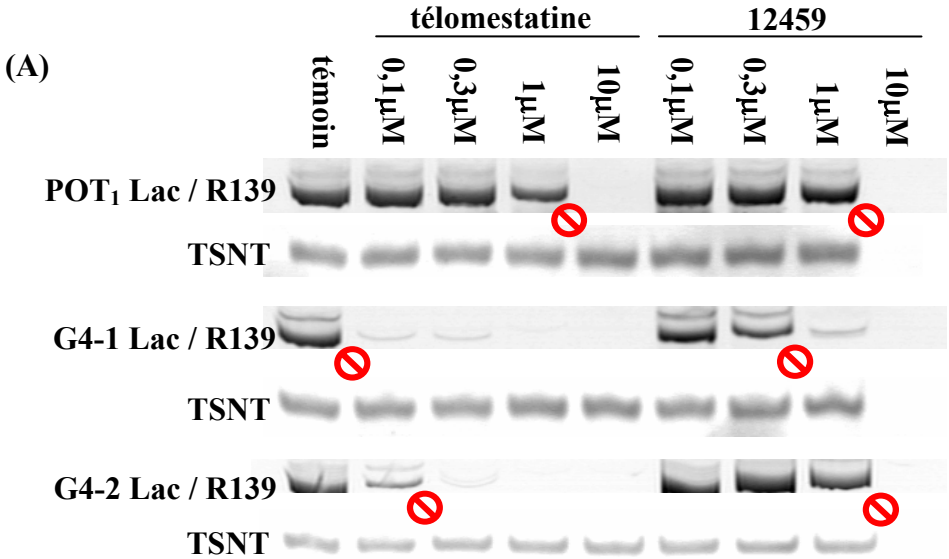
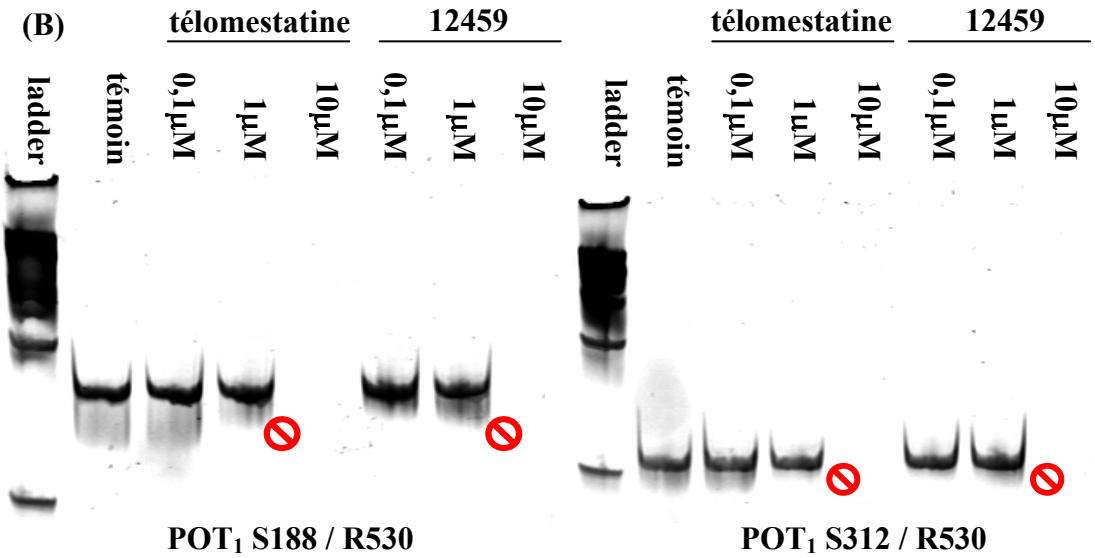


Figure 71. Localisation des différentes amorces utilisées dans les PCR des plasmides G4-POT$_1$.





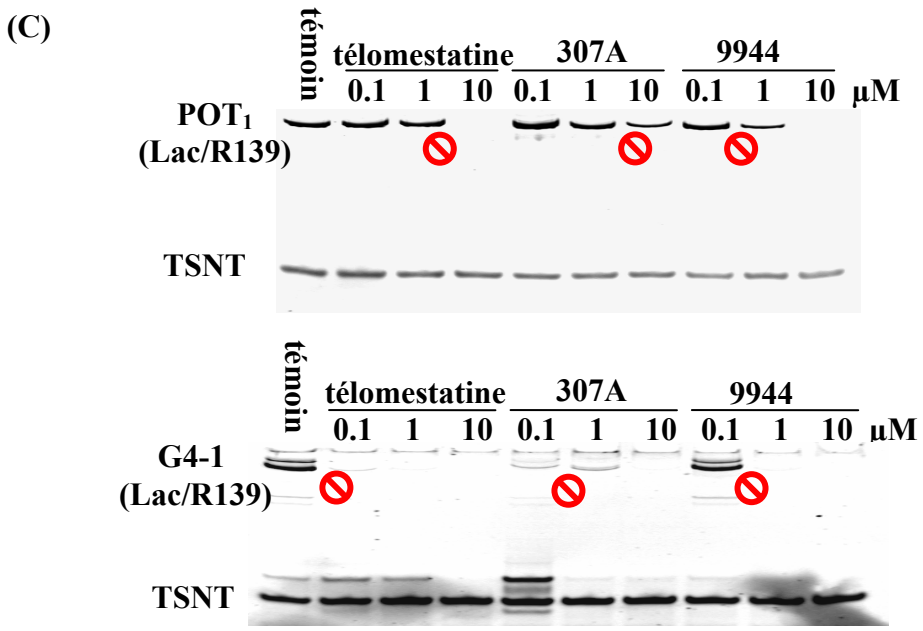


Figure 72. PCR des G4-POT$_1$ par les couples d'oligonucléotides Lac/R139 (A et C), S188/R530 et S312/R530 (B) en présence de concentrations croissantes de différents ligands de G-quadruplexes.

Pour les constructions G4-1-POT$_1$ et G4-2-POT$_1$, l'amplification de la région Lac/R139 a été réalisée en présence de concentration croissantes de ligands (*Figure 72A* et *C*). La télomestatine inhibe totalement l'amplification PCR du plasmide pET22bG4-1-POT$_1$ à 0,1µM et du plasmide pET22bG4-2-POT$_1$ à 0,3µM. Le 12459 inhibe la PCR de pET22bG4-1-POT$_1$ et pET22bG4-2-POT$_1$ à partir de 1 et 10µM, respectivement. Le 307A inhibe totalement la PCR du pET22bG4-1-POT$_1$ à 0,1µM et le 9944 à 1µM.

Pour la région Lac/R139, l'amplification de la séquence sauvage POT$_1$ est inhibée à des concentrations plus importantes de ligands : 10µM de télomestatine, de 12459 et de 9944 et une inhibition partielle par 10µM de 307A.

De plus, l'amplification des régions S188/R530 et S318/R530 du plasmide POT$_1$ est bloqué par la télomestatine et le 12459 à des concentrations identiques à celles obtenues pour le plasmide POT$_1$ dans la région Lac/R139.

Ces résultats suggèrent que ces différents ligands sont capables de stabiliser les G-quadruplexes G4-1 et G4-2 au cours des étapes de l'amplification PCR et de bloquer l'élongation par la *Taq* polymérase. Néanmoins, les résultats du contrôle TSNT indiquent une inhibition moins importante pour la télomestatine et pour le 9944 que pour les amplifications contrôles du plasmide POT$_1$ (régions Lac/R139, S188/R530 et S312/R530), ce qui suggère l'existence de séquence(s) reconnues par ces ligands et capables d'inhiber la PCR dans la séquence de l'ADNc de POT$_1$.

L'examen de cette séquence de POT_1 indique la présence de plusieurs répétitions de guanines potentiellement capables de former un G-quadruplexe, mais limitées à 2 plateaux de quartet (*Figure 73*). Par exemple au niveau de l'ATG, nous retrouvons la séquence ggcgatggcc***atg***gctttgg. Ces répétitions pourraient expliquer l'inhibition de l'amplification par la télomestatine et le 9944.

```
                Lac
-135 ggaattgtga gcggataaca attcccctct agaaataatt ttgtttaact
-85  ttaagaagga gatatacata tgaaatacct gctgccgacc gctgctgctg
-35  gtctgctgct cctcgctgcc cagccggcga tggccatggc tttggttcca
16   gcaacaaatt atatatatac acccctgaat caacttaagg gtggtacaat
66   tgtcaatgtc tatggtgttg tgaagttctt taagccccca tatctaagca
                                   R139
116  aaggaactga ttattgctca gttgtaacta ttgtggacca gacaaatgta
                                  S188
166  aaactaactt gcctgctctt tagtggaaac tatgaagccc ttccaataat
216  ttataaaaat ggagatattg ttcgctttca caggctgaag attcaagtat
                                   S312
266  ataaaaagga gactcagggt atcaccagct ctggctttgc atctttgacg
316  tttgagggaa ctttgggagc ccctatcata cctcgcactt caagcaagta
366  ttttaacttc actactgagg accacaaaat ggtagaagcc ttacgtgttt
416  gggcatctac tcatatgtca ccgtcttgga cattactaaa attgtgtgat
466  gttcagccaa tgcagtattt tgacctgact tgtcagctct tg........
                                R530
```

Figure 73. Séquence du gène POT_1 dans le plasmide PET22b, localisation des amorces et des répétitions de guanines.

En conclusion, nos constructions G4-1-POT_1 et G4-2-POT_1 peuvent former des G-quadruplexes sous l'action de ligands durant un processus tel que la réplication (PCR) où la séparation des 2 brins de l'ADN est effective.

e. PCR stop assay de la séquence télomérique du cilié G4-1

Dans le but de confirmer la stabilisation des G-quadruplexes des séquences télomériques du plasmide G4-1-POT_1, des expériences de « PCR stop assay » ont été réalisées sur la séquence G4-1 (G4-1b) et sur une séquence mutée (G4-1bmu) dans laquelle 3 guanines ont été remplacées par 3 adénines (*Tableau 18*). Les CI50 obtenues par ces expériences sont présentés dans le *Tableau 19*.

G4-1b	**5'-GGG-GTT-TGG-GGT-TTG-GGG-TTT-GGG-GAA-G-3'**	**40 pb avec AntiG4-1b**
G4-1b mu	**5'-GGG-GTT-TGA-AGT-TTG-GAG-TTT-GGG-GAA-G-3'**	**40 pb avec AntiG4-1b**
AntiG4-1b	**5'-ATC-GCT-TCT-CGT-CTT-CCC-CA-3'**	**-**

Tableau 18. Séquences des oligonucléotides utilisés lors du test de « PCR stop assay ».

	télomestatine	*12459*
	CI50 ± écartype	
G4-1b/antiG4-1b	**2,6 ± 0,6**	**1,6 ± 0,1**
G4-1bmu/antiG4-1b	**3,3 ± 0,7**	**9,7 ± 0,4**
Sélectivité	**1,3**	**6,1**

Tableau 19. Effets des ligands télomestatine et 12459 pour les couples d'oligonucléotides G4-1b/antiG4-1b et G4-1bmu/anti G4-1b, déterminés par « PCR stop assay ».

Le ligand 12459 possède une activité et une sélectivité en « PCR stop assay » similaires à ce qui a été obtenu par l'amplification des plasmides G4-1-POT_1 et POT_1 dans la région Lac/R139. La télomestatine montre par contre une variation importante de son activité et de sa sélectivité par rapport aux amplifications réalisées à partir des plasmides. Cette variation de sélectivité a déjà été observée pour les « PCR stop assay » de Pu22myc et 21G et pourrait s'expliquer par l'interaction de ce ligand avec les guanines de l'extrémité de l'oligonucléotide. Nous n'avons cependant pas d'explication simple concernant la différence d'activité de la télomestatine entre la structure oligonucléotidique et l'amplification du plasmide. L'insertion de G4-1 dans le cadre d'une séquence 5' et 3' pourrait modifier la formation et la stabilisation d'un G-quadruplexe par la télomestatine. Cette hypothèse ne peut être vérifiée que par la synthèse de différents oligonucléotides incorporant, entre 5' et 3', des séquences variables du plasmide.

f. Effet des ligands de G-quadruplexe sur la transcription / traduction des protéines chimères G4-1-POT_1 et G4-2-POT_1.

Afin de déterminer si l'insertion des G-quadruplexes pouvait moduler l'expression de la protéine chimère, nous avons évalué l'effet de ligands sur la transcription / traduction couplée (TnT) d'ADNc par un système de lysat de réticulocyte *in vitro* à partir du promoteur T7 de nos constructions. L'addition de méthionine [^{35}S] permet de visualiser la synthèse protéique finale de la réaction (voir Matériels et Méthodes). Des expériences préliminaires nous ont permis de montrer qu'une réaction TnT de 30 minutes permettait la détection des protéines contrôles POT_1, G4-1-POT_1 et G4-2-POT_1. En présence de télomestatine, nous

observons une inhibition de la synthèse des protéines POT_1 et G4-2-POT_1 à une concentration de 40µM (*Figure 74A*).

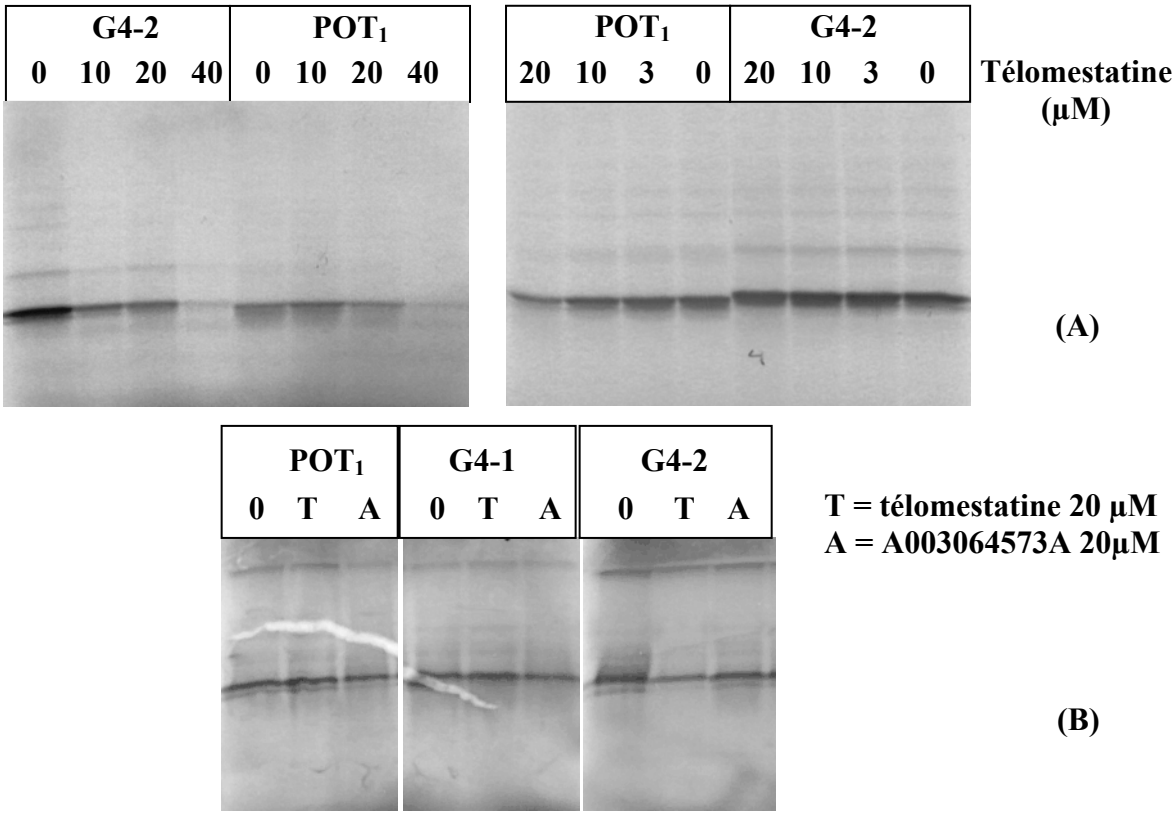


Figure 74. Transcription / traduction couplées des protéines POT_1, G4-1-POT_1 et G4-2-POT_1 en présence de télomestatine ou de A003064573A.

Une inhibition partielle mais non reproductible sur ces constructions est observée en présence de 20µM de télomestatine ou du dérivé de triazine A003064573A (*Figure 74A et B*). De ces expériences, nous concluons que l'insertion d'une séquence G-quadruplexe dans la partie codante d'une protéine ne modifie pas l'expression de cette protéine par rapport au contrôle en présence d'un ligand de G-quadruplexe.

Sachant que la réaction de TnT implique 2 étapes successives de transcription et de traduction, nous avons cherché à différencier l'effet de ces ligands sur ces 2 étapes. Pour étudier l'effet des ligands au niveau de l'étape de traduction, nous avons modifié l'essai en ajoutant le ligand et la méthionine [^{35}S] après 30 minutes (*Figure 75*).

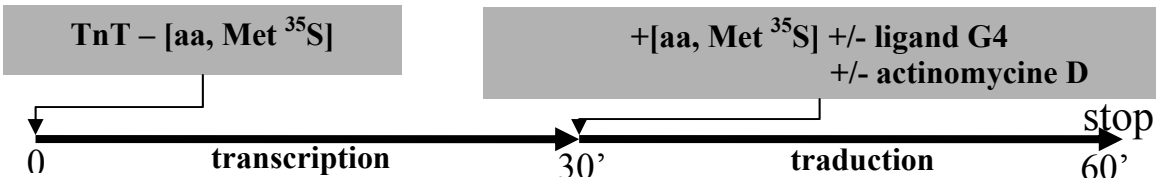


Figure 75. Représentation schématique du test TnT avec l'ajout de ligands G4 uniquement lors des processus de traductions.

Nous avons également utilisé l'actinomycine D, dont la structure plane permet une intercalation spécifique à l'ADN, notamment au niveau de la séquence dATGCAT, inhibant ainsi fortement la synthèse de l'ARN (Heron J. F., 2005). L'addition après 30 minutes d'actinomycine D ne modifie pas la synthèse des protéines, ce qui indique que la synthèse d'ARNm n'est pas en quantité limitante (*Figure 76*).

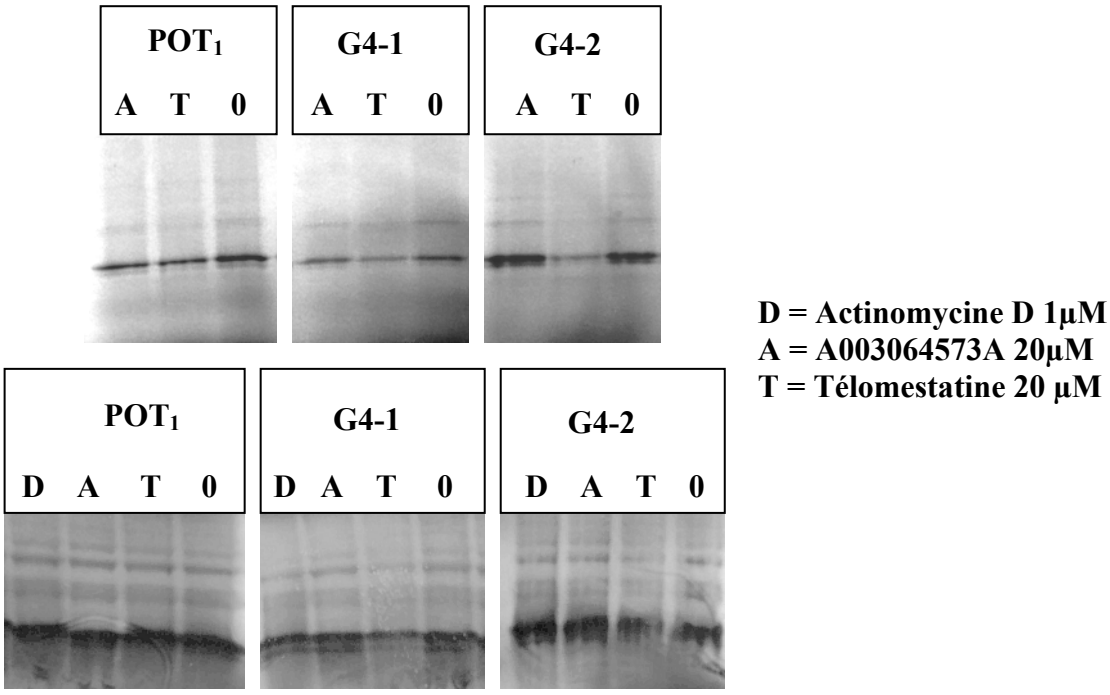


Figure 76. Transcription / traduction couplées des protéines POT_1, G4-1-POT_1 et G4-2-POT_1 en présence de télomestatine, d'actinomycine D ou de A003064573A. Les ligands ne sont présents que pendant l'étape de traduction.

Dans ces expériences, la télomestatine induit une diminution de la synthèse des protéines chimères G4-1-POT_1 et G4-2-POT_1 mais pas de la protéine sauvage POT_1, ce qui indique que la télomestatine bloque la traduction des ARNm. En revanche, aucun effet n'est observé pour le dérivé A003064573A.

Afin de déterminer si ces ligands pourraient agir au niveau de l'étape de transcription, nous avons étudié la transcription *in vitro* de ces constructions à partir du promoteur T7 par la

T7 polymérase. Les ARNm néo-synthétisés sont marqués par incorporation de [^{32}P]UTP. La migration est réalisée dans un gel d'agarose, soit dans les conditions natives, soit après une dénaturation thermique à 70°C pendant 10 minutes (*Figure 77*).

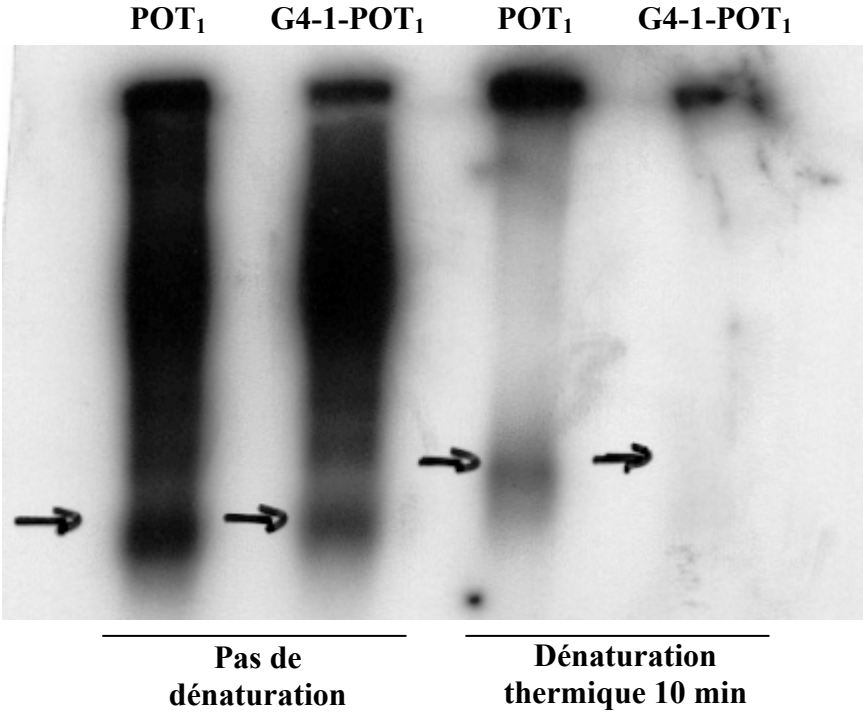


Figure 77. Transcription in vitro des plasmides pET22b-POT$_1$ et pET22b G4-1-POT$_1$.

Dans les 2 conditions d'électrophorèse (dénaturant et non dénaturant), la transcription de l'ARNm de POT$_1$ est inhibée pour le plasmide pET22bG4-1-POT$_1$ par rapport au plasmide pET22bPOT$_1$. Des G-quadruplexes se formant sur la séquence G4-1, en absence de ligand, pourraient expliquer l'inhibition de la transcription. Néanmoins, des expériences complémentaires doivent être réalisées pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Dans un premier temps, il serait indispensable d'utiliser un contrôle négatif dans lequel, une séquence G4-1 mutée serait incapable de former un G-quadruplexe. Dans un deuxième temps, il serait intéressant de réaliser ces expériences en présence de différents ligands afin de déterminer si une stabilisation des G-quadruplexes inhiberait d'avantage la transcription.

g. Discussion

L'insertion de 2 séquences susceptibles de former des G-quadruplexes au niveau de la séquence N-terminale du gène POT$_1$ nous a permis de synthétiser 2 protéines chimères dans lesquelles 8 acides aminés varient par rapport à la protéine sauvage. Ces deux séquences correspondent au télomère humain, ou à des répétitions de nucléotides présentant des

similarités avec les télomères de certains ciliés. Par des techniques de PCR, nous avons montré que des ligands sont capables de stabiliser ces structures en G-quadruplexes et d'inhiber l'amplification d'une partie de la séquence N-terminale du gène POT_1 dans nos constructions.

La sélectivité du 307A est la plus importante parmi les ligands utilisés puisque aucune inhibition n'est observée jusqu'à 10µM pour les contrôles POT_1 et TSNT. Par contre, les ligands télomestatine et 9944 présentent une inhibition de l'amplification de POT_1, suggérant que certaines régions de ce gène présentent des répétitions de guanines susceptibles de former des G-quadruplexes. Une analyse de la séquence de POT_1 indique qu'au niveau de l'ATG, il existe une séquence ggcgatggcc***atg***gctttgg qui pourrait être capable de former un G-quadruplexe à 2 plateaux de guanines.

L'insertion de G4-1 dans le cadre d'une séquence 5' – 3' modifie la formation et la stabilisation d'un G-quadruplexe par ce ligand, comparativement au test de « PCR stop assay » utilisant l'oligonucléotide G4-1. Des travaux réalisés par J.L. Mergny ont montré qu'en présence de Na^+, l'ajout de TTTAA en 5' de la séquence 5'-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3' fait chuter le T_m du G-quadruplexe de 58°C à 44°C et qu'en présence de K^+, il diminue de 65°C à 55°C (Mergny J. L., et al., 1998b). Ces données suggèrent que l'insertion de G4-1 dans le plasmide pourrait modifier l'activité de la télomestatine sur le G-quadruplexe.

Dans le but de compléter ce travail, des expériences complémentaires de PCR et de « PCR stop assay » utilisant les séquences G-riches retrouvées au niveau du gène POT_1 (comme par exemple au niveau de l'ATG) seraient intéressantes à réaliser.

De même, il serait également intéressant d'utiliser les oligonucléotides incorporant des séquences « flanquantes » variables autour du G4-1.

L'action des ligands sur la transcription et la traduction des protéines chimères de POT_1 montre que l'insertion d'une séquence G-quadruplexe dans la partie codante de la protéine POT_1 ne modifie pas son expression par rapport à la protéine contrôle. Par contre, la télomestatine est capable d'inhiber l'étape de traduction des ARNm dans le test TnT. De même, nos expériences préliminaires sur la transcription *in vitro* suggèrent que cette étape pourrait être inhibée par la présence de séquences capables de former des G-quadruplexes. L'absence d'inhibition du test TnT par les ligands pourrait s'expliquer par la présence de nombreux facteurs protéiques dans le lysat de réticulocyte. La présence de protéines nucléaires capables de résoudre les structures G-quadruplexe (hélicases, topoisomérases...) pourrait permettre d'inhiber l'action des ligands.

Par contre, lorsqu'on utilise un système de transcription *in vitro* dans lequel seuls les facteurs essentiels à la synthèse d'ARN sont présents, une inhibition de la transcription est observée.

Il est donc possible que dans un contexte intracellulaire, des mécanismes de régulation de ces structures quadruplexes interviennent pour inhiber l'action des ligands. Afin de vérifier si des protéines nucléaires interviennent dans la déstabilisation des G-quadruplexes, l'insertion d'extraits de ces protéines dans des tests de transcription et de traduction *in vitro* pourraient permettre l'étude de cette hypothèse.

B. Action de ligands G4 sur la croissance cellulaire

1. But du travail

Environ 20% des cellules cancéreuses ou immortalisées n'expriment pas la télomérase mais maintiennent leur taille de télomère par des mécanismes de recombinaison génétique (Bryan T. M., et al., 1997). Ces cellules ALT présentent des télomères de tailles importantes et hétérogènes. (Henson J. D., et al., 2002). L'acridine pentacyclique RHPS4 décrite comme étant capable d'inhiber l'activité télomérase en test TRAP est également capable, après 15 jours d'incubation en présence de dose subtoxiques, d'induire la sénescence cellulaire de la lignée télomérase positive 21NT et de la lignée ALT GM847 (Gowan S. M., et al., 2001). Ces données suggèrent que ce ligand agit sur le substrat de la télomérase, le télomère et que cette action est possible dans des lignées télomérases positives et dans des lignées ALT.

De plus, des travaux du groupe de L. Hurley suggèrent que la télomestatine est plus active pour stabiliser le G-quadruplexe télomérique intramoléculaire que le G-quadruplexe intermoléculaire. Ces auteurs montrent également que la télomestatine inhibent préférentiellement la prolifération cellulaire d'une lignée télomérase positive en comparaison avec une lignée ALT (Kim M. Y., et al., 2003).

Nous avons cherché à savoir quels sont les effets de deux ligands G4 sélectifs, le 307A et la télomestatine, dans un système ALT dans lequel on peut reconstituer l'activité télomérase afin de déterminer l'importance de cette protéine dans l'activité de ces ligands.

2. Action de ligands G4 sur des lignées dérivées de la souche fibroblastique humaine MRC5

a. Caractérisation des lignées MRC5V1, MRC5V1-MIGR1, MRC5V1-hTERT et MRC5V1-DNhTERT

Nous avons obtenus ces 4 lignées auprès de F. Megnin Chanet et nous avons vérifié l'expression de hTERT dans chacun de ces clones par RT PCR comparativement au transcrit de la β2-microglobuline servant de contrôle (*Figure 78*). Le transcrit de hTERT dans la lignée ALT GM847 a également été quantifié, servant de contrôle négatif.

L'expression de hTERT par RT PCR montre les formes caractéristiques de l'épissage de hTERT (+α+β et -β). Les résultats indiquent que la lignée parentale MRC_5V_1, la lignée MRC_5V_1-MIGR1 transfectée par le plasmide MIGR1 sans insert et la lignée GM847 ne présentent pas de forme active de hTERT mais possède une faible expression de la forme inactive. Par contre, les lignées MRC_5V_1-hTERT et MRC_5V_1-DNhTERT transfectées par le

plasmide MIGR1 contenant hTERT ou DNhTERT, respectivement, présentent une surexpression de la forme +α+β. Ces résultats confirment les transfections des lignées MRC_5V_1-hTERT et MRC_5V_1-DNhTERT.

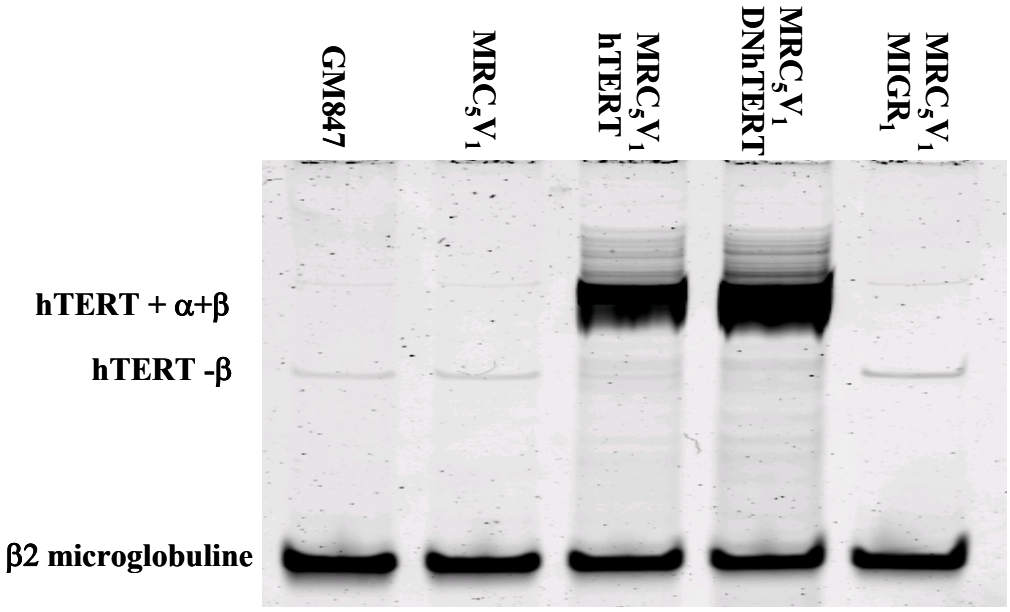


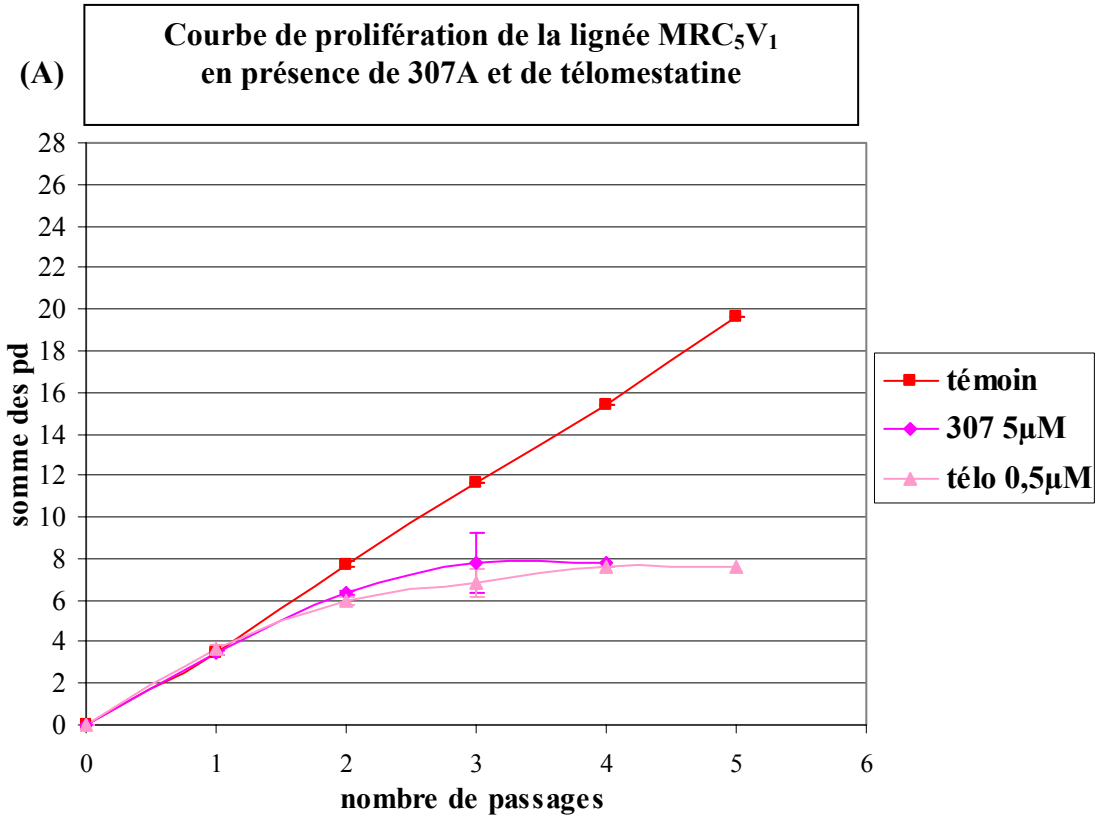
Figure 78. RT PCR de hTERT dans les lignées GM847, MRC5V1, MRC5V1-MIGR1, MRC5V1-hTERT et MRC5V1-DNhTERT

b. Action de ligands G4 sur l'entrée en sénescence

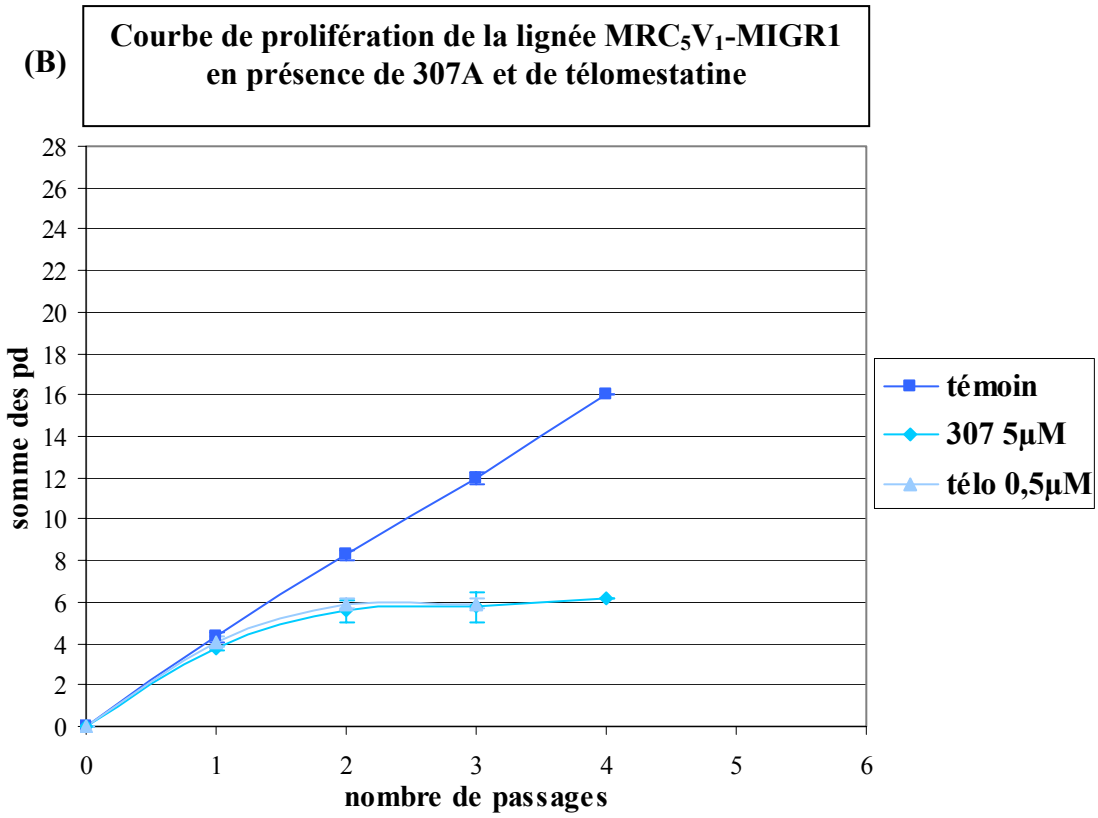
Des tests préliminaires de cytotoxicité ont montré que les ligands 307A et télomestatine n'induisent pas de mort cellulaire aux concentrations de 5µM et 0,5µM respectivement, après 4 jours de traitement, mais provoquent l'entrée en sénescence des cellules. Ces concentrations sont donc retenues dans le but d'étudier l'entrée en sénescence dans la lignée ALT MRC_5V_1 ainsi que dans les clones présentant une surexpression de hTERT ou de son dominant négatif DNhTERT (*Figure 79*).

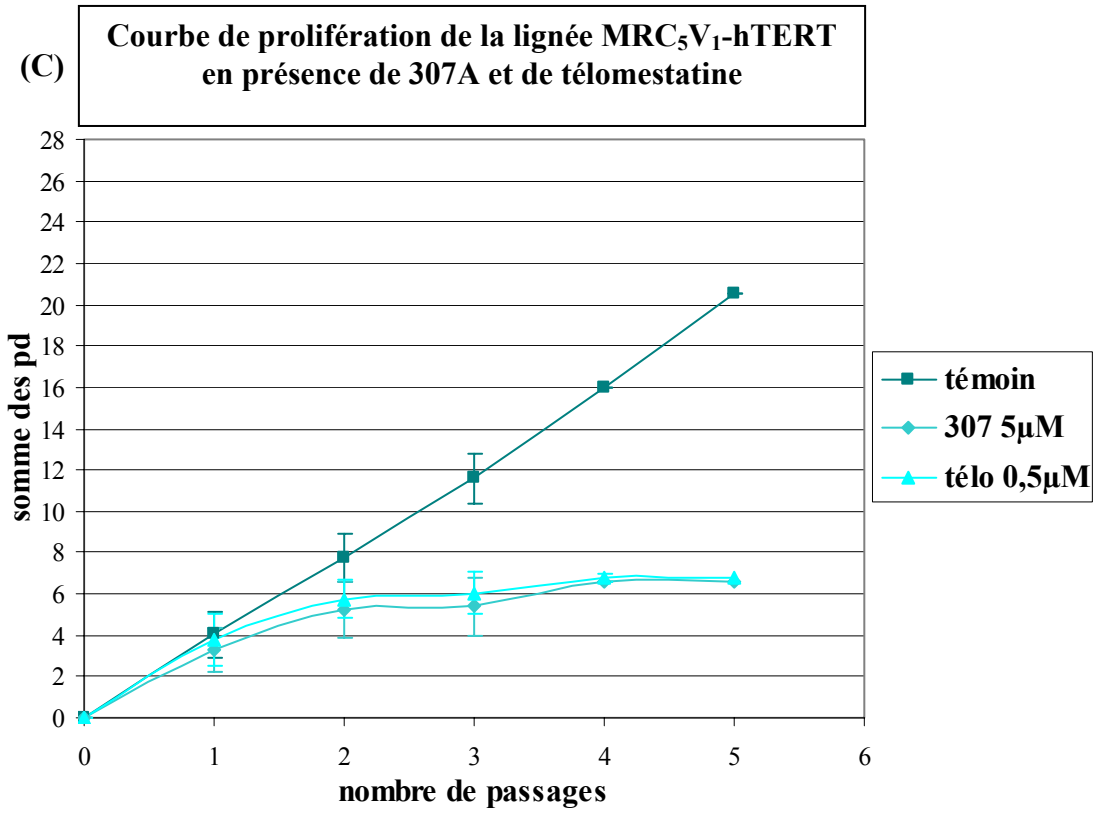
En absence de ligand, les 4 lignées présentent le même doublement de population, environ une division cellulaire par jour. En présence de 307A et de télomestatine, la sénescence est induite de façon similaire pour les 4 lignées. Le doublement de population diminue à partir du deuxième passage. A partir du quatrième passage, la sénescence est atteinte entre 6 et 8 doublements de population. Ces données montrent que les lignées ALT transfectées par hTERT ou par DNhTERT atteignent la sénescence au même moment et après le même nombre de division cellulaire que la lignée parentale MRC_5V_1 ou la lignée MRC_5V_1-MIGR1 transfectée par le plasmide sans insert.

(A)


Courbe de prolifération de la lignée MRC5V1
en présence de 307A et de télomestatine
somme des pd
nombre de passages
témoin
307 5µM
télo 0,5µM

(B)


Courbe de prolifération de la lignée MRC5V1-MIGR1
en présence de 307A et de télomestatine
somme des pd
nombre de passages
témoin
307 5µM
télo 0,5µM



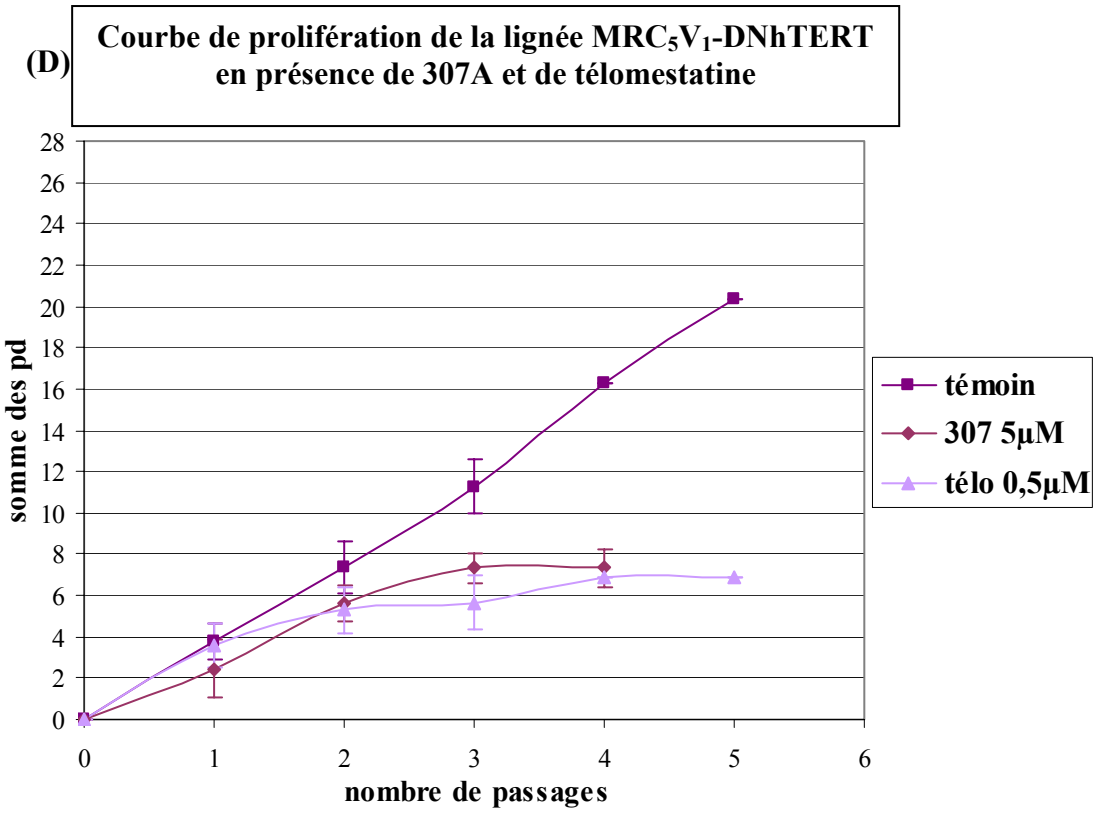


Figure 79. Courbes représentant les doublements de population (pd) des lignées MRC_5V_1 (A), MIGR1 (B), hTERT (C) et DNhTERT (D) en absence de ligand (témoin) et en présence de 307A (5µM) et de télomestatine (0,5µM). Chaque passage correspond à 4 jours de croissance cellulaire en présence de ligands.

Afin d'expliquer ces résultats, nous avons voulu vérifier l'expression de l'activité télomérase dans ces lignées transfectées. Un test TRAP a donc été réalisé (*Figure 80*).

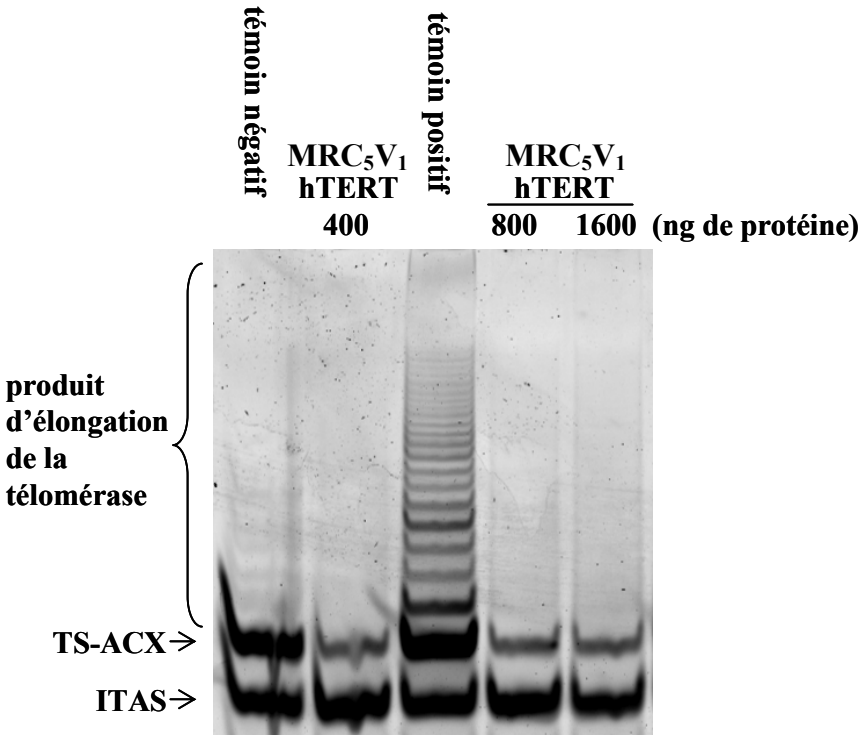


Figure 80. Expression de l'activité télomérase de la lignée MRC_5V_1-hTERT par le test TRAP. Le témoin négatif ne présente aucun extrait protéique. Le témoin positif contient 400ng d'extrait protéique de la lignée JFD11 caractérisée comme possédant une forte activité télomérase.

Jusqu'à 1600 ng de protéines, aucune activité télomérase n'est détectée dans la lignée MRC_5V_1-hTERT. La transfection de hTERT dans ce modèle ne permet pas la restauration de l'activité télomérase. Nous avons aussi vérifié au même passage l'expression du transgène hTERT par RT-PCR (*Figure 81*).

Les résultats montrent que les lignées MRC5V1-hTERT et MRC5V1-DNhTERT expriment ces transgènes. L'absence d'activité télomérase n'est donc pas due à une perte de ces transgènes.

Il a été décrit dans la littérature que le mécanisme ALT était fréquemment dû à une altération de l'expression de la sous unité d'ARN hTR (Hoare S. F., et al., 2001). Il est donc possible que l'absence d'activité télomérase dans ces lignées soit due à une diminution de l'expression de la sous unité ribonucléotidique. Une RT-PCR de hTR a donc été réalisée afin de vérifier cette hypothèse (*Figure 82*).

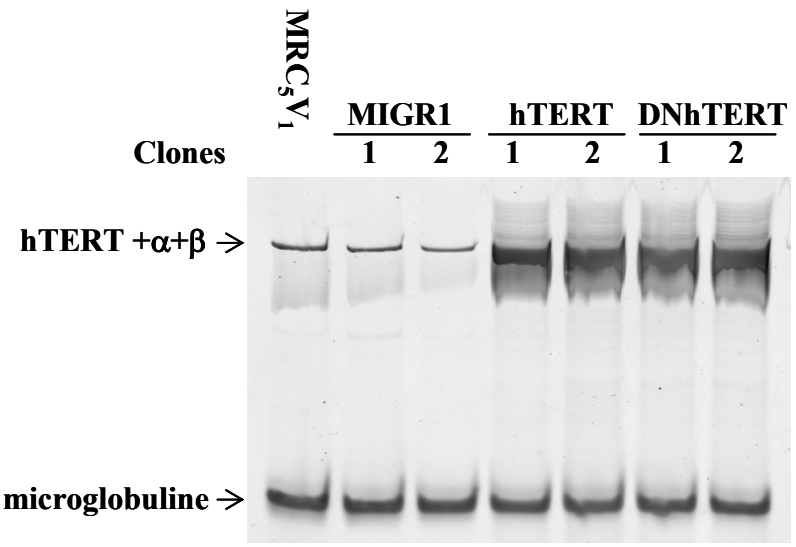


Figure 81. RT PCR de hTERT des lignées MRC_5V_1, MIGR1, hTERT et DNhTERT. Pour chaque cellule transfectée, les clones 1 correspondent à des lignées nouvellement décongelées et les clones 2, les lignées utilisées pour la sénescence.

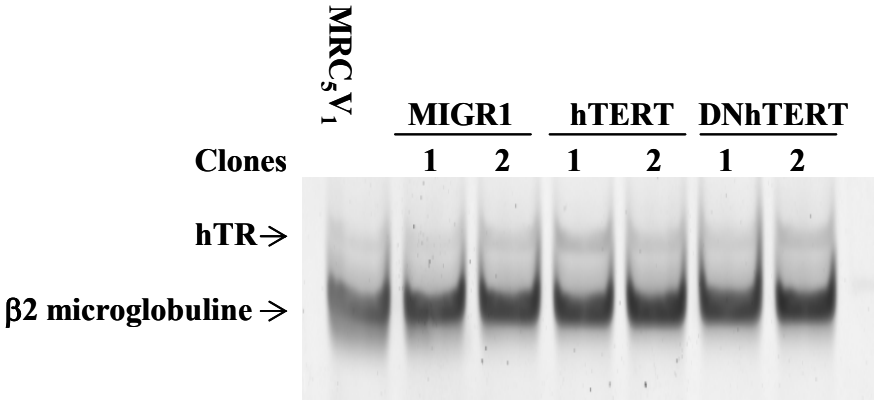


Figure 82. RT PCR de hTR des lignées MRC_5V_1, MIGR1, hTERT et DNhTERT. Pour chaque cellule transfectée, les clones 1 correspondent à des lignées nouvellement décongelées et les clones 2, les lignées utilisées pour la sénescence.

Dans chacune des lignées, le gène hTR est faiblement amplifié. Il existe donc dans ces cellules un mécanisme de régulation négative de l'expression de la sous-unité d'ARN et la transfection de hTERT ne suffit pas à restaurer une activité télomérase.

Des études ont montré que dans plusieurs lignées ALT, le gène hTR est inhibé par méthylation au niveau des îlots CpG de son promoteur (Hoare, et al. 2001). Il peut être réactivé par la 5-Aza-déoxy-Cytidine (5-Aza-dC) (*Figure 83*). Après traitement de la lignée MRC_5V_1-hTERT par la 5-Aza-dC, la RT PCR de hTR indique la présence détectable d'un ARNm. Ce résultat montre que la lignée MRC_5V_1-hTERT présente une méthylation du promoteur de hTR qui bloque son expression. Afin d'induire une activité télomérase dans cette lignée, il faudrait traiter régulièrement les cellules par la 5-Aza-dC, ce qui est

difficilement compatible avec des expériences de sénescence car cette molécule peut être toxique et pourrait induire une mort cellulaire à court terme. Une autre possibilité serait d'induire une surexpression de hTR par transfection dans ces cellules. Nous avons plutôt décidé de changer de modèle cellulaire et de travailler sur des lignées dérivées de la souche normale fibroblastique humaine WI38 réexprimant l'activité télomérase.

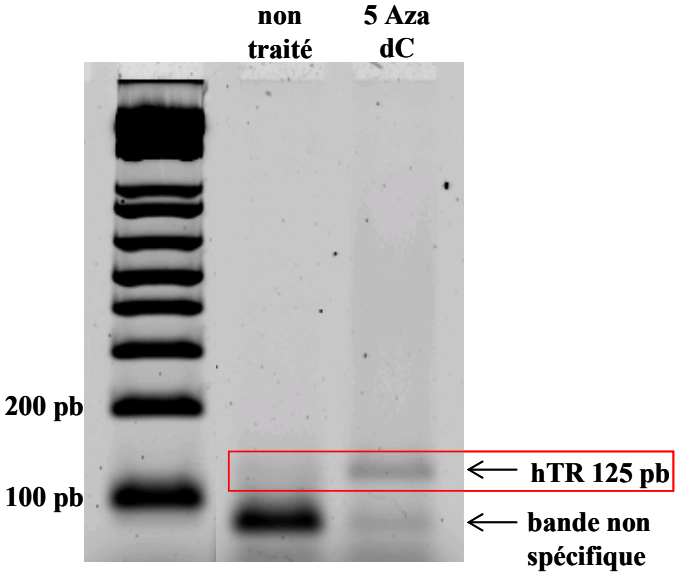


Figure 83. RT PCR de hTR de la lignée MRC$_5$V$_1$-hTERT après 3 traitements par la 5-Aza-déoxy-Cytidine (5µM) pendant 48 heures, chacun étant espacé d'une incubation de 48 heures en absence de traitement .

3. Action de ligands G4 sur des lignées dérivées de la souche fibroblastique humaine WI38

a. Caractérisation des lignées

Les 3 lignées cellulaires dérivées de la WI38 nous ont été envoyées par le laboratoire de Silvia Bacchetti (Guiducci C., et al., 2001). Dans un premier temps, une vérification de la surexpression de hTERT et de hTR a été réalisée par RT PCR (*Figure 84*). La lignée ALT VA13 ne montre pas d'expression de hTERT ni de hTR. Par contre, les lignées transfectées VA13-33.3 et JW10 présentent une surexpression de la transcription des deux gènes. Pour le clone VA13-33.3, le dominant négatif de hTERT est également amplifié par le couple d'amorce de hTERT.

Nous avons ensuite vérifié l'activité télomérase par le test TRAP dans ces cellules (*Figure 85*). Les cellules VA13 et VA13-33.3 ne présentent aucune activité télomérase. Le gène transfecté dans cette dernière lignée correspond donc bien à un dominant négatif. La lignée JW10, en accord avec l'expression de hTERT et hTR mesuré par RT-PCR, possède une activité télomérase.

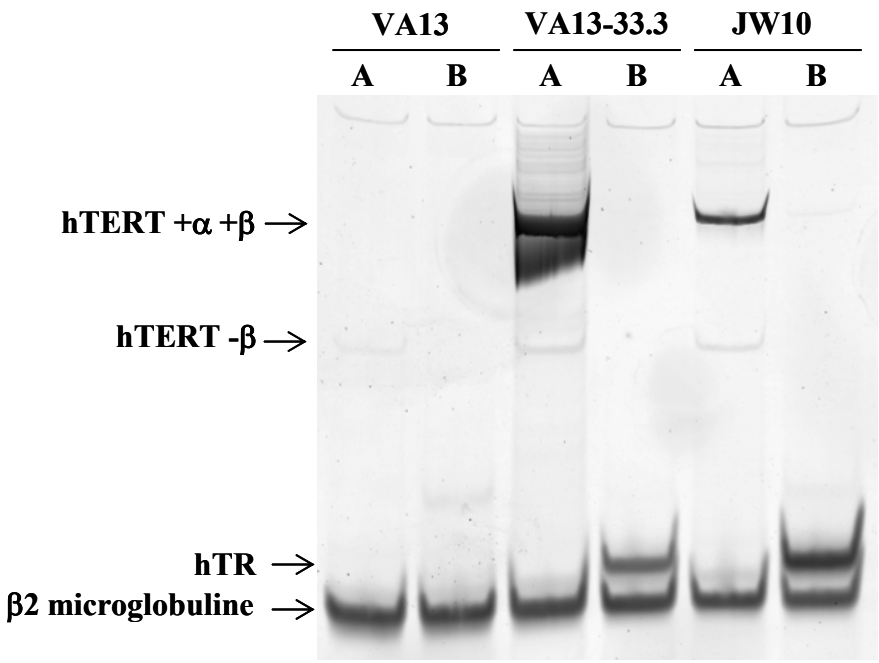


Figure 84. RT PCR de hTERT et hTR des cellules VA13, VA13-33.3 et JW10. A : amplification de hTERT. B : amplification de hTR.

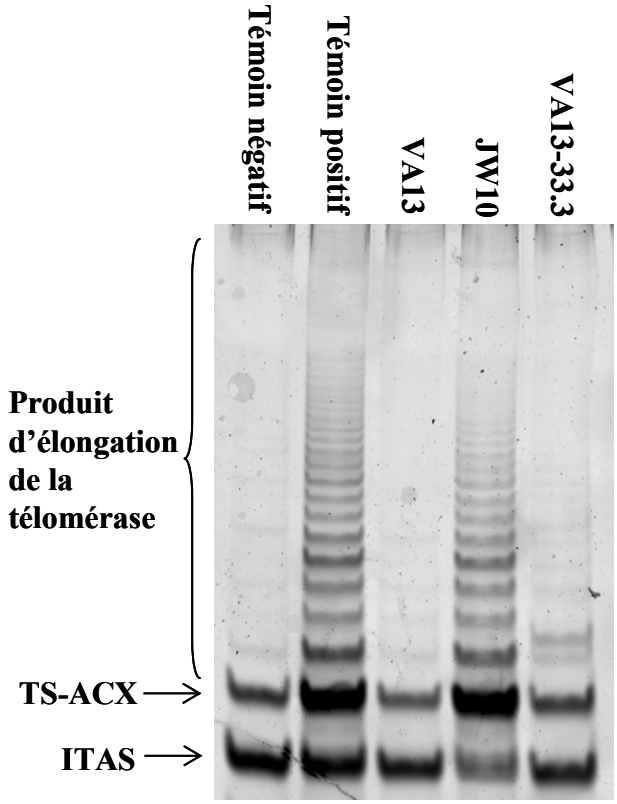


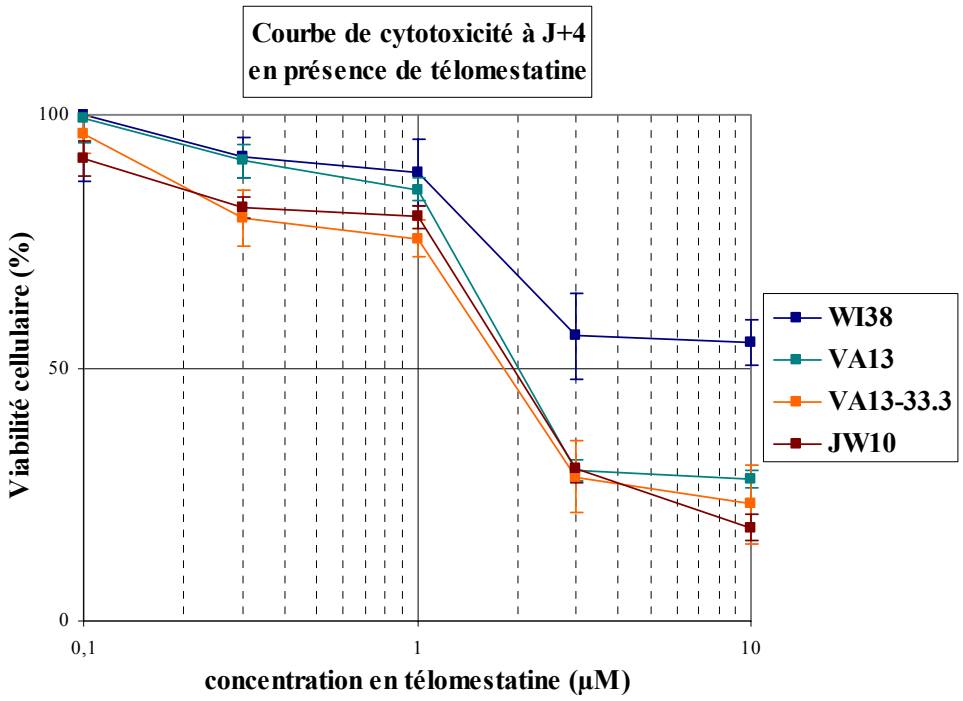
Figure 85. Expression de l'activité télomérase des lignées VA13, VA13-33.3 et JW10 avec 400ng d'extrait protéique. Le témoin négatif ne présente aucun extrait protéique. Le témoin positif contient 400 ng d'extrait de la lignée JFD11 caractérisée comme possédant une forte activité télomérase.

Avec les lignées cellulaires VA13, VA13-33.3 et JW10, nous avons en notre possession un système d'étude complet. Il comprend la lignée WI38 normale, la lignée ALT immortalisée (VA13), la lignée ALT présentant en plus le mécanisme d'allongement des télomères par la télomérase (JW10) et un modèle ALT présentant la surexpression d'une télomérase incapable d'allonger les télomères (VA13-33.3).

b. Effets cellulaires de la télomestatine : étude de la cytotoxicité à court terme

Dans cette partie, des études de cytotoxicité de la télomestatine ont été réalisées sur les 4 lignées cellulaires, en présence de concentrations croissantes de ligands pour 4 jours et 7 jours de traitement. La cytotoxicité cellulaire est mesurée par le test MTT (*Figure 86*).

Après 4 jours de traitement, la télomestatine est faiblement cytotoxique dans la lignée WI38 puisque la CI50 n'est pas atteinte jusqu'à 10µM. Pour les lignées VA13, VA13-33.3 et JW10, la télomestatine est cytotoxique avec une CI50 égale à 2µM. Après 7 jours de traitement, la télomestatine induit une cytotoxicité similaire dans les 4 types cellulaires avec des CI50 comprises entre 1 et 2 µM. Il est possible que la faible cytotoxicité de la télomestatine sur la lignée WI38 après 4 jours de traitement soit due à un temps de doublement de population plus long par rapport aux lignées immortalisées.



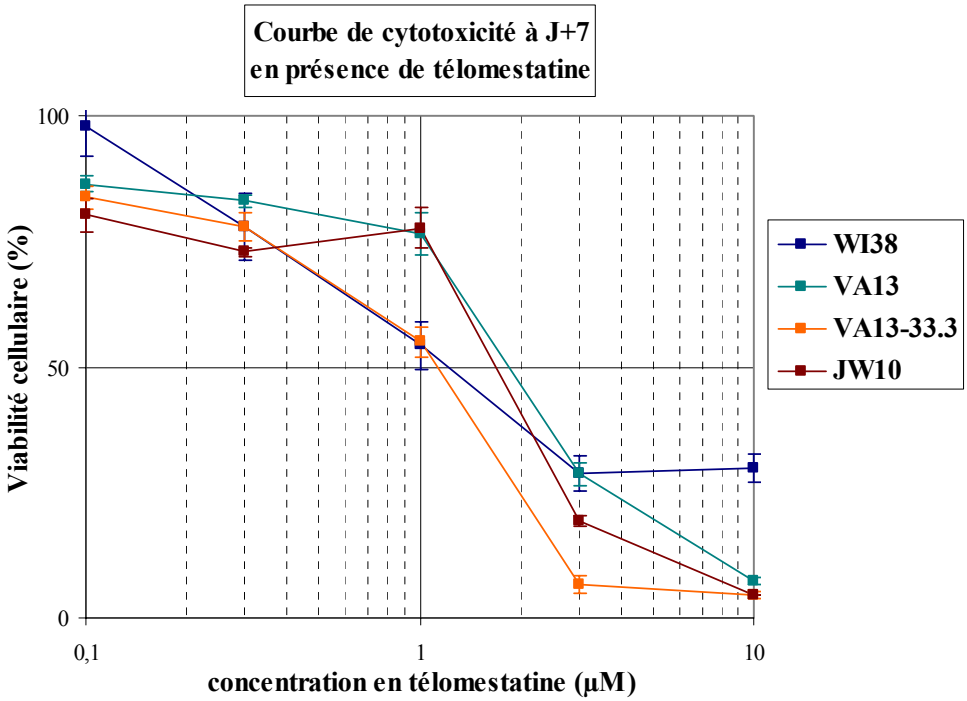


Figure 86. Courbes de cytotoxicité à 4 et 7 jours des lignées WI38, VA13, VA13-33.3 et JW10 en présence de télomestatine.

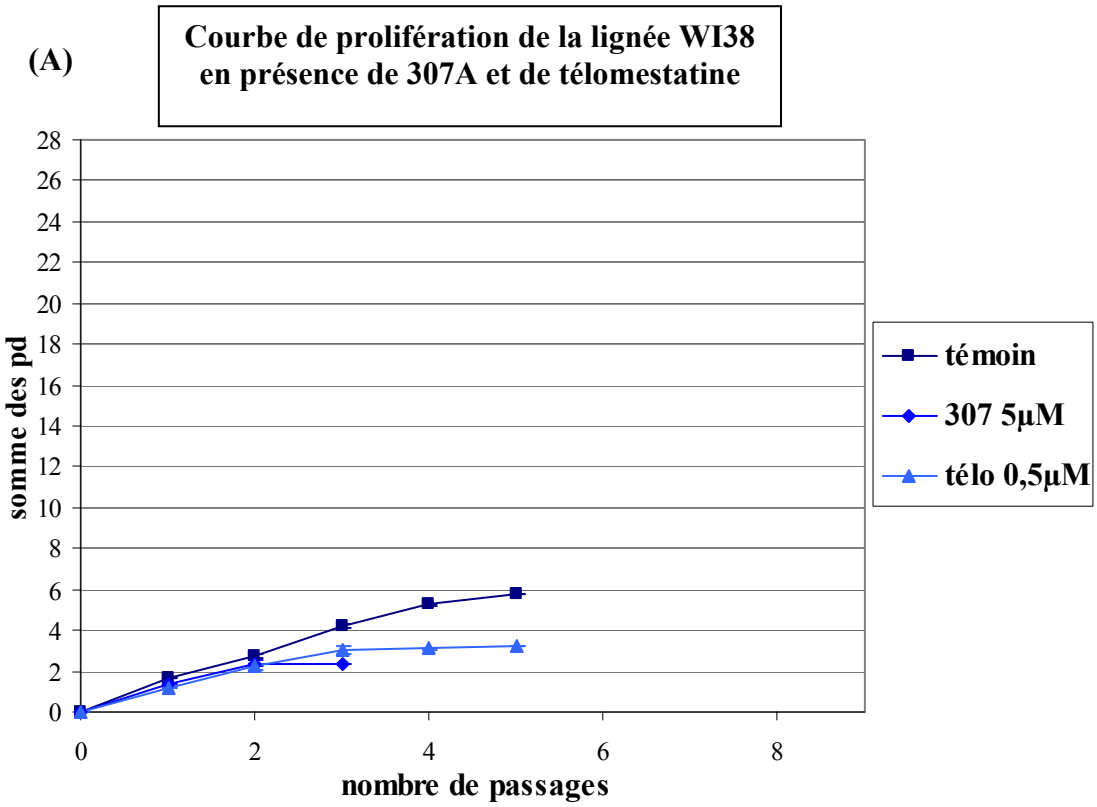
c. Effets cellulaires des ligands G4 : étude de sénescence

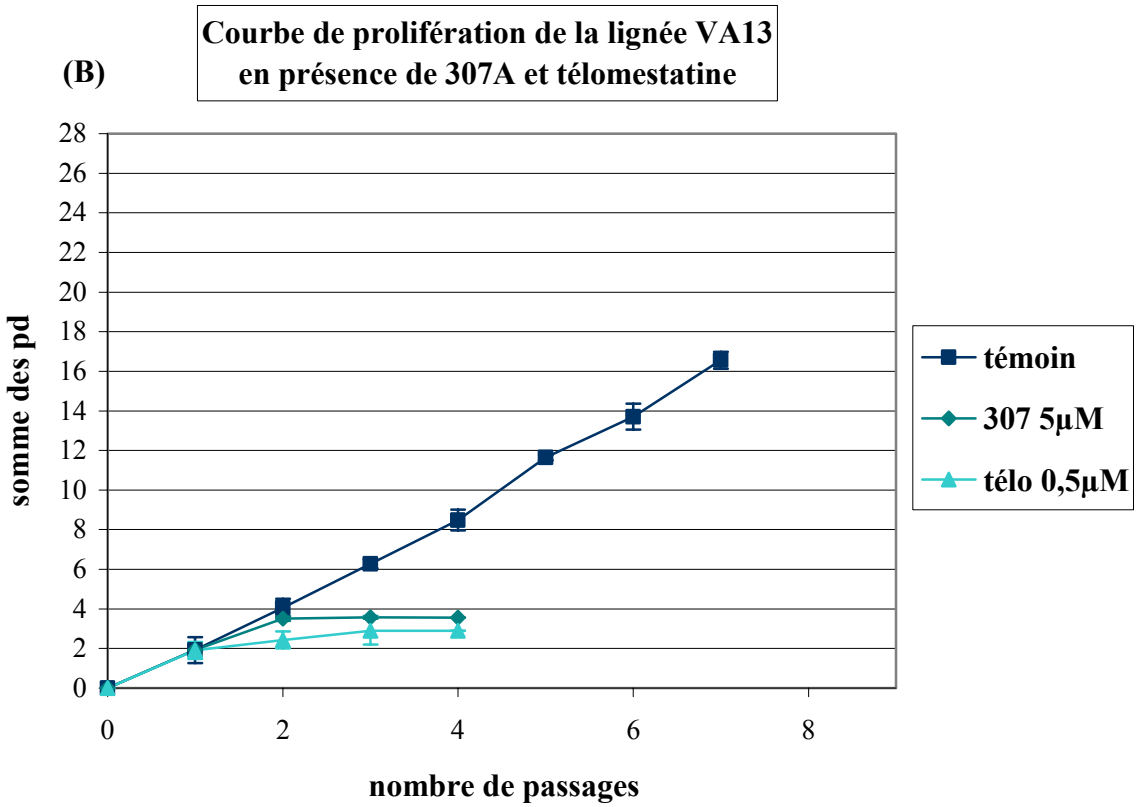
Nous avons évalué l'effet à plus long terme du 307A et de la télomestatine sur les lignées normales WI38 et ALT VA13, ainsi que sur les JW10 (transfectée par hTR et hTERT) et VA13-33.3 (transfectée par hTR et DNhTERT) exprimant la télomérase ou son dominant négatif (*Figure 87*).

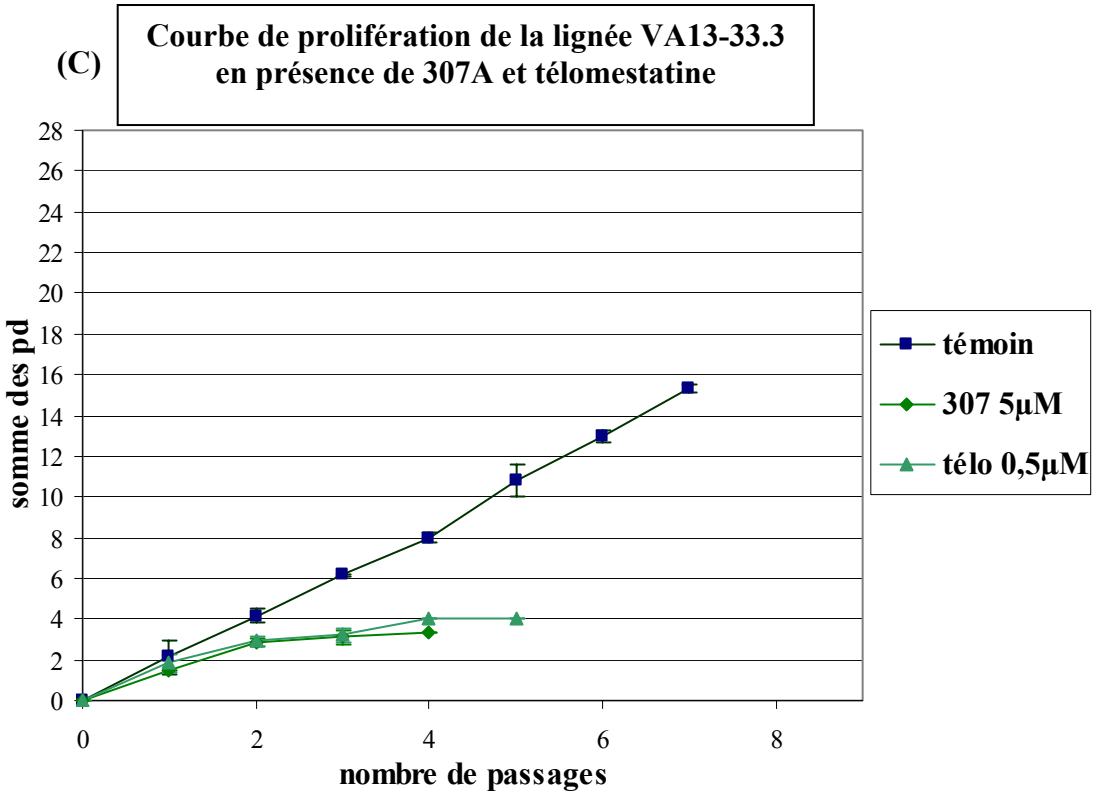
En absence de traitement, la lignée parentale WI38 présente un temps de doublement relativement faible. Au 5ème passage, la somme des pd est de 4, soit environ un doublement de population tous les 3 jours. Les lignées ALT VA13 et VA13-33.3 ont des courbes de croissances similaires avec un temps de doublement de population d'environ 2 jours. La lignée JW10 montre une croissance cellulaire plus rapide avec un temps de doublement de 1,2 jour.

La télomestatine (0,5µM) et le 307A (5µM) provoquent l'entrée en sénescence des lignées WI38, VA13 et VA13-33.3 entre 16 et 20 jours après le début du traitement, pour un doublement de population compris entre 3 et 4. Ces résultats indiquent que la lignée normale WI38 est aussi sensible à l'induction de sénescence par ces ligands que la lignée ALT immortalisée par SV40. La transfection de la lignée VA13 par hTERT et hTR, qui restaurent une activité télomérase fonctionnelle, provoque une différence marquée de sensibilité aux ligands de G-quadruplexe. En effet, dans la lignée JW10, la sénescence apparaît entre 28 et 32

jours, pour un doublement de population compris entre 8 et 10. La réactivation de l'activité télomérase provoque donc l'apparition d'une protection partielle aux effets des ligands.







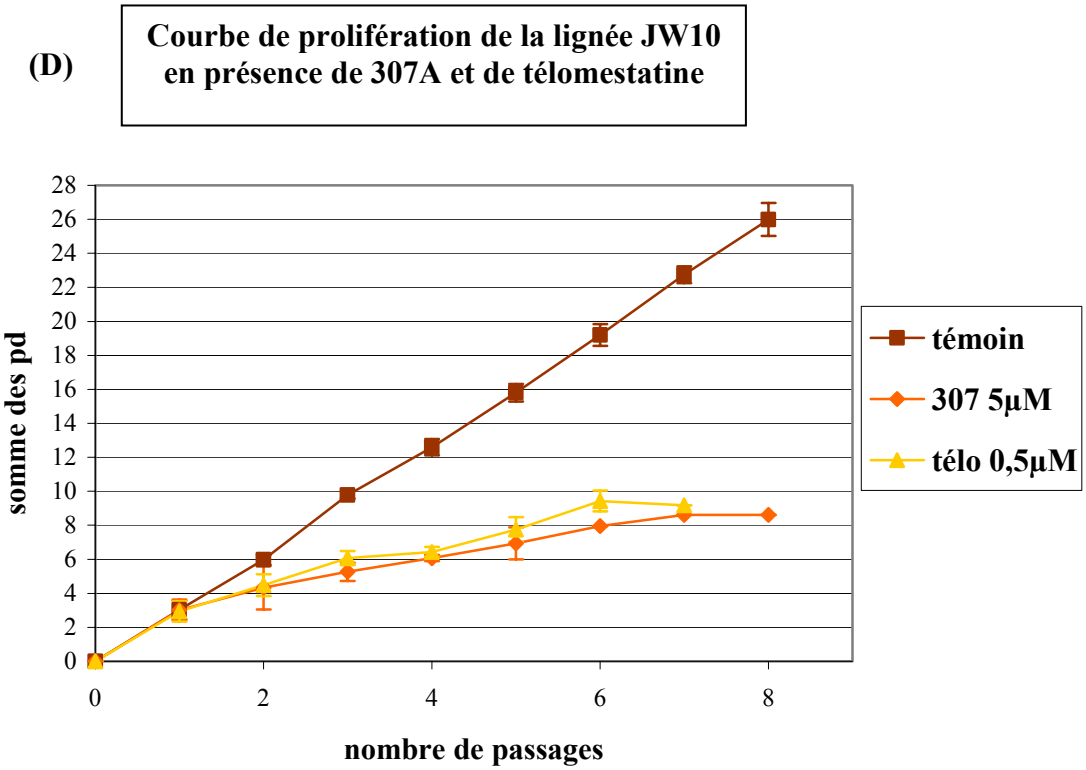


Figure 87. Courbes de prolifération des lignées WI38 (A), VA13 (B), VA13-33.3 (C) et JW10 (D) en présence de 307A 5µM ou télomestatine 0.5µM.

d. Effets des ligands G4 sur le télomère simple brin

Les ligands 307A et télomestatine présentent une forte affinité avec les séquences répétées TTAGGG télomériques et induisent la formation des G-quadruplexes. La stabilisation de ces G-quadruplexes peut avoir des conséquences importantes sur la structure du télomère. Notamment, il est possible qu'ils induisent un raccourcissement du simple brin télomérique en inhibant l'activité catalytique de la télomérase, ou les mécanismes de recombinaison génétique des cellules ALT.

Des expériences réalisées dans notre laboratoire nous ont permis de déterminer l'action des ligands de G-quadruplexes sur le simple brin télomérique dans des lignées tumorales en culture et de déterminer si les ligands G4 altéraient la structure de l'extrémité télomérique (Gomez D., et al., 2004) (voir publication en annexe). Dans ces travaux, nous avons étudié l'effet de la télomestatine sur la longueur du brin G télomérique grâce à la technique d'hybridation en condition non dénaturante que nous avons développée dans le laboratoire. Le signal d'hybridation d'une sonde oligonucléotidique complémentaire au brin G mesuré à l'aide d'un phosphorimager permet en effet d'estimer la longueur du brin G. En complément de cette approche, l'utilisation du T-OLA (Telomeric Oligonucleotide Ligation Assay) décrite dans le littérature et basée sur une ligation par la Taq ligase d'oligonucléotides hybridés sur le brin G permet de mesurer la taille réelle du simple brin télomérique. Ce travail démontre que le traitement court terme (24-48H) des cellules A549 par la télomestatine provoque une forte fixation du ligand sur le simple brin télomérique. Une prolongation du traitement (5 à 12 jours) provoque une forte dégradation du simple brin télomérique qui coïncide avec l'arrêt de prolifération de la lignée et l'induction de la sénescence.

Les G-quartets impliquent une liaison de type Hoogsteen entre le N7 des guanines du plateau. La modification du N7 par le DMS aboutit à une méthylation qui empêche la formation du G-quartet. Nous montrons aussi que le DMS provoque une protection de la fixation de la télomestatine et que sa fixation au simple brin ne peut être déplacée que par une compétition avec une autre structure G-quadruplexe. Ces expériences représentent la première preuve de l'existence des structures G-quadruplexes *in vivo* sous l'effet d'un traitement.

Dans le but de déterminer l'effet des ligands 307A et télomestatine sur le simple brin télomérique des lignées ALT, les cellules VA13, VA13-33.3 et JW10 ont été incubées pendant 4 jours en présence de 307A (5µM) et de télomestatine (1µM) et le simple brin télomérique a été mesuré par hybridation en conditions non dénaturantes avec une sonde 21C (voir matériels et méthodes) (*Figure 88*).

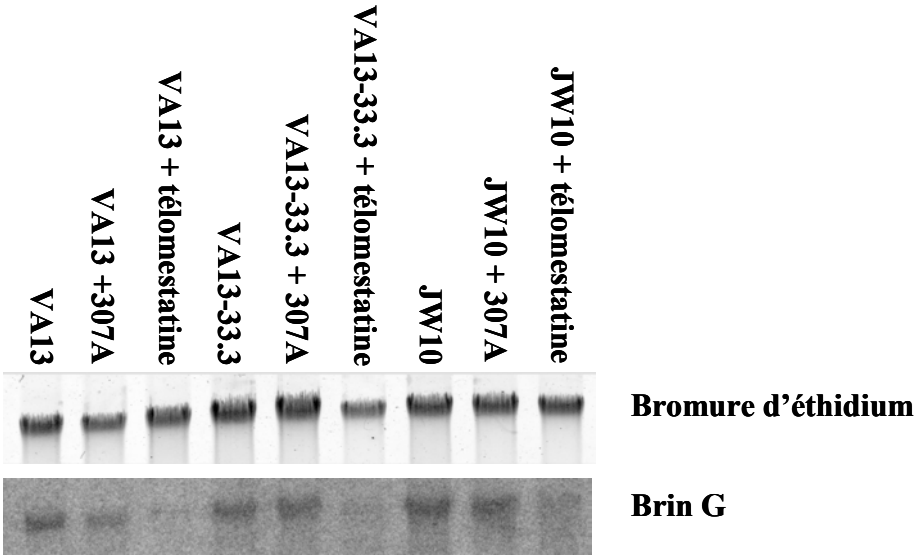


Figure 88. Analyse de l'hybridation en solution non dénaturante du simple brin télomérique provenant d'ADN génomique purifié des lignées VA13, VA13-33.3 et JW10 après traitement de 4 jours en présence de 307A (5µM) ou de télomestatine (1µM).

Le signal du brin G est quantifié et rapporté à la quantité d'ADN totale obtenu grâce au bromure d'éthidium (EtBr). L'expérience a été réalisée 3 fois et les résultats sont représentés dans la *Figure 89*.

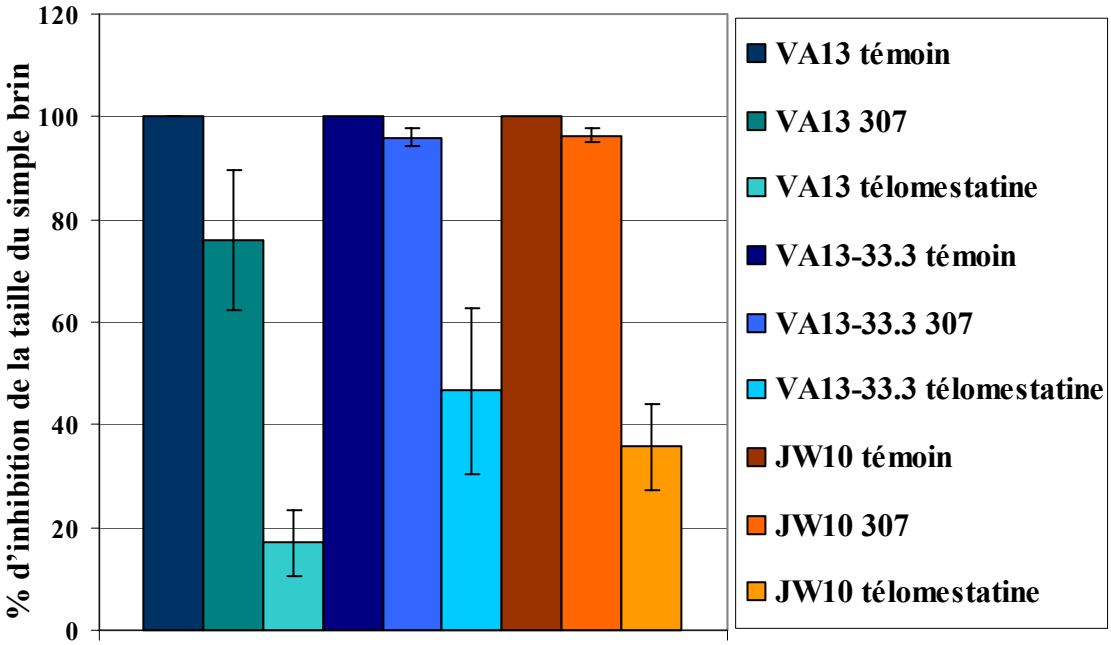


Figure 89. Quantification du signal du simple brin télomérique des lignées VA13, VA13-33.3 et JW10 après incubation pendant 4 jours en présence de 307A 5µM et télomestatine 1µM. La taille des simples brins est exprimée en %, le 100% correspondant à ceux des cellules témoins.

La quantification du signal du simple brin par rapport à l'ADN génomique total (EtBr) indique que l'effet de la télomestatine est plus important que celui du dérivé 307A. D'autre part, la lignée VA13 semble plus sensible à l'effet des ligands que les lignées VA13-33.3 et JW10 où l'effet du 307A est non significatif. Nous avions montré que la télomestatine pouvait bloquer l'hybridation de la sonde 21C au simple brin en restant fixé à l'ADN malgré la procédure d'extraction (Gomez D., et al., 2004). Des expériences de compétition avec un autre oligonucléotide capable de former un G-quadruplexe (pu22myc) avait permis de démontrer cette liaison. Afin de savoir si la télomestatine provoque une dégradation du simple brin dans les lignées ALT ou reste fixée au simple brin télomérique, nous avons effectué une compétition en présence de 10µM de Pu22myc (*Figure 90* et *Figure 91*).

L'ajout de pu22myc à l'ADN de VA13 induit une légère diminution de l'hybridation d'environ 12%. Après l'ajout de 10µM de pu22myc, nous observons une augmentation de 10 à 20% de l'hybridation de la sonde 21C sur les ADN traités par la télomestatine (10% pour la lignée VA13, 20% pour VA13-33.3 et 10% pour JW10). Ces expériences montrent que la compétition avec le Pu22myc ne permet pas de restaurer totalement le signal du simple brin télomérique, ce qui indique que la télomestatine provoque un raccourcissement effectif du simple brin télomérique sur les trois lignées.

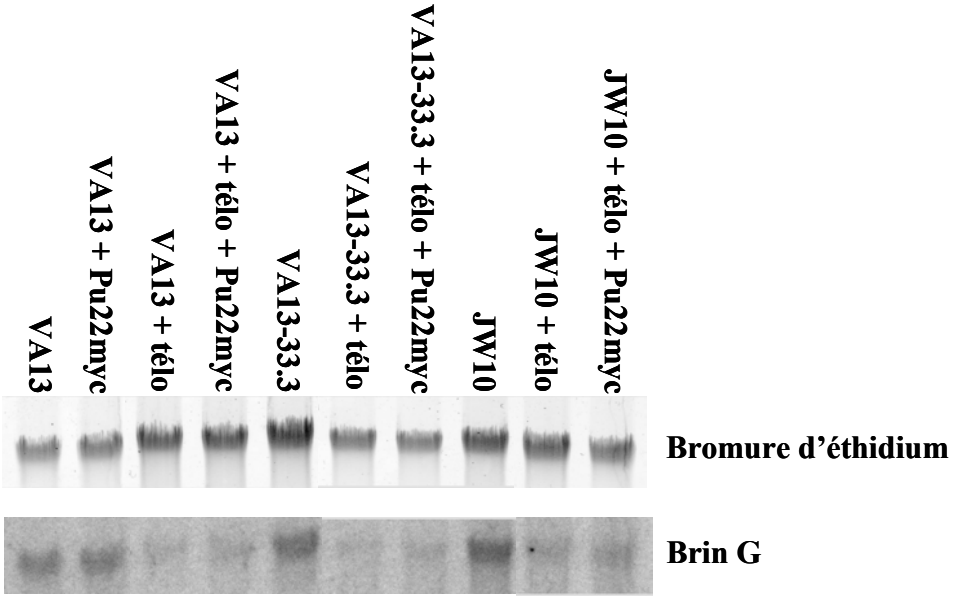


Figure 90. Analyse de l'hybridation en solution non dénaturante du simple brin télomérique provenant d'ADN génomique purifié des lignées VA13, VA13-33.3 et JW10 après traitement de 4 jours en présence de télomestatine (1µM) et en présence ou non d'une compétition par 10µM de Pu22myc.

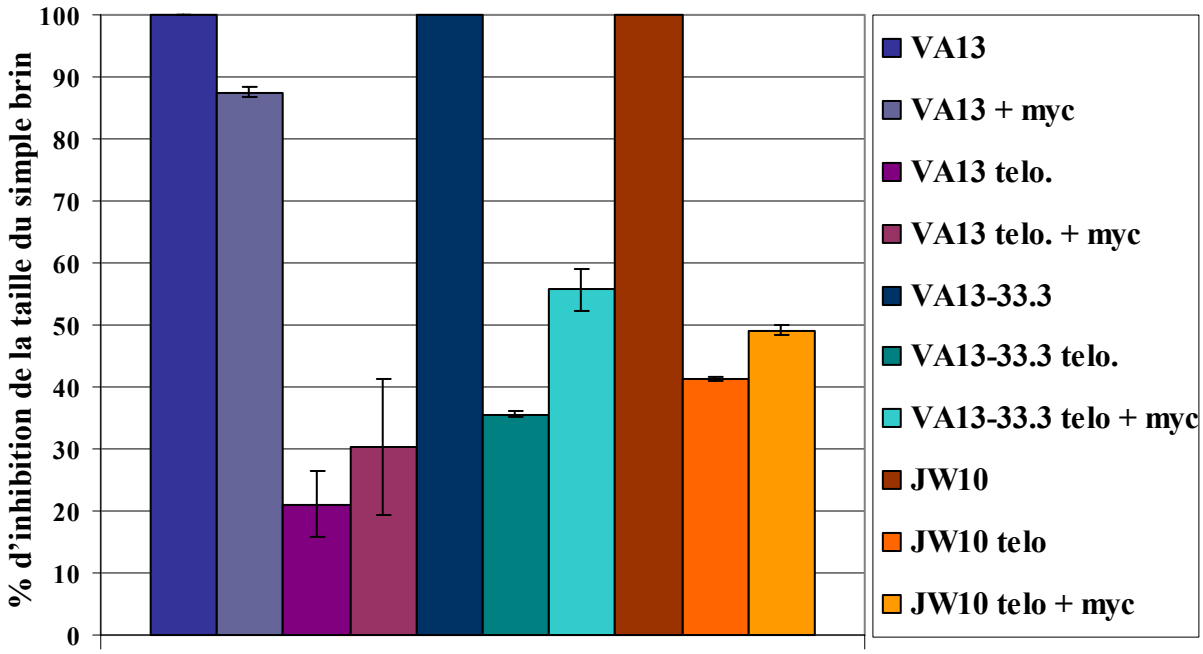


Figure 91. Quantification du signal du simple brin télomérique, après compétition par le pu22myc (10µM), des lignées VA13, VA13-33.3 et JW10 traitées ou non pendant 4 jours par 1µM de télomestatine.

Dans une autre expérience, nous avons traité la lignée VA13 par 1µM de télomestatine pendant 3 à 6 jours et évalué le signal du simple brin télomérique après compétition par le G-quadruplexe Pu22myc (*Figure 92* et *Figure 93*).

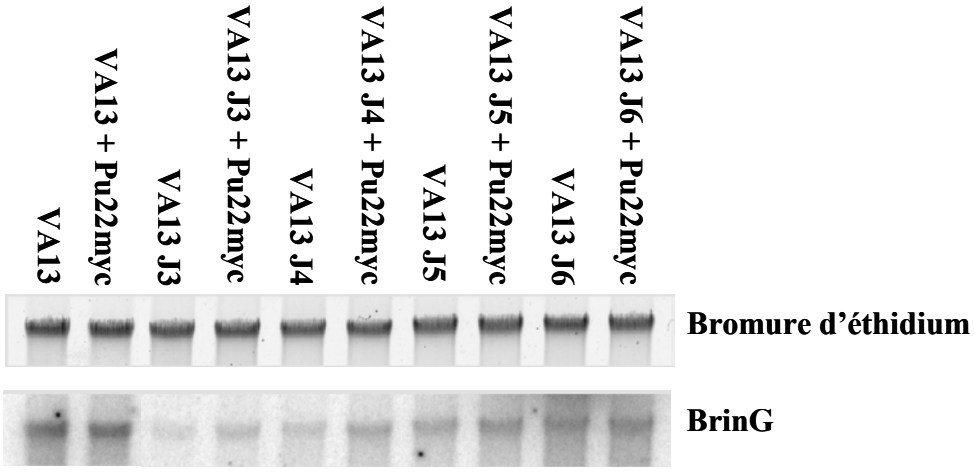


Figure 92. Analyse de l'hybridation en solution non dénaturante du simple brin télomérique provenant d'ADN génomique purifié de la lignée VA13 après traitement de 3, 4, 5 et 6 jours en présence de télomestatine (1µM) et en présence ou non d'une compétition par 10µM de Pu22myc. Le contrôle VA13 correspond à une absence de traitement.

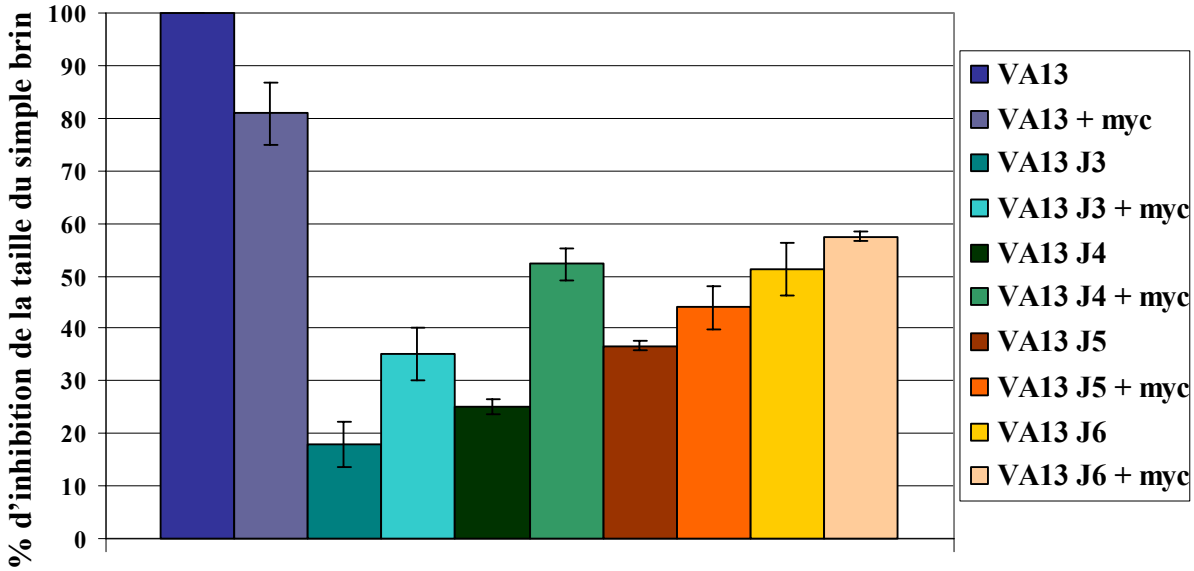


Figure 93. Quantification du signal du simple brin télomérique de la lignée VA13 après 3, 4, 5 et 6 jours d'incubation en présence de 1µM de télomestatine. Une compétition est également réalisée avec 10µM de pu22myc. Le % des cellules en absence de pu22myc est comparé à celui de VA13 et celui des cellules en présence de pu22myc avec VA13 + myc.

Nous observons, après 3 jours de traitement par la télomestatine, une forte diminution du signal du simple brin (environ 86%), observée dans les expériences précédentes. La compétition par 10µM de Pu22myc augmente d'environ 16% ce signal. A J4, J5 et J6, les inhibitions correspondent à 76%, 64% et 53%, respectivement, et en présence de 10µM de Pu22myc, elles atteignent 51%, 60% et 43%. Ces résultats indiquent qu'au fur et a mesure du temps, l'effet de la télomestatine sur le simple brin télomérique diminue. De plus, en augmentant les temps d'incubation à 6 jours, la compétition de la télomestatine par le Pu22myc est moins importante. Il semble donc qu'il existe une adaptation partielle de la lignée VA13 à l'effet de la télomestatine sur le simple brin télomérique.

4. Discussion

Nos résultats indiquent que les ligands de G-quadruplexes sont capables d'induire une cytotoxicité importante à court terme et de provoquer l'entrée en sénescence des cellules à plus long terme, pour les lignées WI38, WI38 immortalisées par SV40 (VA13) et VA13 présentant une activité télomérase induite (JW10).

Après 4 jours de traitement à court terme, la télomestatine est faiblement cytotoxique sur la lignée normale WI38 alors qu'elle présente une CI50 d'environ 2µM pour les lignées immortalisées. L'hypothèse d'une différence de protection et de structure du télomère des

cellules normales par rapport aux cellules ALT, comme c'est le cas pour l'accessibilité de la télomérase entre les cellules télomérase + et normales, pourrait expliquer ces différences de cytotoxicité.

D'un autre coté, la lignée WI38 présente un doublement de population inférieur aux lignées transformées. L'action du ligand apparaît après un certain nombre de divisions, ce qui pourrait expliquer la cytotoxicité préférentielle du ligand pour les lignées ALT comparativement à la lignée WI38.

La télomestatine induit un raccourcissement de la taille du simple brin télomérique dans les lignées VA13, VA13-33.3 et JW10 après un traitement à court terme et à long terme. A court terme, ces résultats ont été confirmés par les expériences de compétition avec la séquence Pu22myc. A des doses subtoxiques, la télomestatine induit l'entrée en sénescence alors qu'à des concentrations plus importantes, elle provoque l'apoptose des cellules. Il existe donc une différence d'action de ce ligand en fonction de la concentration utilisée.

A court terme, la lignée VA13 semble plus sensible au raccourcissement du simple brin télomérique par les ligands 307A et télomestatine que les lignées VA13-33.3 et JW10. Cependant, nous n'observons pas une cytotoxicité à court terme plus importante de la télomestatine sur la lignée VA13, comparativement aux lignées VA13-33.3 et JW10. Ces résultats suggèrent que bien que la dégradation du simple brin soit associée à l'effet biologique de la télomestatine, il n'existe pas de relation directe entre l'importance de la dégradation et l'activité cytotoxique. L'étude comparative de l'effet de la télomestatine sur le simple brin télomérique de ces lignées, à plus faible concentration et lors de la sénescence, permettrait de compléter ces travaux.

Contrairement à la télomestatine, le ligand 307 induit peu ou pas de dégradation du simple brin télomérique à court terme. Récemment, Gaëlle Pennarun a rapporté que le 307A inhibe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose dans différentes lignées cellulaire (Pennarun G., et al., 2005). Dans ces cellules, l'apoptose induite par ce ligand est précédé par des altérations du cycle cellulaire. Ces effets ne sont pas associés à un raccourcissement de la taille des télomères mais à des instabilités télomériques provoquant de chromosomes dicentriques et circulaires, et des ponts anaphasiques. De plus, l'altération du simple brin télomérique induit par ce ligand est relativement modeste ((Pennarun G., et al., 2005) et Dennis Gomez, résultats non publiés). A plus long terme, le 307A induit l'entrée en sénescence des cellules WI38, VA13, VA13-33.3 et JW10 et il nous parait intéressant de déterminer l'effet du ligand sur le simple brin au moment de la sénescence.

Nos résultats montrent donc que la télomestatine et le 307A ont des effets différents sur le simple brin à court terme. L'altération du simple brin induite par ces ligands peut correspondre à l'activation d'un processus endonucléolytique résultant d'une altération de la structure du télomère. Les travaux du groupe de T. de Lange montrent que la dégradation du simple brin induite par un dominant négatif de TRF2 est médiée par ERCC1/XPF (Zhu X. D., et al., 2003). De la même manière, les ligands pourraient induire plus ou moins rapidement la dégradation du simple brin par des mécanismes qui restent à déterminer.

Des travaux récents montrent que l'inactivation des protéines essentielles au maintien de l'intégrité télomérique (TRF2, $hPOT_1$) induisent une diminution de la viabilité cellulaire caractérisée par un arrêt de la croissance, une entrée en sénescence et une altération du simple brin (Karlseder J., et al., 2002) (Takai H., et al., 2003) (Veldman T., et al., 2004). On peut donc émettre l'hypothèse que l'inhibition de la fixation de(s) protéine(s) télomérique(s) par ces ligands puisse induire les altérations fonctionnelles de l'extrémité télomérique (fusions, mitoses anormales) et/ou du simple brin (raccourcissement) que nous observons. Une étude de l'expression et de la localisation de TRF2 et de $hPOT_1$ dans nos modèles cellulaires en sénescence pourrait confirmer cette hypothèse.

Le traitement à long terme par la télomestatine (0,5µM) ou le 307A (5µM) induit l'entrée en sénescence de façon similaire dans les lignées WI38, VA13 et VA13-33.3. Le passage d'un phénotype normal à un phénotype ALT n'est donc pas suffisant pour retarder l'entrée en sénescence. Par contre, la transfection de la lignée VA13 par hTERT et hTR, qui restaure une activité télomérase fonctionnelle provoque une différence marquée de sensibilité aux ligands de G-quadruplexes. En effet, dans la lignée JW10, la sénescence apparaît entre 28 et 32 jours pour un doublement de population compris entre 8 et 10. La réactivation de l'activité télomérase dans la lignée VA13 provoque donc l'apparition d'une protection partielle aux effets de ligands de G-quadruplexe. Cette protection n'est pas observée dans la lignée VA13-33.3 exprimant une forme dominante négative de hTERT, ni dans la lignée MRC_5V_1 transfectée par hTERT dans laquelle l'activité télomérase n'est pas fonctionnelle. Cette résistance pourrait donc être due au rôle de la télomérase dans la protection du télomère.

Ces résultats sont à l'opposé des travaux réalisés par notre groupe sur des lignées télomérases positives. En effet, la surexpression de hTERT ou son inactivation par un dominant négatif de hTERT dans la lignée A549 ne module pas sa sensibilité à court terme par le 12459 (Gomez D., et al., 2003a) et à long terme par le 12459 et la télomestatine (résultats non publiés). Les différences entre ces deux séries d'expériences peuvent expliquer ces résultats contradictoires. En effet, dans un cas la télomérase est surexprimée à partir d'un

système ALT, et dans l'autre cas l'activité télomérase est réprimée par l'expression d'un dominant négatif, ce qui ne correspond pas à la suppression de l'expression de hTERT.

Dans une lignée ALT, les protéines associées aux télomères ne sont pas les mêmes que dans les lignées télomérase positive. C'est le cas notamment de la protéine PML (Wang J., et al., 2004) et des protéines impliquées dans la recombinaison (RAD51, RAD52, RPA...) (Stavropoulos D. J., et al., 2002) (Yeager T. R., et al., 1999) (Bernardi R., et al., 2003). Nous pouvons donc supposer que la structure télomérique dans ces différentes lignées ne soit pas la même et que les cellules ALT soient plus sensibles à l'action à long terme des ligands. La réintroduction de l'activité télomérase de la lignée JW10 entraînerait un changement de conformation des télomères et donc une résistance de cette lignée. La transfection de A549 par hTERT n'induirait pas de résistance puisque les télomères présentent déjà la conformation imposée par la télomérase. Par contre on pourrait s'attendre à observer une hypersensibilité de la lignée A549 transfectée par DNhTERT. Néanmoins, cette transfection ne supprime pas hTERT mais inhibe son action. Il serrait donc intéressant de supprimer hTERT par des expériences d'ARN interférence pour voir si une sensibilité de ces cellules serrait observée.

La détermination et la comparaison de la taille du simple brin télomérique des lignées WI38, VA13, VA13-33.3 et JW10 à différents stades de l'entrée en sénescence pourrait nous permettre de déterminer si l'expression de la télomérase module la dégradation du simple brin. Néanmoins, l'étude de l'effet de la télomestatine sur le simple brin à court terme montre que cette molécule induit un raccourcissement similaire de la taille du simple brin dans les lignées VA13-33.3 et JW10. Il est donc possible que la résistance à long terme observée dans la lignée JW10 ne soit pas liée à une dégradation différentielle du simple brin télomérique dans ces deux lignées.

Dans le but de mieux comprendre le mécanisme de résistance observé dans la lignée JW10, il serait intéressant de réaliser ces expériences de sénescence dans une lignée JW10 dans laquelle, le mécanisme ALT est réprimé. Récemment, une étude réalisée sur des lignées ALT a montré que la surexpression de la protéine sp100, l'un des composants des corps nucléaires de leucémie promyélocytique (PML bodies), induit la séquestration du complexe MRE11/RAD50/NBS1 intervenant dans les mécanismes de recombinaison. Cette séquestration permet de réprimer le mécanisme ALT (Jiang W. Q., et al., 2005).

Des expériences préliminaires réalisées dans notre laboratoire montrent que le signal du simple brin observé après l'hybridation de la sonde brin C est plus important pour la lignée JW10 que pour les lignées VA13 ou VA13-33.3. Cette augmentation peut être due à une taille plus importante du simple brin dans cette lignée, ce qui pourrait expliquer la résistante

observée. Mais elle peut être également due à une meilleure affinité de la sonde brin C sur le simple brin télomérique. Si tel est le cas, il se peut que des altérations de la séquence TTAGGG du simple brin apparaissent dans les lignées VA13 et VA13-33.3. En effet, les mécanismes de recombinaison génétiques dans les lignées ALT peuvent induirent des modifications des répétitions de guanines au niveau du simple brin télomérique. La réintroduction de l'activité télomérase dans ces lignées ALT pourrait corriger ces altérations de la séquence du simple brin et induire la résistance observée pour la lignée JW10. Cette hypothèse ne pourrait être vérifiée que par le séquençage de cette extrémité télomérique. Cette étude pourrait nous permettre de comprendre les différences d'activité et de sélectivité des ligands de G-quadruplexes entre les cellules ALT et les cellules télomérase positive.

C. Conclusion générale

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à sélectionner des ligands actifs et sélectifs sur des séquences riches en guanines potentiellement capables de former des G-quadruplexes dans le génome. Le test de « PCR stop assay » mis au point dans notre laboratoire est un outil présentant de nombreux avantages. Il permet, de façon rapide et reproductible, de déterminer l'activité et la sélectivité de ligands sur les structures G-quadruplexes. Dans nos travaux, nous avons étudié plusieurs séquences potentiellement capables de former ces structures. La comparaison de ce test sur les séquences myc et télomériques nous a permis de classer les ligands de G-quadruplexes dans trois catégories différentes :

- les ligands présentant des activités équipotentes vis-à-vis des séquences myc et télomériques. Parmi eux, nous retrouvons le 307A, la télomestatine et le TMPyP4.
- Les ligands présentant une activité préférentielle pour le quadruplexe télomérique, comme le 115405 et le 9944.
- Les ligands présentant une activité préférentielle pour la séquence myc, comme le BRACO19 et le 12459.

Notre test de « PCR stop assay » nous a permis également de confirmer que des ligands sont capables de stabiliser des G-quadruplexes au niveau de l'intron 6 du gène hTERT. Par le test de « RT stop assay », nous avons montré pour la première fois que des ligands de l'ADN G-quadruplexe sont aussi capables de stabiliser des G-quadruplexes à partir d'amorces d'ARN. Nous avons ainsi montré que ces ligands induisent un épissage alternatif du gène hTERT, en stabilisant les G-quadruplexes des ARN de l'intron 6 du gène hTERT. Ces données pourraient ouvrir de nouvelles voies d'études thérapeutiques dans la recherche de médicaments pour de nombreuses pathologies (par exemple : stabiliser les G-quadruplexes d'ARN du virus VIH afin d'inhiber sa multiplication virale).

Les résultats obtenus par ces tests sont cohérents avec d'autres tests utilisés pour sélectionner des ligands de G-quadruplexe (stabilisation de quadruplexes en présence et en absence de duplexes compétiteurs, dialyse à l'équilibre...) et montrent que des ligands sélectionnés ou synthétisés dans le but de stabiliser le G-quadruplexe télomérique peuvent également être utilisés pour inhiber la transcription de gènes comme hTERT. Par contre, Les différents ligands utilisés n'ont pas permis de reproduire des expériences du groupe de Hurley sur l'inhibition de la transcription du gène *c-myc* dans la lignée Ramos (Siddiqui-Jain A., et

al., 2002). Il est donc nécessaire de sélectionner des ligands sélectifs du gène *c-myc* si l'on veut inhiber la transcription de ce gène.

Grâce à ce test, nous pouvons également étudier d'autres séquences du génome potentiellement capables de former des G-quadruplexes. Récemment, deux équipes ont publié des études décrivant le nombre potentiel de G-quadruplexes présents dans le génome humain (Huppert J. L., et al., 2005) (Todd A. K., et al., 2005). En moyenne, près de 376000 séquences capables de former des structures G-quadruplexes ont été localisées. Après avoir sélectionné les séquences les plus favorables à la formation des G-quadruplexes, le test de « PCR stop assay » permettrait de déterminer l'activité et la sélectivité des différents ligands sur ces séquences.

Nous avons également étudié l'effet de l'insertion d'un G-quadruplexe dans la séquence codante du gène POT_1. La technique de « PCR stop assay » nous a permis de montrer que des ligands sont capables de stabiliser ces structures G-quadruplexes. Dans ce modèle nous avons montré que des ligands de G-quadruplexes n'inhibent pas la transcription et la traduction de la protéine chimère POT_1. Par contre, la télomestatine est capable d'inhiber la traduction des ARNm. De plus, des expériences préliminaires *in vitro* suggèrent que l'étape de transcription pourrait être inhibée par la présence de séquences capables de former des G-quadruplexes. Néanmoins, il serait indispensable d'utiliser des séquences mutées, insérées au niveau du gène POT_1 et incapables de former des G-quadruplexes dans le but d'étudier les effets de ligands sur les complexes de transcriptions et de traductions.

Des protéines capables de résoudre les structures G-quadruplexes (hélicases, topoisomérases) pourraient être à l'origine de l'absence d'inhibition du complexe de transcription / traduction. Des expériences complémentaires doivent être réalisées pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Par exemple, il serait intéressant d'ajouter des extraits de ces protéines dans les tests de transcription et de traduction *in vitro*. Parmi ces protéines, la topoisomérase IIIα est capable de s'associer à BLM et WRN pour relaxer les G-quadruplexes (Wu L., et al., 2002). Cette topoisomérase est également capable d'interagir avec DDX14 et DBX1 (deux protéines présentant des homologies de séquence avec des hélicases de l'ARN) (Fournier A., et al., 2004). D'autres hélicases de l'ARN des familles DDX et DHX ont également été identifiées mais leurs rôles sur des structures G-quadruplexes n'ont pas encore été déterminés (Abdelhaleem M., 2005). Ye et Shiratori ont décrit que l'hélicase WRN pourrait intervenir dans la transcription en s'associant aux ARN polymérases (Ye L., et al., 1998) (Shiratori M., et al., 2002). Enfin, les hélicases BACH1 chez l'homme et RTEL chez la

souris sont également capables de reconnaître les structures G-quadruplexes (Ishikawa M., et al., 2005) (Flanary B., 2004).

Dans une troisième partie, nous avons également cherché à déterminer quels sont les effets des ligands de G-quadruplexes dans des cellules ne présentant pas d'activité télomérase mais régulant leurs tailles de télomère par des mécanismes de recombinaison génétique (ALT). Nous avons montré que la télomestatine induit l'entrée en sénescence de ces cellules et induit un raccourcissement de la taille des télomères. Par contre, le 307A semble utiliser d'autres mécanismes qui restent à déterminer.

Il existe une relation entre l'effet biologique de la télomestatine et une diminution de la taille du simple brin, mais il semble que d'autres facteurs interviennent dans la cytotoxicité et la sénescence cellulaire. Nous avons supposé qu'un défaut de liaison de certaines protéines essentielles au maintien de l'intégrité télomérique peut contribuer aux effets biologiques des ligands. Nous avons pour objectif d'étudier l'expression et la localisation de TRF2 et de $hPOT_1$ dans nos modèles cellulaires après traitement à court terme et à long terme par le 307A et la télomestatine.

La réintroduction d'une activité télomérase fonctionnelle dans des lignées ALT induit une résistance partielle au traitement à long terme pour ces deux ligands. Par contre cette résistance n'est pas observée dans une lignée A549 présentant une surexpression de l'activité télomérase (Gomez D., et al., 2003a). Nous avons supposé qu'une différence des structures télomériques imposés par la télomérase ou par le phénotype ALT est à l'origine de cette résistance.

Enfin, les expériences d'hybridation de la sonde brin C sur les extrémités télomériques nous ont suggéré que la taille et/ou la séquence du simple brin télomérique dans les lignées ALT et télomérase positive peuvent être différentes et responsables de la résistance observée dans la lignée JW10. La détermination de la séquence du simple brin télomérique des lignées ALT serait donc une voie intéressante pour expliquer nos différents résultats.

IV. Références Bibliographiques

1. ABDELHALEEM M.
RNA helicases: regulators of differentiation.
Clin Biochem 2005; 38 (6): 499-503.

2. ADOTEVI O., PONS F. G. and LANGLADE-DEMOYEN P.
[Telomerase: a tumor antigen for anticancer immunotherapy].
Med Sci (Paris) 2004; 20 (1): 19-21.

3. ANCELIN K., BRUNORI M., BAUWENS S., KOERING C. E., BRUN C., RICOUL M., et al.
Targeting assay to study the cis functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2.
Mol Cell Biol 2002; 22 (10): 3474-3487.

4. ARIMONDO P. B., RIOU J. F., MERGNY J. L., TAZI J., SUN J. S., GARESTIER T., et al.
Interaction of human DNA topoisomerase I with G-quartet structures.
Nucleic Acids Res 2000; 28 (24): 4832-4838.

5. ARMBRUSTER B. N., LINARDIC C. M., VELDMAN T., BANSAL N. P., DOWNIE D. L. and COUNTER C. M.
Rescue of an hTERT mutant defective in telomere elongation by fusion with hPot1.
Mol Cell Biol 2004; 24 (8): 3552-3561.

6. BACHAND F. and AUTEXIER C.
Functional reconstitution of human telomerase expressed in Saccharomyces cerevisiae.
J Biol Chem 1999; 274 (53): 38027-38031.

7. BACHAND F. and AUTEXIER C.
Functional regions of human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA required for telomerase activity and RNA-protein interactions.
Mol Cell Biol 2001a; 21 (5): 1888-1897.

8. BACHAND F., TRIKI I. and AUTEXIER C.
Human telomerase RNA-protein interactions.
Nucleic Acids Res 2001b; 29 (16): 3385-3393.

9. BACHRATI C. Z. and HICKSON I. D.
RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging.
Biochem J 2003; 374 (Pt 3): 577-606.

10. BAILEY S. M., BRENNEMAN M. A. and GOODWIN E. H.
Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase-negative cells.
Nucleic Acids Res 2004; 32 (12): 3743-3751.

11. BANIK S. S. and COUNTER C. M.
Characterization of interactions between PinX1 and human telomerase subunits hTERT and hTR.
J Biol Chem 2004; 279 (50): 51745-51748.

12. BARMA D. K., ELAYADI A., FALCK J. R. and COREY D. R.
Inhibition of telomerase by BIBR 1532 and related analogues.
Bioorg Med Chem Lett 2003; 13 (7): 1333-1336.

13. BAUMANN P. and CECH T. R.
Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans.
Science 2001; 292 (5519): 1171-1175.

14. BAUMANN P., PODELL E. and CECH T. R.
Human Pot1 (protection of telomeres) protein: cytolocalization, gene structure, and alternative splicing.
Mol Cell Biol 2002; 22 (22): 8079-8087.

15. BAUR J. A., ZOU Y., SHAY J. W. and WRIGHT W. E.
Telomere position effect in human cells.
Science 2001; 292 (5524): 2075-2077.

16. BEATTIE T. L., ZHOU W., ROBINSON M. O. and HARRINGTON L.
Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase.
Mol Cell Biol 2001; 21 (18): 6151-6160.

17. BECHTER O. E., SHAY J. W. and WRIGHT W. E.
The Frequency of Homologous Recombination in Human ALT Cells.
Cell Cycle 2004; 3 (5): 547-549.

18. BECHTER O. E., ZOU Y., SHAY J. W. and WRIGHT W. E.
Homologous recombination in human telomerase-positive and ALT cells occurs with the same frequency.
EMBO Rep 2003; 4 (12): 1138-1143.

19. BEMARK M. and NEUBERGER M. S.
The c-MYC allele that is translocated into the IgH locus undergoes constitutive hypermutation in a Burkitt's lymphoma line.
Oncogene 2000; 19 (30): 3404-3410.

20. BEN-PORATH I. and WEINBERG R. A.
When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence.
J Clin Invest 2004; 113 (1): 8-13.

21. BERNARDI R. and PANDOLFI P. P.
Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death.
Oncogene 2003; 22 (56): 9048-9057.

22. BHUYAN B. K., LOUGHMAN B. E., FRASER T. J. and DAY K. J.
Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds.
Exp Cell Res 1976; 97 (2): 275-280.

23. BILAUD T., BRUN C., ANCELIN K., KOERING C. E., LAROCHE T. and GILSON E.
Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein.
Nat Genet 1997; 17 (2): 236-239.

24. BISCHOF O., KIM S. H., IRVING J., BERESTEN S., ELLIS N. A. and CAMPISI J.
Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage.
J Cell Biol 2001; 153 (2): 367-380.

25. BLACKBURN E. H.
Switching and signaling at the telomere.
Cell 2001; 106 (6): 661-673.

26. BLACKBURN E. H. and GALL J. G.
A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena.
J Mol Biol 1978; 120 (1): 33-53.

27. BODNAR A. G., OUELLETTE M., FROLKIS M., HOLT S. E., CHIU C. P., MORIN G. B., et al.
Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells.
Science 1998; 279 (5349): 349-352.

28. BONNAL S., SCHAEFFER C., CREANCIER L., CLAMENS S., MOINE H., PRATS A. C., et al.
A single internal ribosome entry site containing a G quartet RNA structure drives fibroblast growth factor 2 gene expression at four alternative translation initiation codons.
J Biol Chem 2003; 278 (41): 39330-39336.

29. BROCCOLI D., SMOGORZEWSKA A., CHONG L. and DE LANGE T.
Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2.
Nat Genet 1997; 17 (2): 231-235.

30. BROSH R. M., JR., ORREN D. K., NEHLIN J. O., RAVN P. H., KENNY M. K., MACHWE A., et al.
Functional and physical interaction between WRN helicase and human replication protein A.
J Biol Chem 1999; 274 (26): 18341-18350.

31. BRYAN T. M. and REDDEL R. R.
Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells.
Eur J Cancer 1997; 33 (5): 767-773.

32. BUCHOLC M., PARK Y. and LUSTIG A. J.
Intrachromatid excision of telomeric DNA as a mechanism for telomere size control in Saccharomyces cerevisiae.
Mol Cell Biol 2001; 21 (19): 6559-6573.

33. BURGER A. M., DAI F., SCHULTES C. M., RESZKA A. P., MOORE M. J., DOUBLE J. A., et al.
The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function.
Cancer Res 2005; 65 (4): 1489-1496.

34. CALLEN E., SAMPER E., RAMIREZ M. J., CREUS A., MARCOS R., ORTEGA J. J., et al.
Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia.
Hum Mol Genet 2002; 11 (4): 439-444.

35. CANELLES M., DELGADO M. D., HYLAND K. M., LERGA A., RICHARD C., DANG C. V., et al.
Max and inhibitory c-Myc mutants induce erythroid differentiation and resistance to apoptosis in human myeloid leukemia cells.
Oncogene 1997; 14 (11): 1315-1327.

36. CATASTI P., CHEN X., MOYZIS R. K., BRADBURY E. M. and GUPTA G.
Structure-function correlations of the insulin-linked polymorphic region.
J Mol Biol 1996; 264 (3): 534-545.

37. CATHERS B. E., SUN D. and HURLEY L. H.
Accurate determination of quadruplex binding affinity and potency of G- quadruplex-interactive telomerase inhibitors by use of a telomerase extension assay requires varying the primer concentration.
Anticancer Drug Des 1999; 14 (4): 367-372.

38. CERONE M. A., LONDONO-VALLEJO J. A. and BACCHETTI S.
Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells.
Hum Mol Genet 2001; 10 (18): 1945-1952.

39. CESARE A. J. and GRIFFITH J. D.
Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops.
Mol Cell Biol 2004; 24 (22): 9948-9957.

40. CHEN J. L., BLASCO M. A. and GREIDER C. W.
Secondary structure of vertebrate telomerase RNA.
Cell 2000; 100 (5): 503-514.

41. CHEUNG I., SCHERTZER M., ROSE A. and LANSDORP P. M.
Disruption of dog-1 in Caenorhabditis elegans triggers deletions upstream of guanine-rich DNA.
Nat Genet 2002; 31 (4): 405-409.

42. CHOMCZYNSKI P. and SACCHI N.
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal Biochem 1987; 162 (1): 156-159.

43. COLGIN L. M., BARAN K., BAUMANN P., CECH T. R. and REDDEL R. R.
Human POT1 Facilitates Telomere Elongation by Telomerase.
Curr Biol 2003; 13 (11): 942-946.

44. COLLINS K. and MITCHELL J. R.
Telomerase in the human organism.
Oncogene 2002; 21 (4): 564-579.

45. CONG Y. S., WRIGHT W. E. and SHAY J. W.
Human telomerase and its regulation.
Microbiol Mol Biol Rev 2002; 66 (3): 407-425.

46. CRABBE L., VERDUN R. E., HAGGBLOM C. I. and KARLSEDER J.
Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity.
Science 2004; 306 (5703): 1951-1953.

47. CRISTOFALO V. J., LORENZINI A., ALLEN R. G., TORRES C. and TRESINI M.
Replicative senescence: a critical review.
Mech Ageing Dev 2004; 125 (10-11): 827-848.

48. CRISTOFALO V. J., PHILLIPS P. D., SORGER T. and GERHARD G.
Alterations in the responsiveness of senescent cells to growth factors.
J Gerontol 1989; 44 (6): 55-62.

49. CRNUGELJ M., HUD N. V. and PLAVEC J.
The solution structure of d(G(4)T(4)G(3))(2): a bimolecular G- quadruplex with a novel fold.
J Mol Biol 2002; 320 (5): 911-924.

50. CUESTA J., READ M. A. and NEIDLE S.
The Design of G-quadruplex Ligands as Telomerase Inhibitors.
Mini Rev Med Chem 2003; 3 (1): 11-21.

51. D'ADDA DI FAGAGNA F., REAPER P. M., CLAY-FARRACE L., FIEGLER H., CARR P., VON ZGLINICKI T., et al.
A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence.
Nature 2003; 426 (6963): 194-198.

52. DARNELL J. C., JENSEN K. B., JIN P., BROWN V., WARREN S. T. and DARNELL R. B.
Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function.
Cell 2001; 107 (4): 489-499.

53. DARNELL J. C., WARREN S. T. and DARNELL R. B.
The fragile X mental retardation protein, FMRP, recognizes G-quartets.
Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2004; 10 (1): 49-52.

54. DAVIES J. T.
G-quartet 40 years later: from 5'-GMP to molecular biology and supramolecular chemistry.
Angew Chem Int Edit 2004; 43: 668-698.

55. DE LANGE T.
Cell biology. Telomere capping--one strand fits all.
Science 2001; 292 (5519): 1075-1076.

56. DE LANGE T.
T-loops and the origin of telomeres.
Nat Rev Mol Cell Biol 2004; 5 (4): 323-329.

57. DE STANCHINA E., QUERIDO E., NARITA M., DAVULURI R. V., PANDOLFI P. P., FERBEYRE G., et al.
PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions.
Mol Cell 2004; 13 (4): 523-535.

58. DEMPSEY L. A., SUN H., HANAKAHI L. A. and MAIZELS N.
G4 DNA binding by LR1 and its subunits, nucleolin and hnRNP D, A role for G-G pairing in immunoglobulin switch recombination.
J Biol Chem 1999; 274 (2): 1066-1071.

59. DEPINHO R. A., SCHREIBER-AGUS N. and ALT F. W.
myc family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells.
Adv Cancer Res 1991; 57: 1-46.

60. DEVEREUX T. R., HORIKAWA I., ANNA C. H., ANNAB L. A., AFSHARI C. A. and BARRETT J. C.
DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene.
Cancer Res 1999; 59 (24): 6087-6090.

61. DIMRI G. P., LEE X., BASILE G., ACOSTA M., SCOTT G., ROSKELLEY C., et al.
A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A 1995; 92 (20): 9363-9367.

62. DING H., SCHERTZER M., WU X., GERTSENSTEIN M., SELIG S., KAMMORI M., et al.
Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein.
Cell 2004; 117 (7): 873-886.

63. DOKAL I.
Dyskeratosis congenita in all its forms.
Br J Haematol 2000; 110 (4): 768-779.

64. DOUARRE C., GOMEZ D., MORJANI H., ZAHM J. M., O'DONOHUE M F., EDDABRA L., et al.
Overexpression of Bcl-2 is associated with apoptotic resistance to the G-quadruplex ligand 12459 but is not sufficient to confer resistance to long-term senescence.
Nucleic Acids Res 2005; 33 (7): 2192-2203.

65. DUCREST A. L., SZUTORISZ H., LINGNER J. and NABHOLZ M.
Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene.
Oncogene 2002; 21 (4): 541-552.

66. DUNHAM M. A., NEUMANN A. A., FASCHING C. L. and REDDEL R. R.
Telomere maintenance by recombination in human cells.
Nat Genet 2000; 26 (4): 447-450.

67. DYER C. A. and SINCLAIR A. J.
The premature ageing syndromes: insights into the ageing process.
Age Ageing 1998; 27 (1): 73-80.

68. DYSON P. J. and RABBITTS T. H.
Chromatin structure around the c-myc gene in Burkitt lymphomas with upstream and downstream translocation points.
Proc Natl Acad Sci U S A 1985; 82 (7): 1984-1988.

69. EL-DALY H., KULL M., ZIMMERMANN S., PANTIC M., WALLER C. F. and MARTENS U. M.
Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR1532.
Blood 2005; 105 (4): 1742-1749.

70. FACCHINI L. M. and PENN L. Z.
The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights.
Faseb J 1998; 12 (9): 633-651.

71. FANG G. and CECH T. R.
The beta subunit of Oxytricha telomere-binding protein promotes G- quartet formation by telomeric DNA.
Cell 1993; 74 (5): 875-885.

72. FENG J., FUNK W. D., WANG S. S., WEINRICH S. L., AVILION A. A., CHIU C. P., et al.
The RNA component of human telomerase.
Science 1995; 269 (5228): 1236-1241.

73. FLANARY B.
Regulation of murine telomere length via Rtel.
Rejuvenation Res 2004; 7 (3): 168-170.

74. FOLINI M., COLELLA G., VILLA R., LUALDI S., DAIDONE M. G. and ZAFFARONI N.
Inhibition of telomerase activity by a hammerhead ribozyme targeting the RNA component of telomerase in human melanoma cells.
J Invest Dermatol 2000; 114 (2): 259-267.

75. FORD L. P., ZOU Y., PONGRACZ K., GRYAZNOV S. M., SHAY J. W. and WRIGHT W. E.
Telomerase can inhibit the recombination-based pathway of telomere maintenance in human cells.
J Biol Chem 2001; 276 (34): 32198-32203.

76. FORSTEMANN K., HOSS M. and LINGNER J.
Telomerase-dependent repeat divergence at the 3' ends of yeast telomeres.
Nucleic Acids Res 2000; 28 (14): 2690-2694.

77. FOURNIER A., GOULAOUIC H. and RIOU J. F.
Polypeptides capables of interacting with human topoisomerase III alfa.
Aventis Pharma SA USA.
BREVET, 2004, US2004152162.

78. FRAMSON P. and BORNSTEIN P.
A serum response element and a binding site for NF-Y mediate the serum response of the human thrombospondin 1 gene.
J Biol Chem 1993; 268 (7): 4989-4996.

79. FRANCHITTO A. and PICHIERRI P.
Bloom's syndrome protein is required for correct relocalization of RAD50/MRE11/NBS1 complex after replication fork arrest.
J Cell Biol 2002; 157 (1): 19-30.

80. FRY M. and LOEB L. A.
Human werner syndrome DNA helicase unwinds tetrahelical structures of the fragile X syndrome repeat sequence d(CGG)n.
J Biol Chem 1999; 274 (18): 12797-12802.

81. FU D. and COLLINS K.
Distinct Biogenesis Pathways for Human Telomerase RNA and H/ACA Small Nucleolar RNAs.
Mol Cell 2003; 11 (5): 1361-1372.

82. FUJIMOTO K., KYO S., TAKAKURA M., KANAYA T., KITAGAWA Y., ITOH H., et al.
Identification and characterization of negative regulatory elements of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter: possible role of MZF-2 in transcriptional repression of hTERT.
Nucleic Acids Res 2000; 28 (13): 2557-2562.

83. FUKUDA H., KATAHIRA M., TSUCHIYA N., ENOKIZONO Y., SUGIMURA T., NAGAO M., et al.
Unfolding of quadruplex structure in the G-rich strand of the minisatellite repeat by the binding protein UP1.
Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99 (20): 12685-12690.

84. GABUT M., MINE M., MARSAC C., BRIVET M., TAZI J. and SORET J.
The SR protein SC35 is responsible for aberrant splicing of the E1alpha pyruvate dehydrogenase mRNA in a case of mental retardation with lactic acidosis.
Mol Cell Biol 2005; 25 (8): 3286-3294.

85. GAZIN C., DUPONT DE DINECHIN S., HAMPE A., MASSON J. M., MARTIN P., STEHELIN D., et al.
Nucleotide sequence of the human c-myc locus: provocative open reading frame within the first exon.
Embo J 1984; 3 (2): 383-387.

86. GEHRING K., LEROY J. L. and GUERON M.
A tetrameric DNA structure with protonated cytosine.cytosine base pairs.
Nature 1993; 363 (6429): 561-565.

87. GELLERT M., LIPSETT M. N. and DAVIES D. R.
Helix formation by guanylic acid.
Proc Natl Acad Sci U S A 1962; 48: 2013-2018.

88. GERMAN J.
Bloom syndrome: a mendelian prototype of somatic mutational disease.
Medicine (Baltimore) 1993; 72 (6): 393-406.

89. GIRALDO R. and RHODES D.
The yeast telomere-binding protein RAP1 binds to and promotes the formation of DNA quadruplexes in telomeric DNA.
Embo J 1994a; 13 (10): 2411-2420.

90. GIRALDO R., SUZUKI M., CHAPMAN L. and RHODES D.
Promotion of parallel DNA quadruplexes by a yeast telomere binding protein: a circular dichroism study.
Proc Natl Acad Sci U S A 1994b; 91 (16): 7658-7662.

91. GIRE V.
Dysfunctional telomeres at senescence signal cell cycle arrest via Chk2.
Cell Cycle 2004; 3 (10): 1217-1220.

92. GLUKHOV A. I., ZIMNIK O. V., GORDEEV S. A. and SEVERIN S. E.
Inhibition of telomerase activity of melanoma cells in vitro by antisense oligonucleotides.
Biochem Biophys Res Commun 1998; 248 (2): 368-371.

93. GOMEZ D., AOUALI N., LONDONO-VALLEJO A., LACROIX L., MEGNIN-CHANET F., LEMARTELEUR T., et al.
Resistance to the short term antiproliferative activity of the G-quadruplex ligand 12459 Is associated with telomerase overexpression and telomere capping alteration.
J. Biol. Chem. 2003a; 278 (50): 50554-50562.

94. GOMEZ D., AOUALI N., RENAUD A., DOUARRE C., SHIN-YA K., TAZI J., et al.
Resistance to senescence induction and telomere shortening by a G-quadruplex ligand inhibitor of telomerase.
Cancer Res 2003b; 63 (19): 6149-6153.

95. GOMEZ D., MERGNY J. L. and RIOU J. F.
Detection of telomerase inhibitors based on G-quadruplex ligands by a modified telomeric repeat amplification protocol assay.
Cancer Res 2002; 62 (12): 3365-3368.

96. GOMEZ D., PATERSKI R., LEMARTELEUR T., SHIN-YA K., MERGNY J. L. and RIOU J. F.
Interaction of telomestatin with the telomeric single-strand overhang.
J Biol Chem 2004; 279 (40): 41487-41494.

97. GOWAN S. M., HARRISON J. R., PATTERSON L., VALENTI M., READ M. A., NEIDLE S., et al.
A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity.
Mol Pharmacol 2002; 61 (5): 1154-1162.

98. GOWAN S. M., HEALD R., STEVENS M. F. and KELLAND L. R.
Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes.
Mol Pharmacol 2001; 60 (5): 981-988.

99. GRAND C. L., HAN H., MUNOZ R. M., WEITMAN S., VON HOFF D. D., HURLEY L. H., et al.
The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo.
Mol Cancer Ther 2002; 1 (8): 565-573.

100. GRAND C. L., POWELL T. J., NAGLE R. B., BEARSS D. J., TYE D., GLEASON-GUZMAN M., et al.
Mutations in the G-quadruplex silencer element and their relationship to c-MYC overexpression, NM23 repression, and therapeutic rescue.
Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101 (16): 6140-6145.

101. GRAND C. L., POWELL T. J., NAGLE R. B., BEARSS D. J., TYE D., GLEASON-GUZMAN M., et al.
Mutations in the G-quadruplex silencer element and their relationship to c-MYC overexpression, NM23 repression, and therapeutic rescue. Retraction.
Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102 (2): 515-516.

102. GRANDORI C., COWLEY S. M., JAMES L. P. and EISENMAN R. N.
The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior.
Annu Rev Cell Dev Biol 2000; 16: 653-699.

103. GREIDER C. W.
Telomeres do D-loop-T-loop.
Cell 1999; 97 (4): 419-422.

104. GREIDER C. W. and BLACKBURN E. H.
Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts.
Cell 1985; 43 (2 Pt 1): 405-413.

105. GREIDER C. W. and BLACKBURN E. H.
The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity.
Cell 1987; 51 (6): 887-898.

106. GREIDER C. W. and BLACKBURN E. H.
A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis.
Nature 1989; 337 (6205): 331-337.

107. GREIDER C. W. and BLACKBURN E. H.
Telomeres, telomerase and cancer.
Sci Am 1996; 274 (2): 92-97.

108. GRIFFITH J. D., COMEAU L., ROSENFIELD S., STANSEL R. M., BIANCHI A., MOSS H., et al.
Mammalian telomeres end in a large duplex loop.
Cell 1999; 97 (4): 503-514.

109. GROBELNY J. V., GODWIN A. K. and BROCCOLI D.
ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/M phase of the cell cycle.
J Cell Sci 2000; 113 Pt 24: 4577-4585.

110. GROBELNY J. V., KULP-MCELIECE M. and BROCCOLI D.
Effects of reconstitution of telomerase activity on telomere maintenance by the alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway.
Hum Mol Genet 2001; 10 (18): 1953-1961.

111. GUIDUCCI C., CERONE M. A. and BACCHETTI S.
Expression of mutant telomerase in immortal telomerase-negative human cells results in cell cycle deregulation, nuclear and chromosomal abnormalities and rapid loss of viability.
Oncogene 2001; 20 (6): 714-725.

112. GUILLERET I., YAN P., GRANGE F., BRAUNSCHWEIG R., BOSMAN F. T. and BENHATTAR J.
Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity.
Int J Cancer 2002; 101 (4): 335-341.

113. GUITTAT L.
Identification de ligands de quadruplexes de guanines inhibiteurs de l'activité télomérase.
Thèse de 3ème cycle: Sciences de la vie : Paris, Muséum National d'Histoire Naturelle : 2004 ; 10.

114. GUITTAT L., ALBERTI P., GOMEZ D., DE CIAN A., PENNARUN G., LEMARTELEUR T., et al.
Targeting human telomerase for cancer therapeutics.
Cytotecnology 2004; (45) : 75-90.

115. GUITTAT L., LACROIX L., GOMEZ D., ARIMONDO P. B., DE CIAN A., PENNARUN G., et al.
Quadruplex structures and quadruplex ligands.
Dynamical Genetics 2004: 199-236.

116. HAHN W. C., STEWART S. A., BROOKS M. W., YORK S. G., EATON E., KURACHI A., et al.
Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells.
Nat Med 1999; 5 (10): 1164-1170.

117. HAIDER S., PARKINSON G. N. and NEIDLE S.
Crystal structure of the potassium form of an Oxytricha nova G- quadruplex.
J Mol Biol 2002; 320 (2): 189-200.

118. HALDER K., MATHUR V., CHUGH D., VERMA A. and CHOWDHURY S.
Quadruplex-duplex competition in the nuclease hypersensitive element of human c-myc promoter: C to T mutation in C-rich strand enhances duplex association.
Biochem Biophys Res Commun 2005; 327 (1): 49-56.

119. HALUSKA P., JR. and RUBIN E. H.
A role for the amino terminus of human topoisomerase I.
Adv Enzyme Regul 1998; 38: 253-262.

120. HAN H. and HURLEY L. H.
G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design.
Trends Pharmacol Sci 2000; 21 (4): 136-142.

121. HAN H., LANGLEY D. R., RANGAN A. and HURLEY L. H.
Selective interactions of cationic porphyrins with G-quadruplex structures.
J Am Chem Soc 2001; 123 (37): 8902-8913.

122. HANAKAHI L. A., SUN H. and MAIZELS N.
High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA.
J Biol Chem 1999; 274 (22): 15908-15912.

123. HARLEY C. B., FUTCHER A. B. and GREIDER C. W.
Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts.
Nature 1990; 345 (6274): 458-460.

124. HARRINGTON L.
Those dam-aged telomeres!
Curr Opin Genet Dev 2004; 14 (1): 22-28.

125. HARRISON R. J., GOWAN S. M., KELLAND L. R. and NEIDLE S.
Human telomerase inhibition by substituted acridine derivatives.
Bioorg Med Chem Lett 1999; 9 (17): 2463-2468.

126. HAYFLICK L.
The cell biology of aging.
J Invest Dermatol 1979; 73 (1): 8-14.

127. HAYFLICK L. and MOORHEAD P. S.
The serial cultivation of human diploid cell strains.
Exp Cell Res 1961; 25: 585-621.

128. HAZEL P., HUPPERT J., BALASUBRAMANIAN S. and NEIDLE S.
Loop-length-dependent folding of G-quadruplexes.
J Am Chem Soc 2004; 126 (50): 16405-16415.

129. HENSON J. D., NEUMANN A. A., YEAGER T. R. and REDDEL R. R.
Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells.
Oncogene 2002; 21 (4): 598-610.

130. HERBIG U., JOBLING W. A., CHEN B. P., CHEN D. J. and SEDIVY J. M.
Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a).
Mol Cell 2004; 14 (4): 501-513.

131. HERON J. F.
L'actinomycine D. [consulté le 07/02/2005]. Disponible à partir de URL :
http://www.oncoprof.net/Generale2000/g09_Chimiotherapie/Complements/g09_comp07.html

132. HIGAKI T., WATANABE T., TAMATOMI I., TAHARA H., SUGIMOTO M., FURUICHI Y., et al.
Terminal telomere repeats are actually short in telomerase-negative immortal human cells.
Biol Pharm Bull 2004; 27 (12): 1932-1938.

133. HISATOMI H., OHYASHIKI K., OHYASHIKI J. H., NAGAO K., KANAMARU T., HIRATA H., et al.
Expression profile of a gamma-deletion variant of the human telomerase reverse transcriptase gene.
Neoplasia 2003; 5 (3): 193-197.

134. HOARE S. F., BRYCE L. A., WISMAN G. B., BURNS S., GOING J. J., VAN DER ZEE A. G., et al.
Lack of telomerase RNA gene hTERC expression in alternative lengthening of telomeres cells is associated with methylation of the hTERC promoter.
Cancer Res 2001; 61 (1): 27-32.

135. HOLT S. E., GLINSKY V. V., IVANOVA A. B. and GLINSKY G. V.
Resistance to apoptosis in human cells conferred by telomerase function and telomere stability.
Mol Carcinog 1999; 25 (4): 241-248.

136. HORIKAWA I., CABLE P. L., AFSHARI C. and BARRETT J. C.
Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene.
Cancer Res 1999; 59 (4): 826-830.

137. HOUGHTALING B. R., CUTTONARO L., CHANG W. and SMITH S.
A Dynamic Molecular Link between the Telomere Length Regulator TRF1 and the Chromosome End Protector TRF2.
Curr Biol 2004; 14 (18): 1621-1631.

138. HUGHES T. R., EVANS S. K., WEILBAECHER R. G. and LUNDBLAD V.
The Est3 protein is a subunit of yeast telomerase.
Curr Biol 2000; 10 (13): 809-812.

139. HUPPERT J. L. and BALASUBRAMANIAN S.
Prevalence of quadruplexes in the human genome.
Nucleic Acids Res 2005; 33 (9): 2908-2916.

140. INCLES C. M., SCHULTES C. M., KEMPSKI H., KOEHLER H., KELLAND L. R. and NEIDLE S.
A G-quadruplex telomere targeting agent produces p16-associated senescence and chromosomal fusions in human prostate cancer cells.
Mol Cancer Ther 2004; 3 (10): 1201-1206.

141. ISHII Y., TSUYAMA N., MAEDA S., TAHARA H. and IDE T.
Telomerase activity in hybrids between telomerase-negative and telomerase-positive immortal human cells is repressed in the different complementation groups but not in the same complementation group of immortality.
Mech Ageing Dev 1999; 110 (3): 175-193.

142. ISHIKAWA F.
Regulation mechanisms of mammalian telomerase. A review.
Biochemistry (Mosc) 1997; 62 (11): 1332-1337.

143. ISHIKAWA M., NUMAZAWA S. and YOSHIDA T.
Redox regulation of the transcriptional repressor Bach1.
Free Radic Biol Med 2005; 38 (10): 1344-1352.

144. ITAHANA K., CAMPISI J. and DIMRI G. P.
Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells.
Biogerontology 2004; 5 (1): 1-10.

145. ITAHANA K., DIMRI G. and CAMPISI J.
Regulation of cellular senescence by p53.
Eur J Biochem 2001; 268 (10): 2784-2791.

146. ITAHANA K., ZOU Y., ITAHANA Y., MARTINEZ J.-L., BEAUSEJOUR C., JACOBS J. J. L., et al.
Control of the Replicative Life Span of Human Fibroblasts by p16 and the Polycomb Protein Bmi-1.
Mol. Cell. Biol. 2003; 23 (1): 389-401.

147. IZBICKA E., WHEELHOUSE R. T., RAYMOND E., DAVIDSON K. K., LAWRENCE R. A., SUN D., et al.
Effects of cationic porphyrins as G-quadruplex interactive agents in human tumor cells.
Cancer Res 1999; 59 (3): 639-644.

148. JACOB N. K., SKOPP R. and PRICE C. M.
G-overhang dynamics at Tetrahymena telomeres.
Embo J 2001; 20 (15): 4299-4308.

149. JACOBS J. J., KIEBOOM K., MARINO S., DEPINHO R. A. and VAN LOHUIZEN M.
The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus.
Nature 1999; 397 (6715): 164-168.

150. JIANG W. Q., ZHONG Z. H., HENSON J. D., NEUMANN A. A., CHANG A. C. and REDDEL R. R.
Suppression of alternative lengthening of telomeres by Sp100-mediated sequestration of the MRE11/RAD50/NBS1 complex.
Mol Cell Biol 2005; 25 (7): 2708-2721.

151. KANAYA T., KYO S., HAMADA K., TAKAKURA M., KITAGAWA Y., HARADA H., et al.
Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down- regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription.
Clin Cancer Res 2000; 6 (4): 1239-1247.

152. KARLSEDER J., BROCCOLI D., DAI Y., HARDY S. and DE LANGE T.
p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2.
Science 1999; 283 (5406): 1321-1325.

153. KARLSEDER J., SMOGORZEWSKA A. and DE LANGE T.
Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss.
Science 2002; 295 (5564): 2446-2449.

154. KELLEHER C., KURTH I. and LINGNER J.
Human Protection of Telomeres 1 (POT1) Is a Negative Regulator of Telomerase Activity In Vitro.
Mol Cell Biol 2005; 25 (2): 808-818.

155. KEPPLER B. R. and JARSTFER M. B.
Inhibition of telomerase activity by preventing proper assemblage.
Biochemistry 2004; 43 (2): 334-343.

156. KERWIN S. M.
G-Quadruplex DNA as a target for drug design.
Curr Pharm Des 2000; 6 (4): 441-478.

157. KHAKHAR R. R., COBB J. A., BJERGBAEK L., HICKSON I. D., GASSER S. M. and WU L.
RecQ helicases: multiple roles in genome maintenance.
Trends Cell Biol 2003; 13 (9): 493-501.

158. KILIAN A., BOWTELL D. D., ABUD H. E., HIME G. R., VENTER D. J., KEESE P. K., et al.
Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types.
Hum Mol Genet 1997; 6 (12): 2011-2019.

159. KIM M. Y., GLEASON-GUZMAN M., IZBICKA E., NISHIOKA D. and HURLEY L. H.
The different biological effects of telomestatin and TMPyP4 can be attributed to their selectivity for interaction with intramolecular or intermolecular G-quadruplex structures.
Cancer Res 2003; 63 (12): 3247-3256.

160. KIM M. Y., VANKAYALAPATI H., SHIN-YA K., WIERZBA K. and HURLEY L. H.
Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex.
J Am Chem Soc 2002; 124 (10): 2098-2099.

161. KIM S. H., BEAUSEJOUR C., DAVALOS A. R., KAMINKER P., HEO S. J. and CAMPISI J.
TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres.
J Biol Chem 2004; 279 (42): 43799-43804.

162. KIM S. J., LEE H. D., ROBBINS P. D., BUSAM K., SPORN M. B. and ROBERTS A. B.
Regulation of transforming growth factor beta 1 gene expression by the product of the retinoblastoma-susceptibility gene.
Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88 (8): 3052-3056.

163. KISHI S. and LU K. P.
A critical role for Pin2/TRF1 in ATM-dependent regulation. Inhibition of Pin2/TRF1 function complements telomere shortening, radiosensitivity, and the G(2)/M checkpoint defect of ataxia- telangiectasia cells.
J Biol Chem 2002; 277 (9): 7420-7429.

164. KNUDSON M., KULKARNI S., BALLAS Z. K., BESSLER M. and GOLDMAN F.
Association of immune abnormalities with telomere shortening in autosomal-dominant dyskeratosis congenita.
Blood 2005; 105 (2): 682-688.

165. KOEPPEL F., RIOU J. F., LAOUI A., MAILLIET P., ARIMONDO P. B., LABIT D., et al.
Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes.
Nucleic Acids Res 2001; 29 (5): 1087-1096.

166. KONDO Y., KOGA S., KOMATA T. and KONDO S.
Treatment of prostate cancer in vitro and in vivo with 2-5A-anti- telomerase RNA component.
Oncogene 2000; 19 (18): 2205-2211.

167. KOSCIOLEK B. A., KALANTIDIS K., TABLER M. and ROWLEY P. T.
Inhibition of telomerase activity in human cancer cells by RNA interference.
Mol Cancer Ther 2003; 2 (3): 209-216.

168. KURZ E. U. and LEES-MILLER S. P.
DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways.
DNA Repair (Amst) 2004; 3 (8-9): 889-900.

169. KUSHNER D. M., PARANJAPE J. M., BANDYOPADHYAY B., CRAMER H., LEAMAN D. W., KENNEDY A. W., et al.
2-5A antisense directed against telomerase RNA produces apoptosis in ovarian cancer cells.
Gynecol Oncol 2000; 76 (2): 183-192.

170. KYO S., TAKAKURA M., KANAYA T., ZHUO W., FUJIMOTO K., NISHIO Y., et al.
Estrogen activates telomerase.
Cancer Res 1999; 59 (23): 5917-5921.

171. LABRANCHE H., DUPUIS S., BEN-DAVID Y., BANI M. R., WELLINGER R. J. and CHABOT B.
Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase.
Nat Genet 1998; 19 (2): 199-202.

172. LANSIAUX A., FORMSTECHER P. and BAILLY C.
[LGD1069: an antagonist to the X retinoid receptor].
Bull Cancer 2000; 87 (3): 235-238.

173. LEBEL C. and WELLINGER R. J.
[The structures at the termini of chromosomes: what is there hidden under the cap ?].
Med Sci (Paris) 2004; 20 (2): 207-212.

174. LEE J. W., HARRIGAN J., OPRESKO P. L. and BOHR V. A.
Pathways and functions of the Werner syndrome protein.
Mech Ageing Dev 2005; 126 (1): 79-86.

175. LEE S. K., JOHNSON R. E., YU S. L., PRAKASH L. and PRAKASH S.
Requirement of yeast SGS1 and SRS2 genes for replication and transcription.
Science 1999; 286 (5448): 2339-2342.

176. LEEM S. H., LONDONO-VALLEJO J. A., KIM J. H., BUI H., TUBACHER E., SOLOMON G., et al.
The human telomerase gene: complete genomic sequence and analysis of tandem repeat polymorphisms in intronic regions.
Oncogene 2002; 21 (5): 769-777.

177. LEI M., BAUMANN P. and CECH T. R.
Cooperative Binding of Single-Stranded Telomeric DNA by the Pot1 Protein of Schizosaccharomyces pombe.
Biochemistry 2002; 41 (49): 14560-14568.

178. LEI M., PODELL E. R. and CECH T. R.
Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection.
Nat Struct Mol Biol 2004; 11 (12): 1223-1229.

179. LEI M., ZAUG A. J., PODELL E. R. and CECH T. R.
Switching Human Telomerase On and Off with hPOT1 Protein in Vitro.
J Biol Chem 2005; 280 (21): 20449-20456.

180. LENDVAY T. S., MORRIS D. K., SAH J., BALASUBRAMANIAN B. and LUNDBLAD V.
Senescence mutants of Saccharomyces cerevisiae with a defect in telomere replication identify three additional EST genes.
Genetics 1996; 144 (4): 1399-1412.

181. LEPECQ J. B. and PAOLETTI C.
A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. Physical-chemical characterization.
J Mol Biol 1967; 27 (1): 87-106.

182. LI B. and DE LANGE T.
Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres.
Mol Biol Cell 2003; 14 (12): 5060-5068.

183. LI B. and LUSTIG A. J.
A novel mechanism for telomere size control in Saccharomyces cerevisiae.
Genes Dev 1996; 10 (11): 1310-1326.

184. LINGNER J., HUGHES T. R., SHEVCHENKO A., MANN M., LUNDBLAD V. and CECH T. R.
Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase.
Science 1997; 276 (5312): 561-567.

185. LIU D., O'CONNOR M. S., QIN J. and SONGYANG Z.
Telosome -- A mammalian telomere associated complex formed by multiple telomeric proteins.
J Biol Chem 2004a; 279 (49): 51338-51342.

186. LIU D., SAFARI A., O'CONNOR M. S., CHAN D. W., LAEGELER A., QIN J., et al.
PTOP interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres.
Nat Cell Biol 2004b; 6 (7): 673-680.

187. LOAYZA D. and DE LANGE T.
POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control.
Nature 2003; 423 (6943): 1013-1018.

188. LONDONO-VALLEJO J. A., DER-SARKISSIAN H., CAZES L., BACCHETTI S. and REDDEL R. R.
Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange.
Cancer Res 2004; 64 (7): 2324-2327.

189. LUNDBLAD V.
Telomere replication: an est fest.
Curr Biol 2003; 13 (11): R439-441.

190. LUNDBLAD V. and BLACKBURN E. H.
An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence.
Cell 1993; 73 (2): 347-360.

191. MAITI S., CHAUDHURY N. K. and CHOWDHURY S.
Hoechst 33258 binds to G-quadruplex in the promoter region of human c-myc.
Biochem Biophys Res Commun 2003; 310 (2): 505-512.

192. MARCAND S., GILSON E. and SHORE D.
A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast.
Science 1997; 275 (5302): 986-990.

193. MARCHAND C., POURQUIER P., LACO G., JING N. and POMMIER Y.
Interaction of human nuclear topoisomerase I with guanosine-quartet- forming and guanosine-rich single-stranded DNA and RNA oligonucleotides.
J Biol Chem 2001; 26: 26.

194. MARCOTTE R., LACELLE C. and WANG E.
Senescent fibroblasts resist apoptosis by downregulating caspase-3.
Mech Ageing Dev 2004; 125 (10-11): 777-783.

195. MARQUET R., BAUDIN F., GABUS C., DARLIX J. L., MOUGEL M., EHRESMANN C., et al.
Dimerization of human immunodeficiency virus (type 1) RNA: stimulation by cations and possible mechanism.
Nucleic Acids Res 1991; 19 (9): 2349-2357.

196. MARTENS U. M., CHAVEZ E. A., POON S. S., SCHMOOR C. and LANSDORP P. M.
Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence.
Exp Cell Res 2000; 256 (1): 291-299.

197. MARUSIC L., ANTON M., TIDY A., WANG P., VILLEPONTEAU B. and BACCHETTI S.
Reprogramming of telomerase by expression of mutant telomerase RNA template in human cells leads to altered telomeres that correlate with reduced cell viability.
Mol Cell Biol 1997; 17 (11): 6394-6401.

198. MASUTOMI K., YU E. Y., KHURTS S., BEN-PORATH I., CURRIER J. L., METZ G. B., et al.
Telomerase maintains telomere structure in normal human cells.
Cell 2003; 114 (2): 241-253.

199. MATHUR V., VERMA A., MAITI S. and CHOWDHURY S.
Thermodynamics of i-tetraplex formation in the nuclease hypersensitive element of human c-myc promoter.
Biochem Biophys Res Commun 2004; 320 (4): 1220-1227.

200. MCCLINTOCK B.
The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome brocken at meiosis.
Proc Natl Acad Sci U S A 1939; 25: 405-416.

201. MCEACHERN M. J., KRAUSKOPF A. and BLACKBURN E. H.
Telomeres and their control.
Annu Rev Genet 2000; 34: 331-358.

202. MERGNY J. L., DE CIAN A., GHELAB A., SACCA B. and LACROIX L.
Kinetics of tetramolecular quadruplexes.
Nucleic Acids Res 2005; 33 (1): 81-94.

203. MERGNY J. L. and HELENE C.
G-quadruplex DNA: a target for drug design.
Nat Med 1998a; 4 (12): 1366-1367.

204. MERGNY J. L., PHAN A. T. and LACROIX L.
Following G-quartet formation by UV-spectroscopy.
FEBS Lett 1998b; 435 (1): 74-78.

205. MERGNY J. L., RIOU J. F., MAILLIET P., TEULADE-FICHOU M. P. and GILSON E.
Natural and pharmacological regulation of telomerase.
Nucleic Acids Res 2002; 30 (4): 839-865.

206. MEYERSON M., COUNTER C. M., EATON E. N., ELLISEN L. W., STEINER P., CADDLE S. D., et al.
hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up- regulated in tumor cells and during immortalization.
Cell 1997; 90 (4): 785-795.

207. MILLER K. M. and COOPER J. P.
The telomere protein taz1 is required to prevent and repair genomic DNA breaks.
Mol Cell 2003; 11 (2): 303-313.

208. MISAWA M., TAUCHI T., SASHIDA G., NAKAJIMA A., ABE K., OHYASHIKI J. H., et al.
Inhibition of human telomerase enhances the effect of chemotherapeutic agents in lung cancer cells.
Int J Oncol 2002; 21 (5): 1087-1092.

209. MISITI S., NANNI S., FONTEMAGGI G., CONG Y. S., WEN J., HIRTE H. W., et al.
Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells.
Mol Cell Biol 2000; 20 (11): 3764-3771.

210. MITCHELL J. R. and COLLINS K.
Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase.
Mol Cell 2000; 6 (2): 361-371.

211. MOHAGHEGH P., KAROW J. K., BROSH JR R. M., JR., BOHR V. A. and HICKSON I. D.
The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases.
Nucleic Acids Res 2001; 29 (13): 2843-2849.

212. MORIN G. B.
The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats.
Cell 1989; 59 (3): 521-529.

213. MOSMANN T.
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.
J Immunol Methods 1983; 65 (1-2): 55-63.

214. MOYZIS R. K., BUCKINGHAM J. M., CRAM L. S., DANI M., DEAVEN L. L., JONES M. D., et al.
A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)n, present at the telomeres of human chromosomes.
Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85 (18): 6622-6626.

215. MULLER H. J.
The Remaking of chromosomes.
The collecting net. Woods Hole 1938; 13: 181-198.

216. MURCHIE A. I. and LILLEY D. M.
Retinoblastoma susceptibility genes contain 5' sequences with a high propensity to form guanine-tetrad structures.
Nucleic Acids Res 1992; 20 (1): 49-53.

217. NABETANI A., YOKOYAMA O. and ISHIKAWA F.
Localization of hRad9, hHus1, hRad1, and hRad17 and caffeine-sensitive DNA replication at the alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia body.
J Biol Chem 2004; 279 (24): 25849-25857.

218. NAKA K., IKEDA K. and MOTOYAMA N.
Recruitment of NBS1 into PML oncogenic domains via interaction with SP100 protein.
Biochem Biophys Res Commun 2002; 299 (5): 863-871.

219. NAKAJIMA A., TAUCHI T., SASHIDA G., SUMI M., ABE K., YAMAMOTO K., et al.
Telomerase inhibition enhances apoptosis in human acute leukemia cells: possibility of antitelomerase therapy.
Leukemia 2003; 17 (3): 560-567.

220. NAKAMURA T. M., MORIN G. B., CHAPMAN K. B., WEINRICH S. L., ANDREWS W. H., LINGNER J., et al.
Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human.
Science 1997; 277 (5328): 955-959.

221. NEUMANN A. A. and REDDEL R. R.
Telomere maintenance and cancer -- look, no telomerase.
Nat Rev Cancer 2002; 2 (11): 879-884.

222. NONIN-LECOMTE S. and LEROY J. L.
Structure of a C-rich strand fragment of the human centromeric satellite III: a pH-dependent intercalation topology.
J Mol Biol 2001; 309 (2): 491-506.

223. O'CONNOR M. S., SAFARI A., LIU D., QIN J. and SONGYANG Z.
The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length.
J Biol Chem 2004; 279 (27): 28585-28591.

224. OH S., SONG Y., YIM J. and KIM T. K.
The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene.
J Biol Chem 1999; 274 (52): 37473-37478.

225. OHKI R., TSURIMOTO T. and ISHIKAWA F.
In vitro reconstitution of the end replication problem.
Mol Cell Biol 2001; 21 (17): 5753-5766.

226. OLOVNIKOV A. M.
Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides.
Dokl Akad Nauk SSSR 1971; 201 (6): 1496-1499.

227. ORREN D. K., THEODORE S. and MACHWE A.
The Werner syndrome helicase/exonuclease (WRN) disrupts and degrades D- loops in vitro.
Biochemistry 2002; 41 (46): 13483-13488.

228. OUELLETTE M. M., LIAO M., HERBERT B. S., JOHNSON M., HOLT S. E., LISS H. S., et al.
Subsenescent telomere lengths in fibroblasts immortalized by limiting amounts of telomerase.
J Biol Chem 2000; 275 (14): 10072-10076.

229. PAN B., XIONG Y., SHI K., DENG J. and SUNDARALINGAM M.
Crystal structure of an RNA purine-rich tetraplex containing adenine tetrads: implications for specific binding in RNA tetraplexes.
Structure (Camb) 2003a; 11 (7): 815-823.

230. PAN B., XIONG Y., SHI K. and SUNDARALINGAM M.
An eight-stranded helical fragment in RNA crystal structure: implications for tetraplex interaction.
Structure (Camb) 2003b; 11 (7): 825-831.

231. PANDITA T. K.
ATM function and telomere stability.
Oncogene 2002; 21 (4): 611-618.

232. PARK M. J., JANG Y. K., CHOI E. S., KIM H. S. and PARK S. D.
Fission yeast Rap1 homolog is a telomere-specific silencing factor and interacts with Taz1p.
Mol Cells 2002; 13 (2): 327-333.

233. PARKINSON G. N., LEE M. P. and NEIDLE S.
Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA.
Nature 2002; 417 (6891): 876-880.

234. PASCOLO E., WENZ C., LINGNER J., HAUEL N., PRIEPKE H., KAUFFMANN I., et al.
Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non- nucleosidic drug candidate.
J Biol Chem 2002; 277 (18): 15566-15572.

235. PATEL J. H., DU Y., ARD P. G., PHILLIPS C., CARELLA B., CHEN C. J., et al.
The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60.
Mol Cell Biol 2004a; 24 (24): 10826-10834.

236. PATEL J. H., LOBODA A. P., SHOWE M. K., SHOWE L. C. and MCMAHON S. B.
Analysis of genomic targets reveals complex functions of MYC.
Nat Rev Cancer 2004b; 4 (7): 562-568.

237. PATEL P. K., KOTI A. S. and HOSUR R. V.
NMR studies on truncated sequences of human telomeric DNA: observation of a novel A-tetrad.
Nucleic Acids Res 1999; 27 (19): 3836-3843.

238. PATEL S. D., ISALAN M., GAVORY G., LADAME S., CHOO Y. and BALASUBRAMANIAN S.
Inhibition of human telomerase activity by an engineered zinc finger protein that binds G-quadruplexes.
Biochemistry 2004; 43 (42): 13452-13458.

239. 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 (57): 9142-9150.

240. PENDINO F., FLEXOR M., DELHOMMEAU F., BUET D., LANOTTE M. and SEGAL-BENDIRDJIAN E.
Retinoids down-regulate telomerase and telomere length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation.
Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98 (12): 6662-6667.

241. PENNARUN G., GRANOTIER C., GAUTHIER L. R., GOMEZ D., HOFFSCHIR F., MANDINE E., et al.
Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands.
Oncogene 2005; 24 (18): 2917-2928.

242. PERREM K., BRYAN T. M., ENGLEZOU A., HACKL T., MOY E. L. and REDDEL R. R.
Repression of an alternative mechanism for lengthening of telomeres in somatic cell hybrids.
Oncogene 1999; 18 (22): 3383-3390.

243. PERREM K., COLGIN L. M., NEUMANN A. A., YEAGER T. R. and REDDEL R. R.
Coexistence of alternative lengthening of telomeres and telomerase in hTERT-transfected GM847 cells.
Mol Cell Biol 2001; 21 (12): 3862-3875.

244. PHARMACEUTICALS C.
[consulté le 07/02/2005]. Disponible à partir de URL :
http://www.cylenepharma.com/

245. PITTS A. E. and COREY D. R.
Inhibition of human telomerase by 2'-O-methyl-RNA.
Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95 (20): 11549-11554.

246. POSTEL E. H., BERBERICH S. J., ROONEY J. W. and KAETZEL D. M.
Human NM23/nucleoside diphosphate kinase regulates gene expression through DNA binding to nuclease-hypersensitive transcriptional elements.
J Bioenerg Biomembr 2000; 32 (3): 277-284.

247. PRICE C. M.
Synthesis of the telomeric C-strand. A review.
Biochemistry (Mosc) 1997; 62 (11): 1216-1223.

248. PRYDE F. E. and LOUIS E. J.
Saccharomyces cerevisiae telomeres. A review.
Biochemistry (Mosc) 1997; 62 (11): 1232-1241.

249. QI L., STRONG M. A., KARIM B. O., ARMANIOS M., HUSO D. L. and GREIDER C. W.
Short telomeres and ataxia-telangiectasia mutated deficiency cooperatively increase telomere dysfunction and suppress tumorigenesis.
Cancer Res 2003; 63 (23): 8188-8196.

250. RAHMAN R., LATONEN L. and WIMAN K. G.
hTERT antagonizes p53-induced apoptosis independently of telomerase activity.
Oncogene 2004; 24 (8): 1320-1327.

251. REDDEL R. R.
Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer.
Cancer Lett 2003; 194 (2): 155-162.

252. RIOU J. F.
G-quadruplex interacting agents targeting the telomeric g-overhang are more than simple telomerase inhibitors.
Curr Med Chem Anti-Canc Agents 2004; 4 (5): 439-443.

253. RIOU J. F., GOMEZ D., LEMARTELEUR T. and TRENTESAUX C.
[G-quadruplex DNA: myth or reality?].
Bull Cancer 2003; 90 (4): 305-313.

254. RIOU J. F., GOMEZ D., MERGNY J. L., GUITTAT L., PATERSKI R., CHENAIS B., et al.
Régulation de la longueur des télomères : rendre le télomère accessible ?
Bull Cancer 2005; 91 (1): 1-10.

255. RIOU J. F., GUITTAT L., MAILLIET P., LAOUI A., RENOU E., PETITGENET O., et al.
Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands.
Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99 (5): 2672-2677.

256. RODIER F., KIM S. H., NIJJAR T., YASWEN P. and CAMPISI J.
Cancer and aging : the impoertance of telomeres in genome maintenance.
Int J Biochem Cell Biol 2005; 37 (5): 977-990.

257. RONINSON I. B., BROUDE E. V. and CHANG B. D.
If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells.
Drug Resist Updat 2001; 4 (5): 303-313.

258. ROSU F., DE PAUW E., GUITTAT L., ALBERTI P., LACROIX L., MAILLIET P., et al.
Selective interaction of ethidium derivatives with quadruplexes: an equilibrium dialysis and electrospray ionization mass spectrometry analysis.
Biochemistry 2003a; 42 (35): 10361-10371.

259. ROSU F., GABELICA V., SHIN-YA K. and DE PAUW E.
Telomestatin-induced stabilization of the human telomeric DNA quadruplex monitored by electrospray mass spectrometry.
Chem Commun (Camb) 2003b; (21): 2702-2703.

260. ROTH A., VERCAUTEREN S., SUTHERLAND H. J. and LANSDORP P. M.
Telomerase is limiting the growth of acute myeloid leukemia cells.
Leukemia 2003; 17 (12): 2410-2417.

261. SCHAEFFER C., BARDONI B., MANDEL J. L., EHRESMANN B., EHRESMANN C. and MOINE H.
The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif.
Embo J 2001; 20 (17): 4803-4813.

262. SCHAFFITZEL C., BERGER I., POSTBERG J., HANES J., LIPPS H. J. and PLUCKTHUN A.
In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with Stylonychia lemnae macronuclei.
Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98 (15): 8572-8577.

263. SCHINDLER A., FIEDLER U., MEYE A., SCHMIDT U., FUSSEL S., PILARSKY C., et al.
Human telomerase reverse transcriptase antisense treatment downregulates the viability of prostate cancer cells in vitro.
Int J Oncol 2001; 19 (1): 25-30.

264. SCHULTZE P., HUD N. V., SMITH F. W. and FEIGON J.
The effect of sodium, potassium and ammonium ions on the conformation of the dimeric quadruplex formed by the Oxytricha nova telomere repeat oligonucleotide d(G(4)T(4)G(4)).
Nucleic Acids Res 1999; 27 (15): 3018-3028.

265. SEARS R. C.
The life cycle of C-myc: from synthesis to degradation.
Cell Cycle 2004; 3 (9): 1133-1137.

266. SEENISAMY J., BASHYAM S., GOKHALE V., VANKAYALAPATI H., SUN D., SIDDIQUI-JAIN A., et al.
Design and synthesis of an expanded porphyrin that has selectivity for the c-MYC G-quadruplex structure.
J Am Chem Soc 2005; 127 (9): 2944-2959.

267. SEENISAMY J., REZLER E. M., POWELL T. J., TYE D., GOKHALE V., JOSHI C. S., et al.
The dynamic character of the G-quadruplex element in the c-MYC promoter and modification by TMPyP4.
J Am Chem Soc 2004; 126 (28): 8702-8709.

268. SEIMIYA H., MURAMATSU Y., OHISHI T. and TSURUO T.
Tankyrase 1 as a target for telomere-directed molecular cancer therapeutics.
Cancer Cell 2005; 7 (1): 25-37.

269. SEN D. and GILBERT W.
Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis.
Nature 1988; 334 (6180): 364-366.

270. SENGUPTA S., LINKE S. P., PEDEUX R., YANG Q., FARNSWORTH J., GARFIELD S. H., et al.
BLM helicase-dependent transport of p53 to sites of stalled DNA replication forks modulates homologous recombination.
Embo J 2003; 22 (5): 1210-1222.

271. SETO A. G., LIVENGOOD A. J., TZFATI Y., BLACKBURN E. H. and CECH T. R.
A bulged stem tethers Est1p to telomerase RNA in budding yeast.
Genes Dev 2002; 16 (21): 2800-2812.

272. SETO A. G., ZAUG A. J., SOBEL S. G., WOLIN S. L. and CECH T. R.
Saccharomyces cerevisiae telomerase is an Sm small nuclear ribonucleoprotein particle.
Nature 1999; 401 (6749): 177-180.

273. SHAFER R. H. and SMIRNOV I.
Biological aspects of DNA/RNA quadruplexes.
Biopolymers 2000; 56 (3): 209-227.

274. SHAMMAS M. A., REIS R. J., LI C., KOLEY H., HURLEY L. H., ANDERSON K. C., et al.
Telomerase inhibition and cell growth arrest after telomestatin treatment in multiple myeloma.
Clin Cancer Res 2004; 10 (2): 770-776.

275. SHAMMAS M. A., SHMOOKLER REIS R. J., AKIYAMA M., KOLEY H., CHAUHAN D., HIDESHIMA T., et al.
Telomerase inhibition and cell growth arrest by G-quadruplex interactive agent in multiple myeloma.
Mol Cancer Ther 2003; 2 (9): 825-833.

276. SHAMMAS M. A., SIMMONS C. G., COREY D. R. and SHMOOKLER REIS R. J.
Telomerase inhibition by peptide nucleic acids reverses 'immortality' of transformed human cells.
Oncogene 1999; 18 (46): 6191-6200.

277. SHAY J. W. and WRIGHT W. E.
Hayflick, his limit, and cellular ageing.
Nat Rev Mol Cell Biol 2000; 1 (1): 72-76.

278. SHAY J. W. and WRIGHT W. E.
Telomeres in dyskeratosis congenita.
Nat Genet 2004; 36 (5): 437-438.

279. SHIN-YA K., WIERZBA K., MATSUO K., OHTANI T., YAMADA Y., FURIHATA K., et al.
Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from Streptomyces anulatus.
J Am Chem Soc 2001; 123 (6): 1262-1263.

280. SHIPPEN-LENTZ D. and BLACKBURN E. H.
Functional evidence for an RNA template in telomerase.
Science 1990; 247 (4942): 546-552.

281. SHIRATORI M., SUZUKI T., ITOH C., GOTO M., FURUICHI Y. and MATSUMOTO T.
WRN helicase accelerates the transcription of ribosomal RNA as a component of an RNA polymerase I-associated complex.
Oncogene 2002; 21 (16): 2447-2454.

282. SIDDIQUI-JAIN A., GRAND C. L., BEARSS D. J. and HURLEY L. H.
Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription.
Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99 (18): 11593-11598.

283. SIEBENLIST U., BRESSLER P. and KELLY K.
Two distinct mechanisms of transcriptional control operate on c-myc during differentiation of HL60 cells.
Mol Cell Biol 1988; 8 (2): 867-874.

284. SIEBENLIST U., HENNIGHAUSEN L., BATTEY J. and LEDER P.
Chromatin structure and protein binding in the putative regulatory region of the c-myc gene in Burkitt lymphoma.
Cell 1984; 37 (2): 381-391.

285. SIMONSSON T.
G-quadruplex DNA structures--variations on a theme.
Biol Chem 2001; 382 (4): 621-628.

286. SIMONSSON T. and HENRIKSSON M.
c-myc Suppression in Burkitt's Lymphoma Cells.
Biochem Biophys Res Commun 2002; 290 (1): 11-15.

287. SIMONSSON T., PECINKA P. and KUBISTA M.
DNA tetraplex formation in the control region of c-myc.
Nucleic Acids Res 1998; 26 (5): 1167-1172.

288. SIMONSSON T., PRIBYLOVA M. and VORLICKOVA M.
A nuclease hypersensitive element in the human c-myc promoter adopts several distinct i-tetraplex structures.
Biochem Biophys Res Commun 2000; 278 (1): 158-166.

289. SINGER M. S. and GOTTSCHLING D. E.
TLC1: template RNA component of Saccharomyces cerevisiae telomerase.
Science 1994; 266 (5184): 404-409.

290. SMITH S. and DE LANGE T.
TRF1, a mammalian telomeric protein.
Trends Genet 1997; 13 (1): 21-26.

291. SMITH S. and DE LANGE T.
Tankyrase promotes telomere elongation in human cells.
Curr Biol 2000; 10 (20): 1299-1302.

292. SMITH S., GIRIAT I., SCHMITT A. and DE LANGE T.
Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres.
Science 1998; 282 (5393): 1484-1487.

293. SMOGORZEWSKA A. and DE LANGE T.
Regulation of telomerase by telomeric proteins.
Annu Rev Biochem 2004; 73: 177-208.

294. SMOGORZEWSKA A., VAN STEENSEL B., BIANCHI A., OELMANN S., SCHAEFER M. R., SCHNAPP G., et al.
Control of human telomere length by TRF1 and TRF2.
Mol Cell Biol 2000; 20 (5): 1659-1668.

295. SON S. H., YU E., CHOI E. K., LEE H. and CHOI J.
Promyelocytic leukemia protein-induced growth suppression and cell death in liver cancer cells.
Cancer Gene Ther 2005; 12 (1): 1-11.

296. SPINK K. G., EVANS R. J. and CHAMBERS A.
Sequence-specific binding of Taz1p dimers to fission yeast telomeric DNA.
Nucleic Acids Res 2000; 28 (2): 527-533.

297. STANSEL R. M., DE LANGE T. and GRIFFITH J. D.
T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang.
Embo J 2001; 20 (19): 5532-5540.

298. STAVROPOULOS D. J., BRADSHAW P. S., LI X., PASIC I., TRUONG K., IKURA M., et al.
The Bloom syndrome helicase BLM interacts with TRF2 in ALT cells and promotes telomeric DNA synthesis.
Hum Mol Genet 2002; 11 (25): 3135-3144.

299. STEWART S. A., BEN-PORATH I., CAREY V. J., O'CONNOR B. F., HAHN W. C. and WEINBERG R. A.
Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence.
Nat Genet 2003; 33 (4): 492-496.

300. STEWART S. A., HAHN W. C., O'CONNOR B. F., BANNER E. N., LUNDBERG A. S., MODHA P., et al.
Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length- independent mechanism.
Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99 (20): 12606-12611.

301. SUMI M., TAUCHI T., SASHIDA G., NAKAJIMA A., GOTOH A., SHIN-YA K., et al.
A G-quadruplex-interactive agent, telomestatin (SOT-095), induces telomere shortening with apoptosis and enhances chemosensitivity in acute myeloid leukemia.
Int J Oncol 2004; 24 (6): 1481-1487.

302. SUN H., BENNETT R. J. and MAIZELS N.
The Saccharomyces cerevisiae Sgs1 helicase efficiently unwinds G-G paired DNAs.
Nucleic Acids Res 1999; 27 (9): 1978-1984.

303. SUN H., KAROW J. K., HICKSON I. D. and MAIZELS N.
The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA.
J Biol Chem 1998; 273 (42): 27587-27592.

304. SUNDQUIST W. I. and HEAPHY S.
Evidence for interstrand quadruplex formation in the dimerization of human immunodeficiency virus 1 genomic RNA.
Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90 (8): 3393-3397.

305. SURRALLES J., JACKSON S. P., JASIN M., KASTAN M. B., WEST S. C. and JOENJE H.
Molecular cross-talk among chromosome fragility syndromes.
Genes Dev 2004; 18 (12): 1359-1370.

306. TAHARA H., TOKUTAKE Y., MAEDA S., KATAOKA H., WATANABE T., SATOH M., et al.
Abnormal telomere dynamics of B-lymphoblastoid cell strains from Werner's syndrome patients transformed by Epstein-Barr virus.
Oncogene 1997; 15 (16): 1911-1920.

307. TAKAHASHI Y., LALLEMAND-BREITENBACH V., ZHU J. and DE THE H.
PML nuclear bodies and apoptosis.
Oncogene 2004; 23 (16): 2819-2824.

308. TAKAI H., SMOGORZEWSKA A. and DE LANGE T.
DNA damage foci at dysfunctional telomeres.
Curr Biol 2003; 13 (17): 1549-1556.

309. 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 Res 1999; 59 (3): 551-557.

310. TAKATA M., SASAKI M. S., SONODA E., MORRISON C., HASHIMOTO M., UTSUMI H., et al.
Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells.
Embo J 1998; 17 (18): 5497-5508.

311. TAUCHI T., SHIN-YA K., SASHIDA G., SUMI M., NAKAJIMA A., SHIMAMOTO T., et al.
Activity of a novel G-quadruplex-interactive telomerase inhibitor, telomestatin (SOT-095), against human leukemia cells: involvement of ATM-dependent DNA damage response pathways.
Oncogene 2003; 22 (34): 5338-5347.

312. TEIXEIRA M. T., ARNERIC M., SPERISEN P. and LINGNER J.
Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states.
Cell 2004; 117 (3): 323-335.

313. TENG S. C. and ZAKIAN V. A.
Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in Saccharomyces cerevisiae.
Mol Cell Biol 1999; 19 (12): 8083-8093.

314. TESMER V. M., FORD L. P., HOLT S. E., FRANK B. C., YI X., AISNER D. L., et al.
Two inactive fragments of the integral RNA cooperate to assemble active telomerase with the human protein catalytic subunit (hTERT) in vitro.
Mol Cell Biol 1999; 19 (9): 6207-6216.

315. THAM W. H. and ZAKIAN V. A.
Transcriptional silencing at Saccharomyces telomeres: implications for other organisms.
Oncogene 2002; 21 (4): 512-521.

316. THEOBALD D. L. and WUTTKE D. S.
Prediction of Multiple Tandem OB-Fold Domains in Telomere End-Binding Proteins Pot1 and Cdc13.
Structure (Camb) 2004; 12 (10): 1877-1879.

317. THEOLEYRE O. and BAKLOUTI F.
Oncogenic transcription factors as splicing regulators.
Med Sci (Paris) 2004; 20 (11): 1014-1019.

318. TODD A. K., JOHNSTON M. and NEIDLE S.
Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA.
Nucleic Acids Res 2005; 33 (9): 2901-2907.

319. TOKUTAKE Y., MATSUMOTO T., WATANABE T., MAEDA S., TAHARA H., SAKAMOTO S., et al.
Extra-chromosomal telomere repeat DNA in telomerase-negative immortalized cell lines.
Biochem Biophys Res Commun 1998; 247 (3): 765-772.

320. TOMASKA L., MCEACHERN M. J. and NOSEK J.
Alternatives to telomerase: keeping linear chromosomes via telomeric circles.
FEBS Lett 2004; 567 (1): 142-146.

321. ULANER G. A., HU J. F., VU T. H., GIUDICE L. C. and HOFFMAN A. R.
Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts.
Cancer Res 1998; 58 (18): 4168-4172.

322. VAN BRABANT A. J., YE T., SANZ M., GERMAN I. J., ELLIS N. A. and HOLLOMAN W. K.
Binding and melting of D-loops by the Bloom syndrome helicase.
Biochemistry 2000; 39 (47): 14617-14625.

323. VAN DER BURGT I., CHRZANOWSKA K. H., SMEETS D. and WEEMAES C.
Nijmegen breakage syndrome.
J Med Genet 1996; 33 (2): 153-156.

324. VAN STEENSEL B. and DE LANGE T.
Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1.
Nature 1997; 385 (6618): 740-743.

325. VAN STEENSEL B., SMOGORZEWSKA A. and DE LANGE T.
TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions.
Cell 1998; 92 (3): 401-413.

326. VELDMAN T., ETHERIDGE K. T. and COUNTER C. M.
Loss of hPot1 Function Leads to Telomere Instability and a cut-like Phenotype.
Curr Biol 2004; 14 (24): 2264-2270.

327. WAI L. K.
Telomeres, telomerase, and tumorigenesis--a review.
MedGenMed 2004; 6 (3): 19.

328. WANG J., SHIELS C., SASIENI P., WU P. J., ISLAM S. A., FREEMONT P. S., et al.
Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions.
J Cell Biol 2004; 164 (4): 515-526.

329. WANG R. C., SMOGORZEWSKA A. and DE LANGE T.
Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres.
Cell 2004; 119 (3): 355-368.

330. WANG Y. and PATEL D. J.
Guanine residues in d(T2AG3) and d(T2G4) form parallel-stranded potassium cation stabilized G-quadruplexes with anti glycosidic torsion angles in solution.
Biochemistry 1992; 31 (35): 8112-8119.

331. WANG Y. and PATEL D. J.
Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G- tetraplex.
Structure 1993; 1 (4): 263-282.

332. WANG Y. and PATEL D. J.
Solution structure of the Tetrahymena telomeric repeat d(T2G4)4 G-tetraplex.
Structure 1994; 2 (12): 1141-1156.

333. WANG Z., KYO S., TAKAKURA M., TANAKA M., YATABE N., MAIDA Y., et al.
Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase gene expression via activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway.
Cancer Res 2000; 60 (19): 5376-5381.

334. WATSON J. D.
Origin of concatemeric T7 DNA.
Nat New Biol 1972; 239 (94): 197-201.

335. WATT P. M., HICKSON I. D., BORTS R. H. and LOUIS E. J.
SGS1, a homologue of the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for maintenance of genome stability in Saccharomyces cerevisiae.
Genetics 1996; 144 (3): 935-945.

336. WEI C. and PRICE C. M.
Cell cycle localization, dimerization, and binding domain architecture of the telomere protein cPot1.
Mol Cell Biol 2004; 24 (5): 2091-2102.

337. WEISMAN-SHOMER P., COHEN E. and FRY M.
Interruption of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)(n) by interspersed d(AGG) trinucleotides diminishes the formation and stability of d(CGG)(n) tetrahelical structures.
Nucleic Acids Res 2000a; 28 (7): 1535-1541.

338. WEISMAN-SHOMER P., COHEN E. and FRY M.
Distinct domains in the CArG-box binding factor A destabilize tetraplex forms of the fragile X expanded sequence d(CGG)(n).
Nucleic Acids Res 2002; 30 (17): 3672-3681.

339. WEISMAN-SHOMER P., COHEN E., HERSHCO I., KHATEB S., WOLFOVITZ-BARCHAD O., HURLEY L., et al.
The cationic porphyrin TMPyP4 destabilizes the tetraplex form of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)n.
Nucleic Acids Res 2003; 31 (14): 3963-3970.

340. WEISMAN-SHOMER P., NAOT Y. and FRY M.
Tetrahelical forms of the fragile X syndrome expanded sequence d(CGG)(n) are destabilized by two heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-related telomeric DNA-binding proteins.
J Biol Chem 2000b; 275 (3): 2231-2238.

341. WHITE L. K., WRIGHT W. E. and SHAY J. W.
Telomerase inhibitors.
Trends Biotechnol 2001; 19 (3): 114-120.

342. WIKIPEDIA.
Telomere [consulté le 07/02/2005]. Disponible à partir de URL :
http://en.wikipedia.org/wiki/Telomere

343. WILLIAMSON J. R.
G-quartet structures in telomeric DNA.
Annu Rev Biophys Biomol Struct 1994; 23: 703-730.

344. WONG K. K., MASER R. S., BACHOO R. M., MENON J., CARRASCO D. R., GU Y., et al.
Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing.
Nature 2003; 421 (6923): 643-648.

345. WOTTON D. and SHORE D.
A novel Rap1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in Saccharomyces cerevisiae.
Genes Dev 1997; 11 (6): 748-760.

346. WRIGHT W. E., TESMER V. M., HUFFMAN K. E., LEVENE S. D. and SHAY J. W.
Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end.
Genes Dev 1997; 11 (21): 2801-2809.

347. WU G., LEE W. H. and CHEN P. L.
NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres.
J Biol Chem 2000; 275 (39): 30618-30622.

348. WU K. J., GRANDORI C., AMACKER M., SIMON-VERMOT N., POLACK A., LINGNER J., et al.
Direct activation of TERT transcription by c-MYC.
Nat Genet 1999; 21 (2): 220-224.

349. WU L., DAVIES S. L., NORTH P. S., GOULAOUIC H., RIOU J. F., TURLEY H., et al.
The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III.
J Biol Chem 2000; 275 (13): 9636-9644.

350. WU L. and HICKSON I. D.
The Bloom's syndrome helicase stimulates the activity of human topoisomerase IIIalpha.
Nucleic Acids Res 2002; 30 (22): 4823-4829.

351. XIONG J., FAN S., MENG Q., SCHRAMM L., WANG C., BOUZAHZA B., et al.
BRCA1 inhibition of telomerase activity in cultured cells.
Mol Cell Biol 2003; 23 (23): 8668-8690.

352. 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.
Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98 (7): 3826-3831.

353. XU D., WANG Q., GRUBER A., BJORKHOLM M., CHEN Z., ZAID A., et al.
Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells.
Oncogene 2000; 19 (45): 5123-5133.

354. XU L. and BLACKBURN E. H.
Human Rif1 protein binds aberrant telomeres and aligns along anaphase midzone microtubules.
J Cell Biol 2004; 167 (5): 819-830.

355. YANEZ G. H., KHAN S. J., LOCOVEI A. M., PEDROSO I. M. and FLETCHER T. M.
DNA structure-dependent recruitment of telomeric proteins to single-stranded/double-stranded DNA junctions.
Biochem Biophys Res Commun 2005; 328 (1): 49-56.

356. YE J. Z. and DE LANGE T.
TIN2 is a tankyrase 1 PARP modulator in the TRF1 telomere length control complex.
Nat Genet 2004a; 36 (6): 618-623.

357. YE J. Z., DONIGIAN J. R., VAN OVERBEEK M., LOAYZA D., LUO Y., KRUTCHINSKY A. N., et al.
TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres.
J Biol Chem 2004b; 279 (45): 47264-47271.

358. YE J. Z., HOCKEMEYER D., KRUTCHINSKY A. N., LOAYZA D., HOOPER S. M., CHAIT B. T., et al.
POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex.
Genes Dev 2004c; 18 (14): 1649-1654.

359. YE L., NAKURA J., MORISHIMA A. and MIKI T.
Transcriptional activation by the Werner syndrome gene product in yeast.
Exp Gerontol 1998; 33 (7-8): 805-812.

360. YEAGER T. R., NEUMANN A. A., ENGLEZOU A., HUSCHTSCHA L. I., NOBLE J. R. and REDDEL R. R.
Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body.
Cancer Res 1999; 59 (17): 4175-4179.

361. YEO M., RHA S. Y., JEUNG H. C., SHEN X. H., YANG S. H., AN S. W., et al.
Different role of functional domains of hTR in DNA binding to telomere and telomerase reconstruction.
FEBS Lett 2005; 579 (1): 127-132.

362. YI X., SHAY J. W. and WRIGHT W. E.
Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells.
Nucleic Acids Res 2001; 29 (23): 4818-4825.

363. YI X., TESMER V. M., SAVRE-TRAIN I., SHAY J. W. and WRIGHT W. E.
Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels.
Mol Cell Biol 1999; 19 (6): 3989-3997.

364. YOKOYAMA Y., TAKAHASHI Y., SHINOHARA A., LIAN Z., WAN X., NIWA K., et al.
Attenuation of telomerase activity by a hammerhead ribozyme targeting the template region of telomerase RNA in endometrial carcinoma cells.
Cancer Res 1998; 58 (23): 5406-5410.

365. YOKOYAMA Y., TAKAHASHI Y., SHINOHARA A., WAN X., TAKAHASHI S., NIWA K., et al.
The 5'-end of hTERT mRNA is a good target for hammerhead ribozyme to suppress telomerase activity.
Biochem Biophys Res Commun 2000; 273 (1): 316-321.

366. ZHANG H. and COHEN S. N.
Smurf2 up-regulation activates telomere-dependent senescence.
Genes Dev 2004; 18 (24): 3028-3040.

367. ZHANG R. G., GUO L. X., WANG X. W. and XIE H.
Telomerase inhibition and telomere loss in BEL-7404 human hepatoma cells treated with doxorubicin.
World J Gastroenterol 2002; 8 (5): 827-831.

368. ZHANG X., MAR V., ZHOU W., HARRINGTON L. and ROBINSON M. O.
Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells.
Genes Dev 1999; 13 (18): 2388-2399.

369. ZHANG Y. and HE D. M.
Effect of antisense hTERT mRNA oligodeoxynucleotide on telomerase activity of leukemic cells.
Cell Biol Int 2002; 26 (5): 427-431.

370. ZHAO J., BILSLAND A., HOARE S. F. and KEITH W. N.
Involvement of NF-Y and Sp1 binding sequences in basal transcription of the human telomerase RNA gene.
FEBS Lett 2003; 536 (1-3): 111-119.

371. ZHAO J. Q., GLASSPOOL R. M., HOARE S. F., BILSLAND A., SZATMARI I. I. and KEITH W. N.
Activation of Telomerase RNA Gene Promoter Activity by NF-Y, Sp1, and the Retinoblastoma Protein and Repression by Sp3.
Neoplasia 2000; 2 (6): 531-539.

372. ZHAO J. Q., HOARE S. F., MCFARLANE R., MUIR S., PARKINSON E. K., BLACK D. M., et al.
Cloning and characterization of human and mouse telomerase RNA gene promoter sequences.
Oncogene 1998; 16 (10): 1345-1350.

373. ZHENG L. and LEE W. H.
The retinoblastoma gene: a prototypic and multifunctional tumor suppressor.
Exp Cell Res 2001; 264 (1): 2-18.

374. ZHONG Z., SHIUE L., KAPLAN S. and DE LANGE T.
A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro.
Mol Cell Biol 1992; 12 (11): 4834-4843.

375. ZHOU X. Z. and LU K. P.
The Pin2/TRF1-Interacting Protein PinX1 Is a Potent Telomerase Inhibitor.
Cell 2001; 107 (3): 347-359.

376. ZHU H., FU W. and MATTSON M. P.
The catalytic subunit of telomerase protects neurons against amyloid beta-peptide-induced apoptosis.
J Neurochem 2000; 75 (1): 117-124.

377. ZHU J., WANG H., BISHOP J. M. and BLACKBURN E. H.
Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening.
Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96 (7): 3723-3728.

378. ZHU X. D., KUSTER B., MANN M., PETRINI J. H. and DE LANGE T.
Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres.
Nat Genet 2000; 25 (3): 347-352.

379. ZHU X. D., NIEDERNHOFER L., KUSTER B., MANN M., HOEIJMAKERS J. H. and DE LANGE T.
ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes.
Mol Cell 2003; 12 (6): 1489-1498.

V. Annexes

Articles insérés dans ce manuscrit :

Lemarteleur T, Gomez D, Paterski R, Mandine E, Mailliet P, Riou JF.

Stabilization of the c-myc gene promoter quadruplex by specific ligands' inhibitors of telomerase.
Biochem Biophys Res Commun. 2004; 323(3): 802-808.

Gomez D, Lemarteleur T, Lacroix L, Mailliet P, Mergny JL, Riou JF.

Telomerase downregulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing.
Nucleic Acids Res. 2004; 32(1): 371-379.

Articles publiés dans le cadre de la thèse insérés en annexe :

Riou JF, Gomez D, Lemarteleur T, Trentesaux C.

G-quadruplex DNA: myth or reality?
Bull Cancer. 2003; 90(4): 305-313.

Gomez D, Aouali N, Londono-Vallejo A, Lacroix L, Megnin-Chanet F, Lemarteleur T, Douarre C, Shin-ya K, Mailliet P, Trentesaux C, Morjani H, Mergny JL, Riou JF.

Resistance to the short term antiproliferative activity of the G-quadruplex ligand 12459 is associated with telomerase overexpression and telomere capping alteration.
J Biol Chem. 2003; 278(50): 50554-50562.

Gomez D, Paterski R, Lemarteleur T, Shin-Ya K, Mergny JL, Riou JF.

Interaction of telomestatin with the telomeric single-strand overhang.
J Biol Chem. 2004; 279(40): 41487-41494.

Articles publiés dans le cadre de la thèse :

Lionel Guittat, , Laurent Lacroix, Dennis Gomez, Paola B. Arimondo, Anne de Cian, Gaëlle Pennarun, Samir Amrane, Patrizia Alberti, Thibault Lemarteleur, Nassera Aouali, Hamid Morjani, Chantal Trentesaux, Barbara Saccà, Eliane Mandine, François Boussin, Patrick Mailliet, Jean-François Riou & Jean-Louis Mergny

Quadruplex structures and quadruplex ligands.
Dynamical Genetics, 2004 : 199-236.

Lionel Guittat, Patrizia Alberti, Dennis Gomez, Anne de Cian, Gaëlle Pennarun, Thibault Lemarteleur, Chafke Belmokhtar, Rajaa Paterski, Hamid Morjani, Chantal Trentesaux, Eliane Mandine, François Boussin, Patrick Mailliet, Laurent Lacroix, Jean-François Riou & Jean-Louis Mergny

Targeting human telomerase for cancer therapeutics.
Cytotechnology. 2004. 45 : 75-90.

SYNTHÈSE
© John Libbey Eurotext
Bull Cancer 2003 ; 90 (4) : 305-13

L'ADN G-quadruplexe : mythe ou réalité ?

G-quadruplex DNA: myth or reality?

Jean-François Riou[1]
Dennis Gomez[1]
Thibault Lemarteleur[1]
Chantal Trentesaux[1,2]

[1] Institut fédératif de recherche 53, UFR de Pharmacie, Université de Reims-Champagne-Ardenne, 51, rue Cognacq-Jay, 51096 Reims
E-mail : jf.riou@univ-reims.fr
[2] Adresse actuelle, CNRS UMR 6142, Université de Reims-Champagne-Ardenne, 51096 Reims

Résumé. La séquence particulière de l'ADN télomérique composée de répétitions du motif GGTTAG permet la formation d'une structure d'ADN non usuelle en quadruplexe de guanines (G-quadruplexe). Des petites molécules pouvant fixer et stabiliser l'ADN télomérique sous sa conformation G-quadruplexe sont capables d'inhiber les fonctions de la télomérase. Plusieurs travaux récents ont démontré que les ligands de G-quadruplexe pouvaient inhiber l'activité de la télomérase dans les cellules tumorales et représenter une nouvelle approche expérimentale pour limiter la croissance tumorale. L'existence intracellulaire des structures G-quadruplexes est cependant controversée car aucune preuve directe n'a permis de l'établir au sein de l'ADN cellulaire. De nombreuses séquences d'acides nucléiques réparties au sein du génome des mammifères sont potentiellement capables d'adopter une structure en G-quadruplexe et différentes structures protéiques ont été décrites pour fixer les G-quadruplexes *in vitro*. Ces données font des G-quadruplexes une famille structurale beaucoup plus large que celle initialement découverte au niveau du télomère et posent le problème de la sélectivité d'action des ligands de G-quadruplexe et de leur index thérapeutique dans le cadre d'une stratégie de recherche antitumorale. ▲

Mots clés : G-quadruplexe, G-quartet, télomérase, télomère.

Abstract. *The peculiar sequence of telomeric DNA, composed of repetitions of the GGTTAG motif allows the formation of an unusual DNA conformation based on guanine-quadruplex (G-quadruplex). Small molecules that bind and stabilize telomeric DNA under its G-quadruplex conformation are able to impair telomerase activity. Several recent reports have shown that G-quadruplex ligands could block telomerase activity in cancer cells and represent a new experimental approach to limit cancer growth. The intracellular existence of G-quadruplex structure is still controversial, since no direct proof allowed to establish its reality. Many sequences of nucleic acids in the mammalian genome are able to form a G-quadruplex* in vitro *and several proteins have been described to interact* in vitro *with G-quadruplex. These data indicated that G-quadruplex are members of a family of target structures larger than that initially described at telomeres, and raised the question of the selectivity and therapeutic index of their ligands in the context of an antitumor therapy.* ▲

Key words: *G-quadruplex, G-quartet, telomerase, telomere.*

Article reçu le 15 janvier 2003
accepté le 24 février 2003

Les télomères humains sont devenus un centre d'intérêt scientifique majeur ces cinq dernières années. Cet intérêt est lié aux propriétés biologiques essentielles des télomères dans le contrôle de l'intégrité du génome et à leur rôle lors des processus de sénescence cellulaire et de développement tumoral. Dans les cellules somatiques, l'ADN télomérique consiste en une région double brin qui varie de 10 à 15 kb contenant de nombreuses répétitions en tandem de séquences hexa-nucléotidiques de type TTAGGG et une extension terminale simple brin d'environ 200 à 300 bases (brin G) [1]. Au cours de la division cellulaire, le processus de réplication du télomère est incomplet et aboutit à un raccourcissement à chaque cycle de division, ce qui provoque un problème majeur pour la cellule (crise) en dessous d'une taille critique du télomère et après un délai qui correspond au nombre de divisions nécessaires pour atteindre cette taille critique [2]. L'activation d'une enzyme capable de synthétiser l'ADN télomérique, la télomérase, permet à la cellule d'échapper à ce stade critique et de devenir immortelle. L'identification de la télomérase comme cible potentielle d'agents anticancéreux s'est effectuée en plusieurs étapes critiques au cours de la dernière décennie.

La première étape s'est réalisée grâce à l'analyse de prélèvements d'échantillons de tumeurs chez des patients. L'activation de la télomérase a été observée dans 85 % des tumeurs humaines et a une fonction de maintien de la longueur des télomères de façon à conserver le potentiel de division immortelle de la tumeur [3]. Dans les tumeurs humaines, la

Tirés à part : J.-F. Riou

longueur minimale des télomères est de 4 kb. Une méthodologie fondée sur une amplification PCR de l'ADN synthétisé par la télomérase a rendu possible la détection de l'activité télomérase qui est présente en quantité infime par rapport aux autres polymérases et qui correspond au « fameux » essai TRAP (*telomeric repeat amplification protocol*) [4]. A l'inverse, la majorité des cellules somatiques est dépourvue d'activité télomérase.

La deuxième étape a permis de valider la télomérase comme cible dans des systèmes cellulaires. La découverte initiale du composant ARN associé à l'activité télomérase (hTR) a conduit à la mise au point d'oligomères ADN anti-sens de hTR capables d'induire sur la cellule tumorale en culture les effets attendus d'un inhibiteur de l'activité télomérase, c'est-à-dire une inhibition retardée de la croissance tumorale accompagnée d'un raccourcissement de la longueur des télomères [5]. Ces résultats expérimentaux ainsi que l'importance clinique de l'activation de la télomérase dans les différents types de tumeurs suggéraient que la télomérase était une cible « presque idéale » pour la recherche de composés chimiques inhibiteurs [6].

L'étape suivante correspond à la tentative de reproduire ces expériences *in vivo* chez la souris en supprimant par *knock out* (KO) le composant ARN de la télomérase (mTR). D'une façon inattendue, les premiers résultats publiés avec le KO mTR murin n'indiquaient pas que l'activité télomérase soit un facteur essentiel pour la survie de la souris, et d'une façon plus générale pour la survie tumorale [7]. L'intérêt initial voué à la recherche de composés inhibant cette enzyme est vite retombé, bien que l'on puisse supposer qu'il existe des différences physiologiques importantes entre l'homme et la souris. Après un an d'expectative, des résultats fondamentalement différents furent publiés sur ce modèle de KO par ce même groupe [8]. Le KO mTR produisait un phénotype influençant la viabilité de la souris après plusieurs générations. Ce délai important, comparativement aux cellules humaines en culture, pouvait être attribué à la longueur initiale particulièrement importante des télomères chez le genre *Mus musculus*.

Le fait marquant suivant de ce « feuilleton scientifique » fut l'identification et le clonage du composant catalytique de la télomérase (hTERT) qui a été réalisé simultanément par plusieurs groupes [9] et qui correspond à une sous-unité de type transcriptase inverse capable de synthétiser *de novo* le télomère à l'aide de hTR, servant de guide ARN. hTERT joue aussi un rôle important au cours des processus d'immortalisation et d'oncogenèse [10, 11]. Son inactivation par des dominants négatifs a permis de mettre à jour la fonction critique de l'activité de la télomérase sur la survie de la cellule tumorale. Elle peut provoquer soit une sénescence réplicative, soit l'apoptose des cellules tumorales, en fonction du contexte génétique de la cellule [12, 13]. Les données actuelles sur la télomérase indiquent que cette enzyme, non seulement contrôle la longueur des télomères, mais aussi maintient leur protection de façon à éviter leur reconnaissance comme une lésion de l'ADN par les systèmes de réparation de la cellule [14].

Un point récurrent contre l'utilisation en clinique de petites molécules inhibant l'activité télomérase est souvent souligné par un certain nombre de cliniciens. Il concerne l'important délai auquel on peut s'attendre, suite à une thérapie anti-télomérase pour réduire la longueur des télomères dans les tumeurs humaines [15]. Il n'est toujours pas certain que la thérapie anti-télomérase puisse aboutir à un résultat avant que la tumeur provoque le décès du patient. A l'heure actuelle et bien qu'il existe des inhibiteurs catalytiques nanomolaires de hTERT, aucune étude n'a pu montrer une efficacité *in vivo* d'un tel traitement dans des tumeurs humaines greffées sur un modèle murin [16]. Un thio-phosphoramidate dirigé contre la région « guide » de hTR montre une activité antitumorale *in* vivo modeste, mais significative et dépourvue de toxicité. Cet oligonucléotide nommé GRN163, développé par la société Geron, est proposé en études cliniques de phase I [17]. Il apparaît clairement que l'utilisation thérapeutique future des inhibiteurs de la télomérase sera fondée sur leur activité en combinaison avec une chimiothérapie antitumorale plus agressive.

Au cours des cinq dernières années, une approche différente, ayant pour cible le télomère plutôt que l'activité télomérase, est apparue et est fondée sur une reconnaissance sélective de conformations particulières de l'ADN télomérique [18, 19]. La partie simple brin de l'ADN télomérique peut en effet adopter *in vitro* une structure intramoléculaire en quadruplexe de guanines (G4) qui inhibe l'activité télomérase. Plusieurs laboratoires ont démontré que des ligands sélectifs stabilisant l'ADN G4 pouvaient inhiber l'activité catalytique de la télomérase et induire la sénescence réplicative dans les cellules tumorales *(figure 1)* [20-24]. Au contraire de la télomérase qui a suivi un parcours « étape par étape » pour démontrer son statut de cible, le statut de cible de l'ADN G4 est beaucoup moins clair. Aucune évidence formelle de l'existence *in vivo* de l'ADN G4 n'a été apportée expérimentalement. Cette revue a pour objectif de faire le point sur les données permettant de croire en la réalité de l'existence de ces structures G4 dans les organismes vivants et les consé-

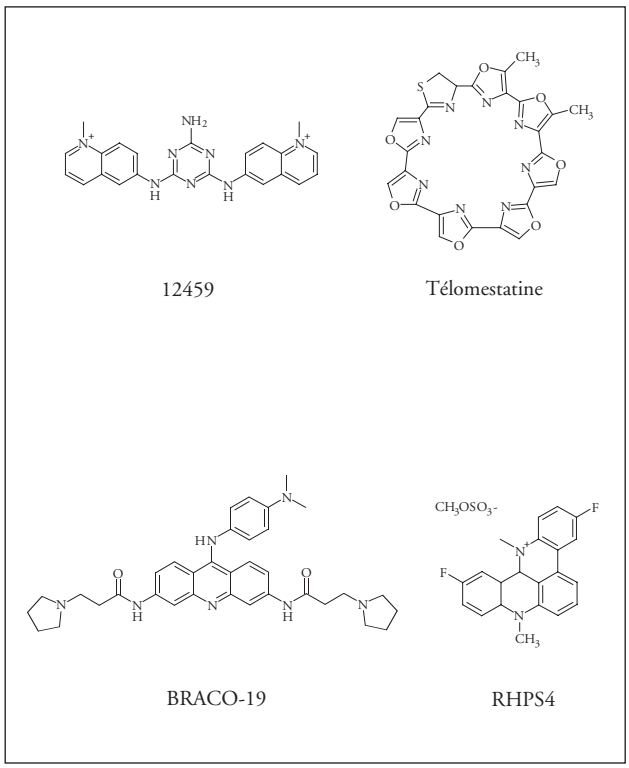


Figure 1. **Structure chimique de différents ligands de G-quadruplexe inhibiteurs de la télomérase et décrits pour induire la sénescence réplicative de cellules tumorales.**

quences attendues de l'utilisation de ces ligands dans cette stratégie thérapeutique.

Structures de l'ADN G-quadruplexe et localisations potentielles dans le génome

L'ADN simple brin contenant plusieurs guanines consécutives peut s'assembler en une structure à 4 brins fondée sur la formation d'un quartet de guanines plan *(figure 2, A)* qui est stabilisé par des liaisons hydrogènes de type *Hoogsteen* entre les N7 des guanines adjacentes et par un cation central situé entre deux plans de quartets adjacents. Le G-quadruplexe peut être composé par un repliement intramoléculaire de l'ADN simple brin qui forme autant de plateaux de quartets qu'il existe de guanines adjacentes répétées selon un multiple de 4. Les G-quadruplexes peuvent aussi être formés par l'association de 2 ou 4 brins contenant des répétitions de guanines *(figure 2, B à D)*.
Le simple brin télomérique des vertébrés contient des répétitions de trois guanines adjacentes qui se replient pour former un G-quadruplexe unimoléculaire présentant deux structures différentes selon la nature du cation central *(figure 2, E)*. En présence de Na+, le G-quadruplexe adopte une structure anti-parallèle présentant trois boucles dans les prolongements des quartets terminaux, dont une diagonale [25]. En présence de K+, des études de cristallographie par rayons X ont récemment permis d'élucider une structure totalement différente formant un G-quadruplexe parallèle dans lequel les trois boucles sont diagonales et externes aux plateaux de quartets [26]. Cette structure en K+ a été obtenue à partir d'une tentative de co-cristallisation du quadruplexe en présence d'un ligand. Bien que le ligand soit exclu de la structure finale, son rôle dans l'obtention de cette structure quadruplexe n'est pas déterminé et des doutes subsistent sur la possibilité d'obtenir cette structure quadruplexe en solution.

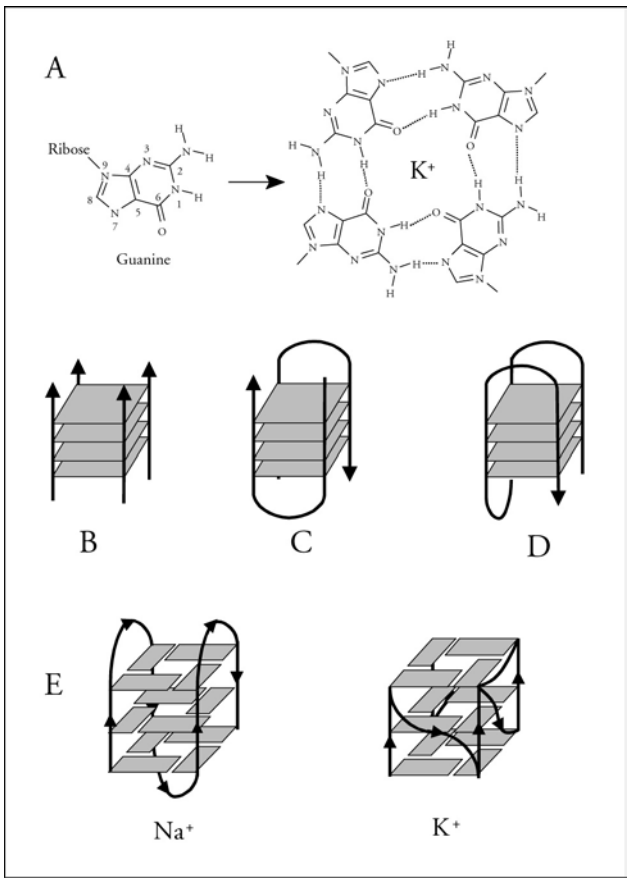


Figure 2. **G-quartet et G-quadruplexes. A) Quatre résidus guanines forment une structure plane en G-quartet grâce à des liaisons hydrogène *Hoogsteen* impliquant les N7 des guanines, le G-quartet est stabilisé par un cation central. B) Modèle de G-quadruplexe intermoléculaire à 4 brins. C) Modèle de G-quadruplexe intermoléculaire à 2 brins (dimérique). D) Modèle de G-quadruplexe intramoléculaire. E) Structure du G-quadruplexe intramoléculaire issu de la séquence télomérique GGG(TTAGGG)3 en présence d'ions Na+ (antiparallèle) et en présence d'ions K+ (parallèle).**

La plupart des organismes vivants, à l'exception des bactéries et de certaines espèces comme *Drosophila melanogaster*, contiennent des répétitions de guanines au niveau de leurs télomères et de nombreux motifs télomériques connus sont capables de s'agencer en G-quadruplexe *in vitro*.

L'existence physique du G-quadruplexe télomérique des vertébrés n'a pas été démontrée *in vivo ;* néanmoins, les conditions physicochimiques permettant son assemblage sont parfaitement compatibles avec les conditions physiologiques régnant dans le milieu intracellulaire [27]. Chez les ciliés, la structure du génome est fondamentalement différente de celle des vertébrés et est répartie en deux organites, un micronoyau diploïde et un macronoyau haploïde issu de la transformation sexuée du micronoyau. Dans le macronoyau, chaque gène est individualisé sur un chromosome et le macronoyau comprend donc plusieurs millions de chromosomes et autant de structures télomériques. Cet organisme possède une activité télomérase intense et constitue un modèle de choix pour étudier la structure des télomères. Des anticorps ScFv dirigés contre la structure télomérique de *Stylonychia laemmae* reconnaissent sélectivement le G4 *in vitro* (Kd = 5 nM) [28]. *In vivo*, cet anticorps marque sélectivement le macronoyau et ne reconnaît pas le micronoyau. Au cours de la réplication du macronoyau, la fixation de l'anticorps disparaît, ce qui traduit un processus qui modifie la structure du G4 au niveau des télomères du cilié. Ce travail représente la première preuve expérimentale de l'existence d'une structure G4 dans un organisme vivant bien qu'il ne puisse pas être exclu que la structure G4 soit formée par l'interaction de l'anticorps et ne préexiste pas dans la cellule. Malgré la sélectivité de cet anticorps, ce type d'approche expérimentale a peu de chance d'aboutir à un résultat positif dans les cellules de vertébrés dont les séquences télomériques représentent une fraction infime du génome comparativement aux ciliés.

Outre les télomères, le génome des vertébrés contient de nombreuses régions riches en répétitions de guanines qui peuvent former *in vitro* des structures G4. Ces séquences G riches sont localisées au niveau des régions de commutation (*switch)* des gènes des chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) [29] et des régions répétées du rDNA et du centromère [30, 31] ainsi qu'au niveau de promoteurs de certains gènes tels que Rb, c-myc, PDGF-A, c-myb et Ki-ras [32-34]. Le rDNA et les régions *switch* des IgH sont le siège de processus de recombinaison importants afin d'obtenir la variabilité des immunoglobulines et de maintenir l'intégralité du rDNA. Chez la levure, l'absence de Sgs1, une hélicase capable de résoudre les structures G4, provoque une fragmentation nucléolaire et une instabilité du rDNA [35].

A la différence du brin G télomérique, ces séquences G répétées se trouvent dans une structure double brin de l'ADN et la formation d'une zone simple brin nécessaire au repliement en structure G4 ne peut s'effectuer que dans le cadre d'une modification de l'ADN double brin, comme par exemple au cours des processus de transcription ou de réplication de l'ADN qui sont des événements transitoires durant le cycle de division de la cellule. L'ADN double brin étant protégé dans une structure nucléosomique complexe, le rôle des protéines fixant l'ADN dans l'assemblage ou le désassemblage des structures G4 est mal connu. Il existe cependant de nombreuses régions du génome (par exemple, les promoteurs de gènes) dont la chromatine possède une structure ouverte avec des régions hypersensibles à la DNAse I.

Au niveau du télomère, une structure particulière, la T-loop, a été identifiée par microscopie électronique et correspondrait à une invasion du brin G dans le double brin télomérique en formant une D-loop, ce qui créerait une bulle de simple brin où pourraient apparaître les structures G4 [36]. L'existence physiologique de la T-loop sur au moins une fraction des télomères semble assez bien établie, par contre la structure en D-loop reste actuellement non démontrée. Cette structure possède une forte analogie avec les intermédiaires de recombinaison et pourrait correspondre à un intermédiaire du mécanisme ALT (*alternative lengthening of telomere*) permettant d'allonger les télomères en l'absence de télomérase par un processus de recombinaison entre les télomères [37].

L'exemple le mieux décrit de structure G4 apparaissant dans un contexte double brin correspond au G4 du promoteur *c-myc*. Le promoteur du gène *c-myc* contient un site hypersensible à la DNAse I (NHE III_1) qui contrôle 85-90 % de l'activité transcriptionnelle de ce gène et qui est proche du promoteur P1. Le brin non codant de cet élément contient un 27-mer riche en G capable de former un G4 *in vitro (figure 3, A)*. Les brins purines et pyrimidines de ce 27-mer sont capables de fixer deux facteurs nécessaires à la transcription, CNBP et hnRNP-K. Le groupe de L. Hurley a récemment proposé que la stabilisation par le TMPyP4 *(figure 3, B)* de cette structure puisse conduire à une répression de l'activité transcriptionnelle de *c-myc* dans des modèles cellulaires. Dans ce modèle, la conversion du G4 en une structure duplexe stabilisée par CNBP et hnRNP-K est requise pour l'activité transcriptionnelle de *c-myc* [34]. L'interconversion du G4 en ADN duplexe serait assurée par la protéine NM23-H2, capable de couper et de réparer l'ADN sur des sites spécifiques [38]. Ce système de régulation d'activité transcriptionnelle impliquant un G4 correspondrait à un système plus général de régulation de gènes impliqués dans la croissance et la différenciation (c-myb, Ki-ras, PDGF-A) dont le principal avantage serait de permettre une réponse rapide et indépendante d'une modification de la structure du nucléosome. L'utilisation d'autres ligands de G4 de familles chimiques différentes, tels que la télomestatine ou le 12459, mais beaucoup plus sélectifs que le TMPyP4, n'a pas permis d'obtenir une inhibition de la transcription de *c-myc* dans les mêmes modèles cellulaires [T. Lemarteleur, résultats non publiés]. Le TMPyP4 est en effet un ligand de G4 peu sélectif capable d'interagir avec différentes formes d'acides nucléiques autres que l'ADN G4 et qui inhibe la télomérase dans le test TRAP à une concentration voisine de celle qui inhibe l'activité Taq polymérase (inhibition non spécifique de l'essai TRAP). Il est donc tout à fait possible que l'inhibition de *c-myc* relève plutôt d'une interaction du TMPyP4 avec les séquences double brin G/C riches de ce promoteur.

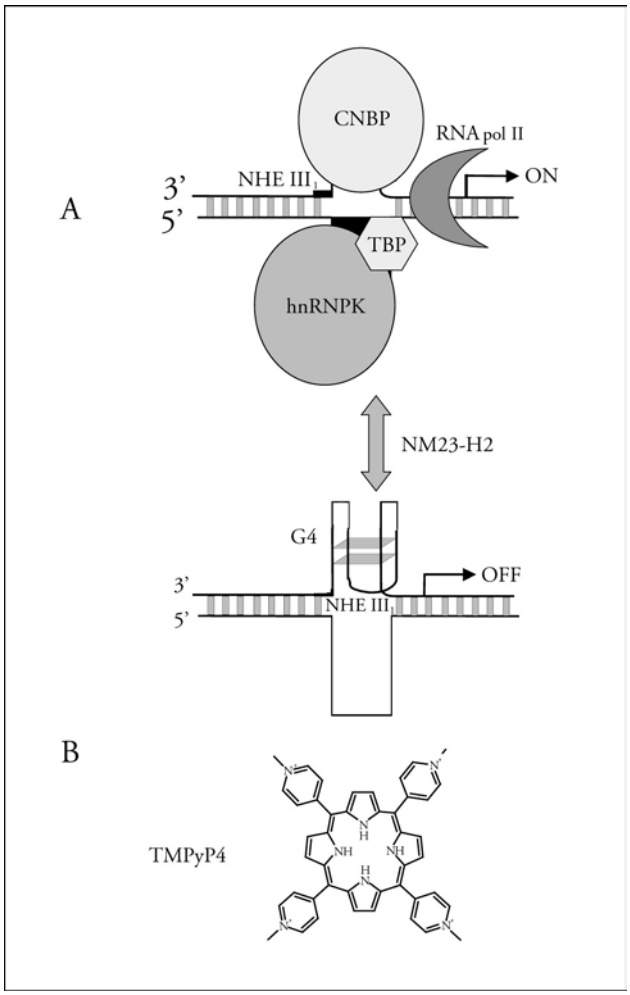


Figure 3. **Modèle de l'activation et de la répression de la transcription du gène *c-myc* impliquant le site NHE III_1. A) L'interconversion de la forme G-quadruplexe du brin G-riche en forme simple brin serait assurée par la protéine NM23-H2, capable de couper et ressouder l'ADN. La conversion en G4 empêcherait la fixation au niveau du NHE III_1 de plusieurs facteurs nécessaires à l'activité transcriptionnelle tels que hnRNPK et CNBP (d'après Siddiqui-Jain *et al.* [34]). B) Structure du dérivé de porphyrine TMPyP4.**

Les répétitions de G sont aussi observées au niveau de l'ADN minisatellite (MN) que l'on appelle aussi VNTR (*variable number of tandem repeats*) et correspondent à des répétitions de 5 à 100 nucléotides largement dispersées dans le génome humain [39]. Certains VNTR pourraient être impliqués dans la prédisposition génétique à différentes maladies. Bien qu'elles soient connues pour être des sites de recombinaison durant la méiose, ces séquences sont génétiquement stables dans les cellules somatiques mais présentent de nombreuses altérations dans les tumeurs humaines. Le MN Pc1 chez la souris consiste en une répétition de la séquence d(GGCAG)n et ce motif ou un motif similaire contenant d(GGCAGG)n est rencontré dans de nombreuses régions hypervariables dans le génome des mammifères [40]. Le brin G du motif Pc1 est capable de former *in vitro* une structure G4 et fixe la protéine UP1 correspondant à un fragment protéolytique de hnRNP A1 [41].

Le gène hTERT, codant pour le composant transcriptase inverse de la télomérase, contient deux régions introniques contenant plusieurs VNTR [42]. Deux VNTR de 38 bp et 36 bp sont localisés en 3' et en 5' de l'exon 6 et représentent une région de plusieurs kilobases qui contient des répétitions de G compatibles avec la formation de séquences G4 unimoléculaires au niveau de l'ARNm de hTERT. Il est intéressant de noter que cette région de hTERT est le siège d'un épissage alternatif qui provoque la délétion des exons 7 et 8 pour donner une forme inactive de l'enzyme [43].

Bien que la participation de structures G4 dans l'épissage alternatif des gènes n'ait pas été démontrée directement, des structures G4 peuvent se former *in vitro* à partir d'un brin ARN [15] et des résultats récents suggèrent que les G4 peuvent se former au niveau des ARNm :

– plusieurs ARNm (sémaphorine 3F, histone H4,...) contiennent un motif analogue à sc1 (**GG**AA**GG**AGU**GG**CUG**GG**) dans des régions 3' UTR, 5' UTR ou codantes qui forment *in vitro* un G4 unimoléculaire avec deux plateaux de G-quartets. Le motif sc1 sous forme G4 est la cible de la protéine FMRP (*fragile X mental retardation protein*) qui joue un rôle dans la régulation de la traduction de ces ARNm, en transportant ces ARNm par l'intermédiaire de la fixation au motif G4 [44, 45] ;

– le traitement par un ligand de G4 de lignées tumorales provoque une altération de l'épissage alternatif de l'ARNm de hTERT correspondant à une diminution du transcrit actif (+α,+β) et une augmentation du transcrit inactif épissé (-β) [46] ;

– un certain nombre de protéines participant directement ou indirectement à l'épissage de l'ARNm sont capables d'interagir avec les G4, telles que les hnRNP et la topo-isomérase I [47, 48].

Protéines reconnaissant les G-quadruplexes

La possibilité de formation des G4 à partir d'un substrat ADN ou ARN permet d'un point de vue structural à ces acides nucléiques de présenter une structure bien différenciée de celle de leurs équivalents simple ou double brin. Cette différenciation structurale et l'existence de systèmes protéiques capables de reconnaître les G4 *(tableau 1)* représentent un autre argument indirect de l'existence, au moins transitoire, des G4 dans un contexte cellulaire.

Les protéines qui fixent avec une haute affinité les G4 et fonctionnent au niveau des régions du génome riches en G comprennent la nucléoline, une protéine majeure du nucléole et des constituants majeurs du complexe hnRNP [47, 49]. La nucléoline et hnRNP-D s'associent dans les cellules B pour former le complexe LR1 qui possède une forte affinité pour les régions *switch* des gènes d'immunoglobuline et jouerait un rôle dans les processus de recombinaison [47]. hnRNP-A1, une protéine majeure du complexe hnRNP, est impliquée dans le transport et l'épissage des ARNm et fixe les séquences télomériques en jouant un rôle dans l'élongation des télomères [50, 51]. Le fragment protéolytique UP1 de hnRNP-A1, ne possédant pas de fonction d'épissage, fixe les régions G riches de l'ADN minisatellite hypervariable de souris (Pc1) et possède une fonction de désassemblage des G4 de type (TTAGGG)4 [41]. UP1 est par ailleurs capable de restaurer la longueur normale des télomères dans des mutants de hnRNP-A1 [50].

Tableau I. **Protéines reconnaissant les G-quadruplexes.**

Protéine	Références
Nucléoline	[47, 49]
Ribonucléoprotéine hnRNP-D	[47]
UP1 (Fragment de hnRNPA1)	[41]
ADN topo-isomérase I	[48]
Hélicases BLM et WRN	[60, 61]
Nucléase GQN1	[68]
Protéine de fixation au télomère RAP1p	[69]
qTBP42 (analogue de CBF-A)	[70]
Protéine doigt de zinc Gq1	[71]

D'une façon plus générale, les hnRNP participeraient à un complexe lié au télomère et à la télomérase qui régulerait l'accessibilité de l'enzyme au télomère [52]. Les hnRNP liées au télomère impliqueraient hnRNP-A1, A2-B1, D et E et les hnRNP liées à la télomérase comprendraient hnRNP-A1, C1/C2 et D.

La nucléoline est un marqueur de la prolifération cellulaire qui possède une activité hélicase, intervient dans le transport nucléo-cytoplasmique et fixe différentes protéines nucléolaires, dont la topo-isomérase I [53]. Les structures oligonucléotidiques riches en G capables de former des structures G4 possèdent des effets inhibiteurs sur la prolifération des cellules tumorales en induisant un arrêt du cycle cellulaire en phase S [54]. Le mécanisme d'action de ces oligonucléotides G4 ferait intervenir un blocage des fonctions de la nucléoline, en agissant comme des substrats suicides vis-à-vis des cibles ADN de la nucléoline. Il est vraisemblable que l'apport à la cellule d'un excès de structures G4 exogènes peut mimer l'effet de la stabilisation des G4 intracellulaires par des ligands spécifiques. La topo-isomérase I, qui possède une importante localisation nucléolaire et joue un rôle dans la transcription du rDNA, possède aussi une activité de fixation des structures G4 et est capable de catalyser l'assemblage de structures G4 *in vitro* [48]. Il est intéressant de noter que les oligonucléotides riches en G sont aussi des substrats suicides bloquant l'activité catalytique de la topo-isomérase I [55].

Les autres types de topo-isomérases interviennent plus ou moins directement sur la formation des structures G4. La topo-isomérase II est capable de cliver une structure G4 et les topo-isomérases II et III s'associent avec des hélicases de la famille RecQ (WRN, BLM, Sgs1) capables de dissocier sélectivement les structures G4 [56-58]. Chez la levure, la délétion du gène Sgs1 complémente le phénotype d'hyper-recombinaison du rDNA provoqué par la délétion de Top3, tandis que la double délétion des gènes Top1 et Sgs1 provoque un phénotype synthétique létal, c'est-à-dire non viable, alors que la délétion séparée de chacun des deux gènes est viable [59].

La formation d'un couple hélicase-topo-isomérase correspond à une association qui permet de spécialiser les fonctions de ces enzymes à une tâche précise au cours des processus du métabolisme de l'ADN tels que la réplication, la réparation, la transcription et la recombinaison. Ces couples interviendraient dans la régulation de la formation d'intermédiaires de recombinaison et de réplication impliquant des structures particulières de l'ADN (G4, jonctions Hollidays) [60-62].

Chez l'homme, les fonctions des couples hélicases RecQ-topo-isomérases sont encore mal connues, car il existe une

redondance importante de ces hélicases (WRN, RecQL4, BLM,...) et des topo-isomérases (topo I, Im, IIα, IIβ, IIIα, IIIαm, IIIβ) qui multiplient les associations possibles. On sait cependant que les hélicases WRN et BLM sont relocalisées au niveau des télomères lors du phénotype ALT (*alternative lengthening of telomeres*) qui correspond à un mécanisme d'allongement des télomères par recombinaison [63-66]. Leur rôle pourrait être de résoudre les structures en T-loop et/ou les G4 au cours de cette recombinaison.

Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, l'inactivation du gène dog1 qui code pour une hélicase de type DEAH (DNA/RNA helicase) provoque une délétion de l'ADN au niveau de répétitions de G [67]. Ces délétions sont observées chez 50 % des mutants, ce qui suggère un mécanisme directionnel associé à la réplication spécifique d'un des brins de l'ADN *(figure 4)*. La fonction de cette hélicase, dont l'activité biochimique n'a pas encore été caractérisée, serait de résoudre les structures de G4 unimoléculaires apparaissant au cours de la réplication de l'ADN. Il est intéressant de noter que l'homologue le plus proche chez l'homme de DOG1 correspond à la protéine BACH1 (connue aussi sous le nom de BRIP1) qui a été identifiée pour son interaction avec la protéine BRCA1 et qui est mutée dans certaines formes de cancer du sein. Le rôle de BRCA1 est de promouvoir les recombinaisons homologues et il est vraisemblable que BRCA1 et BACH1 jouent un rôle dans le contrôle de ces processus de recombinaison au niveau de séquences riches en G.

Une nucléase qui clive sélectivement les G4, GQN1 (*G quartet nuclease* 1) a aussi été identifiée à partir d'extraits de cellules B [68]. GQN1 ne clive pas l'ADN simple ou double brin, ni les jonctions Hollidays ou l'ARN G4. L'activité de cette enzyme, qui est fortement exprimée dans les cellules B, pourrait participer aux processus de recombinaison des gènes d'immunoglobulines en association avec le complexe LP1.

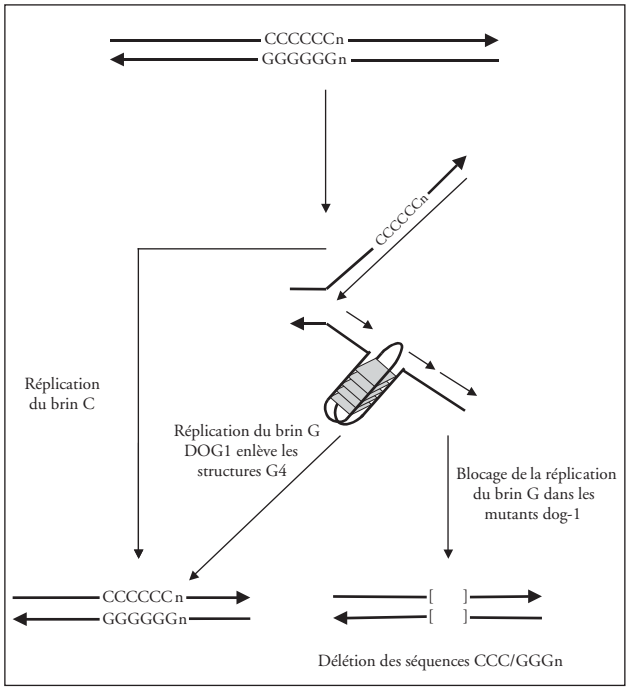


Figure 4. **Modèle de l'action de DOG1. En fonction de la direction de la réplication de l'ADN, le brin G contenant les séquences GGGGGn sera sous une forme simple brin et peut former une structure secondaire de type G-quadruplexe. Si cette structure n'est pas résolue par l'activité hélicase de DOG1, la formation du G-quadruplexe intramoléculaire provoque un arrêt de la réplication qui aboutit à une délétion de la séquence GGGGGGn (d'après Cheung *et al.* [67]).**

L'existence de systèmes protéiques spécialisés capables de reconnaître ou de modifier les structures G4 suggère que le catabolisme des G4 durant les processus de réplication, de transcription ou de recombinaison est un événement crucial pour le cycle de division de la cellule. Un contrôle strict de la régulation de l'assemblage ou du désassemblage des structures G4 est vraisemblablement nécessaire pour maintenir l'intégrité des processus de réplication, de recombinaison et de transcription des parties riches en G du génome. L'inactivation de facteurs impliqués dans le désassemblage des G4 (BLM, WRN, RecQL4) provoque l'apparition de maladies génétiques qui ont en commun une atteinte sévère de la stabilité du génome et qui sont à l'origine de déficience immunitaire, de sénescence précoce ou de prédisposition aux cancers.

Les protéines connues pour fixer naturellement les G4 sont généralement capables de fixer d'autres séquences nucléotidiques (à l'exception de la nucléase GQN1) et l'analyse des domaines fonctionnels de fixation aux G4 ne permet pas de différencier leurs domaines de fixation de ceux fixant les acides nucléiques. Par exemple, la protéine RAP1 possède deux domaines distincts mais inséparables capables de fixer G-quadruplexes et ADN double brin télomérique [69]. Plus récemment, la protéine qTBP42 purifiée à partir de foie de rat a été identifiée comme un homologue de *CArG-box binding factor A* (CBF-A) de souris contenant cinq domaines conservés de fixation aux acides nucléiques [70]. Les domaines de qTBP42 capables de déstabiliser les quadruplexes bimoléculaires de type G'2 d(CGG)n du gène FMR1 correspondent aux domaines RNP1(1) ou au ATP/GTP-*binding box* de CBF-A.

La recherche de motifs protéiques capables de fixer spécifiquement le G4 télomérique par une technologie de mutagenèse aléatoire et d'expression en phage (*phage-display*) à partir d'une librairie issue de la protéine à doigt de zinc Zif268 a conduit à l'identification de plusieurs doigts de zinc synthétiques spécifiques des G4 (Gq1 à 4) [71]. Le motif Gq1 possède un Kd de 24 nM pour le G4 télomérique et ne fixe pas l'ADN simple ou double brin. Gq1 inhibe l'activité télomérase avec une IC50 de 70 nM, ce qui indique qu'elle est capable de mimer l'effet de petites molécules ligands de G4. Elle peut être facilement manipulée par génie génétique et être couplée, par exemple, à une séquence de localisation nucléaire ou à un marqueur fluorescent (GFP) ; elle représente un outil extrêmement intéressant pour explorer dans la cellule la localisation des structures G-quadruplexes au niveau du télomère humain ou étudier sa surexpression et donc la stabilisation des G4.

Conséquences cellulaires

L'apparition récente de ligands sélectifs des structures G4 capables de perturber *in vitro* l'équilibre de leur assemblage/désassemblage permet d'établir une nouvelle stratégie d'inhibition de la télomérase qui cible l'ADN télomérique.

Le traitement à long terme de lignées cellulaires tumorales par des concentrations subtoxiques de ligands G4 provoque un arrêt retardé de la croissance cellulaire qui s'accompagne

d'un phénotype caractéristique de sénescence et d'un raccourcissement progressif de la longueur des télomères [21]. L'arrêt du traitement par le ligand G4 avant l'irréversibilité de la sénescence permet une réactivation de la télomérase, de la croissance cellulaire. Ces données indiquent que les ligands de G4 se comportent comme des inhibiteurs de l'activité télomérase intracellulaire.

Cependant, ces ligands sont aussi capables d'arrêter la prolifération cellulaire de cellules déficientes en activité télomérase présentant le phénotype ALT et d'induire l'apoptose de cellules télomérase-positives lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations plus importantes [21]. Ces résultats indiquent que la stabilisation des structures G4 est capable de perturber de nombreux processus impliqués dans la croissance cellulaire, indépendamment de l'activité télomérase.

La redondance des structures ADN ou ARN capables de former un G4 ainsi que des protéines capables de fixer ces structures laisse entrevoir de nombreuses pistes pouvant expliquer cette action télomérase-indépendante, comme par exemple, les hélicases de la famille RecQ qui sont sensibles *in vitro* à une inhibition sélective par des ligands G4 et qui participent au mécanisme ALT [63, 72]. Il est aussi possible que la structure du télomère simple brin (brin G) soit déstabilisée par l'absence de fixation d'un facteur essentiel à son intégrité, tel que Pot1 [73], ce qui pourrait se traduire par une apoptose des cellules.

Des mécanismes cellulaire plus complexes reliés à la transcription de certains gènes, à l'épissage alternatif ou au transport d'ARNm, à l'intégrité de la fonction du nucléole qui ne sont pas directement liés à la stabilité ou à la réplication du télomère pourraient aussi intervenir dans le mécanisme d'action de ces ligands.

Ces différents aspects posent le problème crucial de la toxicité potentielle de ces ligands sur les cellules normales de l'organisme dans le cadre d'une stratégie thérapeutique antitumorale.

L'utilisation de ces ligands à des doses subtoxiques sur des lignées normales immortalisées par hTERT (possédant des télomères > 10 kb) n'a montré aucun effet délétère sur la croissance après un traitement d'environ 1 an [21]. Ce résultat indique qu'il est possible d'obtenir un index thérapeutique pour ces ligands dans le cadre d'une stratégie d'inhibition de la télomérase.

Plusieurs expériences *in vivo* réalisées sur des xénogreffes de tumeurs humaines chez la souris nude montrent que le BRACO 19 [24] ou la télomestatine [20] possèdent une activité de blocage de la croissance tumorale à des concentrations non toxiques, ce qui indique l'existence d'une fenêtre thérapeutique pour ces dérivés (à prendre avec réserve car la longueur des télomères est plus importante chez la souris que chez l'homme). La possibilité que des éventuels effets toxiques soient dus à l'interaction avec un G-quadruplexe non télomérique ne doit pas être exclue, notamment lors d'une utilisation à une dose proche de la dose maximale non toxique.

Le point critique au cœur des recherches actuelles sur ces ligands est donc d'obtenir la plus grande sélectivité possible vis-à-vis des autres formes d'acides nucléiques et d'essayer de définir s'il existe une sélectivité de ces ligands vis-à-vis des multiples formes possibles de G-quadruplexes pouvant exister dans le génome et dont l'interaction provoquerait un effet indésirable.

La preuve de l'existence intracellulaire des G-quadruplexes revient donc comme un leitmotiv pour définir, non seulement le cadre de leur activité, mais aussi leurs toxicités potentielles. ▼

Remerciements. Les auteurs remercient Patrick Mailliet (Aventis Pharma SA, Vitry-sur-Seine) et Jean-Louis Mergny (Muséum national d'histoire naturelle, Paris) pour leur collaboration et soutien de longue date. Nos travaux sont soutenus par l'Action concertée incitative molécules et cibles thérapeutiques (projet ACI 324) et par l'Association pour la recherche sur le cancer (contrat ARC 4691). Thibault Lemarteleur bénéficie d'une bourse de l'Association régionale pour l'enseignement et la recherche scientifique et technologique (ARERS).

Références

1. Greider CW, Blackburn EH. Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am* 1996 ; 274 : 92-7.
2. Granger MP, Wright WE, Shay JW. Telomerase in cancer and aging. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002 ; 41 : 29-40.
3. 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 : 2011-5.
4. Wright WE, Shay JW, Piatyszek MA. Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic Acids Res* 1995 ; 23 : 3794-5.
5. Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, *et al.* The RNA component of human telomerase. *Science* 1995 ; 269 : 1236-41.
6. Autexier C, Greider CW. Telomerase and cancer : revisiting the telomere hypothesis. *Trends Biochem Sci* 1996 ; 21 : 387-91.
7. Blasco MA, Lee HW, Rizen M, Hanahan D, DePinho R, Greider CW. Mouse models for the study of telomerase. *Ciba Found Symp* 1997 ; 211 : 160-70.
8. Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW, 2nd, Greider CW, DePinho RA. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 1998 ; 392 : 569-74.
9. Cech TR, Nakamura TM, Lingner J. Telomerase is a true reverse transcriptase : a review. *Biochemistry (Mosc)* 1997 ; 62 : 1202-5.
10. Counter CM, Hahn WC, Wei W, Caddle SD, Beijersbergen RL, Lansdorp PM, *et al.* Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 14723-8.
11. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999 ; 400 : 464-8.
12. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, *et al.* Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nature Med* 1999 ; 5 : 1164-70.
13. Zhang X, Mar V, Zhou W, Harrington L, Robinson MO. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev* 1999 ; 13 : 2388-99.
14. Chan SW, Blackburn EH. New ways not to make ends meet : telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 2002 ; 21 : 553-63.
15. Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, Teulade-Fichou MP, Gilson E. Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res* 2002 ; 30 : 839-65.
16. Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, Hauel N, Kauffmann I, Priepke H, *et al.* A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *Embo J* 2001 ; 20 : 6958-68.
17. Harley C. Status and issues for therapeutics based on telomerase biology. *The role of telomere and telomerase in cancer* 2002. December 7-11 : San Francisco, California.

18. Lavelle F, Riou JF, Laoui A, Mailliet P. Telomerase : a therapeutic target for the third millennium ? *Crit Rev Oncol Hematol* 2000 ; 34 : 111-26.

19. Mergny JL, Mailliet P, Lavelle F, Riou JF, Laoui A, Helene C. The development of telomerase inhibitors : the G-quartet approach. *Anticancer Drug Des* 1999 ; 14 : 327-39.

20. Shin-Ya K, Park HR, Wierzba K, Matsuo KI, Ohtani T, Ito R, *et al.* Telomestatin, a novel telomerase inhibitor of microbial origin. *Proc Am Assoc Cancer Res* 2002 ; 43 : #1250.

21. Riou JF, Guittat L, Mailliet P, Laoui A, Renou E, Petitgenet O, *et al.* Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 2672-7.

22. Neidle S, Parkinson G. Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002 ; 1 : 383-93.

23. Gowan SM, Heald R, Stevens MF, Kelland LR. Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes. *Mol Pharmacol* 2001 ; 60 : 981-8.

24. Gowan SM, Harrison JR, Patterson L, Valenti M, Read MA, Neidle S, *et al.* A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity. *Mol Pharmacol* 2002 ; 61 : 1154-62.

25. Wang Y, Patel DJ. Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G- tetraplex. *Structure* 1993 ; 1 : 263-82.

26. Parkinson GN, Lee MP, Neidle S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* 2002 ; 417 : 876-80.

27. Phan AT, Mergny JL. Human telomeric DNA : G-quadruplex, i-motif and Watson-Crick double helix. *Nucleic Acids Res* 2002 ; 30 : 4618-25.

28. Schaffitzel C, Berger I, Postberg J, Hanes J, Lipps HJ, Pluckthun A. In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with Stylonychia lemnae macronuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 8572-7.

29. Sen D, Gilbert W. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* 1988 ; 334 : 364-6.

30. Nonin-Lecomte S, Leroy JL. Structure of a C-rich strand fragment of the human centromeric satellite III : a pH-dependent intercalation topology. *J Mol Biol* 2001 ; 309 : 491-506.

31. Elder JF, Jr., Turner BJ. Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *Q Rev Biol* 1995 ; 70 : 297-320.

32. Murchie AI, Lilley DM. Retinoblastoma susceptibility genes contain 5' sequences with a high propensity to form guanine-tetrad structures. *Nucleic Acids Res* 1992 ; 20 : 49-53.

33. Simonsson T, Pecinka P, Kubista M. DNA tetraplex formation in the control region of c-myc. *Nucleic Acids Res* 1998 ; 26 : 1167-72.

34. Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 11593-8.

35. Sinclair DA. Paradigms and pitfalls of yeast longevity research. *Mech Ageing Dev* 2002 ; 123 : 857-67.

36. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, *et al.* Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999 ; 97 : 503-14.

37. Reddel RR, Bryan TM, Colgin LM, Perrem KT, Yeager TR. Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiat Res* 2001 ; 155 : 194-200.

38. Postel EH, Abramczyk BM, Levit MN, Kyin S. Catalysis of DNA cleavage and nucleoside triphosphate synthesis by NM23- H2/NDP kinase share an active site that implies a DNA repair function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000 ; 97 : 14194-9.

39. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 1985 ; 314 : 67-73.

40. Mitani K, Takahashi Y, Kominami R. A GGCAGG motif in minisatellites affecting their germline instability. *J Biol Chem* 1990 ; 265 : 15203-10.

41. Fukuda H, Katahira M, Tsuchiya N, Enokizono Y, Sugimura T, Nagao M, *et al.* Unfolding of quadruplex structure in the G-rich strand of the minisatellite repeat by the binding protein UP1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002 ; 99 : 12685-90.

42. Leem SH, Londono-Vallejo JA, Kim JH, Bui H, Tubacher E, Solomon G, *et al.* The human telomerase gene : complete genomic sequence and analysis of tandem repeat polymorphisms in intronic regions. *Oncogene* 2002 ; 21 : 769-77.

43. Kyo S, Inoue M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells : how can we apply them for cancer therapy ? *Oncogene* 2002 ; 21 : 688-97.

44. Darnell JC, Jensen KB, Jin P, Brown V, Warren ST, Darnell RB. Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* 2001 ; 107 : 489-99.

45. Mazroui R, Huot ME, Tremblay S, Filion C, Labelle Y, Khandjian EW. Trapping of messenger RNA by fragile X mental retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet* 2002 ; 11 : 3007-17.

46. Gomez D, Renaud A, Martinez S, Mailliet P, Mergny JL, Riou JF. Cellular resistance to a G-quadruplex DNA ligand inhibitor of telomerase. *The role of telomeres and telomerase in cancer* 2002. December 7-11 : San Francisco, california.

47. Dempsey LA, Sun H, Hanakahi LA, Maizels N. G4 DNA binding by LR1 and its subunits, nucleolin and hnRNP D, A role for G-G pairing in immunoglobulin switch recombination. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 1066-71.

48. Arimondo PB, Riou JF, Mergny JL, Tazi J, Sun JS, Garestier T, *et al.* Interaction of human DNA topoisomerase I with G-quartet structures. *Nucleic Acids Res* 2000 ; 28 : 4832-8.

49. Hanakahi LA, Sun H, Maizels N. High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 15908-12.

50. LaBranche H, Dupuis S, Ben-David Y, Bani MR, Wellinger RJ, Chabot B. Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase. *Nature Genet* 1998 ; 19 : 199-202.

51. Dallaire F, Dupuis S, Fiset S, Chabot B. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and UP1 protect mammalian telomeric repeats and modulate telomere replication in vitro. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 14509-16.

52. Ford LP, Wright WE, Shay JW. A model for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in telomere and telomerase regulation. *Oncogene* 2002 ; 21 : 580-3.

53. Haluska P, Jr., Rubin EH. A role for the amino terminus of human topoisomerase I. *Adv Enzyme Regul* 1998 ; 38 : 253-62.

54. Xu X, Hamhouyia F, Thomas SD, Burke TJ, Girvan AC, McGregor WG, *et al.* Inhibition of DNA replication and induction of S phase cell cycle arrest by G-rich oligonucleotides. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 43221-30.

55. Marchand C, Pourquier P, Laco G, Jing N, Pommier Y. Interaction of human nuclear topoisomerase I with guanosine-quartet- forming and guanosine-rich single-stranded DNA and RNA oligonucleotides. *J Biol Chem* 2001 ; 26 : 26.

56. Wu L, Davies SL, North PS, Goulaouic H, Riou JF, Turley H, *et al.* The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 9636-44.

57. Watt PM, Hickson ID, Borts RH, Louis EJ. SGS1, a homologue of the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for maintenance of genome stability in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics* 1996 ; 144 : 935-45.

58. Bennett RJ, Noirot-Gros MF, Wang JC. Interaction between yeast sgs1 helicase and DNA topoisomerase III. *J Biol Chem* 2000 ; 275 : 26898-905.

59. Wu L, Hickson ID. RecQ helicases and topoisomerases : components of a conserved complex for the regulation of genetic recombination. *Cell Mol Life Sci* 2001 ; 58 : 894-901.

60. Mohaghegh P, Karow JK, Brosh Jr RM, Jr., Bohr VA, Hickson ID. The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases. *Nucleic Acids Res* 2001 ; 29 : 2843-9.

61. Sun H, Karow JK, Hickson ID, Maizels N. The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 27587-92.

62. Duguet M. When helicase and topoisomerase meet ! *J Cell Sci* 1997 ; 110 : 1345-50.

63. Stavropoulos DJ, Bradshaw PS, Li X, Pasic I, Truong K, Ikura M, *et al.* The Bloom syndrome helicase BLM interacts with TRF2 in ALT cells and promotes telomeric DNA synthesis. *Hum Mol Genet* 2002 ; 11 : 3135-44.

64. Huang P, Pryde FE, Lester D, Maddison RL, Borts RH, Hickson ID*, et al.* SGS1 is required for telomere elongation in the absence of telomerase. *Curr Biol* 2001 ; 11 : 125-9.
65. Opresko PL, Von Kobbe C, Laine JP, Harrigan J, Hickson ID, Bohr VA. Telomere binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J Biol Chem* 2002 ; 13 : 13.
66. Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 2002 ; 21 : 598-610.
67. Cheung I, Schertzer M, Rose A, Lansdorp PM. Disruption of dog-1 in Caenorhabditis elegans triggers deletions upstream of guanine-rich DNA. *Nature Genet* 2002 ; 31 : 405-9.
68. Sun H, Yabuki A, Maizels N. A human nuclease specific for G4 DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 12444-9.
69. Giraldo R, Suzuki M, Chapman L, Rhodes D. Promotion of parallel DNA quadruplexes by a yeast telomere binding protein : a circular dichroism study. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 7658-62.
70. Weisman-Shomer P, Cohen E, Fry M. Distinct domains in the CArG-box binding factor A destabilize tetraplex forms of the fragile X expanded sequence d(CGG)(n). *Nucleic Acids Res* 2002 ; 30 : 3672-81.
71. Isalan M, Patel SD, Balasubramanian S, Choo Y. Selection of zinc fingers that bind single-stranded telomeric DNA in the G-quadruplex conformation. *Biochemistry* 2001 ; 40 : 830-6.
72. Li JL, Harrison RJ, Reszka AP, Brosh RM, Jr., Bohr VA, Neidle S*, et al.* Inhibition of the Bloom's and Werner's syndrome helicases by G- quadruplex interacting ligands. *Biochemistry* 2001 ; 40 : 15194-202.
73. Baumann P, Podell E, Cech TR. Human Pot1 (protection of telomeres) protein : cytolocalization, gene structure, and alternative splicing. *Mol Cell Biol* 2002 ; 22 : 8079-87.

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 278, No. 50, Issue of December 12, pp. 50554–50562, 2003
Printed in U.S.A.
© 2003 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Resistance to the Short Term Antiproliferative Activity of the G-quadruplex Ligand 12459 Is Associated with Telomerase Overexpression and Telomere Capping Alteration*

Received for publication, August 1, 2003, and in revised form, September 28, 2003
Published, JBC Papers in Press, October 2, 2003, DOI 10.1074/jbc.M308440200

Dennis Gomez‡, Nassera Aouali§, Arturo Londoño-Vallejo¶, Laurent Lacroix‖, Frédérique Mégnin-Chanet, Thibault Lemarteleur‡ ‡‡, Céline Douarre‡, Kazuo Shin-ya§§, Patrick Mailliet¶¶, Chantal Trentesaux‡, Hamid Morjani§, Jean-Louis Mergny‖, and Jean-François Riou‡‖‖**

*From ‡Onco-Pharmacologie, IFR53, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims 51096, France, §CNRS UMR 642, IFR53, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims 51096, France, ¶Génétique des Télomères et Cancer, INSERM U434, Paris 75010, France, ‖Laboratoire de Biophysique, INSERM U565, CNRS UMR 8646, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris 75005, France, **INSERM U350, Institut Curie-Recherche, Bat. 112, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France, §§Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan, ¶¶Aventis Pharma SA, Centre de Recherche de Paris, Vitry sur Seine 94403, France, and ‡‡EA3306, IFR53, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51096 Reims, France*

Ligands that stabilize the telomeric G-rich single-stranded DNA overhang into G-quadruplex can be considered as potential antitumor agents that block telomere replication. Ligand 12459, a potent G-quadruplex ligand that belongs to the triazine series, has been previously shown to induce both telomere shortening and apoptosis in the human A549 cell line as a function of its concentration and time exposure. We show here that A549 clones obtained after mutagenesis and selected for resistance to the short term effect of ligand 12459 frequently displayed hTERT transcript overexpression (2–6-fold). Overexpression of hTERT was also characterized in two resistant clones (JFD10 and JFD18) as an increase in telomerase activity, leading to an increase in telomere length. An increased frequency of anaphase bridges was also detected in JFD10 and JFD18, suggesting an alteration of telomere capping functions. Transfection of either hTERT or DN-hTERT cDNAs into A549 cells did not confer resistance or hypersensitivity to the short term effect of ligand 12459, indicating that telomerase expression is not the main determinant of the antiproliferative effect of ligand 12459. In contrast, transfection of DN-hTERT cDNA into resistant JFD18 cells restored sensitivity to apoptotic concentrations of ligand 12459, suggesting that telomerase does participate in the resistance to this G-quadruplex ligand. This work provides evidence that telomerase activity is not the main target for the 12459 G-quadruplex ligand but that hTERT functions contribute to the resistance phenotype to this class of agents.

Telomeres are essential to maintain the stability of chromosome ends and are synthesized by a specialized enzyme called telomerase. Telomerase is overexpressed in a large number of tumors and is involved in cell immortalization and tumorigenesis, whereas it is not described as being expressed in most somatic cells (1). A recent work showed that telomerase was efficiently expressed in S phase from normal cycling cells and played an important function to delay the onset of replicative senescence by maintaining the 3′ telomeric overhang integrity independently from overall telomere length regulation (2). Differential expression of telomerase between normal and cancer cells was the initial rationale for the evaluation of telomerase inhibitors as potential anticancer agents (3), and a highly specific catalytic telomerase inhibitor, BIBR1532, was described as impairing cancer cell proliferation without acute toxicity in a mouse xenograft model (4). Since telomerase is expressed in normal proliferating human cells, the useful therapeutic index of these inhibitors has to be carefully determined in future studies.

Folding of the telomeric G-rich single-stranded overhang into a quadruplex DNA has been found to inhibit telomerase activity. Stabilization of G-quadruplexes can then be considered an original strategy to achieve antitumor activity (5–8). The intracellular existence of G-quadruplexes was recently demonstrated in the telomeres from ciliates (9). G-quadruplex could also be formed from duplex telomeric DNA under appropriate ionic and pH conditions (10) or in the presence of specific ligands (11). The c-*myc* gene promotor sequence allowed the formation of a G-quadruplex that corresponded to the first demonstration of the physiologic relevance of such a structure in mammalian cells (12).

The 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine derivatives are potent telomerase inhibitors that bind to telomeric G-quadruplexes (13). In this series, **12459** (Fig. 1*a*) is one of the most selective G-quadruplex-interacting compounds and it displayed a 25-fold selectivity when telomerase inhibition was compared with the *Taq* polymerase inhibition by using the TRAP[1]-G4 assay (14).

* This work was supported by an Action Concertée Incitative, "Molécules et Cibles Thérapeutiques" grant from the French Ministry of Research and by Association pour la Recherche sur le Cancer Grants 4691 (to J.-F. R.), 4321 (to J.-L. M.), 4779 (to A. L.-V.), and 4427 (to F. M.-C.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We dedicate this work to the memory of Professor Claude Hélène (1938–2003).

‖‖ To whom correspondence should be addressed: UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France. Tel.: 33-326-91-80-13; Fax: 33-326-91-37-30; E-mail: jf.riou@univ-reims.fr.

[1] The abbreviations used are: TRAP, telomere repeat amplification protocol; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; TRF, telomeric restriction fragment; RT, reverse transcriptase; DAPI, 4′,6-diamidino-2-phenylindole; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid; hTERT, human TERT; hTR, human TR; hnRNPA1, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1; Gy, grays.

This paper is available on line at http://www.jbc.org

12459 also presents strong affinities to different G-quadruplex structures when compared with other forms of nucleic acids.[2] In addition, **12459** is able to induce both telomere shortening and apoptosis in the human lung adenocarcinoma A549 cell line as a function of its concentration and time exposure (13).

Telomerase inhibition usually resulted in a long term inhibition of cell proliferation because of the delay in eroding telomere to a critical length that impairs cell division (1). However, inhibition of telomerase activity could induce dramatic and rapid consequences on cell viability in cell lines bearing critically short telomeres (15) or mutations in the telomerase RNA template (16, 17). Furthermore, inactivation of hTERT in normal human cells was recently shown to decrease cell proliferation and cell cycle progression (2). Therefore, the peculiar feature of **12459** to inhibit telomerase activity and to induce short term inhibition of proliferation in A549 cells prompted us to determine whether such telomerase inhibition has a link with the antiproliferative effect of this class of G-quadruplex ligands. For that purpose, we have established **12459**-resistant clones, using the short term antiproliferative activity of **12459** as a selection criterion and investigated their resistance phenotype. Induction of resistance to **12459** is characterized by a functional overexpression of telomerase activity in half of the clones analyzed. Resistant clones presented an increased incidence of anaphase bridges that reflected telomere capping dysfunctions. We also showed that transfection of hTERT in A549 cells was not sufficient to confer resistance to **12459**. In contrast, transfection of DN-hTERT in a resistant clone abolished resistance to **12459**.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Oligonucleotides and Compounds—All oligonucleotides were synthesized and purified by Eurogentec (Seraing, Belgium). Triazine derivatives **12459** and **115405** were synthesized according to Ref. 45. Telomestatin was purified according to Ref. 18. BRACO19 was synthesized according to Ref. 19. Other compounds were commercially available (Sigma). Solutions of compounds were prepared in 10 mM Me_2SO, except telomestatin, which was prepared at 5 mM in MeOH/Me_2SO (50:50). Further dilutions were made in water.

Telomerase Assay—Telomerase extracts were prepared from A549, JFD10, and JFD18 cells as described before (20). The TRAP assay was performed in the presence of an internal control (internal telomerase assay standard) corresponding to the 36-mer (5′-AATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-3′) according to Ref. 21.

Cell Culture Conditions and Selection of Resistant Clones—A549 human lung carcinoma cell line was from the American Type Culture Collection. These cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium with Glutamax (Invitrogen), supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics. 50×10^6 cells were seeded into 10 tissue culture flasks and were treated for 48 h with 300 μg/ml ethyl methyl sulfonate. Cells were washed and cultured in ethyl methyl sulfonate-free medium for 4 days and then treated with 10 μM **12459** for 4 weeks. Every 4 days, medium and **12459** were changed in order to eliminate dead cells and cellular debris. Remaining cells were further cloned in soft agar (10^4 cells/dishes) containing either 5 or 10 μM **12459**. After 2 weeks, surviving clones (100 clones from each selection condition) were collected from agar using a 1-ml tip and were individually plated in 96-well culture plates in the presence or absence of **12459** (10 μM). 15 of 200 clones (JFD1, JFD2, JFD3, JFD4, JFD5, JFD7, JFD8, JFD9, JFD10, JFD11, JFD12, JFD14, JFD15, JFD16, and JFD18) were able to grow in the presence of **12459** and were further cultured in drug-free medium.

An 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide survival assay (4 days) in the presence of various cytotoxic compounds was performed in 96-well plates, each point in quadruplicate, as recommended by the manufacturer (Sigma). Due to an interference of **12459** with the coloration induced by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a survival assay for this compound was performed in 6-well plates, each point in triplicate. The number of viable cells was counted after trypan blue dye exclusion in a hematocytometer.

For apoptosis determination, A549 cells were seeded on 4-well coverslides and treated with **12459**. Cells were washed with phosphate-buffered saline and stained with Hoechst 33342 at 1 μg/ml. cells with apoptotic nuclei were counted in a different part of the slide by fluorescence microscopy. Results corresponded to the mean of three separate determinations ± S.D. relative to control untreated cells.

Radiation survival was determined by clonogenic assays. Cells were irradiated in culture medium at room temperature in an IBL-637 (^{137}Cs) irradiator (CIS-Biointernational, Saclay, France) at a dose rate of 1.05 Gy/min. Experiments were performed in triplicate or more. Colonies were allowed to grow for 8 days and then fixed with methanol, stained, and scored. Small colonies (<50 cells) were disregarded. Radiation survival curves were drawn for best fit to a linear quadratic equation, as usual: $\ln S/S0 = -\alpha D - \beta D^2$, where $S0$ represents the clonogenic efficiency, S is the residual survival, D is the radiation dose, and α and β are numerical parameters characterizing the radiosensitivity of the cell line.

Infections of A549 and JFD18 Cells—Lentiviral supernatants containing hTERT, DN-hTERT cDNAs, or control HPV vector were a generous gift from Dr. Annelise Bennaceur-Griscelli (Institut Gustave Roussy, Villejuif, France). A549 or JFD18 cells at 1.5×10^5 cells/ml were infected at a multiplicity of infection equal to 50 in the presence of 4 μg/ml Polybrene in complete culture medium. Enhanced green fluorescent protein-positive cells were sorted 5 days later by flow cytometry according to a high or low intensity of fluorescence. Populations that expressed a high intensity of fluorescence were seeded in 25-cm^2 flasks and cultivated for up to 81 days. Cytotoxicity and clonogenic survival experiments were performed on cultures between days 60 and 80 after infection.

Clonogenic survival assays were performed with 5×10^3 cells from A549- or JFD18-transfected cell lines according to the previously published procedure (22) in the presence or absence of 5 μM **12459**. Results represent the mean value ± S.D. of triplicate determinations.

RNA Preparation and RT^1-PCR Assays—Total RNA was isolated from 1×10^6 cells using Tri-Reagent (Sigma) as recommended by the manufacturer. One μg of total RNA was reverse transcribed in a 20-μl reaction volume using random hexamers, avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, and the reaction buffer provided in the reverse transcription kit (Promega). The volume of the sample was adjusted to 200 μl with diethylpyrocarbonate-treated water at the end of the reaction. A 10-μl aliquot of cDNA was used for PCR amplifications. hTERT was amplified using the forward TERT2109 primer (5′-GCCTGAGCTGTACTTTGTCAA-3′) and the reverse TERT2531R primer (5-AGGCTGCAGAGCAGCGTGGAGAGG-3′) according to Ref. 23, with the following cycling conditions: 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. Amplification of β_2-microglobulin was performed as a control using the same PCR conditions with primer forward (5′-ACCCCCACTGAAAAAGATGA-3′) and primer reverse (5′-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3′). Amplifications of the different genes were performed using the same PCR cycle conditions using the following primers: hTR, forward primer (5′-TCTAACCCTAACTGAGAAGGGCGTAG-3′) and reverse primer (5′-GTTTGCTCTAGAATGAACGGTGGAAG-3′); TRF1, forward primer (5′-AGCAGAAGAGCCACTGAAAGCA-3′) and reverse primer (5′-CTTCGCTGTCTGAGGAAATCAG-3′); TRF2, forward primer (5′-TGAAAACGAAACTTCAGCCCCG-3′) and reverse primer (5′-GTGCTGCCTGAACTTGAAACAG-3′); hPot1, forward primer (5′-CCAGCTCTGCTTTGCATCTTT-3′) and reverse primer (5′-CAAGAGCTGACAAGTCAGGTCA-3′); BLM, forward primer (5′-GCCCTACAGGGAATTCTATG-3′) and reverse primer (5′-GTTTCAGCCCAGTTGCTACT-3′); WRN, forward primer (5′-CTTCCACCAACTCTCTGTTTG-3′) and reverse primer (5′-CTGTGATAATTGCAGGTCCAG-3′); NCL, forward primer (5′-AATGAGGGCAGAGCAATCAGG-3′) and reverse primer (5′-GTCAGTAACTATCCTTGCCCG-3′); hnRNPA1, forward primer (5′-ACGAAACCAAGGTGGCTATG-3′) and reverse primer (5′-AGCGTCACGATCAGACTGTT-3′). Amplified products were resolved on 6% nondenaturing polyacrylamide gels in 1× TBE and stained with SYBR Green I (Roche Applied Science). Quantification was performed by a CCD camera (Bioprint) and a BioCapt software analysis, relative to the signal of β_2-microglobulin. Results represent the mean value of two or three independent RNA extractions, as indicated.

Telomeric Restriction Size Fragment Determination—Genomic DNA was digested with HinfI/RsaI restriction enzymes and electrophoresed in 0.8% agarose gels in 1× TBE buffer. DNA were transferred onto hybond N+ membrane (Amersham Biosciences) and then prehybridized for 2 h at 65 °C in 7% SDS, 1% bovine serum albumin, and 0.5 M $NaPO_4$, pH 8.0. A 0.7-kb telomere DNA probe (pUCTelo; a gift from Prof. E. Gilson, Ecole Normale Supèrieure, Lyon, France) was labeled

[2] L. Guittat and J.-L. Mergny, unpublished results.

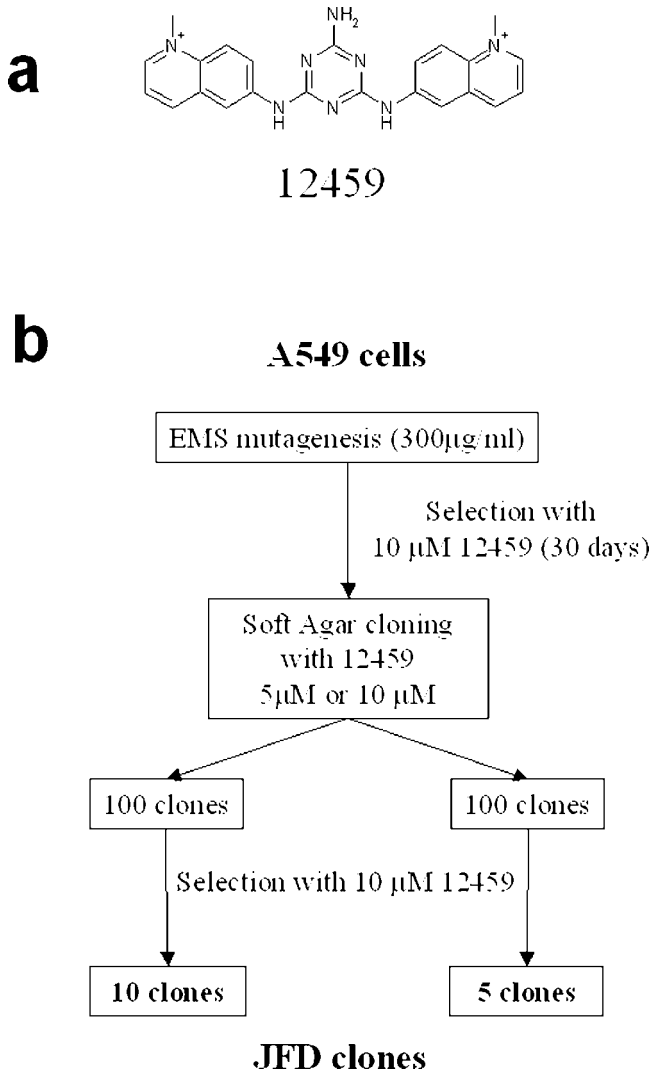


FIG. 1. **Selection of A549 clones resistant to the G-quadruplex ligand 12459.** *a*, chemical structure of **12459**. *b*, schematic diagram of the resistance selection process.

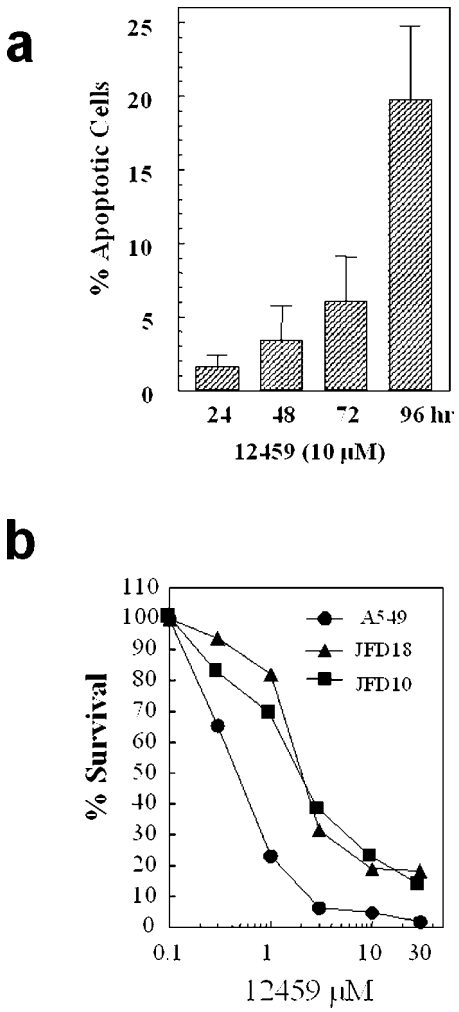


FIG. 2. **Antiproliferative and apoptotic effects of 12459.** *a*, apoptosis induction by **12459** in A549 cells. Cells were treated for 24, 48, 72, and 96 h with **12459** at 10 μM. Cells were fixed and stained with Hoechst 33342, and the percentage of cells exhibiting apoptotic nuclei was calculated relative to untreated cells. *b*, antiproliferative effect of **12459** against parental A549 and resistant JFD10 and JFD18 clones for 96-h drug exposure.

with [α-^{32}P]dCTP by random priming and was added to the solution. Hybridization was performed overnight at 65 °C. Membranes were washed twice with 0.2× SSC, 0.1% SDS at 65 °C for 15 min and then twice with 2× SSC, 0.1% SDS at room temperature. Telomeric smears were revealed by autoradiography, and the mean length of the telomere restriction fragment (TRF) corresponds to the peak of the densitometric integration curve from two separate experiments.

FISH Analysis—Metaphase chromosome spreads were prepared from cells treated with colcemid (0.1 μg/ml, 1 h; Eurobio) and then hypotonic KCl and fixed in methanol/acetic acid (3:1, v/v). Fixed cells were dropped onto clean slides and left to dry overnight prior to hybridization with a telomeric specific $(CCCTAA)_3$-Cy3 PNA probe (PerSeptive Biosystems) as described (24) and staining with DAPI. Fluorescent signals were visualized under a UV microscope (Axioplan2; Zeiss) equipped with a computer-piloted filter wheel and were captured with a CCD camera (Photometrics-Sensys) using the Smart-Capture software (Vysis) (settings: gain = 3 (red), 1 (blue); binning = 4) and a fixed exposure time of 2 s. A flat field template was used to correct for unevenness in field illumination. Merged DAPI-Cy3 pseudocolor images were used to colocalize chromosomes and telomere signals. Original grayscale Cy3 images were saved for quantitative analysis using the Iplab Spectrum P software (Skanalytics). Overall telomere fluorescence was estimated by calculating the mean pixel value of the metaphase using an automatic segmentation protocol provided by the software.

For the FISH localization of hTERT, metaphase preparations were cohybridized with a biotin-labeled BAC carrying the whole hTERT locus (25) and a digoxigenin-labeled chromosome 5 painting. The probes were revealed using Texas Red-coupled avidin (Vector) and a fluorescein isothiocyanate-conjugated antidigoxigenin antibody (Sigma), respectively. Chromosomes were counterstained with DAPI, and fluorescent signals were visualized and captured as above. Merged DAPI-fluorescein isothiocyanate-Texas Red images were then obtained to count and localize hTERT loci.

Anaphase Bridge Analysis—To determine the presence of anaphase bridges, cells were seeded on microscope slides and stained with Chromomycin A3 (Sigma). Images of anaphases were recorded with a confocal microscope (Bio-Rad MRC 1024) with excitation at 457 nm and emission at 530 nm. At least 50 metaphases were examined for sensitive A549 and JFD10- or JFD18-resistant clones.

RESULTS

Resistant clones were obtained after ethyl methyl sulfonate mutagenesis and soft agar cloning selection (26) in the presence of 10 μM **12459** (Fig. 1*b*), a concentration of drug able to induce apoptosis with a 72–96-h delay (Fig. 2*a*). After the initial selection procedure, clones were plated and maintained in the absence of **12459**. Among 200 clones isolated, 15 were confirmed for **12459** resistance in a 96-h cytotoxicity assay with resistance indexes varying from 3- to 5-fold (Fig. 2*b*). The resistance phenotype of the selected clones is stable for at least 6 months, when cells are grown in the absence of **12459**.

The level of hTERT transcripts was investigated in the resistant clones by RT-PCR analysis. hTERT presents a complex

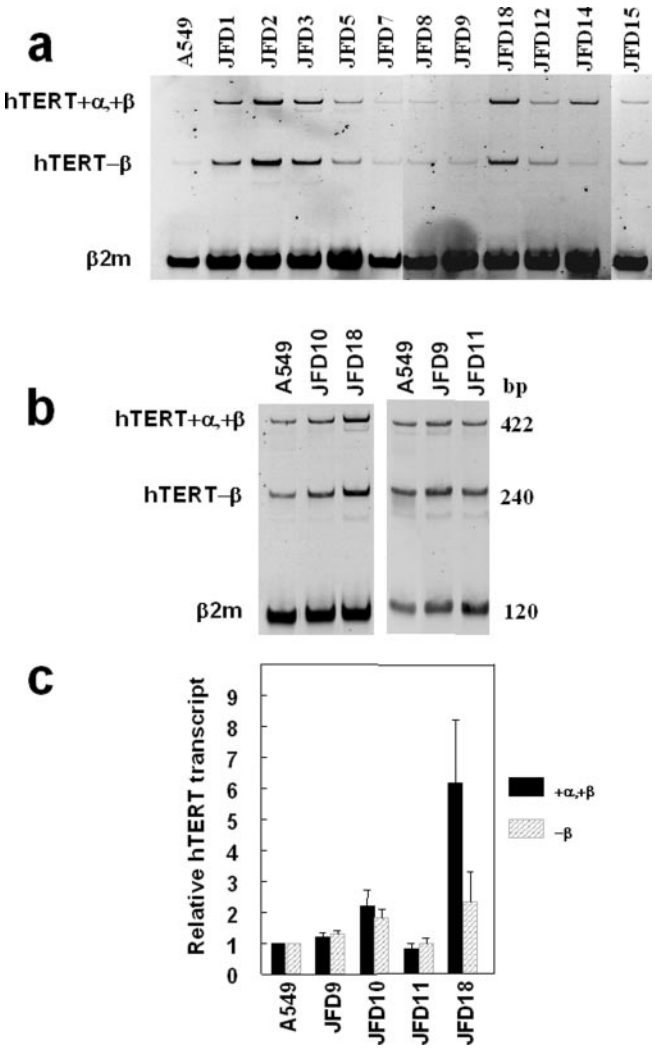


FIG. 3. **Expression of hTERT transcript in 12459-resistant clones.** *a*, RT-PCR of hTERT in A549 cells and JFD-resistant clones, as indicated. *b*, RT-PCR of hTERT in A549 and JFD10-, JFD18-, JFD9-, and JFD11-resistant clones, as indicated. The β_2-microglobulin transcript is used as a control for mRNA expression. RT-PCR analysis detects active ($+\alpha,+\beta$) and inactive ($-\beta$) hTERT transcripts. The size of the PCR products (bp) is indicated on the *right*. *c*, quantification of three independent RT-PCR experiments (from independent RNA extractions) for the active $+\alpha,+\beta$ and the inactive $-\beta$ hTERT transcripts on A549 parental cells and JFD10-, JFD18-, JFD9-, and JFD11-resistant clones. Data were normalized relative to the β_2-microglobulin transcript (*β2m*) and to the values of parental A549 cells defined as 1.

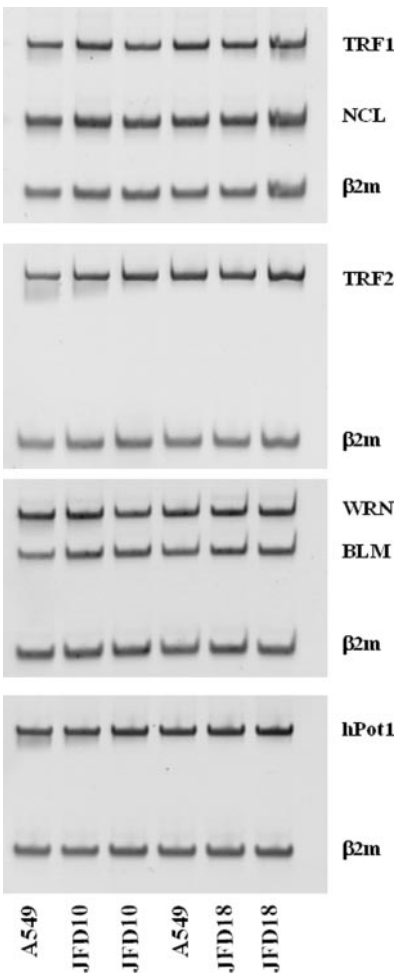


FIG. 4. **Expression of telomere-associated genes transcript in 12459-resistant clones.** RT-PCR of TRF1, TRF2, nucleolin (*NCL*), Werner (*WRN*), Bloom (*BLM*), and hPot1 in A549, JFD10, and JFD18 clones, as indicated. β_2-Microglobulin (*β2m*) transcript is used as a control for mRNA expression. *Duplicate lanes* represent independent RT-PCR experiments.

splicing pattern that includes an active $+\alpha,+\beta$ transcript and several inactive species including one major $-\beta$ transcript and two minor $-\alpha$ and $-\alpha,-\beta$ transcripts that were barely detectable by RT-PCR (Fig. 3, *a* and *b*) (23, 27). The results indicated that the majority of the clones (8 of 13) presented an overexpression of the active $+\alpha,+\beta$ transcript, as evidenced for JFD1, JFD2, JFD3, JFD5, JFD10, JFD12, and JFD18 in Fig. 3, *a* and *b*. Three independent RT-PCR quantitative experiments indicated that hTERT expression was increased by 2-fold or 6-fold in JFD10 and JFD18, respectively, whereas it remained unchanged in JFD9 and JFD11 (Fig. 3*c*). The two hTERT-overexpressing clones, JFD10 and JFD18, were further analyzed for transcriptional levels of hTR (telomerase RNA subunit), hPot1, TRF1, TRF2 (telomere-binding proteins), BLM, WRN (RecQ helicases), nucleolin (NCL), and hnRNPA1 (Figs. 4 and 5). No significant modification of the transcript levels was found for these genes in the resistant clones, as compared with the parental cells.

In order to determine whether the increased hTERT transcript levels resulted in an increase in telomerase activity, TRAP activity was measured on serial amounts of protein extracts prepared from A549 and JFD18 cells. In agreement with its ($+\alpha,+\beta$) hTERT mRNA increase, telomerase activity was found augmented in JFD18 and JFD10 cells as compared with parental cells (Fig. 6*a*). In contrast, JFD9 and JFD11 did not present variations of telomerase activity, as compared with A549 cells (results not shown). The *in vitro* inhibitory effect of **12459** was also measured by the TRAP-G4 assay (14) on extracts from A549 and JFD10-and JFD18-resistant cells. **12459** and telomestatin were found to inhibit TRAP-G4 with equal IC_{50} values for sensitive and resistant extracts (results not shown). These results excluded qualitative alterations of telomerase that could modify the sensitivity of the enzyme to the *in vitro* effect of these inhibitors.

Treatment of A549 cells with **12459** was previously shown to down-regulate telomerase activity (13). We have determined whether resistance phenotype is altering the effect of **12459** to down-regulate telomerase activity in JFD10 and JFD18 clones. As shown in Fig. 6*b*, telomerase activity measured by TRAP from A549-treated cells was strongly decreased. In contrast, telomerase activity measured by TRAP in JFD10 and JDF18 cells under **12459** treatment remained detectable with levels comparable with that from untreated resistant cells (Fig. 6, *b* and *c*), thus indicating that JFD10 and JFD18 are resistant to the **12459**-induced down-regulation of telomerase activity.

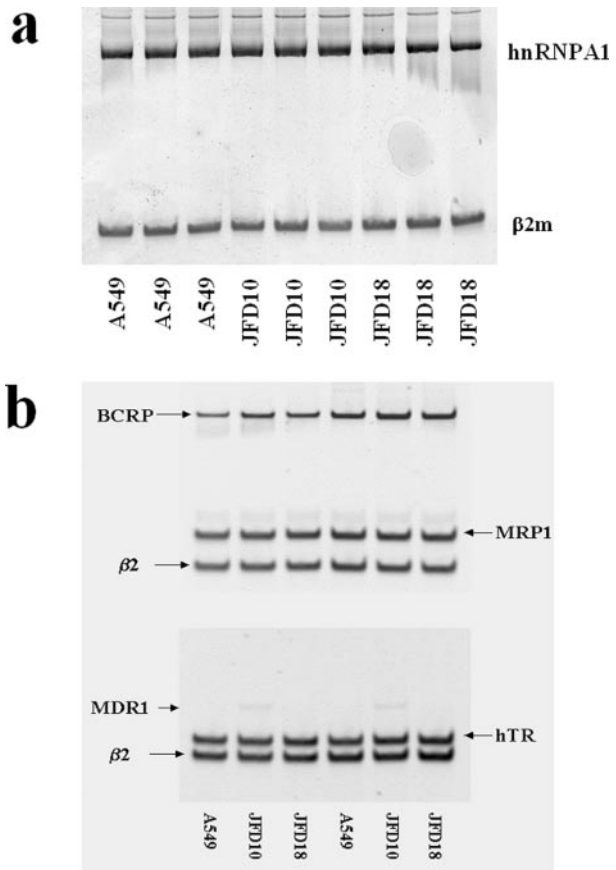


FIG. 5. **Expression of hnRNPA1, hTR, and multidrug resistance genes in resistant cells.** *a*, expression of hnRNPA1 gene transcript by RT-PCR in A549, JFD10, and JFD18, as indicated. *b*, expression of multidrug resistance-associated gene transcript and hTR in **12459**-resistant clones. RT-PCR of hTR, breast cancer resistance protein (*BCRP*), multidrug-related protein 1 (MRP1), multidrug resistance 1 (MDR1) in A549, JFD10, and JFD18 clones, as indicated. β_2-Microglobulin (*β2m*) transcript is used as a control for mRNA expression. *Triplicate* or *duplicate lanes* represented independent RT-PCR experiments from separate RNA extractions.

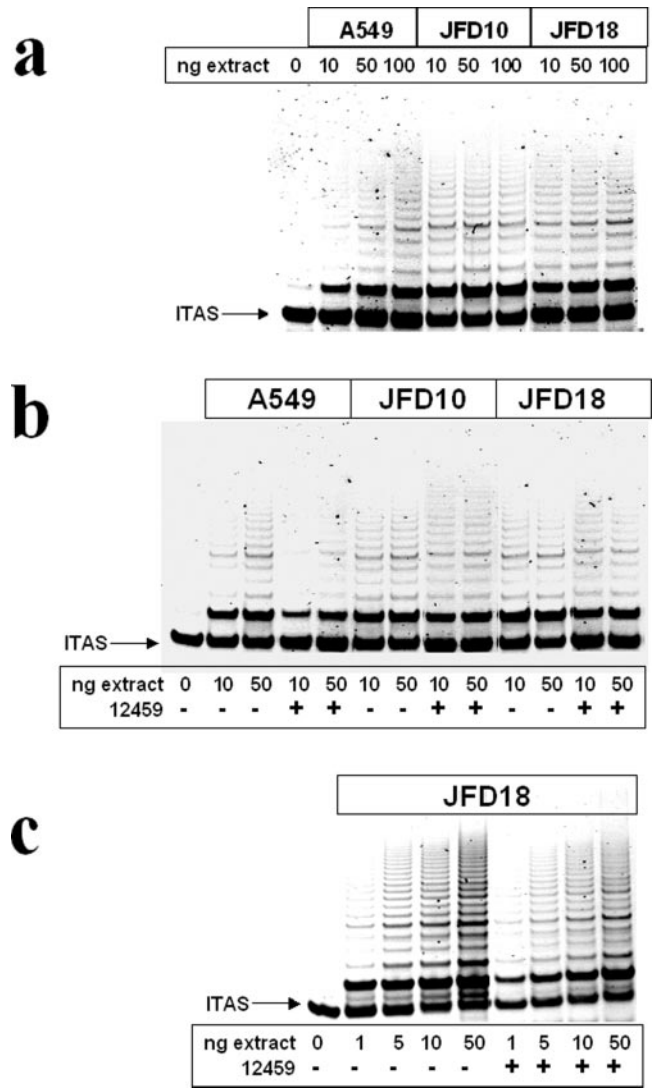


FIG. 6. **Telomerase activity in sensitive and resistant cells.** Telomerase activity was measured by the TRAP assay with CHAPS extracts from A549 and resistant clones JFD10 and JFD18 (as indicated). *a*, TRAP assay with extracts (10, 50, and 100 ng) from untreated cells. In resistant clones, TRAP activity is higher than in A549-sensitive cells. *b*, TRAP assay with extracts (10 and 50 ng) from A549 and resistant clones. As indicated, cells were treated with 10 μM **12459** for 48 h (+) or untreated (−) before the extract preparation. *c*, TRAP assay with extracts (1, 5, 10, and 50 ng) from the JFD18-resistant clone. As indicated, cells were treated with 10 μM **12459** for 48 h or untreated before the extract preparation. **12459** treatment induced a down-regulation of TRAP activity in A549 cells. In resistant clones, TRAP activity remained higher that in A549 under **12459** treatment. *ITAS*, internal telomerase assay standard.

An expected consequence for the clones that presented increased (+α,+β) hTERT transcript levels is a gain in telomere length. We analyzed the telomere length in JFD10 and JFD18 after 3 months in culture in the absence of **12459**. These two clones presented a mean length TRF of 8–9 kb, as compared with 6.5 kb measured in the parental A549 cells (Fig. 7*a*). Quantitative FISH analysis also indicated a 42% increase in the PNA probe hybridization intensity at telomeres for the JFD18 clone, as compared with A549 (Fig 7, *b* and *c*). Altogether, these data are consistent with an increase in telomerase activity in these clones due to hTERT overexpression. FISH analysis showed three copies of the chromosome 5, each bearing one copy of the hTERT gene in both A549 and JFD18 metaphases, suggesting that the hTERT overexpression did not result from locus amplification or chromosome duplication (Fig. 7*d*).

The presence of increased anaphase bridges has been associated with a disruption of the capping function of the telomere (28, 29). Also, another G-quadruplex ligand, TMPyP4, has been found to induce anaphase bridges in sea urchin oocytes (30). We have determined whether **12459** may induce the formation of anaphase bridges in A549 and resistant clones. We were not able to detect a significant presence of anaphase bridges (<5%) for concentrations of **12459** ranging from 0.1 to 10 μM after a 48-h treatment with the drug in both sensitive and resistant cells (not shown). In contrast, untreated JFD10- and JFD18-resistant cells presented a higher basal level of anaphase bridges (25–30%) as compared with the A549-sensitive cell line (less than 5%). Typical images of anaphase bridges obtained with A549, JFD10, and JFD18 cell lines are shown in Fig. 8*a*. In the JFD18 clone, FISH analyses also revealed occasional telophase bridges, in the middle of which telomere signals are detected (Fig. 8*b*). Interestingly, this high incidence of anaphase bridges has no apparent effect on the proliferation rate of the resistant cells, since their doubling time remained equivalent to that of A549 cells (20–21 h). We concluded that selection of resistance has altered telomere capping functions without perturbing cell division.

The JFD18 clone presented a 5-fold resistance to **12459** (Fig. 2*a*) and was further evaluated for its cross-resistance pattern to other G-quadruplex ligands or to other cytotoxic agents with

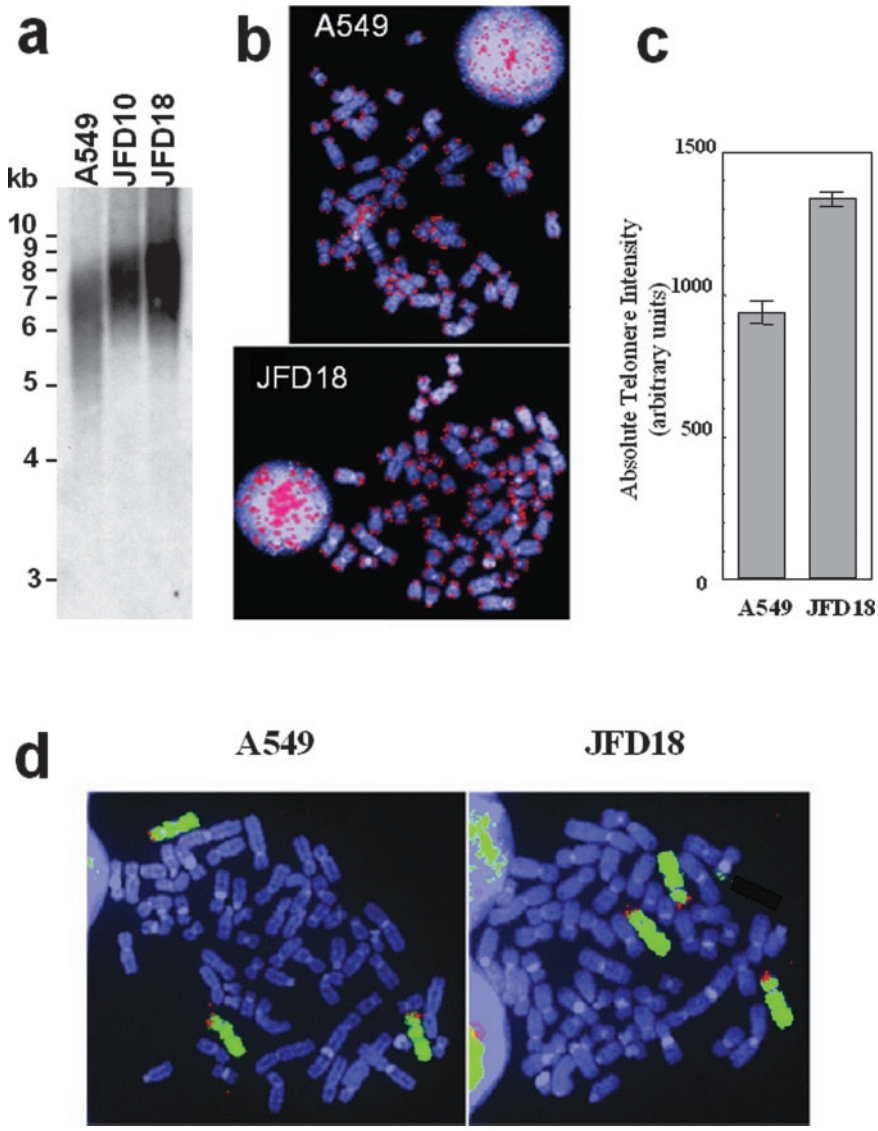


FIG. 7. **Increased telomere length and hTERT gene localization in JFD10- and JFD18-resistant clones.** *a*, TRF analysis of A549 and resistant clones (JFD10 and JFD18). Genomic DNA was digested with HinfI and RsaI, resolved on 0.8% agarose gel, transferred onto a nylon membrane, and then hybridized under standard conditions with a 0.7-kb telomere DNA probe (a gift from E. Gilson). Mean TRF increased from 6.5 kb (A549) to 8–9 kb (JFD clones). *b*, *pseudocolor images* of metaphase spreads from A549 and JFD18 cells hybridized to a PNA-telomere-specific probe (in *red*). Chromosomes are counterstained with DAPI. The corresponding unmodified (original) grayscale images were used to calculate the mean pixel value for all telomeres. *c*, mean of the telomere fluorescence intensity (24 metaphases, arbitrary units) for A549 and JFD18 cells. The difference between these cell lines is highly significant ($p < 1 \times 10^{-10}$). The *error bars* indicate the S.E. JFD18 presented a 42% increase in telomere fluorescence, as compared with A549. *d*, *pseudocolor* images of metaphase spreads from A549 (*left*) and JFD18 (*right*) cells cohybridized with a BAC carrying hTERT (revealed in *red*) and a chromosome 5 painting (revealed in *green*). Three copies of hTERT at their normal position (5p15.33) are detected in both cell lines. A marker chromosome carrying a small chromosome 5 fragment is detected in 100% of JFD18 metaphases, whereas it is only observed in 2–3% of metaphases from the parental A549 cells.

various mechanisms of action. As indicated in Fig. 9*a*, JFD18 has no cross-resistance to the topoisomerase inhibitors doxorubicin, etoposide, and camptothecin and to the G-quadruplex ligands telomestatin and BRACO19. In contrast, JFD18 displayed a partial cross-resistance to the DNA-interactive agent mitomycin C (3.7-fold) and to the tubulin poison vinblastin (2.1-fold) and was slightly cross-resistant to the triazine derivative **115405** (1.8-fold). These data indicated that JFD18 does not have the characteristics of a multidrug resistance phenotype. In agreement, no variation in multidrug-related protein 1 (*MRP1*) and breast cancer resistance protein (*BCRP*) transcripts was found in JFD18, and the multidrug resistance 1 (*MDR1*) transcript remained undetectable (Fig. 5*b*). Similar results were found for the JFD10 clone that displayed a 5-fold resistance to **12459** (Fig. 5*b*). It should be noticed that non-triazine G-quadruplex ligands displayed poor growth-inhibitory properties against A549 cells, as compared with triazine derivatives, with IC_{50} values equal to 9 and 3 μM for telomestatin and BRACO19, respectively. Furthermore, JFD18 cells did not present significant resistance against the effect of ionizing radiation, as compared with A549 (Fig. 9*b*).

Analysis of hTERT expression in the different **12459**-resistant clones suggested that two phenotypic classes of clones were observed. In the first, active hTERT transcript was up-regulated (*i.e.* JFD10 and JFD18), and in the second, active hTERT transcript was maintained at the same levels as compared with A549 (*i.e.* JFD9 and JFD11). These results raised the question of whether or not an increased telomerase activity is a key element in the resistance to short term treatment with **12459** in A549 cells. To address this possibility, we investigated the effect of **12459** in A549 cells transfected either with hTERT or with DN-hTERT cDNA and in JFD18 cells transfected with DN-hTERT cDNA. As expected, expression of hTERT in A549 cells considerably increased telomerase activity and telomere length, as compared with cells transfected with an empty vector (not shown). On the other hand, the expression of DN-hTERT abolished the telomerase activity in both A549 and JFD18 cells (not shown), as already described for this mutant (31, 32). After 80 days of culture, the DN-hTERT A549 and DN-hTERT JFD18 cells both showed a significant decrease in telomere length (Fig 10). This suggested that the overexpression of telomerase in JFD18 cells was necessary to maintain the telomere length and that telomere lengthening in JFD18 was not due to a telomerase-independent mechanism selected during resistance acquisition.

The short term antiproliferative activity of **12459** was determined in cells transfected with the different constructions in order to evaluate the effects of overexpression or inactivation of telomerase. Interestingly, hTERT A549 or DN-hTERT A549 cells did not present significant differences in their sensitivity

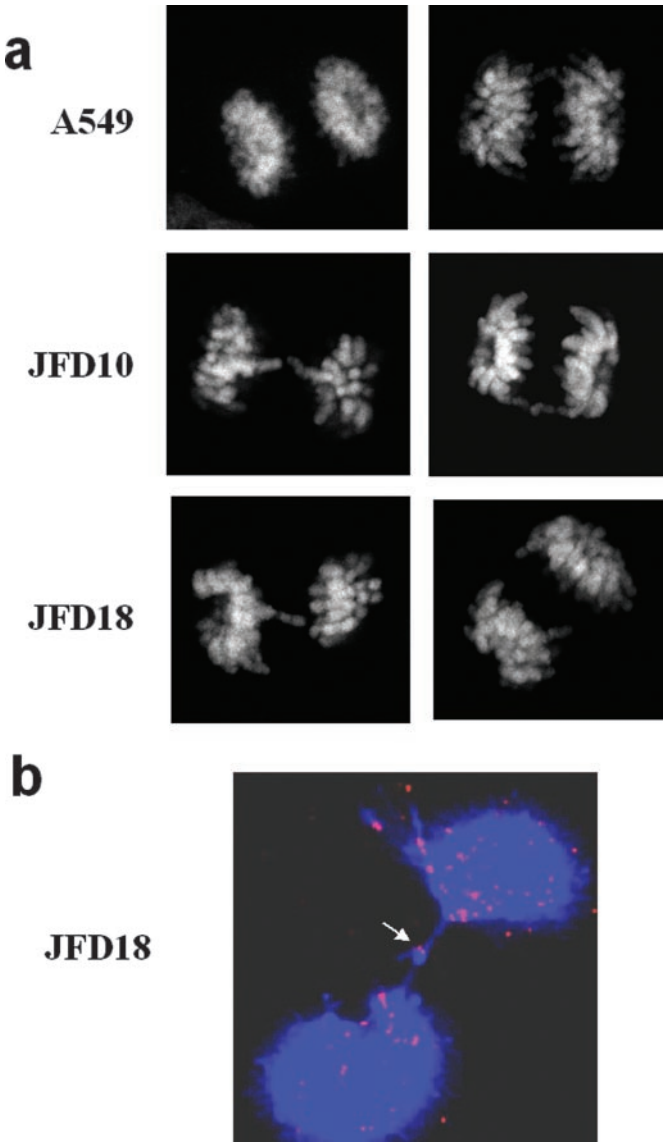


FIG. 8. **Anaphase bridges in 12459-resistant clones.** *a*, representative images of anaphase bridges in JFD10- and JFD18-resistant cells, as compared with A549 cells that do not present significant figures of bridges. Cells were stained with chromomycin A3, and images recorded by confocal microscopy. *b*, telophase of JFD18 cells. *Blue*, chromosome DNA stained with DAPI; *red dots*, TTAGGG repeats hybridized with a fluorescent Cy3-PNA probe. A DNA bridge is present with dots of TTAGGG fluorescence detectable in the center of the bridge (*arrow*).

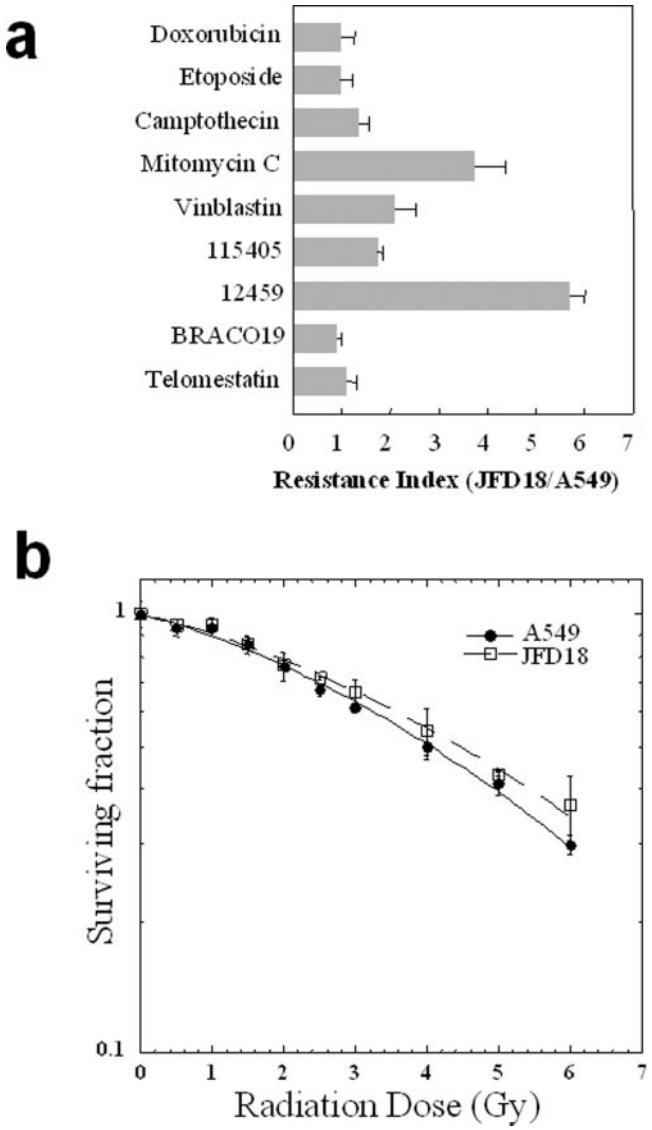


FIG. 9. **Cross-resistance pattern of JFD18 clone toward G-quadruplex ligands, antitumor drugs and ionizing radiations.** *a*, cross-resistance pattern of JFD18 clone. Resistance index represented for each compound the ratio of IC_{50} on JFD18/IC_{50} on A549 measured for 96-h drug exposure. Data represented the mean values ± S.D. of three independent determinations. *b*, radiation survival curves for A549 (●) and JFD18 (□) cells. The curves were drawn for best fit to a linear quadratic equation (see "Experimental Procedures"). Found: $\alpha = 0.100 \pm 0.012\ Gy^{-1}$, $\beta = 0.017 \pm 0.003\ Gy^{-2}$ for A549 cells; $\alpha = 0.092 \pm 0.010\ Gy^{-1}$, $\beta = 0.014 \pm 0.002\ Gy^{-2}$ for JFD18 cells. *Bars*, S.D.

to the antiproliferative activity of **12459**, as compared with HPV A549 cells transfected with the empty vector (not shown). These results suggested that variations of telomerase activity were not essential for the sensitivity of A549 cells to **12459**. On the other hand, DN-hTERT JFD18 cells displayed an increased sensitivity for the highest concentrations of **12459** assayed (10 and 30 μM), as compared with HPV JFD18 cells (Fig. 11*a*). This suggests that interfering with telomerase activity in these cells partially restores the sensitivity to **12459** for concentrations of compound equivalent to that used during the resistance selection procedure.

To confirm these results, we determined the effect of **12459** on the transfected cell line in a soft agar clonogenic survival assay. In the presence of 5 μM **12459**, we found identical clonogenic survivals for HPV A549, hTERT A549, and DN-hTERT A549 (Fig. 11*b*). On the other hand, the full resistance to the effect of **12459** for clonogenic survival of the HPV JFD18 cell line was found to be almost completely reversed in the DN-hTERT JFD18 cell line (Fig. 11*b*).

DISCUSSION

We have described in the present work the characterization of A549 clones selected for resistance to 10 μM **12459**. A characteristic of the majority of the clones is an overexpression of the hTERT transcript that varies from 2- to 6-fold. The increased hTERT transcript level is related to an increase in telomerase activity in two of the hTERT overexpressing clones, JFD10 and JFD18, and as a consequence these clones also present longer telomeres. JFD10 and JFD18 clones also showed increased incidence in anaphase bridge formation that suggested an alteration of the capping function of telomeres (28). The establishment of resistance to **12459** in A549 cells by using a different procedure (*i.e.* lower **12459** concentration and long term senescence as a selection criterion to obtain the

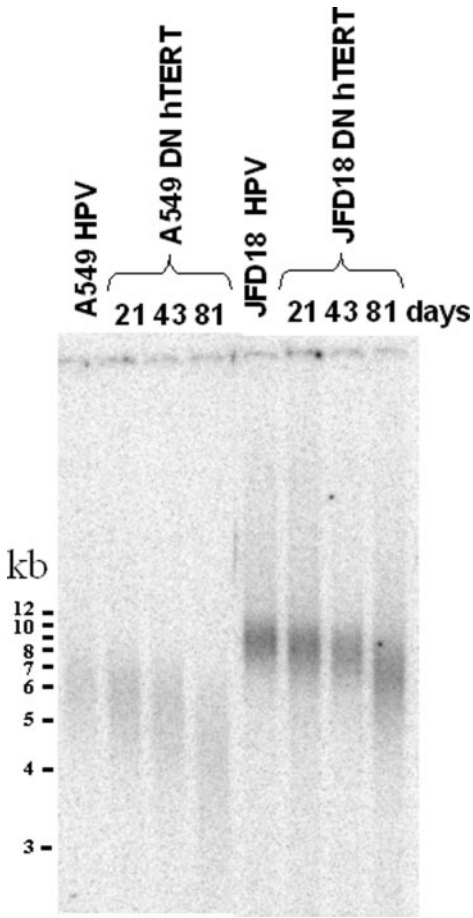


FIG. 10. **DN-hTERT-induced telomere shortening in A549 and JFD18 cells.** Shown is telomeric length restriction (TRF) analysis of A549 cells transfected with empty vector (A549 HPV or JFD18 HPV) or with DN-hTERT (A549 DN-hTERT or JFD18 DN-hTERT), as indicated. DNA samples were harvested at the indicated days for A549 or JFD18 DN-hTERT and at day 81 for A549 or JFD18 HPV. Molecular weight markers are indicated on the *left*.

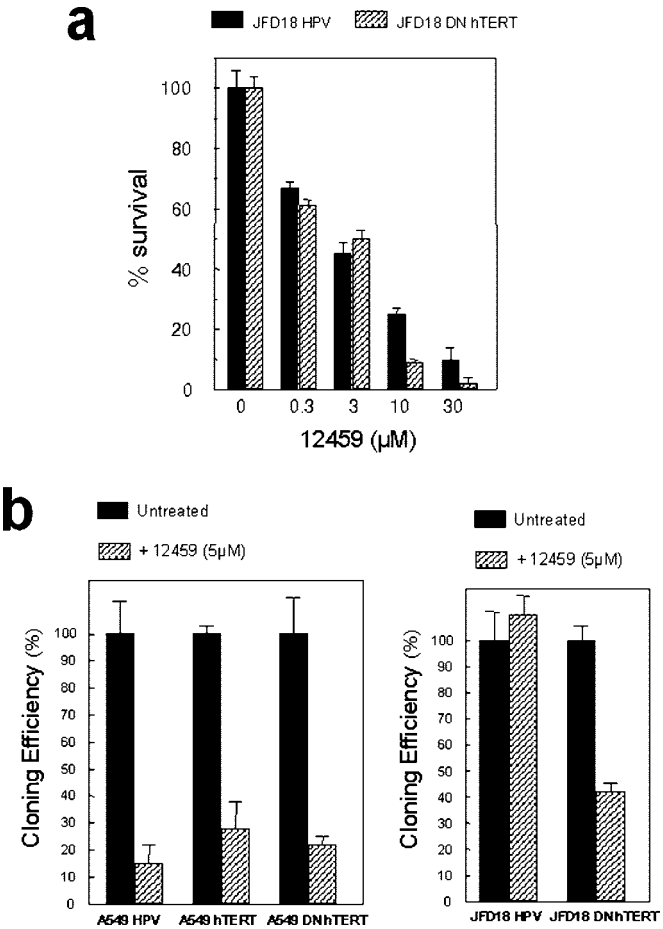


FIG. 11. **Antiproliferative effects of 12459 against hTERT- or DN-hTERT-transfected cells.** *a*, antiproliferative effect of **12459** (96-h exposure) against the JFD18-resistant clone transfected with DN-hTERT (JFD18 DN-hTERT) or with empty vector (JFD18 HPV). Results represent the mean ± S.D. of quadruplicate measurements. Significant differences were observed for 10 and 30 μM **12459**. *b*, effect of **12459** (5 μM) by soft agar clonogenic survival against A549 cells (*left panel*) transfected with empty vector (*HPV*), with hTERT, or with DN-hTERT and survival against JFD18 cells (*right panel*) transfected with empty vector (*HPV*) or with DN-hTERT. Clones were counted after 15 days, and results represent the mean ± S.D. of triplicate measurements.

JFA2-resistant cells) also led to a 2-fold increase in hTERT transcript levels, an increase in telomere lengths, and higher incidence of anaphase bridges (33). Therefore, up-regulation of telomerase expression and telomere capping modification represent frequent phenotypic alterations related to resistance to this G-quadruplex ligand.

On the other hand, telomerase overexpression in these resistant models may not necessary indicate that there is a direct link between levels of telomerase activity and the cellular effects of these ligands. Any pathway that may antagonize the drug effect in resistant cells is expected to restore normal telomerase activity. However, our results indicated that drug inactivation is not mediated by multidrug resistance genes and that JFD18 does not have the cross-resistance characteristics of a multidrug-resistant cell line.

A more direct argument indicating that modulation of telomerase activity is not a major determinant for the antiproliferative activity of **12459** was obtained by the transfection experiments with hTERT or DN-hTERT in A549 cells in which **12459** antiproliferative activity was not modified. This agrees with previous results showing that triazine derivatives were able to inhibit proliferation of telomerase-positive and -negative cell lines, including the GM847 ALT cell line (13). Similar findings were recently published for other G-quadruplex ligands, such as the porphyrin derivative TMPyP4 that was found to be active against telomerase-positive and -negative cell lines (11). In contrast, telomestatin was found to be active against telomerase-positive cells but inactive against ALT cells (11). This study also suggested a link between the selectivity of telomestatin for intramolecular G-quadruplex or TMPyP4 for intermolecular G-quadruplex and the ability of these compounds to mediate different biological effects against telomerase-positive or -negative (ALT) tumor cell lines (11). In contrast to these compounds, **12459** was not found to distinguish between intramolecular, dimer, and intermolecular forms of quadruplexes,[2] a result that may explain the biological differences between **12459**, telomestatin, and TMPyP4.

Although transfection of hTERT was not sufficient to confer resistance to **12459** in A549 cells, our results demonstrated that increased telomerase activity participated in the mechanism of resistance to **12459**. The expression of DN-hTERT in the JFD18-resistant clone reversed the resistance to concentrations of **12459** able to induce apoptosis in A549 cells.

It has been suggested that the induction of quadruplex formation in telomeric overhang repeats would inhibit telomerase activity and therefore telomere stabilization (34). End-capping of telomeres is controlled by telomerase itself (35, 36) and by TRF2, a double-stranded telomeric DNA-binding protein that participates in the formation of T-loop structures at telomeres

(37). Overexpression of TRF2 protects critically shortened telomeres from fusion and delays the onset of replicative senescence (38). The human protein hPot1 that specifically binds to the single-stranded 3′ overhang of telomere sequence plays a potential role in telomere protection. Deletion of the hPot1 homologue in yeast results both in the loss of telomeric DNA and in end-to-end fusions (39). Pot1 was recently shown to modulate telomere elongation by telomerase (40, 41) and may serve as a terminal transducer of TRF1, a negative regulator of telomerase activity (40). The human homologue of EST1 that recruits or activates telomerase at the 3′ end of telomeres, hEST1A, also affects telomere capping when overexpressed (28).

It is suspected that ligands that stabilize the folding of single-stranded telomeric DNA overhang into stable quadruplex structures might effectively compete with the end-capping functions of hPot1, TRF2, or telomerase itself, with dramatic and rapid consequences for cell viability (34). Our results indicated that telomerase is necessary for the maintenance of resistance in JFD18 cells, but it is not sufficient to induce resistance in sensitive cells. An attractive explanation for such a difference would be a modification of the telomere capping in resistant cells in which the need for telomerase capping functions became essential to maintain efficient telomere protection against the effect of **12459**. This change is reflected by the increased rate of anaphase bridge formation in the resistant clones. It is also possible that telomerase activity is indirectly modulated by the alteration of another factor essential for telomere end-capping.

Recent reports have also shown that telomerase overexpression can suppress DNA damage and/or damage-related signals that trigger cell death (42–44). This may represent an alternative explanation for the resistance to apoptotic concentrations of **12459**. However, the cross-resistance profile of the JFD18 clone discriminated between a DNA-damaging agent such as mitomycin C, found to be cross-resistant, and between DNA topoisomerase inhibitors or ionizing radiations that were not. In the JFD9 clone that does not overexpress telomerase, mitomycin C was found to be 2.7-fold cross-resistant, suggesting rather a telomerase-independent cross-resistance pathway for JFD18 and JFD9 for this DNA-damaging agent. A detailed analysis of the apoptotic pathways for these clones would give interesting clues on these points.

In conclusion, our work presents evidence that the level of telomerase activity is not directly linked to the antiproliferative activity of **12459** but that resistance to this G-quadruplex ligand is frequently associated with both up-regulation of telomerase activity and alteration of telomere capping functions that may participate directly or indirectly in the mechanism of resistance in some clones.

Acknowledgments—We thank H. Der Sarkissian for help in hTERT localization, A. Bennaceur-Griscelli and F. Delhommeau for experiments with hTERT lentivirus, and H. Bobichon for confocal microscope facilities.

REFERENCES

1. McEachern, M. J., Krauskopf, A., and Blackburn, E. H. (2000) *Annu. Rev. Genet.* **34,** 331–358
2. Masutomi, K., Yu, E. Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J., Metz, G. B., Brooks, M. W., Kaneto, S., Murakami, S., DeCaprio, J. A., Weinberg, R. A., Stewart, S. A., and Hahn, W. C. (2003) *Cell* **114,** 241–253
3. Sharma, S., Raymond, E., Soda, H., Sun, D., Hilsenbeck, S. G., Sharma, A., Izbicka, E., Windle, B., and Von Hoff, D. D. (1997) *Ann. Oncol.* **8,** 1063–1074
4. Damm, K., Hemmann, U., Garin-Chesa, P., Hauel, N., Kauffmann, I., Priepke, H., Niestroj, C., Daiber, C., Enenkel, B., Guilliard, B., Lauritsch, I., Muller, E., Pascolo, E., Sauter, G., Pantic, M., Martens, U. M., Wenz, C., Lingner, J., Kraut, N., Rettig, W. J., and Schnapp, A. (2001) *EMBO J.* **20,** 6958–6968
5. Parkinson, G. N., Lee, M. P., and Neidle, S. (2002) *Nature* **417,** 876–880
6. Mergny, J. L., Riou, J. F., Mailliet, P., Teulade-Fichou, M. P., and Gilson, E. (2002) *Nucleic Acids Res.* **30,** 839–865
7. Neidle, S., and Parkinson, G. (2002) *Nat. Rev. Drug Discov.* **1,** 383–393
8. Rezler, E. M., Bearss, D. J., and Hurley, L. H. (2002) *Curr. Opin. Pharmacol.* **2,** 415–423
9. Schaffitzel, C., Berger, I., Postberg, J., Hanes, J., Lipps, H. J., and Pluckthun, A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 8572–8577
10. Phan, A. T., and Mergny, J. L. (2002) *Nucleic Acids Res.* **30,** 4618–4625
11. Kim, M. Y., Gleason-Guzman, M., Izbicka, E., Nishioka, D., and Hurley, L. H. (2003) *Cancer Res.* **63,** 3247–3256
12. Siddiqui-Jain, A., Grand, C. L., Bearss, D. J., and Hurley, L. H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 11593–11598
13. Riou, J. F., Guittat, L., Mailliet, P., Laoui, A., Renou, E., Petitgenet, O., Megnin-Chanet, F., Hélène, C., and Mergny, J. L. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 2672–2677
14. Gomez, D., Mergny, J. L., and Riou, J. F. (2002) *Cancer Res.* **62,** 3365–3368
15. Zhang, X., Mar, V., Zhou, W., Harrington, L., and Robinson, M. O. (1999) *Genes Dev.* **13,** 2388–2399
16. Guiducci, C., Cerone, M. A., and Bacchetti, S. (2001) *Oncogene* **20,** 714–725
17. Kim, M. M., Rivera, M. A., Botchkina, I. L., Shalaby, R., Thor, A. D., and Blackburn, E. H. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 7982–7987
18. Shin-ya, K., Wierzba, K., Matsuo, K., Ohtani, T., Yamada, Y., Furihata, K., Hayakawa, Y., and Seto, H. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123,** 1262–1263
19. Gowan, S. M., Harrison, J. R., Patterson, L., Valenti, M., Read, M. A., Neidle, S., and Kelland, L. R. (2002) *Mol. Pharmacol.* **61,** 1154–1162
20. Fu, W., Begley, J. G., Killen, M. W., and Mattson, M. P. (1999) *J. Biol. Chem.* **274,** 7264–7271
21. Krupp, G., Kuhne, K., Tamm, S., Klapper, W., Heidorn, K., Rott, A., and Parwaresch, R. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25,** 919–921
22. Riou, J. F., Naudin, A., and Lavelle, F. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187,** 164–170
23. Yi, X., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29,** 4818–4825
24. Zijlmans, J. M., Martens, U. M., Poon, S. S., Raap, A. K., Tanke, H. J., Ward, R. K., and Lansdorp, P. M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94,** 7423–7428
25. Leem, S. H., Londono-Vallejo, J. A., Kim, J. H., Bui, H., Tubacher, E., Solomon, G., Park, J. E., Horikawa, I., Kouprina, N., Barrett, J. C., and Larionov, V. (2002) *Oncogene* **21,** 769–777
26. Gupta, R. S., Gupta, R., Eng, B., Lock, R. B., Ross, W. E., Hertzberg, R. P., Caranfa, M. J., and Johnson, R. K. (1988) *Cancer Res.* **48,** 6404–6410
27. Wick, M., Zubov, D., and Hagen, G. (1999) *Gene* (*Amst.*) **232,** 97–106
28. Reichenbach, P., Hoss, M., Azzalin, C. M., Nabholz, M., Bucher, P., and Lingner, J. (2003) *Curr. Biol.* **13,** 568–574
29. van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998) *Cell* **92,** 401–413
30. Izbicka, E., Nishioka, D., Marcell, V., Raymond, E., Davidson, K. K., Lawrence, R. A., Wheelhouse, R. T., Hurley, L. H., Wu, R. S., and Von Hoff, D. D. (1999) *Anticancer Drug Des.* **14,** 355–365
31. Delhommeau, F., Thierry, A., Feneux, D., Lauret, E., Leclercq, E., Courtier, M. H., Sainteny, F., Vainchenker, W., and Bennaceur-Griscelli, A. (2002) *Oncogene* **21,** 8262–8271
32. Hahn, W. C., Stewart, S. A., Brooks, M. W., York, S. G., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R. L., Knoll, J. H., Meyerson, M., and Weinberg, R. A. (1999) *Nat. Med.* **5,** 1164–1170
33. Gomez, D., Aouali, N., Renaud, A., Douarre, C., Shin-ya, K., Tazi, J., Martinez, S., Trentesaux, C., Morjani, H., and Riou, J. F. (2003) *Cancer Res.* **63,** 6149–6153
34. Neidle, S., and Parkinson, G. N. (2003) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13,** 275–283
35. Blackburn, E. (1999) *Mt. Sinai J. Med.* **66,** 292–300
36. Ouellette, M. M., Liao, M., Herbert, B. S., Johnson, M., Holt, S. E., Liss, H. S., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275,** 10072–10076
37. Stansel, R. M., de Lange, T., and Griffith, J. D. (2001) *EMBO J.* **20,** 5532–5540
38. Karlseder, J., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002) *Science* **295,** 2446–2449
39. Baumann, P., and Cech, T. R. (2001) *Science* **292,** 1171–1175
40. Loayza, D., and De Lange, T. (2003) *Nature* **423,** 1013–1018
41. Colgin, L. M., Baran, K., Baumann, P., Cech, T. R., and Reddel, R. R. (2003) *Curr. Biol.* **13,** 942–946
42. Oh, H., Taffet, G. E., Youker, K. A., Entman, M. L., Overbeek, P. A., Michael, L. H., and Schneider, M. D. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98,** 10308–10313
43. Akiyama, M., Yamada, O., Kanda, N., Akita, S., Kawano, T., Ohno, T., Mizoguchi, H., Eto, Y., Anderson, K. C., and Yamada, H. (2002) *Cancer Lett.* **178,** 187–197
44. Holt, S. E., Glinsky, V. V., Ivanova, A. B., and Glinsky, G. V. (1999) *Mol. Carcinog.* **25,** 241–248
45. Mailliet, P., Riou, J. F., Mergny, J. L., Laoui, A., Lavelle, F., and Petitgenet, O. (2001) Patent WO 0140218

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Vol. 279, No. 40, Issue of October 1, pp. 41487–41494, 2004
Printed in U.S.A.
© 2004 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Interaction of Telomestatin with the Telomeric Single-strand Overhang*

Received for publication, June 2, 2004, and in revised form, July 21, 2004
Published, JBC Papers in Press, July 23, 2004, DOI 10.1074/jbc.M406123200

Dennis Gomez‡, Rajaa Paterski‡, Thibault Lemarteleur‡, Kazuo Shin-ya§, Jean-Louis Mergny¶, and Jean-François Riou‡‖

From the ‡Laboratoire d'Onco-Pharmacologie, JE 2428, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France, the §Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan, and the ¶Laboratoire de Biophysique, Muséum National d'Histoire Naturelle USM 503, INSERM Unité 565, CNRS UMR 5153, 43 rue Cuvier, 75005 Paris, France

The extremities of chromosomes end in a G-rich single-stranded overhang that has been implicated in the onset of the replicative senescence. The repeated sequence forming a G-overhang is able to adopt a peculiar four-stranded DNA structure *in vitro* called a G-quadruplex, which is a poor substrate for telomerase. Small molecule ligands that selectively stabilize the telomeric G-quadruplex induce telomere shortening and a delayed growth arrest. Here we show that the G-quadruplex ligand telomestatin has a dramatic effect on the conformation of intracellular G-overhangs. Competition experiments indicate that telomestatin strongly binds *in vitro* and *in vivo* to the telomeric overhang and impairs its single-stranded conformation. Long-term treatment of cells with telomestatin greatly reduces the G-overhang size, as evidenced by specific hybridization or telomeric oligonucleotide ligation assay experiments, with a concomitant delayed loss of cell viability. *In vivo* protection experiments using dimethyl sulfate also indicate that telomestatin treatment alters the dimethyl sulfate effect on G-overhangs, a result compatible with the formation of a local quadruplex structure at telomeric overhang. Altogether these experiments strongly support the hypothesis that the telomeric G-overhang is an intracellular target for the action of telomestatin.

Telomeres are essential DNA-protein structures that cap and protect the end of the eukaryotic chromosome from illegitimate recombination, degradation, and detection as DNA damage (1). Telomeres are also of particular interest because of their role in maintaining indefinite proliferation of cells (2, 3). In humans, the telomere is composed of tandem repeats of the G-rich duplex sequence 5′-TTAGGG-3′, with a G-rich 3′ strand extending beyond its complement to form an overhang (G-overhang) averaging 130–210 bases in length (4, 5). G-overhangs are present on all chromosomal ends and are formed during S-phase through a complex mechanism that involves cleavage of the C-strand and is independent of telomerase activity (5–8). G-overhangs may be involved in different DNA conformations such as T-loops or G-quadruplexes. T-loops are created through the strand invasion of the 3′ telomeric overhang into the duplex part of the telomere and are thought to represent a strategy to protect chromosome ends from fusion by an overhang sequestration mechanism (9, 10). Because of the repetition of guanines, the G-overhang is prone to quadruplex formation in which 4 blocks of repeated guanines are engaged into 3 adjacent quartets; each quartet involves 4 guanines stabilized by Hoogsteen bonds (11–13). The G-overhang can fold into at least two different intramolecular quadruplexes that differ in the position of the adjacent loop regions (14, 15). Optimal telomerase activity requires the non-folded single-stranded telomere overhang and G-quadruplex formation has been shown to inhibit telomerase elongation *in vitro* (16). Hence, stabilization of telomeric G-quadruplexes by small molecule ligands has emerged as an original strategy to achieve anti-tumor therapy (12, 13, 17). Several classes of ligands are potent inhibitors of telomerase and display strong affinities for G-quadruplex structures (11). Small molecule ligands that selectively stabilize the telomeric G-quadruplex induce telomere shortening and replicative senescence (18–21). Among those, the natural product telomestatin (22) (chemical formula shown in Fig. 1) appears very promising because of its high selectivity toward quadruplexes as compared with all other nucleic acid conformations (23).[1] Telomestatin induces delayed growth arrest and/or apoptosis in different tumor cell types and displays an interesting selectivity toward cancer cells as compared with normal progenitors (19, 24–27). Telomere shortening is also observed in cells treated with telomestatin but arises earlier than expected for a single mechanism involving telomerase inhibition (19, 26). Furthermore, the extent of telomere degradation is limited to a few kilobases and is often undetectable in cell lines bearing short telomeres. Recent results indicate that G4 ligands from the triazine series induce short-term apoptotic effects independently of the presence of telomerase activity and that resistance to these agents is associated with telomere capping alterations (28). We have examined here the effect of telomestatin on the conformation and the length of the telomeric G-overhang.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Oligonucleotides, Compounds, and Cells—All oligonucleotides were synthesized and purified by Eurogentec (Seraing, Belgium). Telomestatin was prepared at 5 mM in methanol, Me_2SO (50:50). Additional dilutions were made in water. A549 human lung carcinoma was from the American Type Culture Collection. These cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium with glutamax (Invitrogen), supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics.

* This work was supported by Association pour la Recherche contre le Cancer Grants 4321 and 3365 (to J.-L. M.) and 4691 (to J.-F. R.) and an Action Concertée Incitative "Médicament et Cibles thérapeutiques" from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (to J.-L. M. and J.-F. R.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‖ To whom correspondence should be addressed: JE 2428 Onco-Pharmacologie, UFR de Pharmacie, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France. E-mail: jf.riou@univ-reims.fr.

[1] L. Guittat, personal communication.

Long-term Growth Assay—A549 cells were seeded at 7.5×10^4 cells/25-cm^2 flask in the presence of different concentrations of telomestatin. Cells were passaged every 4 days; viable cells were counted with a hemacytometer, and reseeded at the original density. Results represented the cell survival (in %), as compared with untreated cells at each passage.

Solution Hybridization Experiments—The non-denaturing hybridization assay to detect 3′ telomere G-overhang was performed with a modification of the procedure described previously (26, 29). Aliquots of 2.5 μg of undigested genomic DNA were hybridized at 50 °C overnight with 0.5 pmol of [γ-^{32}P]ATP-labeled 21C oligonucleotide (5′-CCCTAACCCTAACCCTAACCC-3′) in sodium/magnesium hybridization buffer containing 20 mM Tris, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$ in a volume of 20 μl. In some experiments $MgCl_2$ was omitted (sodium buffer) and NaCl was replaced by KCl (potassium buffer) or LiCl (lithium buffer), as indicated. For competition with pu22myc (5′-GAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAG-3′) the reactions were performed in sodium buffer without $MgCl_2$. To detect the telomere C-overhang, genomic DNA was hybridized overnight in sodium buffer without $MgCl_2$ with 0.5 pmol of [γ-^{32}P]ATP-labeled 20G oligonucleotide (5′-GGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3′). Reactions were stopped by the addition of 6 μl of loading buffer (20% glycerol, 1 mM EDTA, and 0.2% bromphenol blue) and samples were size fractionated on 0.8% agarose gels in 1× TBE buffer containing ethidium bromide (EtBr). Gels were dried on Whatman filter paper. EtBr fluorescence and radioactivity were scanned with a phosphorimager (Typhoon 9210, Amersham Biosciences). Results were expressed as the relative hybridization signal normalized to the fluorescent signal of EtBr.

Dimethyl Sulfate Treatment—After 24 to 48 h of treatment with telomestatin (1 to 5 μM), cells were washed with fresh medium and were treated with 0.05% DMS[2] for 5 to 10 min at 4 °C as described (30). The reaction was stopped by adding 1 M β-mercaptoethanol and DNA was purified as usual.

T-OLA Analysis—T-OLA was performed as described before (29). 5 μg of DNA were added to a 20-μl reaction mixture containing 0.5 pmol of ^{32}P-end-labeled $(CCCTAA)_4$ oligonucleotide for 12 h at 50 °C, followed

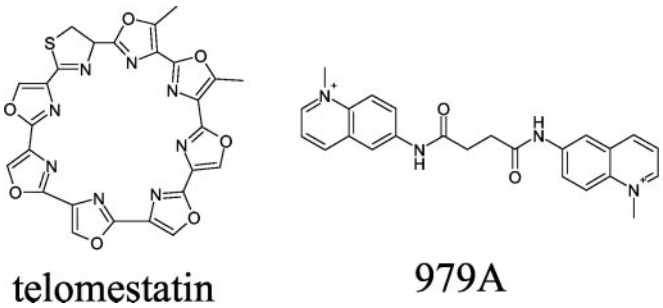


FIG. 1. **Chemical formula of telomestatin and 979A.**

[2] The abbreviations used are: DMS, dimethyl sulfate; T-OLA, telomeric oligonucleotide ligation assay; TRF_2, telomeric repeat factor 2.

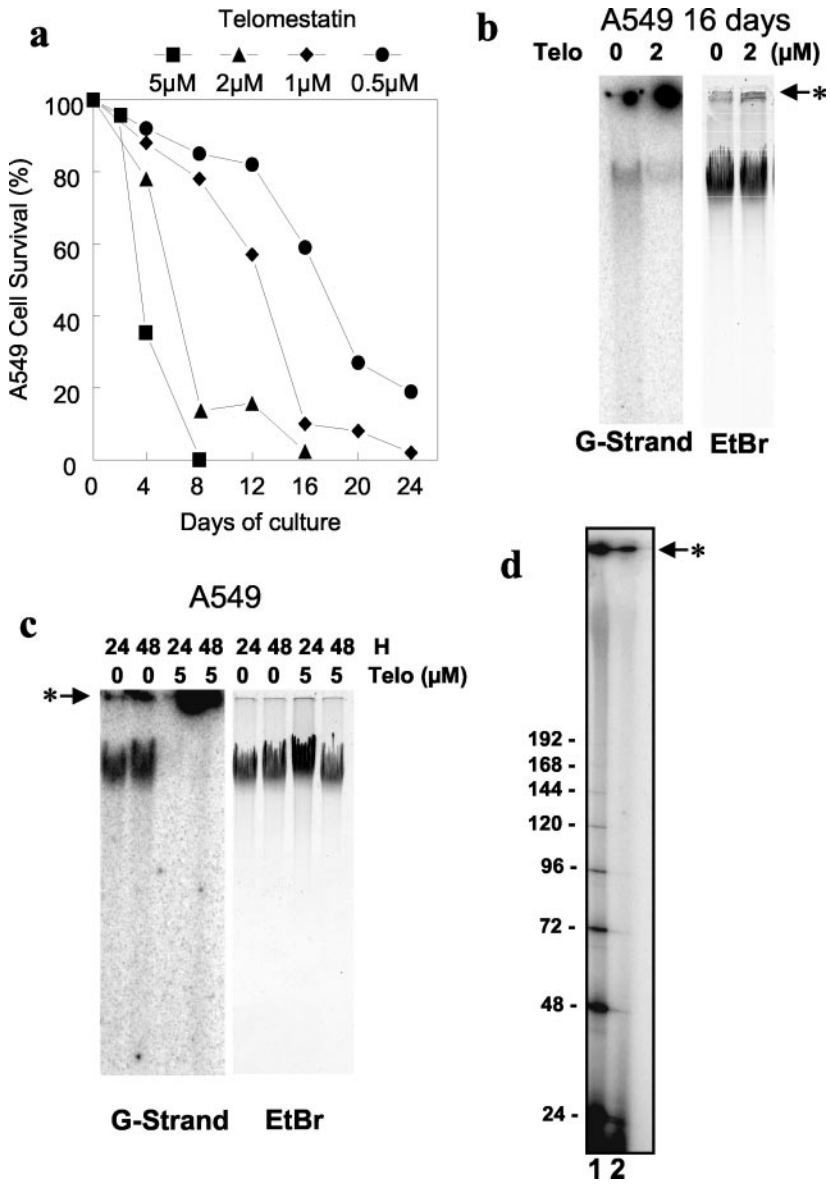


FIG. 2. **Measurement of the telomeric overhang in telomestatin-treated A549 cells.** *a*, effect of telomestatin on the growth of human A549 lung carcinoma cells. Cells were exposed to the indicated concentrations of telomestatin and cell survival was measured 4 days after seeding (except for 5 μM telomestatin). The surviving fraction was reseeded every 4 days until the culture reached a senescence-like growth arrest. *b* and *c*, non-denaturing solution hybridization analysis of the 3′ telomeric overhang in A549 cells. *a*, induced to delayed growth arrest by 16 days of treatment with telomestatin (2 μM) or untreated cells (0). *b*, treated for 24 and 48 h with telomestatin (5 μM) or untreated cells (0), as indicated. *G-strand*, hybridization signal of the gel with 21C probe. *EtBr*, ethidium bromide staining of the gel. The *asterisks* indicate the position of the loading well at the top of the gel. *d*, T-OLA analysis of the telomeric overhang from A549 control cells (*lane 1*) and cells treated with 5 μM telomestatin for 48 h (*lane 2*). The reaction produced DNA fragments with sizes increasing by units of 24 nucleotides as indicated. The *asterisk* indicates the position of the loading well at the top of the gel.

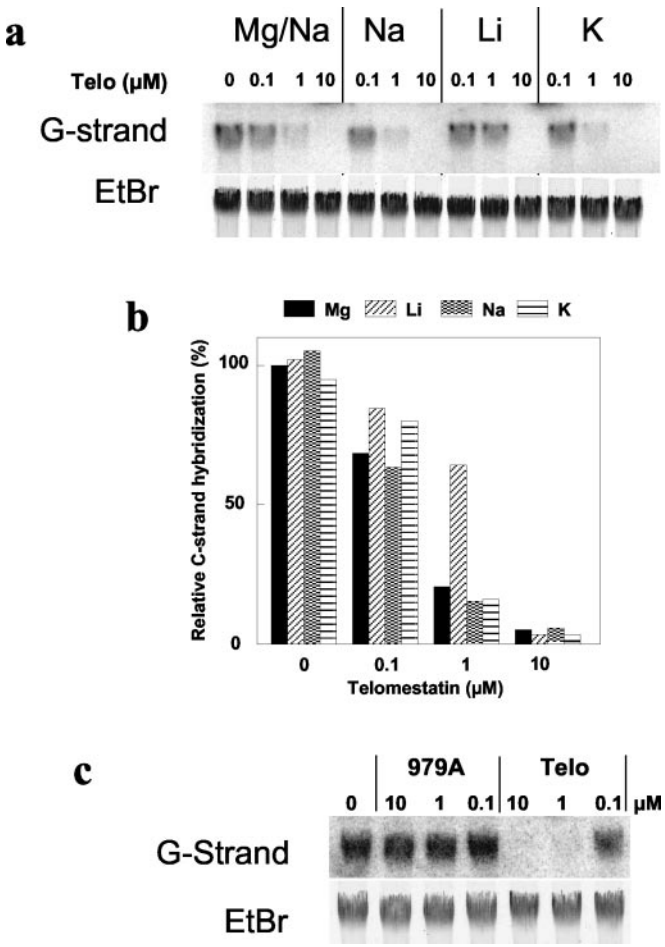


FIG. 3. **Telomestatin inhibited hybridization at telomeric G-overhang.** *a*, non-denaturing solution hybridization analysis of the telomeric G-overhang from purified A549 genomic DNA treated with different concentrations of telomestatin (0.1, 1, and 10 μM) in different salt conditions: magnesium/sodium, sodium, lithium, or potassium as described under "Experimental Procedures." *b*, quantification of the telomestatin effect. G-overhang hybridization signal is normalized relative to the EtBr signal. The results are expressed relative to untreated A549 DNA in magnesium/sodium buffer (defined as 100%). *c*, non-denaturing solution hybridization analysis of the telomeric G-overhang from purified A549 genomic DNA treated with different concentrations of telomestatin (0.1, 1, and 10 μM) or 979A (0.1, 1, 10 μM) in sodium buffer. *G-strand*, hybridization signal of the gel with 21C probe. *EtBr*, ethidium bromide staining of the gel.

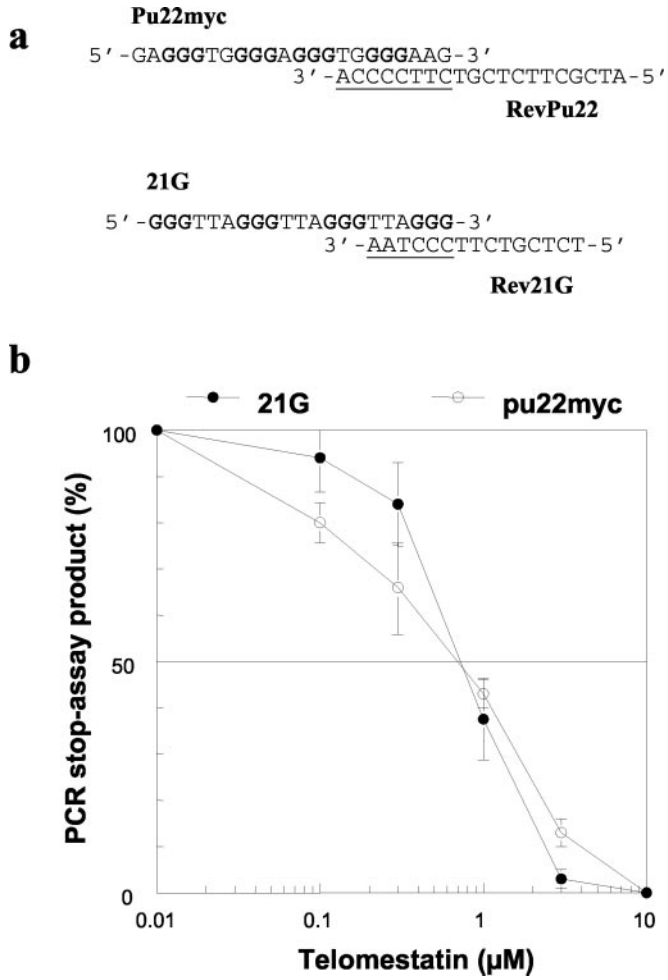


FIG. 4. **Effect of telomestatin on c-*myc* and telomeric oligomers forming G-quadruplexes determined by using the PCR-stop assay.** *a*, sequences of the oligomers used. *b*, increasing concentrations of telomestatin (0.1–30 μM) were added to G-quadruplex forming oligomers and their reverse counterpart, as described under "Experimental Procedures." Double-stranded PCR products were quantified by fluorescence with a Typhoon PhosphorImager. Each point corresponded to the mean ± S.D. of independent triplicate determinations relative to control untreated sample defined as 100%. 21G, *closed circle*; pu22myc, *open circle*.

by ligation with 20 units of Taq ligase at 50 °C for a further 5 h. Reaction products were precipitated, dried, and resuspended in a formamide-based loading buffer and electrophoresed onto 6% acrylamide, 6 M urea gels. Gels were dried and radioactivity was detected with a PhosphorImager.

Fluorescence Experiments—The melting behavior of a fluorescent nucleotide F21G (5′-FAM-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-DabCyl-3′) was studied alone, and in the presence of 20 μg of genomic DNA and/or 5 μM telomestatin. Assays were performed in a buffer containing 0.5 μM F21G, 10 mM cacodylate, pH 8.0, 0.1 M LiCl, and 5 mM KCl. Excitation wavelength was 470 ± 20 nm and emission of fluorescein was recorded at 530 ± 20 nm using the Roche LightCycler real-time PCR apparatus as described (31).

PCR Stop Assay—The stabilization of G-quadruplex structures by telomestatin was investigated by a PCR-stop assay (32) using a test oligonucleotide and a complementary oligonucleotide that partially hybridizes to the last G-repeat of the test oligonucleotide. Sequences of the test oligonucleotides (Pu22myc and 21G) and the corresponding complementary sequence (RevPu22 and Rev21G) used here are presented in Fig. 4*a*.

Assay reactions were performed in a final volume of 25 μl, in a 10 mM Tris, pH 8.3, buffer with 50 mM KCl, 1.5 mM $Mg(OAc)_2$, 7.5 pmol of each oligonucleotide, 1.5 units of Taq polymerase, and the indicated amount of the ligand. Reaction mixtures were incubated in a thermocycler with the following cycling conditions: 94 °C for 2 min, followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s. Amplified products were resolved on 12% non-denaturing polyacrylamide gels in 1× TBE and stained with SYBR Green I (Roche). Fluorescence was scanned with a phosphorimager (Typhoon 9210, Amersham). Results represent the mean ± S.D. of three independent experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

G-overhang Signal Is Strongly Decreased in the Presence of Telomestatin—Because senescence might also result from telomere uncapping and the status of the 3′ overhang (33–35), we have examined the effects of the treatment with G-quadruplex ligands on the telomeric G-overhang by using a non-denaturing solution hybridization technique with a complementary oligonucleotide (21C) and native agarose gel electrophoresis without any digestion by restriction enzymes (see "Experimental Procedures" for details). The localization of the signal relative to undigested DNA and sensitivity to exonucleases (Ref. 29 and data not shown) supported evidence for the specificity of this assay to G-rich telomeric single-stranded DNA. Continuous treatment of A549 human lung carcinoma cells with 1 or 2 μM telomestatin induced a delayed growth arrest starting at days 16 and 8, respectively, that led to a senescent-like culture in

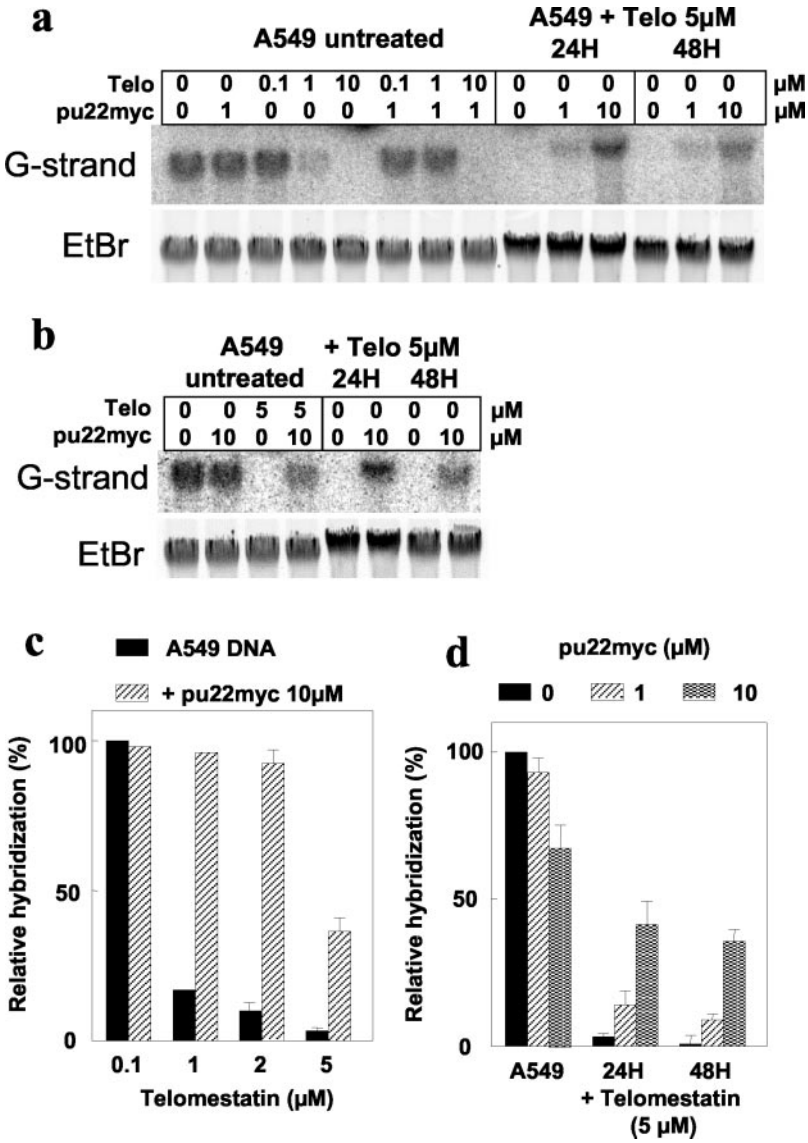


FIG. 5. **Pu22myc quadruplex competes with the effect of telomestatin at the telomeric overhang.** *a* and *b*, non-denaturing solution hybridization analysis of the telomeric G-overhang from A549 cells untreated or treated with 5 μM telomestatin for 24 and 48 h in sodium buffer. *a*, DNA from untreated cells (A549 untreated) was incubated with different concentrations of telomestatin (0.1, 1, and 10 μM) with or without the pu22myc quadruplex competitor (1 μM), as indicated. DNA from telomestatin-treated cells (A549 + Telo 5 μM) was incubated with or without pu22myc quadruplex competitor (1 or 10 μM), as indicated. *b*, DNA from untreated cells (A549 untreated) was incubated with 5 μM telomestatin with or without 10 μM pu22myc quadruplex competitor, as indicated. DNA from telomestatin-treated cells (*A549 + Telo* 5 μM) was incubated with or without pu22myc quadruplex competitor (10 μM), as indicated. *c*, quantification of the competition with 10 μM pu22myc for *in vitro* treatment with telomestatin (0.1, 1, 2, and 5 μM). *d*, quantification of the competition with pu22myc for 24- or 48-h treatments of A549 cells with telomestatin (5 μM). G-strand overhang signal was normalized relative to the EtBr signal and results expressed as the relative hybridization of the 21C probe from untreated A549 DNA defined as 100%.

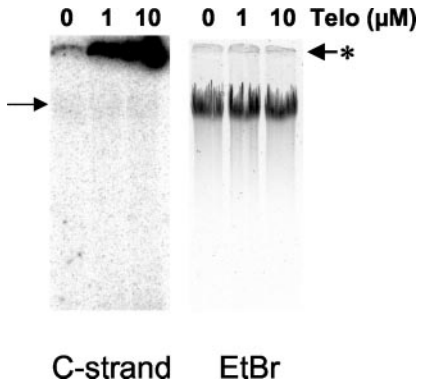


FIG. 6. **Telomestatin does not inhibit hybridization at the telomeric C-rich overhang.** Non-denaturing solution hybridization analysis of the telomeric C-overhang from purified A549 genomic DNA treated with different concentrations of telomestatin (1 and 10 μM) in sodium buffer. *C-strand*, hybridization signal of the gel with 20G probe is indicated by an *arrow*. *EtBr*, ethidium bromide staining of the gel. The *asterisk* indicates the position of the loading well at the *top* of the gel.

which both apoptotic and SA-β-galactosidase expressing cells were detected (Ref. 26 and data not shown, see also Fig. 2*a*). In the presence of 5 μM telomestatin, growth arrest was observed after only 4 days of exposure (Fig. 2*a*, *squares*). DNA extracted from the A549 human lung carcinoma cell line growth arrested by 2 μM telomestatin presented a significant decrease in the G-overhang signal, as compared with untreated cells (Fig. 2*b*). Treatment with 1 and 5 μM telomestatin for a shorter period (24 or 48 h), a time when the ligand has no or reduced impact on cell culture growth (Fig. 2*a*), also provoked a dramatic decrease in the G-overhang signal with an effect detectable within 24 h (>95% at 5 μM, 70% at 1 μM) (Figs. 2*c* and 9*b*).

To confirm these findings, we also used the T-OLA assay (29), which measures the G-overhang length (Fig. 2*d*). Again, telomestatin-treated A549 cells presented a marked shortening of the telomeric G-overhang to 24 nucleotides, as compared with 192 nucleotides in control untreated cells.

Both methods indicate that telomestatin is able to induce a rapid and dramatic alteration of the telomeric G-overhang. Surprisingly, the G-overhang loss was found earlier than expected and might represent a rapid degradation process triggered by telomestatin as a consequence of changes in the telomeric overhang configuration. On the other hand, because telomestatin is a potent and specific G-quadruplex ligand, we cannot exclude that the ligand modified the G-overhang in a conformation that further inhibited the hybridization reaction. This would mean that telomestatin tightly binds to the telomeric overhang during DNA extraction and purification. Several experiments were then designed to answer this point.

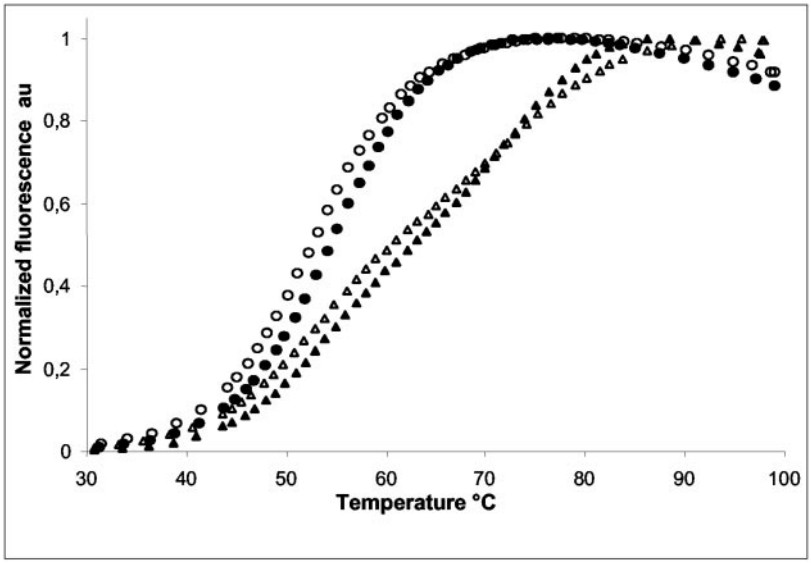


FIG. 7. **Selectivity for telomestatin between F21G *versus* genomic DNA.** The melting behavior of 0.5 μM F21G alone (*open circle*), in the presence of 20 μg of genomic DNA (*closed circle*), 5 μM telomestatin (*open triangle*), and both 20 μg of genomic DNA and 5 μM telomestatin (*closed triangle*). Melting temperature of each assay is determined using the derivative function of the fluorescence.

Telomestatin Specifically Binds to the Single-stranded Conformation of G-overhang in Vitro—We first investigated whether telomestatin could stabilize the telomeric overhang in a conformation that impaired hybridization. Previous studies have shown that, under physiological conditions, formation of a G-quadruplex structure delays but does not prevent the hybridization of the complementary C-strand leading to the formation of a $(TTAGGG/CCCTAA)_n$ duplex (36). The addition of a specific ligand is expected to shift the equilibrium toward the G-quadruplex folding and therefore to inhibit hybridization. This was initially proposed for a bisacridine dye (37) and recently demonstrated for telomestatin by using short oligonucleotides mimicking four telomere repeats (23).

These results were obtained with short (21–22 bases long) synthetic oligodeoxynucleotides. Because of its size, the structure and folding of a 200-base long telomeric overhang into a quadruplex might be qualitatively and quantitatively different from that described with oligonucleotides. The potency or the nature of the ligand, as well as the ionic or protein environment, might also greatly influence this folding and the nature of the complex. We therefore studied the *in vitro* effect of telomestatin on the G-overhang from purified genomic DNA. Not only is the overhang length different from the model systems mentioned above, but the nature of genomic DNA implies the presence of a huge molar excess of double-stranded sequences that could trap telomestatin if this ligand had an insufficient specificity toward quadruplexes. Overnight incubation of the labeled C-strand (21C) with genomic DNA in the presence of telomestatin induced a concentration-dependent inhibition of the hybridization signal in Na^+ and K^+ salt conditions (Fig. 3, *a* and *b*). The presence of Li^+ partially released the extent of the inhibition (Fig. 3, *a* and *b*), in agreement with the known requirements for G-quadruplex stabilization (13). Interestingly, the addition of Mg^{2+} that favors duplex hybridization over G-quadruplex folding (38) did not change the extent of the inhibition (Fig. 3, *a* and *b*, compare magnesium/sodium and sodium), indicating that telomestatin created a potent and stable interaction at telomeric overhang related to its property of interacting with G-quadruplex. Consistent with these findings, a G4-inactive ligand (formula shown in Fig. 1) was unable to inhibit 21C hybridization under all conditions tested (Fig. 3*c* and data not shown). For *in vitro* treatment with telomestatin, the presence of the labeled probe was also observed in the loading well but disappeared after further pretreatment with proteinase K without any change of the telomeric overhang signal (not shown), indicating that it corresponded to aggregation with the remaining proteins from the DNA preparation.

c-Myc Quadruplex Competes with the Telomestatin Effect at Telomeric Overhang—Further evidence of the involvement of G-quadruplexes in hybridization inhibition was obtained by using competition experiments with another G-quadruplex forming oligonucleotide (pu22myc) derived from the NHE III1 element of the c-*myc* promoter (39). This quadruplex was found to be efficiently stabilized by telomestatin in a PCR-stop assay with an IC_{50} equal to that of the telomeric sequence (Fig. 4*b*) and presented several mismatches with the 21C oligonucleotide that prevent duplex formation. As shown in Fig. 5*a*, the addition of 1 μM pu22myc did not interfere with 21C hybridization to the telomeric overhang and abolished the inhibitory effect of telomestatin (up to 1 μM). At a higher telomestatin concentration (10 μM), pu22myc was unable to prevent the loss of the hybridization signal, in agreement with competition between the telomeric overhang and pu22myc G-quadruplexes for telomestatin binding. In the presence of 10 μM pu22myc, the reversion of the telomestatin-induced inhibition was further improved and was complete for a telomestatin concentration up to 2 μM and partial (40%) with 5 μM (Fig. 5, *a* and *c*).

As a control, hybridization experiments were also performed with the 20G oligonucleotide that probed the transient telomeric C-rich overhang described during the S phase of proliferating cells (40). A very weak hybridization band corresponding to the C-overhang was detected in the absence of treatment. This signal was not modified by the treatment with telomestatin up to a concentration of 10 μM (Fig. 6). These *in vitro* experiments allow us to conclude that telomestatin specifically targets the telomeric G-overhang structure from purified genomic DNA through the formation of stable G-quadruplex structures, as previously reported for oligonucleotides (23, 25).

Telomestatin Remains Attached to the G-overhang and Prevents Hybridization of a Complementary Probe—We then investigated whether telomestatin might alter the conformation of the telomeric G-overhang and remains tightly bound to the telomeric overhang after cellular treatment. DNA from A549-treated cells (5 μM, 24 h) was incubated in the presence of the quadruplex competitor pu22myc. A partial reversion of the hybridization signal loss was observed in the presence pu22myc (Fig. 5, *a* and *b*). The recovery was up to 41% of the G-overhang signal as a function of the pu22myc competitor concentration and slightly decreased to 35% when telomestatin

treatment was prolonged to 48 h (Fig. 5*d*). This suggests that telomestatin was strongly bound to the telomeric overhang in a conformation that impaired 21C hybridization. We conclude that short-term treatment (up to 48 h) with telomestatin did not completely degrade the G-overhang. Such tight binding of telomestatin to the G-overhang implies a very strong selectivity of this ligand for telomeric ends over duplex DNA, in agreement with previous selectivity studies with different oligonucleotides (23, 25). This was previously demonstrated by using short oligonucleotides by MS-MSI (23) and fluorescence resonance energy transfer (FRET) experiments using a 26-nucleotide long duplex oligonucleotide as a competitor with the 21G oligonucleotide (the minimal telomeric sequence able to form a quadruplex). In the presence of a 650-base molar excess of the ds26 oligonucleotide, the melting temperature induced by telomestatin was not modified (not shown). Under the same experimental conditions, the stabilization induced by other ligands such as ethidium derivatives was lost (41), demonstrating that telomestatin is more selective toward quadruplexes than these derivatives. To investigate the selectivity toward human double-stranded genomic DNA, fluorescence experiments using F21G-Dabcyl in the presence of telomestatin were performed with purified A549 DNA. The melting temperature of the oligonucleotide (74 °C in the presence of 5 μM telomestatin) was not modified up to a 3×10^3 base molar excess of DNA, indicating a very potent selectivity for telomestatin between telomeric G-quadruplex and duplex genomic DNA (Fig. 7). Such tight and specific binding of telomestatin to the G-overhang quadruplex is also in agreement with the results of the *in vitro* competition experiment with the pu22myc quadruplex.

Telomestatin Induces an Effective G-overhang Degradation Associated with the Delayed A549 Growth Arrest—At this point, because of its tight binding to the telomeric overhang, we were unable to conclude whether a short-term exposure of A549 cells to 5 μM telomestatin resulted, at least partially, in a rapid degradation of the telomeric overhang, because the pu22myc competition induced a partial reversion of the hybridization that was nearly equal for *in vitro* experiments (40%) and cell treatment (35–41%). This ligand concentration also provoked a rapid growth arrest after 4 days of exposure of the cells (Fig. 1*a*). To determine whether the onset of the delayed growth arrest induced by telomestatin corresponded to an effective degradation of the telomeric overhang, we studied the long-term effect of telomestatin exposure at a lower concentration.

After 16 days of treatment with 2 μM telomestatin, the remaining A549 cells were washed in fresh culture medium without telomestatin and maintained for a further 9 days in the absence of the drug to achieve a density suitable for DNA extraction (Fig. 8*a*, *open triangle*). During that period, cell population doubling was equal to 3.2, corresponding to a 67-h doubling time, as compared with 22 h for control cells, indicating that these cells have not fully recovered from the effects of the drug. Interestingly, the telomeric G-overhang signal was still found to be decreased by 70% (Fig. 8*b*), a value suggesting that the G-overhang was substantially degraded.

After 4 to 12 days of treatment with 2 μM telomestatin, the telomeric G-overhang signal decreased from 33 to 10%, respectively (Fig. 8*c*). *In vitro*, the effect of this telomestatin concentration is fully reversed by the competition with 10 μM pu22myc (Figs. 5*c* and 8*c*). DNA from A549-treated cells (4 to 12 days) were incubated in the presence of the pu22myc competitor (10 μM). The recovery was up to 71% of the hybridization at 4 days, but markedly decreased to 48% when telomestatin treatment was prolonged to 12 days (Fig. 8*c*). Importantly, and contrary to the previous experiments at

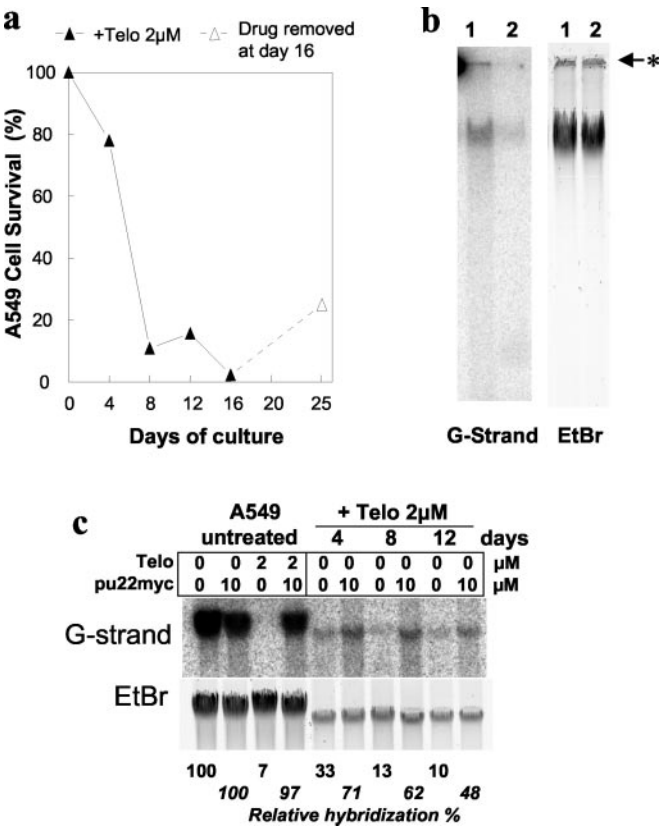


FIG. 8. **Long-term treatment with telomestatin induced an effective G-overhang degradation.** *a*, growth of A549 cells after telomestatin removal. A549 cells were induced to growth arrest by treatment with telomestatin (2 μM, *solid triangle*). Drug was removed at day 16 and cells were incubated for an additional 9 days (*open triangle*) and DNA was extracted. *b*, non-denaturing solution hybridization analysis of the 3′ telomeric overhang in A549 cells induced to growth arrest by telomestatin and maintained for 9 days in drug-free medium. *Lane 1*, control untreated A549; *lane 2*, A549 cells at day 25 after drug removal at day 16 (see Fig. 8*a*, *open triangle*). The *asterisk* indicates the position of the loading well at the top of the gel. *c*, non-denaturing solution hybridization analysis of the 3′ telomeric overhang in A549 cells untreated or treated by 2 μM telomestatin for 4, 8, and 12 days, as indicated. DNA from untreated cells (A549 untreated) was incubated with 2 μM telomestatin with or without 10 μM pu22myc quadruplex competitor, as indicated. DNAs from telomestatin-treated cells (+*Telo* 2 μM) were incubated with or without pu22myc quadruplex competitor (10 μM), as indicated. *Numbers* indicate the relative hybridization signal (%) relative to untreated A549 DNA (*upper numbers*) or relative to untreated A549 DNA with 10 μM pu22myc (*lower numbers*).

higher telomestatin concentrations, the addition of pu22myc allowed to determine the effective G-overhang signal. This observation supports the conclusion that telomestatin induced a bona fide and persistent reduction in G-overhang length. In other words, the reduction of the radioactive signal resulting from the stabilization of a quadruplex during hybridization that prevents formation of a duplex with the radiolabeled probe cannot fully account for the reduction observed in Fig. 8. G-overhang degradation correlated with the telomestatin-induced delayed loss of viability of A549 cells.

DMS Treatment Alters Telomestatin Effects on G-overhangs—To confirm that the telomeric overhang signal decrease was not the sole result of a tenacious interaction of the ligand with the telomeric overhang during hybridization, we used *in vivo* protection experiments with DMS. Treatment of A549 cells with DMS before DNA extraction modifies the electrophoretic migration of genomic DNA and creates discrete double-stranded DNA breaks (Fig. 9*a*, *EtBr*), as previously described (30). The radioactive band intensity was also reduced to about 70% of the control (Fig. 9, *a* and *b*), indicating a rapid decrease

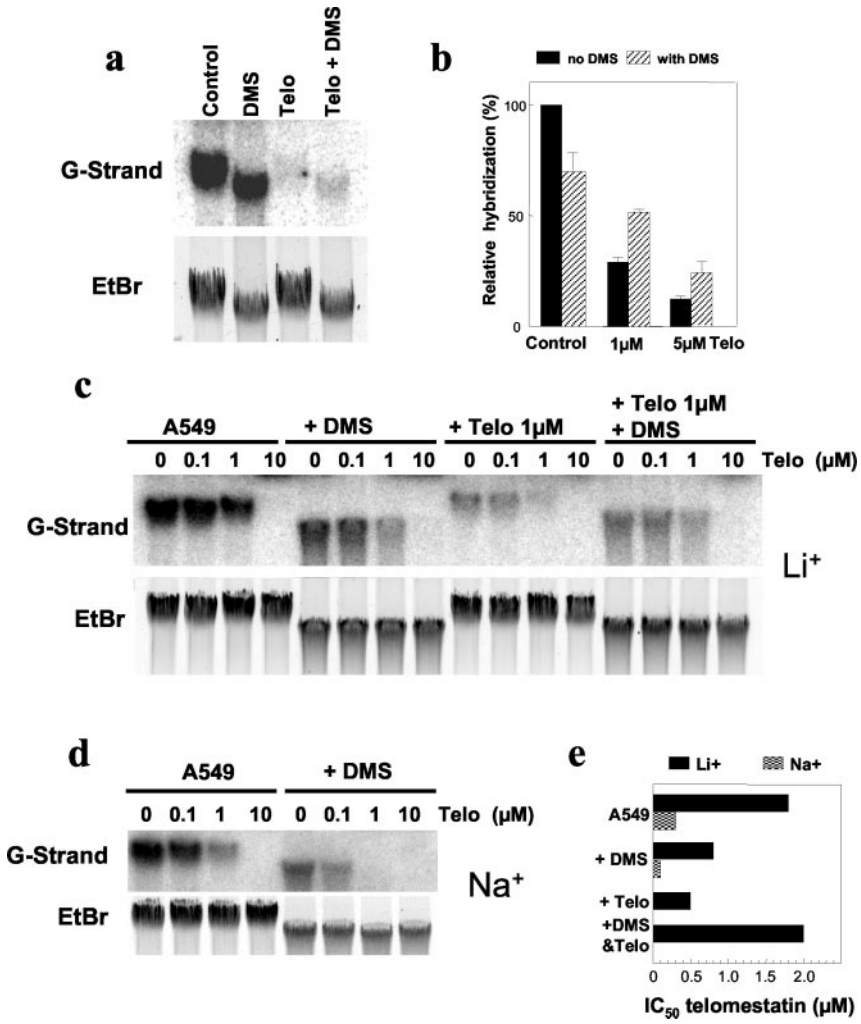


FIG. 9. **Effect of DMS on telomestatin-induced overhang loss in A549 cells.** DMS induced telomeric overhang loss but protected against the telomestatin-induced effect on overhang. Non-denaturing solution hybridization analysis: *a*, in sodium buffer of the 3′ telomeric overhang in untreated A549 cells (*control*), cells treated with DMS for 10 min (*DMS*), cells treated for 48 h with 5 μM telomestatin (*Telo*) and cells treated with 5 μM telomestatin for and with DMS for 10 min (*Telo + DMS*). *b*, quantification of the DMS protection effect (three independent experiments) for A549 cells treated with 1 or 5 μM telomestatin. Hybridization signal of the 21C probe (*G-strand*) was normalized relative to the ethidium bromide (*EtBr*) signal and results are expressed relative to the signal from untreated A549 DNA defined as 100%. *c*, analysis in lithium buffer of the telomeric G-overhang from untreated A549 cells (*A549*), cells treated with DMS for 10 min (+*DMS*), cells treated for 48 h with 1 μM telomestatin (+*Telo*), and cells treated with 1 μM telomestatin for 48 h and with DMS for 10 min (+*Telo 1* μM, + *DMS*). As indicated, telomestatin (0.1, 1, or 10 μM) was added to DNA samples to determine the *in vitro* inhibition of hybridization by telomestatin. *d*, analysis in sodium buffer of the telomeric G-overhang from untreated A549 cells (A549) and cells treated with DMS for 10 min (+*DMS*). As indicated, telomestatin (0.1, 1, or 10 μM) was added to DNA samples to determine *in vitro* inhibition of hybridization by telomestatin. *e*, IC_{50} of telomestatin for *in vitro* inhibition of hybridization in sodium or lithium buffer for the indicated cellular treatment conditions (see *panels c* and *d*).

in G-overhang size that corresponded to the onset of a rapid endonucleolytic process of the telomeric G-overhang. When telomestatin treatment (24 h, 5 μM) was followed by DMS treatment before DNA extraction, a 2-fold increase in the G-overhang hybridization was observed, as compared with telomestatin treatment alone (Fig. 9, *a* and *b*). Similar results were obtained in the presence of 1 μM telomestatin for 24 h (Fig. 9, *b* and *c*), suggesting that DMS is able to decrease the effect of telomestatin on the G-overhang.

Further *in vitro* treatment with telomestatin (0.1 to 10 μM, Fig. 9*c*) was applied to DNA from DMS- and/or telomestatin-treated cells in lithium buffer conditions. In that case, telomestatin-induced inhibition of G-overhang was increased in DNA from DMS-treated cells (IC_{50} = 0.8 μM), as compared with control cells (IC_{50} = 1.8 μM), suggesting that DMS-induced overhang shortening facilitated the effect of the ligand *in vitro*. Similar results were obtained in sodium buffer conditions (Fig. 9*d*). DNA from cells treated with telomestatin (1 μM, 24 h) provided a stronger inhibition with further *in vitro* treatment with the ligand (IC_{50} = 0.5 μM) (Fig. 9*c*). In contrast, DNA from cells treated with both DMS and telomestatin had a reduced effect on G-overhangs (IC_{50} = 2 μM) in agreement with a protection of their action (Fig. 9*c*). Because DMS is applied for a short time after the addition of telomestatin, and as DMS treatment by itself induces a G-overhang decrease, the protection likely resulted from an interaction of telomestatin with the overhang that protected it against the DMS action. This experiment suggests that telomestatin engages the telomeric overhang *in vivo* in a DNA structure resistant to the action of DMS. Because DMS mostly induces N7-alkG modifications *in vivo* (30), the protection is compatible with the formation by telomestatin of quadruplex Hoogsteen bonds at the telomeric overhang *in vivo*.

CONCLUSIONS

Our data indicate that telomestatin is able to impair the telomeric overhang structure in human cells. A tight and specific interaction of the ligand with telomeric overhang compatible with the formation of a stable G-quadruplex was found, and prolonged treatment of the cells with telomestatin resulted in a marked decrease in the G-overhang signal that correlated with the onset of the delayed growth arrest. Recent reports indicate that TRF_2 is essential for protection of the telomeric overhang and prevents the action of the nucleotide excision repair nuclease ERCC1/XPF that participates in the overhang removal (34). We propose that the alteration of the G-overhang conformation by telomestatin might alter its capping by essential factors such as TRF_2, therefore leading to its degradation. Our results are also in agreement with the finding that another ligand from the 2,6-pyridocarboxamide series is preferentially associated with mitotic telomeres during metaphase.[3] Our results represent the first evidence that telomeric overhangs are an important target for the biological effect of these classes of agents.

Acknowledgments—We thank L. Lacroix (MNHN, Paris) for helpful discussions, F. Boussin (CEA, Saclay, France) and L. Guittat (MNHN,

[3] F. Boussin, personal communication.

Paris) for sharing unpublished results, and S. Bacchetti (Istituto Regina Elena, Roma) and S. Stewart (Washington University, St Louis) for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

1. Blackburn, E. H. (2001) *Cell* **106,** 661–673
2. Shay, J. W. (1997) *J. Cell. Physiol.* **173,** 266–270
3. Hahn, W. C., Stewart, S. A., Brooks, M. W., York, S. G., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R. L., Knoll, J. H., Meyerson, M., and Weinberg, R. A. (1999) *Nat. Med.* **5,** 1164–1170
4. Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D., and Shay, J. W. (1997) *Genes Dev.* **11,** 2801–2809
5. Makarov, V. L., Hirose, Y., and Langmore, J. P. (1997) *Cell* **88,** 657–666
6. Hemann, M. T., and Greider, C. W. (1999) *Nucleic Acids Res.* **27,** 3964–3969
7. Wright, W. E., Tesmer, V. M., Liao, M. L., and Shay, J. W. (1999) *Exp. Cell Res.* **251,** 492–499
8. Jacob, N. K., Kirk, K. E., and Price, C. M. (2003) *Mol. Cell* **11,** 1021–1032
9. Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999) *Cell* **97,** 503–514
10. De Lange, T. (2004) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5,** 323–329
11. Mergny, J. L., Riou, J. F., Mailliet, P., Teulade-Fichou, M. P., and Gilson, E. (2002) *Nucleic Acids Res.* **30,** 839–865
12. Neidle, S., and Parkinson, G. (2002) *Nat. Rev. Drug Discov.* **1,** 383–393
13. Davies, J. T. (2004) *Angew. Chem. Int. Ed.* **43,** 668–698
14. Parkinson, G. N., Lee, M. P., and Neidle, S. (2002) *Nature* **417,** 876–880
15. Wang, Y., and Patel, D. J. (1993) *Structure* **1,** 263–282
16. Zahler, A. M., Williamson, J. R., Cech, T. R., and Prescott, D. M. (1991) *Nature* **350,** 718–720
17. Mergny, J. L., and Hélène, C. (1998) *Nat. Med.* **4,** 1366–1367
18. Riou, J. F., Guittat, L., Mailliet, P., Laoui, A., Renou, E., Petitgenet, O., Megnin-Chanet, F., Hélène, C., and Mergny, J. L. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 2672–2677
19. Tauchi, T., Shin-Ya, K., Sashida, G., Sumi, M., Nakajima, A., Shimamoto, T., Ohyashiki, J. H., and Ohyashiki, K. (2003) *Oncogene* **22,** 5338–5347
20. Gowan, S. M., Harrison, J. R., Patterson, L., Valenti, M., Read, M. A., Neidle, S., and Kelland, L. R. (2002) *Mol. Pharmacol.* **61,** 1154–1162
21. Gowan, S. M., Heald, R., Stevens, M. F., and Kelland, L. R. (2001) *Mol. Pharmacol.* **60,** 981–988
22. Shin-ya, K., Wierzba, K., Matsuo, K., Ohtani, T., Yamada, Y., Furihata, K., Hayakawa, Y., and Seto, H. (2001) *J. Am. Chem. Soc.* **123,** 1262–1263
23. Rosu, F., Gabelica, V., Shin-ya, K., and De Pauw, E. (2003) *Chem. Commun.* 2702–2703
24. Shammas, M. A., Reis, R. J., Li, C., Koley, H., Hurley, L. H., Anderson, K. C., and Munshi, N. C. (2004) *Clin. Cancer Res.* **10,** 770–776
25. Kim, M. Y., Gleason-Guzman, M., Izbicka, E., Nishioka, D., and Hurley, L. H. (2003) *Cancer Res.* **63,** 3247–3256
26. Gomez, D., Aouali, N., Renaud, A., Douarre, C., Shin-Ya, K., Tazi, J., Martinez, S., Trentesaux, C., Morjani, H., and Riou, J. F. (2003) *Cancer Res.* **63,** 6149–6153
27. Kim, M. Y., Vankayalapati, H., Shin-ya, K., Wierzba, K., and Hurley, L. H. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124,** 2098–2099
28. Gomez, D., Aouali, N., Londono-Vallejo, A., Lacroix, L., Megnin-Chanet, F., Lemarteleur, T., Douarre, C., Shin-ya, K., Mailliet, P., Trentesaux, C., Morjani, H., Mergny, J.-L., and Riou, J.-F. (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 50554–50562
29. Cimino-Reale, G., Pascale, E., Battiloro, E., Starace, G., Verna, R., and D'Ambrosio, E. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29,** E35
30. Cloutier, J. F., Castonguay, A., O'Connor, T. R., and Drouin, R. (2001) *J. Mol. Biol.* **306,** 169–188
31. Darby, R. A., Sollogoub, M., McKeen, C., Brown, L., Risitano, A., Brown, N., Barton, C., Brown, T., and Fox, K. R. (2002) *Nucleic Acids Res.* **30,** e39
32. Gomez, D., Lemarteleur, T., Lacroix, L., Mailliet, P., Mergny, J. L., and Riou, J. F. (2004) *Nucleic Acids Res.* **32,** 371–379
33. Stewart, S. A., Ben-Porath, I., Carey, V. J., O'Connor, B. F., Hahn, W. C., and Weinberg, R. A. (2003) *Nat. Genet.* **33,** 492–496
34. Zhu, X. D., Niedernhofer, L., Kuster, B., Mann, M., Hoeijmakers, J. H., and de Lange, T. (2003) *Mol. Cell* **12,** 1489–1498
35. Masutomi, K., Yu, E. Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J. L., Metz, G. B., Brooks, M. W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J. A., Weinberg, R. A., Stewart, S. A., and Hahn, W. C. (2003) *Cell* **114,** 241–253
36. Phan, A. T., and Mergny, J. L. (2002) *Nucleic Acids Res.* **30,** 4618–4625
37. Alberti, P., Ren, J., Teulade-Fichou, M. P., Guittat, L., Riou, J. F., Chaires, J., Hélène, C., Vigneron, J. P., Lehn, J. M., and Mergny, J. L. (2001) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **19,** 505–513
38. Alberti, P., and Mergny, J. L. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100,** 1569–1573
39. Siddiqui-Jain, A., Grand, C. L., Bearss, D. J., and Hurley, L. H. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 11593–11598
40. Cimino-Reale, G., Pascale, E., Alvino, E., Starace, G., and D'Ambrosio, E. (2003) *J. Biol. Chem.* **278,** 2136–2140
41. Rosu, F., De Pauw, E., Guittat, L., Alberti, P., Lacroix, L., Mailliet, P., Riou, J. F., and Mergny, J. L. (2003) *Biochemistry* **42,** 10361–10371

LEMARTELEUR Thibault – Etude de ligands de l'ADN G-quadruplexe sur la transcription et la prolifération dans des lignées cellulaires humaines

Th.D. : 3ème cycle : Reims : 2005

RESUME :

Le simple brin télomérique peut adopter une structure en G-quadruplexe. Des composés qui stabilisent ces structures sont capables de bloquer la réplication du télomère et d'induire la sénescence et/ou l'apoptose de lignées tumorales. Plusieurs séquences dans le génome sont potentiellement capables d'adopter une structure en G-quadruplexe.

Nous avons mis au point un test PCR permettant d'évaluer la stabilisation du G-quadruplexe du promoteur du gène *c-myc* par des ligands décrits pour stabiliser le quadruplexe télomérique. A l'aide d'une amorce mutée incapable de former le G-quadruplexe, nous avons déterminé la sélectivité de ces ligands.

Le 12459 stabilise la formation de G-quadruplexes de l'intron 6 du gène hTERT dans la lignée A549 et inhibe l'activité télomérase par une altération de l'épissage alternatif de ce gène.

Nous avons aussi étudié l'effet de l'insertion d'un quadruplexe dans la séquence codante du gène POT_1. Dans ce modèle, les ligands n'inhibent pas la transcription/traduction couplée de la protéine. Par contre, la télomestatine inhibe la traduction et des expériences *in vitro* suggèrent que la transcription pourrait être inhibée par la présence de ces G-quadruplexes.

Enfin, nous avons étudié les effets des ligands dans des cellules ALT régulant leurs tailles de télomère par recombinaison génétique. Ces ligands induisent une cytotoxicité à court terme et un arrêt de la prolifération cellulaire à plus long terme. La télomestatine induit un raccourcissement de la taille du simple brin télomérique à court terme et la réexpression de l'activité télomérase dans une lignée ALT induit une résistance partielle à l'entrée en sénescence par les ligands.

MOTS-CLES :

- TELOMERE
- LIGAND
- TELOMERASE
- GENE MYC
- G-QUADRUPLEXES

JURY :

Président :	Monsieur le docteur Jean Louis Mergny
Rapporteurs :	Madame le docteur Evelyne Ségal-Bendirdjian
	Monsieur le docteur José Arturo Londono-Vallejo
Examinateurs :	Monsieur le docteur Patrick Mailliet
	Monsieur le professeur Jean Marc Millot
Directeur de thèse :	Monsieur le professeur Jean François Riou

---

ADRESSE DE L'AUTEUR :

Monsieur Thibault Lemarteleur
29 rue du Colonel Fabien
51100 Reims