UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE UNITE DE FORMATION et de RECHERCHE de PHARMACIE

ANNEE 2007

N° :

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

MENTION : PHARMACIE

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Soutenue publiquement le 11 septembre 2007

par

Céline Douarre

Née le 1^{er} février 1977 à Chambray-Les -Tours

ETUDE DE LIGANDS DE L'ADN G-QUADRUPLEXE SUR L'INTEGRITE DES TELOMERES : VOIES DES DOMMAGES A L'ADN AU COURS DE L'APOPTOSE ET DE LA SENESCENCE DANS DES LIGNEES TUMORALES HUMAINES.

Rapporteurs :	Dr. SEGAL -BENDIRDJIAN Evelyne (Unité INSERM 685, PARIS)
	Dr POMMIER Yves (NCI, NIH, Bethesda)
Examinateurs :	Dr. MERGNY Mojgan (INSERM 4756, Chateney-Malabry)
	Pr. RIOU Jean- François (Université de Reims Champagne-Ardenne)
	Dr. GOMEZ Dennis (IPBS, Toulouse)
Directeur de thèse :	Pr. TRENTESAUX Chantal (Université de Reims Champagne-Ardenne)

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Jean-François Riou, Directeur de l'équipe JE 2428 d'Onco-Pharmacologie à Reims pour m'avoir accueillie dans son équipe, et pour avoir toujours suivi de près mon travail. Merci pour les nombreuses opportunités que vous m'avez données de collaborer avec les membres de l'équipe. Soyez assuré de mon plus profond respect.

J'exprime toute ma reconnaissance à Madame le Professeur Chantal Trentesaux, ma directrice de thèse pour son encadrement, sa disponibilité, sa gentillesse et pour la confiance qu'elle m'a accordée.

Je voudrais remercier vivement Madame le docteur Evelyne Ségal-Bendirdjian d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Merci pour vos conseils et vos remarques pour l'amélioration de ce manuscrit.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur le Docteur Yves Pommier de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de ma thèse.

Mes remerciements vont également à madame le Docteur Mojgan Mergny qui a accepté d'examiner mon travail et de faire partie de ce jury.

Un grand merci à Monsieur le Docteur Dennis Gomez d'avoir accepté de siéger au sein de mon jury.

Mes remerciements sont également adressés à tous les membres de la jeune équipe 2428 :

Merci Dennis pour l'aide et les conseils indispensables que tu m'as abondamment fournis tout au long de ma thèse. Travailler à tes côtés pendant trois ans a été pour moi un réel plaisir. Merci pour ta passion et ta motivation contagieuses ainsi que pour ton éternel sens de l'humour qui ont contribués à travailler dans les meilleures conditions qu'ils soient. J'ai été très fière de continuer ton travail sur le 12459.

Merci Lionel pour tes encouragements, tes conseils et ton soutien pendant la fin de rédaction de thèse. Ils ont été importants pour moi.

Merci égalemment à Thibault, Rajaa, Thomas, Bertrand, Simon (mon Chacal), Nassima, Pamela, Jérôme, Lahcen et Hamid.

A toi Nadia (mes zécureuils), cette aventure n'aurait pas été la même si je ne t'avais pas rencontrée. Merci pour ton amitié, ton affection, ta complicité, qui me sont si chères, pour ton humour et ton soutien permanent depuis le DEA.

A toi Victoria (ma Libanaise préférée et la reine des ChIP) pour ton amitié et ton dynamisme.

A toi Emilie, depuis maintenant 15 ans que je te connais tu seras toujours restée à mes côtés et surtout dans les moments difficiles .Merci de m'avoir encouragée tout au long de ma thèse et plus particulièrement pendant la rédaction. Merci aussi pour tes cours sur word.

A Gilles, Ali, Franck, Florence, Patrick, Nassera, Salima : A vous toutes et tous, merci pour tous les moments que nous avons partagés et qui ont fait de ces quatres années une aventure humaine inoubliable!

Merci à Madame Pisani et Madame Cousinat pour leur aide technique si précieuse.

Pour terminer, je tiens à exprimer des remerciements plus personnels et intimes...

A Mon père, à Ma mère, à Mamia, pourtant si loin de moi mais toujours très proches à la fois,

A Christine et Carine, mes deux fantastiques sœurs, merci de m'avoir toujours soutenue dans ce que je voulais faire, même si cela m'a géographiquement séparée de vous et de vos deux petits Loups (et bientôt trois !)

A ma famille

Et enfin à toi, Pierre, sans qui je n'aurais jamais fait de thèse. Considère que celle-ci est aussi la tienne. Je t'... exactement.

Liste des abbréviations

A :	adénine		
ADN :	Acide DésoxyRibonucléique		
AIF:	Apoptosis Inducing Factor		
ALT :	Alternative Lengthening of Telomeres		
Apaf-1:	Apoptotic Protease Activating Factor 1		
APB :	ALT associated PML bodies		
ARN :	Acide RiboNucléique		
ATM ·	Ataxia telangiectasia mutated		
ATR ·	ATM and Rad3 related		
h ·	hase		
Bcl-2.	B-cell lymphoma 2		
BH [.]	B cell lymphonia 2 Bcl-2 homology domain		
Broal ·	B-galactosidase		
BER ·	Base Excision Renair		
BH.	Bal-2 Homology		
DII. BIM·	Bloom		
DLIVI .	Bioolii		
	Compage Activisted DNese		
CAD. $CAD/ICAD$.	Caspase Activated DNase / Inhibitar of Caspase Activated DNase		
CAD/ICAD .	Caspase Activated Divase / Infinition of Caspase Activated Divase		
CAPK :	Ceramide Activated Proteine Kinase		
CARD :	Caspase Activation Recruitment Domain		
Caspase :	Cysteinyl ASPartic acid-ProteASE		
CDB :	Cassures Double-Brin de l'AND		
c-FLIP:	cellular FLICE Inhibitory Protein		
CHAPS :	3-[3-(Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate		
CHK1 :	CHeckpoint Kinase 1		
CHK2 :	CHeckpoint Kinase 2		
cIAP:	cellular IAP		
CI50 :	concentration inhibitrice de 50% de l'activité		
c-myc :	myelocytomastosis		
CSB :	Cassures Simple-Brin de l'ADN		
Cyt <i>c</i> :	Cytochrome <i>c</i>		
DD :	Death Domain		
DED :	Death Effector Domain		
$\Delta \Psi$ m:	Potentiel transmembranaire mitochondrial		
DEVD :	aspartate-glutamate- valine- aspartate		
DFF :	DNA Fragmentation Factor		
DISC :	Death Inducing Signaling Complex		
D-loop :	displacement loop		
DMSO :	DiMéthylSulfOxyde		
DNA-PK :	Protéine Kinase Dépendante de l'ADN		
DR:	Death Receptors		
DR4, DR5 :	Death Receptor 4, Death Receptor 5 : (DR4=TRAILR1, DR5=TRAILR2)		
EDTA :	Acide EthyleneDiamine Tétra-acétique		
Endo G:	Endonucléase G		
ERK :	Extracellular signal-Regulated Kinase		
ERO:	Espèces Réactives d'Oxygène		
FACS:	Fluorescence Activated Cell Sorter		

FADD :	Fas Associated Death Domain		
FasL :	Fas Ligand		
FITC :	Fluorescein IsoThioCyanate		
fmk :	fluoromethylketone		
FSC:	Forward SCatter		
G :	Guanine		
HRR :	Homologous Recombination Repair		
hTERT :	human Telomerase Reverse Transcriptase		
hTR :	human Telomerase RNA		
IAP:	Inhibitor of Apoptosis Proteins		
ICAD/DFF45:	Inhibitor Caspase-Activated DNAse/DNA Fragmentation Factor		
IETD :	isoleucine-glutamate-thréonine-aspartate		
IP :	Iodure de Propidium		
IR :	Ionizing Radiation		
JC-1 :	5.5',6.6'-tetrachloro-1,1',3.3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide		
JNK:	c-Jun N-terminal Kinase		
kb :	kilobase		
kDa :	kilo-Dalton		
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase		
MIMP	Mitochondrial Inner Membrane Permeabilization		
MMP [.]	Mitochondrial Membrane Permeabilization		
MMR ·	MisMatch Repair		
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization		
MPT [.]	Mitochondrial Permeability Transition		
NAIP	Neuronal IAP		
NER ·	Nucleotide Excision Renair		
NHEL ·	Non Homologous End-Joining		
NLS [.]	Nuclear Localisation Sequence		
NO [.]	Oxyde Nitrique		
PARP ·	Poly(ADP-Ribose) Polymérase		
nh ·	naire de bases		
PCR ·	Polymerase Chain Reaction		
PD ·	Doublement de Population		
PIP1 ·	POT1 Interacting Protein 1		
	Phosphoinositide 3-Kinase related Kinase		
DV D.	Protein Kinase B		
PKC	Protoin Kinase C		
DMI ·	ProMyelocytic Leukemia		
\mathbf{DOT}_1	Protoction Of Tolomoro 1		
	Pormashility Transition Pore Complex		
	Phoenhotidy/Sérino		
	Phosphaludy Selline Dermochility Transition Dara Complex		
PIPC.	pretáine du Dátinehlasteme		
KU. DE:	Proteine du Reimoblastome		
KE.	Renculum Endoplasinique		
KUS:	Reactive Oxygen Species		
KrA . DT .	Replication Protein A		
KI:	Reverse Transcription Data 1 i D (i		
KIPCK:	Reverse Transcription Polychain Reaction		
SAPK/JNK :	Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-terminal Kinase		
Smac-DIABLO:	Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct Inhibitor		

SOD:	SuperOxyde Dismutase
SV40 :	Simian Virus 40
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
T :	thymine
TANK :	tankyrase
TBE :	Tris/Borate/EDTA
TIF:	Telomere-Induced Foci
T-loop :	telomeric loop
TNF :	Tumor Necrosis Factor
TPP1:	TINT1/ PTOP/ PIP1
TRAIL :	Tumor necrosis factor (TNF)-Related Apoptosis-Inducing Ligand (=Apo-2L)
TRAILR :	Récepteur de TRAIL
TRAP :	Telomeric Repeat Amplification Protocol
TRF1-2 :	TTAGGG repeat factor 1 -2
Tris-HCl :	hydrochlorure de Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV :	UltraViolet
VDAC :	Voltage Dependent Anion Channel
WRN :	Werner
XIAP:	X-chromosome linked IAP
Z.VAD-fmk:	Benzoloxy-valine-alanine-aspartate-O-methyl-fluoromethylketone

SOMMAIRE

Liste d	les figures	11
Liste d	les tableaux	13
Situati	ion du sujet	14
I. IN	TRODUCTION	16
A.	Les télomères	17
1.	Historique	17
2.	Description et structure.	18
3.	Le problème de la réplication terminale	20
4.	Le capuchon télomérique chez l'homme (shelterin).	22
B.	La télomérase.	26
1.	Historique et introduction	26
2.	Structure de la télomérase.	27
	a) La sous-unité catalytique hTERT :	28
	b) La sous-unité ribonucléotidique hTR :	30
3.	Réplication des télomères par la télomérase.	31
C.	La régulation de la télomérase :	33
1.	Régulation de la télomérase via l'expression de hTERT.	33
	a) Activation du promoteur de hTERT	33
	b) Répression du promoteur de hTERT :	36
	c) Epissage alternatif de l'ARNm de hTERT	37
	d) Régulation post-traductionnelle de hTERT :	38
2.	Régulation de la télomérase via l'expression de hTR	38
D.	La régulation des télomères	40
1.	Structure en T-loop et protection des télomères	40
2.	Régulation de la taille des télomères par les protéines du complexe shelterin	42
	a) TRF1 dans la régulation des télomères.	43
	b) TRF2 dans la régulation des télomères.	45
	c) Rôle de hPOT1 dans la régulation des télomères	47
	d) Interconnection de TRF1 et de TRF2	50
E.	Les structures G-quartet et G-quadruplexe.	51
1.	Structure.	51
2.	Mise en évidence de l'existence in vivo des G-quadruplexes.	54
3.	Fonction des G-quadruplexes.	55
4.	G-quadruplexe et télomères.	56
5.	Les autres G-quadruplexes potentiels du génome	57
	a) Les régions « switch » des immunoglobulines	57
	b) Les régions répétées du rDNA et du centromère.	57
	c) Les promoteurs de gènes.	58
6.	Quadruplexe et ARN.	58
7.	Protéines reconnaissant les G-quadruplexes.	59
	a) Hélicases et topoisomérases.	60
	b) Résolvases.	61
	c) Nucléases	61
	d) Autres protéines fixant les G-quadruplexes.	62

F.	Télomère/Télomérase et cancer.	62
1.	Stratégies ciblant la télomérase.	63
	a) cibler hTERT	63
	b) Cibler hTR	67
2.	Stratégies ciblant le télomère.	68
	a) Par les ligands des G-quadruplexes	68
	b) Par les protéines associées au télomère	72
G.	Déprotection du télomère et dommages à l'ADN	73
1.	Voies de détection de dommages à l'ADN.	73
	Reconnaissance des dommages de l'ADN	74
2.	Activation des points de contrôle du cycle cellulaire	78
3.	Réparation des dommages de l'ADN	80
4.	Rôle de P53 dans la réponse aux dommages de l'ADN	81
5.	TRF2 dans la réponse aux dommages de l'ADN	85
6.	Signal d'arrêt des dommages à l'ADN.	85
7.	Dommages à l'ADN conduisant à la sénescence.	89
	a) La sénescence intrinsèque (FigI-42).	90
	b) La sénescence extrinsèque (Fig I-42)	93
8.	Dommages de l'ADN conduisant à l'apoptose.	95
	a) Caractéristiques morphologiques.	95
	b) Caractéristiques biochimiques	96
	c) Les principaux effecteurs de l'apoptose	96
	(1) Les caspases :	96
	Apoptose indépendante des caspases.	98
	(2) Les protéines de la famille Bcl-2	99
	Bcl-2, hTERT et apoptose.	100
	d) La voie intrinsèque mitochondriale	102
	(1) Perméabilisation membranaire.	102
	(2) Libération des protéines apoptotiques de l'espace intermembranaire	104
	(3) Alteration de la fonction mitochondriale.	104
D !!	e) La voie extrinseque des « recepteurs de mort ».	105
Bilan	et presentation des objectifs de l'étude	107
II. M	ATERIELS ET METHODES	108
A.		109
1.	Les lignees cellulaires.	109
Ζ.	(1) Entrotion dog collulog	109
	 Entretien des centres	109
	 (2) FIOMERATION et determination de la viabilité centralie	109
3	(5) Cryoconservation des centres	110
B.	Etude de la prolifération cellulaire en présence de 12459	110
D. C	Mise en évidence de l'anontose par coloration au Hoechst	111
С. D	Inhibition de l'apoptose par le DEVD-EMK et l'IETD-EMK	112
D. F	Action de ligands de G-quadruplexe sur la sénescence cellulaire	112
E. F	Ftude du potentiel membranaire mitochondrial par microspectro-fluorométrie	112
G	Etude de la production des ROS par microspectrofluorométrie	114
О. Н	Restriction des fragments télomériques (TRF)	114
1	Principe du TRF	114
2	Préparation de la sonde brin C radiomarquée	114
3	Préparation des ADN.	
	1	-

4.	Hybridation	115	;
I.	Expérience d'hybridation en solution.	115	;
1.	Principe	115	;
2.	Protocoles	115	;
3.	Expériences de compétition avec le Pu22myc.	116	,
J.	Identification des protéines par western blot.	116	ĵ
1.	Principe	116	ĵ
2.	Extraction des protéines cellulaires	118	,
3.	Obtention des protéines nucléaires par extraction acide.	119)
4.	Ouantification des histones.	119)
5.	Migration et électrotransfert	120)
6.	Immunodetection	120)
K.	Etude de la transcription par RT-PCR	121	
1.	Extraction des ARNs totaux	122)
	a) Ouantification et contrôle de gualité.	122)
2.	Transcription inverse (« Reverse-Transcription », RT) kit promega	123	;
3.	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) classique.	123	;
L.	PCR en temps réel	125	;
1	Extraction des ARNs totaux	125	;
2	Réaction de transcription inverse · idem PCR classique	125	,
	Réaction de polymérisation en chaine	125	
M	Immunofluorescence	126	5
N	Détection de l'activité SA β-galactosidase	127	1
$\hat{\mathbf{O}}$	Transfection des cellules avec les siRNA PPMID	128	2
1	Principe	128	Ś
2	Mode opératoire	130)
<u>Р</u> .	Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux	130)
1.	Principe de la cytométrie en flux	130)
2	Application de la cytométrie en flux à l'étude du cycle Cellulaire	131	,
2.	Conditions expérimentales	131	
III RI	FSULTATS	133	ł
PART	IF 1	13c 13d	Ĺ
Altéra	tion du simple brin télomérique et modulation par Rcl-2 de l'apontose induite	15-	r
nar le	12459 ligand de l'ADN G-quadrunleye	134	l
Introdu	iction	134	r
PURL	ICATION 1	137	,
Résult:	ate	138	2
Discus	sion et Conclusion	14()
PART	IF 2	143	į
Etude	des voies de dommages à l'ADN induites nar le 12459 au cours de la sénescence	i te	'
de l'ar	acts voles de dominages à l'ADIV induités par le 12457 au cours de la senescence	143	ł
Introdu	Jetion	144	Ĺ
Résulte	ate	14-	г
Δ	Détection des fouers vH2AX au niveau de l'ADN de cellules traitées par différente	14.	'
11. CONC	entrations de 12459 induisant la sénescence ou l'anontose	ς 1Δ4	
R	Mise en évidence des voies de contrôle des dommages à l'ADN en condition de	14.	'
D. céna	scence	1/7	,
1	Etude de l'expression des protéines P53 et P21 par western blot	14/ 1// S	2
1. 2	Etude de l'expression des proteines i 55 et 1 21 par vesteril blot.	140 Pc	'
2. do	mmages à l'ADN	148	ç
u 0			٠.

C. Mise en évidence des voies de contrôle des dommages à l'ADN aux concentration	ns de	
12459 induisant l'apoptose.	150	
1. Mise en évidence par immunofluorescence de l'activation de P53.	151	
2. Mise en évidence par western blot de l'expression de P53 et de P21	152	
3. Etude de l'activation des kinases de contrôle du cycle cellulaire CHK1 et CHK	2 par	
western blot	154	
4. Etude de l'état de phosphorylation de P53 après traitement par 10 μ M de 12459). 155	
5. Identification des sérines phosphorylées responsables de l'activation de P53	155	
6. Etude de la phosphorylation de P38 MAPK après traitement des cellules A549	par	
$10 \ \mu M \ de \ 12459$	158	
D. Le traitement par 10 µM de 12459 permet l'induction de la protéine PPM1D	159	
1. Inhibition de l'expression de la protéine PPM1D par siRNA dans la lignée A54	.9.	
160		
2. Effets des siRNA PPM1D sur la formation de foci γ H2AX après traitement par	15	
μM de 12459	161	
E. Espèces réactives de l'oxygène et dommage de l'ADN.	163	
1. Effet d'un traitement par l'H2O2 sur le télomère.	163	
2. Inhibition des espèces réactives de l'oxygène et expression de PPM1D	164	
 Inhibition des espèces réactives de l'oxygène et formation de foci γH2AX 	165	
Discussion et Conclusion	167	
PARTIE 3	175	
Effet de la télomestaine sur le simple brin télomérique et sur la localisation de proté	ines	
télomériques	175	
Introduction	176	
PUBLICATION 2	177	
Résultats	178	
Discussion et Conclusion 17		
IV. CONCLUSION GENERALE		
V. BIBLIOGRAPHIE	189	
VI. ANNEXES	229	

Liste des figures

Figure I-1 : Structure primaire de l'ADN télomérique humain.	20
Figure I-2 : Le problème de la réplication terminale.	21
Figure I-3 : Schématisation du complexe shelterin sur l'ADN télomérique	23
Figure I-4 : Représentation schématique de la structure primaire de la protéine TRF1	24
Figure I-5 : Représentation schématique de la structure primaire de la protéine TRF2	25
Figure I-6 : Représentation schématique de la protéine hPOT1.	26
Figure I-7 : Représentation schématique de la structure du complexe télomérase	28
Figure I-8 : Structure et organisation des protéines de la famille TERT.	29
Figure I-9 : Structure secondaire et linéaire de hTR.	31
Figure I-10 : Modèle d'élongation processive par la télomérase	32
Figure I-11 : Hypothèse télomérique.	33
Figure I-12 : Schéma représentatif de la régulation transcriptionnelle de hTERT.	34
Figure I-13 : Représentation schématique du gène hTERT montrant les sites d'insertions (I1	à
I4) et de délétion (- α et - β) de l'épissage alternatif de ce gène	37
Figure I-14 : Représentation schématique du promoteur du gène hTR.	39
Figure I-15 : Modèles de structure des télomères.	40
Figure I-16 : Structure T-loop.	41
Figure I-17 : Modèle spéculatif de la formation de la T-loop par le complexe shelterin	41
Figure I-18 : Visualisation par microscopie électronique de la fixation de P53 sur un modèle	Э
d'ADN télomérique et de T-loop.	42
Figure I-19 : Régulation de la taille des télomères par les complexes shelterin	43
Figure I-20 : TIN2 fonctionne comme un régulateur de l'activité de la tankyrase	45
Figure I-21 : Modèle de la régulation de la taille du télomère par hPOT1 proposé par T. De	
Lange	48
Figure I-22 : Modèle de la régulation de la taille du télomère par hPOT1 proposé par T. De	
Lange	49
Figure I-23 : Le complexe TRF1 : TRF1-TIN2-PIP1-POT1.	50
Figure I-24 : Interconnexion entre TRF1, TRF2 et POT1.	51
Figure I-25 : Les structures G-quartet et G-quadruplexe.	52
Figure I-26 : Structure G-quadruplexe.	53
Figure I-27: Schéma représentant la formation d'un ADN G-quadruplexe pendant des	
évènements cellulaires normaux.	56
Figure I-28 : Schéma récapitulant les différentes stratégies visant à cibler la télomérase	63
Figure I-29 : Mécanisme de l'inhibition de la télomérase par stabilisation de G-quadruplexe	;
par des ligands spécifiques	69
Figure I-30 : Structure de la télomestatine	69
Figure I-31 : Structure du modèle le plus stable de l'interaction de la télomestatine avec la	
séquence télomérique humaine (Kim et al., 2002)	70
Figure I-32 : Formule de l'acridine Braco 19	71
Figure I-33 : Structure de la porphyrine TMpyP4	71
Figure 1-34 : Structure de la triazine 12459.	12
Figure 1-35: Modele de reconnaissance des cassures doubles brins par ATM et par ATR	/6
Figure 1-36 : P53 est au centre de la voie de reponse aux dommages de l'ADN	11
Figure 1-37 : Schema representatif de la regulation de CHK1 et CHK2 en condition de stress	S.
	/ð

Figure I-38 : Points de contrôle du cycle cellulaire	. 79
Figure I-39 : Modele de stabilisation de P53 Figure I-40 : Modifications post-traductionnelles de la protéine P53 humaine induites par le	. 82 35
dommages à l'ADN.	. 84
Figure I-41 : Rôles de PPM1D dans la boucle de rétrocontrôle négative des voies de	
dommage à l'ADN médiées par ATM et ATR par déphosphorylation de CHK1 et P53	. 88
Figure I-42 : Il existe deux types de sénescence chez les cellules de mammifères.	. 90
Figure I-43 : Les dysfonctionnements télomériques induisent l'arrêt du cycle cellulaire via	
P21 et l'entrée des cellules en sénescence.	. 92
Figure I-44 : Signalisation de la sénescence chez l'homme	. 94
Figure I-45 : Modifications morphologiques au cours de l'apoptose.	. 95
Figure I-46 : Classification des caspases apoptotiques chez les mammifères	. 97
Figure I-47 : Les protéines de la famille Bcl-2 1	100
Figure I-48 : Voie intrinsèque mitochondriale 1	105
Figure I-49 : Interconnexion des voies apoptotiques intrinsèques et extrinsèques par le cliva	ıge
de Bid	106
Figure II-1 : Principe de l'ARN interférence par siRNA.	129
Figure III-1 : Induction de la sénescence et de l'apoptose par le 12459 dans la lignée A549.	135
Figure III-2 · Détection des fovers vH2AX par immunofluorescence sur les cellules A549	155
traitées par 0.5. 1 et 5 uM de 12459 pendant 4 jours puis fixées au paraformaldéhyde	145
Figure III-3 · Détection des fovers vH2AX et de TRF1 par immunofluorescence sur les	175
cellules A 549 traitées par 0.5, 1 et 5 uM de 12459 pendant 4 jours puis fixées au	
naraformaldéhyde	146
Figure III-4 · Détection de la phosphorylation de H2AX par western-blot après traitement p	ar
différents temps d'incubation avec 10 µM de 12459	147
Figure III-5 · Expression de P53 et de P21 par western blot après traitement des cellules A5	349
nar 0.5 1 et 2µM de 12459	148
Figure III-6 : Expression des protéines P53, P21, CHK2 Tr68, CHK1 S317, P53 S15 et P53	;
S20 des cellules A549 en condition de sénescence.	149
Figure III-7 : Localisation par immunofluorescence de P53 dans les cellules A549 après	-
traitement par 10 uM de 12459, pendant 14 et 24 heures	151
Figure III-8 : A) Expression de P53 et de P21 par western blot après traitement des cellules	3
A549 par 10 μM de 124591	152
Figure III-9 : Analyse de la répartition dans le cycle cellulaire des cellules A549 traitées pa	ır
10 μM de 12459 aux jours 1, 2, 3 et 4 par cytométrie en flux	153
Figure III-10 : Expression par western-blot des protéines P53, CHK2 Thr68, CHK1 S317	
dans les cellules A549 traitées par 10 µM de 124591	154
Figure III-11 : Analyse par western blot de l'expression de P53 et de sa phosphorylation sur	r
les sérines sur des échantillons cellulaires traités par 10 µM de 124591	155
Figure III-12: Etude par western blot de la phosphorylation de P53 à partir d'extraits	
protéiques de cellules A549 traitées par 10 µM de 12459 1	156
Figure III-13 : Analyse par western blot de la phosphorylation de P53 sur la sérine 392 1	157
Figure III-14 : Etude par western blot de l'activation par phosphorylation de la P38 MAPK	
sur des extraits protéiques de cellules A549 traitées par 10 µM de 124591	158
Figure III-15 : Etude de l'expression de P53, PPM1D, CHK1 S317 par western blot sur des	
extraits protéiques de cellules A549 traitées par 10 µM de 12459 1	159
Figure III-16 : Expression par western blot de PPM1D des cellules A549, contrôles siRNA	et
siRNA PPM1D (4j) traitées par 0,5 mM de H ₂ O pendant 4 heures 1	160

Liste des tableaux

Tableau 1 : Structure primaire des télomères.Erreur ! Signet non défini.Tableau 2 : Régions d'interaction et fonction de certaines protéines associées à hTERT ethTR.Erreur ! Signet non défini.Tableau 3 : Protéines qui interagissent avec les G-quadruplexse in vitro... Erreur ! Signet non défini.

Situation du sujet

En dépit des progrès accomplis sur le plan thérapeutique et au niveau des techniques de dépistage (de plus en plus précoce), les effets secondaires des médicaments antitumoraux, les problèmes de résistance et l'échappement tumoral demeurent les principales causes d'échec dans le traitement des cancers.

La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques reste une des principales préoccupations des chercheurs en oncologie. Parmi ces nouvelles cibles figurent les télomères qui sont devenus un centre d'intérêt majeur depuis 8 dernières années (pour revue (Rezler *et al.*, 2002; Rezler *et al.*, 2003)). 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.

En effet, au cours de la division cellulaire des cellules somatiques, le processus de réplication du télomère est incomplet et aboutit à un raccourcissement à chaque cycle de division. Cette érosion de l'extrémité télomérique provoque un problème majeur pour la cellule (crise) en dessous d'une taille critique du télomère et aboutit à la sénescence ou l'apoptose. La télomérase, une enzyme capable de synthétiser l'ADN télomérique, permet à la cellule d'échapper à ce stade critique et de devenir immortelle. La télomérase est activée dans 85% des tumeurs humaines et, outre son rôle dans l'allongement des télomères, elle participe activement aux processus de tumorigénèse (Hahn *et al.*, 1999). Ces données font de la télomérase une cible particulièrement attractive pour la recherche de nouveaux agents antitumoraux. 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.

Plusieurs approches ont été proposées pour bloquer l'activité de la télomérase : inhiber l'activité enzymatique ou interagir avec les séquences télomériques pour bloquer la réaction d'élongation des télomères (Mergny *et al.*, 2002). La seconde voie ayant pour cible le télomère, plutôt que la télomérase, fait l'objet de la thématique de recherche de nôtre laboratoire depuis quelques années. Cette approche est basée sur la conformation particulière que peut adopter l'ADN télomérique.

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.

En 1938, pour la première fois, les généticiens Herman J. Müller et Barbara McClintock décrivent le télomère grâce à des expériences d'irradiations aux rayons X de *Drosophila melanogaster* et de maïs. Tous deux aboutirent aux mêmes conclusions: les extrémités naturelles des chromosomes étaient différentes de celles issues des sites de cassures des chromosomes. Les extrémités naturelles seraient protégées des phénomènes de réarrangement chromosomique, contrairement aux extrémités des cassures double brin (Muller,1938). McClintock rapporta en 1939 que les extrémités des chromosomes de maïs ayant subi des cassures double brin étaient capables de fusionner alors que les extrémités de ces chromosomes restaient stables (McClintock, 1939). En 1938, Muller donna le nom de télomère (du grec telos : fin et meros : la partie) aux extrémités naturelles protectrices des chromosomiques s'opèrent aboutissant à la mort cellulaire.

Dans les années 1970, James D. Watson décrivit le problème de la réplication terminale. En effet, pendant la réplication de l'ADN, la DNA polymérase DNA dépendante ne réplique pas complètement l'extrême partie terminale en 5' des chromosomes, ceci laissant une petite région du télomère non répliquée. Il pensa alors qu'il devait exister au sein de la cellule un mécanisme compensatoire capable de répliquer cette lacune terminale, à moins que le télomère se raccourcisse à chaque division cellulaire (Watson, 1972).

En 1961, Hayflick donne une description biologique du vieillissement. Il a montré que les cellules humaines diploïdes ont une capacité de division limitée de culture cellulaire, ainsi il définit la limite de Hayflick comme le nombre maximal de divisions que les cellules peuvent effectuer *in vitro* (Hayflick *et al.*, 1961). Une fois cette limite atteinte les cellules subissent des changements morphologiques et biochimiques qui déclenchent l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'entrée des cellules en sénescence (Shay, 1999 ; Reddel, 2000).

Puis, dans les années 1970, Aleksei Matveevitch Olovnikov établit le lien entre la sénescence cellulaire et les problèmes de réplication terminale. Il émet l'hypothèse que le raccourcissement télomérique correspond à une horloge interne du vieillissement. En effet, cette horloge régulerait le nombre de division cellulaire avant que les cellules ne rentrent en sénescence (Olovnikov, 1971). Cette théorie à été confirmée par Harley en 1990 avec l'observation d'une perte progressive du télomère dans des cellules en division cultivées *in vitro* (Harley *et al.*, 1990).

La télomérase, enzyme responsable du maintien et de l'allongement des télomères a été isolée en 1985 par l'équipe d'Elizabeth Blackburn (Greider 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, 1989). Au même moment, l'équipe de Greider observait que la télomérase était quasiment toujours absente des cellules somatiques normales (Harley et al., 1990). Quelques cellules de mammifères ne montrant aucune activité télomérase sont capables de maintenir la taille de leur télomères (Bryan et al., 1995; Rogan et al., 1995), ceci démontrant l'existence de mécanismes n'impliquant pas la télomérase pour la maintenance du télomère. Le maintien de la longueur des télomères est assuré par des mécanismes de recombinaisons entre les télomères, un mécanisme connu sous le nom de ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) (Bryan et al., 1997). L'activité ALT n'a exclusivement été détectée que dans des situations anormales incluant les tumeurs humaines, des lignées cellulaires humaines immortalisées et dans des lignées cellulaires murines dépourvues de télomérase (Bryan et al., 1995; Niida et al., 2000). Les cellules ALT possèdent des télomères apparemment longs (> 20 kb) et hétérogènes tandis que les tumeurs télomérase-positives possèdent des télomères plus courts (entre 4 et 15 kb).

2. Description et structure.

Les extrémités des télomères humains sont des structures nucléoprotéiques constituées de séquences d'ADN non codantes. Ces régions sont des répétitions en tandem de séquences hexanucléotidiques 5' TTAGGG 3' pouvant aller jusqu'à 25000 pb (Greider, 1996). Les télomères protègent les chromosomes des phénomènes de dégradation, de réarrangements, et de fusion avec les autres extrémités chromosomiques (Sandell *et al.*, 1993). En plus de leur rôle dans le maintien de la stabilité du chromosome, les télomères sont impliqués dans l'organisation spatiale du noyau et dans la séparation des chromosomes pendant la division cellulaire (Kirk *et al.*, 1997). Les télomères joueraient aussi un rôle sur la régulation transcriptionnelle de gènes localisés près des extrémités chromosomiques (Shore, 1995). De plus, le télomère empêche l'activation des protéines de contrôle du cycle cellulaire qui reconnaissent les dommages à l'ADN et qui déclenchent l'apoptose ou la sénescence.

Le séquençage de l'ADN télomérique chez les différentes espèces montre que la séquence d'ADN aux extrémités des chromosomes est relativement bien conservée (Tableau 1), ce qui démontre son importance fonctionnelle. Dans la plupart des cas, l'ADN télomérique est constitué de courtes régions répétées en tandem. Le nombre de répétitions varie selon les espèces, selon les individus et même entre les chromosomes d'une même cellule. Dans tous

les organismes étudiés, le brin riche en guanine (G-riche), qui correspond à l'extrémité 3', est plus long que le brin complémentaire riche en cytosine, créant ainsi une extension simple brin en 3' du chromosome.

Chez l'homme, l'ADN télomérique consiste en une région double brin qui varie de 10 à 15 kb et un extension simple brin d'environ 200 à 300 bases (Greider, 1996) (FigI-1).

La première séquence télomérique décrite fût celle du protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila* (Blackburn *et al.*, 1978). Les télomères de cet organisme comportent 50 -70 répétitions de la séquence TTGGGG/CCCAAA (T_2G_4/C_4A_2) et le brin G-riche correspond à l'extrémité 3'. La taille de l'extension 3' est de l'ordre de 12 à 16 nucléotides (Tableau1).

Organismes	Séquences répétées	Abréviation des répétitions		
Protozoaires				
Tetrahymena	TTGGGG	T_2G_4		
Oxytricha	TTTTGGGG	T_4G_4		
Euplotes	TTTTGGGG	T_4G_4		
Trypanosome	TTAGGG	T ₂ AG ₃		
Champignons				
Saccharomyces	TGTGGTGTGGG	(TG) ₁₋₆ TG ₂₋₃		
Plantes				
Arabidopsis	TTTAGGG	T ₃ AG ₃		
Silene	TTTAGGG	T ₃ AG ₃		
Vertébrés				
Homo sapiens	TTAGGG	T ₂ AG ₃		
Autres vertébrés	TTAGGG	T ₂ AG ₃		

 Tableau 1 : Structure primaire des télomères. MEDECINE/SCIENCES 2004 ; 20 : 207-12

-Chromosome---⁵TTAGGGTTAGGG(TTAGGG)_nTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG³ -Chromosome---³<u>AATCCCAATCCC(AATCCC)_nAATCCCAATCCC</u>⁵

Répétitions télomériques double brin ~ 15 Kb Extension télomérique simple brin (~200b)

Figure I-1 : Structure primaire de l'ADN télomérique humain.

L'ADN télomérique humain consiste en une région double brin qui varie de 10 à 15 kb et une extension simple brin d'environ 200 à 300 bases.

3. Le problème de la réplication terminale.

Le problème de la réplication terminale a été défini par Watson et Olovnikov au début des années 1970, quand ils ont observé que au cours la réplication, le brin répliqué de façon discontinue nécessitait la fixation d'une amorce pour permettre l'allongement par les ADN polymérases cellulaires. Ainsi, ce brin répliqué se raccourcirait une fois l'amorce ARN terminal dégradée.

La réplication de l'ADN s'effectuant toujours dans le sens 5'-3', la situation est donc différente sur les deux brins. Sur l'un, la fourche avance de 3' vers 5' et la chaine complémentaire peut être synthétisée directement en suivant la progression de la fourche : c'est la synthèse du brin précoce. Sur l'autre brin, par contre, il faut attendre que la fourche se soit ouverte pour permettre la synthèse en direction opposée à la progression de l'hélicase. La chaîne tardive est donc synthétisée de façon discontinue sous forme de fragments appelés fragments d'Okazaki, dont la longueur varie de 100 nucléotides chez les eucaryotes à 1000 nucléotides chez les procaryotes. Une amorce d'ARN est nécessaire pour le début de chaque fragment. Ces amorces sont ensuite excisées et remplacées par de l'ADN puisque la synthèse du fragment suivant a amené le 3'OH apparié nécessaire. En effet, du côté 5' du brin, l'ADN a été synthétisé à partir d'une amorce d'ARN, mais une fois cette amorce excisée, il n'y a pas de fragment plus tardif en amont permettant d'amorcer le comblage de la lacune. Ce nouveau brin est par conséquent plus court que son modèle du côté 5'. Comme il sert lui-même de modèle à la génération suivante, sa double hélice fille sera plus courte. Ceci se répétant à chaque division cellulaire, les chromosomes devraient être de plus en plus courts dans les cellules. Cependant, il existe l'enzyme télomérase, qui dans certains cas est activée, qui vient allonger le brin parental de son côté 3' en ajoutant, comme une ADN polymérase, des

nucléotides du 5' vers le 3', mais sans brin matrice : la télomérase possède elle même une matrice d'ARN qui lui sert de modèle pour synthétiser cette séquence (FigI-2).



Figure I-2 : Le problème de la réplication terminale.

L'ADN parental est répliqué (ADN nouvellement synthétisé) par un mécanisme semiconservatif. La réplication semi-conservative de l'ADN ne permet pas de régénérer une extension 3' simple brin à l'extrémité du brin avancé. En revanche, à l'extrémité du brin retardé, l'élimination de la dernière amorce d'ARN produit une courte extension simple brin. La création du substrat de la télomérase à l'extrémité du brin avancé ne peut se faire que par l'intervention d'une exonucléase 5'-3', alors que ce substrat est créé par défaut à l'extrémité du brin retardé. L'élongation se produirait, dans les deux cas, par l'intervention de la télomérase, sans que l'on sache actuellement si cet ajout a lieu avant ou après la réplication conventionnelle. M/S 2004 ;20 :207-12.

4. Le capuchon télomérique chez l'homme (shelterin).

Les télomères sont des complexes nucléoprotéiques spécialisés constitués de protéines spécifiques associées aux séquences TTAGGG des extrémités chromosomiques. Ce complexe appelé « télosome » ou « capuchon télomérique » ou « shelterin » (de Lange, 2005) permet à la cellule de faire la distinction entre des cassures double brin de l'ADN et les extrémités naturelles des chromosomes. En effet, un télomère dépourvu de son complexe protéique est reconnu par la machinerie cellulaire comme des cassures double brin, ce qui permet le déclenchement des voies de détection de dommages à l'ADN et l'activation des kinases des points de contrôle du cycle cellulaire. Ces complexes protéiques permettent ainsi la protection des extrémités chromosomiques vis-à-vis de l'activation des voies de reconnaissance de dommages à l'ADN et de l'action d'exonucléases impliquées dans les voies de réparation.

Le complexe shelterin (FigI-3) est constitué de six protéines, trois de ces protéines, TRF1, TRF2, POT1 reconnaissant directement les séquences TTAGGG, et trois autres, TIN2, TPP1 et RAP1 permettant l'interconnection entre les protéines du complexe shelterin.

Les constituants du complexe shelterin ont graduellement été identifiés lors de ces dix dernières années. La première protéine télomérique de mammifères, maintenant appelée TRF1, a été isolée grâce à sa capacité de fixation des séquences TTAGGG double brin *in vitro* (Zhong *et al.*, 1992; Chong *et al.*, 1995). TRF2 a été identifiée comme un paralogue de TRF1 dans les bases de données (Bilaud *et al.*, 1997; Broccoli *et al.*, 1997). TIN2 et RAP1 ont été mis en évidence par des technique de doubles hybrides avec TRF1 et TRF2 (Kim *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2000). TPP1, PTOP et PIP1 ont été découverts plus récemment grâce à leur capacité d'interagir avec TIN2. POT1 est la protéine la plus conservée du complexe shelterin et a été identifiée grâce à ses homologies de séquence avec la sous-unité TEBP α , un facteur se fixant aux extrémités télomériques chez le cilié *Oxytrichia nova* (Baumann *et al.*, 2001).



Figure I-3 : Schématisation du complexe shelterin sur l'ADN télomérique.

A) Six protéines (TRF1, TRF2, hRAP1, TIN2 et POT1) forment le complexe « shelterin » aussi appelé « télosome ». B) Domaines des différentes structures primaires des protéines de complexe shelterin Le complexe shelterin est constitué de six protéines, trois de ces protéines, TRF1, TRF2, POT1 reconnaissent directement les séquences TTAGGG, et trois autres, TIN2, TPP1 et RAP1 permettent l'interconnection entre les protéines du complexe shelterin. POT1 est associée à TRF1 par l'intermédiaire deTIN2 et TPP1. TIN2 possèdent un site de fixation à TRF1 et un autre à TRF2. Rap1 est associée à TRF2.(de Lange, 2005).

- TRF1 :

TRF1 (TTAGGG repeat factor 1) fixe l'ADN double brin linéaire et circulaire mais pas l'ADN simple brin (FigI-4). C'est une protéine de 60 kDa 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 Myb (Smith *et al.*, 1997). A son extrémité Nterminale se trouve un domaine acide pouvant servir de site de reconnaissance pour des protéines de régulation. L'expression d'un dominant négatif de TRF1 provoque l'élongation des télomères, ceci démontrant que la fonction première de TRF1 est de réguler la longueur des télomères (van Steensel *et al.*, 1997).



Figure I-4 : Représentation schématique de la structure primaire de la protéine TRF1. La protéine TRF1 possède un domaine de dimérisation TRFH, un domaine Myb de fixation à l'ADN et un domaine acide en N-terminale. Elle contient également une séquence d'adressage nucléaire NLS (nuclear localization signal).

- TRF2 :

TRF2 est une protéine essentielle du télomère qui interagit directement avec l'ADN double brin (FigI-5). Elle présente comme TRF1 un domaine Myb de reconnaissance à l'ADN, et fonctionne comme un homodimère grâce à son site TRFH. TRF2 possède, contrairement à TRF1 un domaine basique à son extrémité N-terminale. Le rôle principal de TRF2 est associé à la protection des extrémités chromosomiques en maintenant la structure des télomères. En effet, par introduction d'un dominant négatif de TRF2^{$\Delta B\Delta M$}, les cellules perdent leur capacité à distinguer les extrémités télomériques de l'ADN cassé. La libération de TRF2 au niveau du télomère induit un raccourcissement du simple brin télomérique, ce qui conduit à la formation de liaisons covalentes entre les télomères, observables sur des métaphases sous forme de fusions télomériques ou de chromosomes fusionnés (van Steensel *et al.*, 1998).



Figure I-5 : Représentation schématique de la structure primaire de la protéine TRF2. La protéine TRF2 possède un domaine de dimérisation TRFH, un domaine Myb de fixation à l'ADN et un domaine basique en N-terminale. Elle contient également une séquence d'adressage nucléaire NLS

- **POT1**:

POT1 (Protection Of Telomere 1) est la protéine du complexe shelterin se fixant à l'ADN télomérique simple brin (FigI-6). Cette protéine a été identifiée par similarité de séquence avec la protéine TEBPa de Oxytrichia nova, la première protéine de fixation du simple brin télomérique à avoir été caractérisée. POT1 possède à son extrémité N-terminale deux domaines OB (Oligonucleotide/ Oligosaccharide Binding Fold) lui permettant de reconnaître spécifiquement la séquence TAGGGTTAG comme séquence minimale de reconnaissance. La structure cristallographique de TEBPa met en évidence trois domaines OB fold (Horvath et al., 1998), deux impliqués dans la fixation à l'ADN et le dernier nécessaire à l'interaction avec TEBPB. POT1 possède à son extrémité C-terminale un domaine de reconnaissance à un complexe protéique associé à TRF1. Il est associé aux séquences doubles brin de l'ADN télomérique de part ses interactions avec des protéines de liaison TPP1 (PTOP/ TINT1/PIP1) et TIN2 (de Lange, 2005). En 2003 l'équipe de T. De Lange en 2003 (Loayza et al., 2003) montra que la surexpression d'une forme mutée de POT1 (tronquée au niveau de son domaine N-terminal OB fold) engendrait un raccourcissement du simple brin télomérique dans des cellules télomérases positives, alors que la surexpression de la forme entière de hPOT1 n'avait pas d'effet sur la longueur du télomère. Néanmoins d'autres équipes ont montré que la surexpression de la forme entière de hPOT1 permettait l'augmentation de la taille du simple brin télomérique par activation de la télomérase (Colgin et al., 2003; Armbruster et al., 2004; Gomez et al., 2006). Ces différentes conclusions indiquent que hPOT1 joue un rôle essentiel mais complexe dans la régulation de la taille du télomère.



Figure I-6 : Représentation schématique de la protéine hPOT1.

hPOT1 possède à son extrémité N-terminale deux domaines OB (Oligonucleotide/ Oligosaccharide Binding Fold) de fixation à l'ADN simple brin et un domaine d'interaction avec TRF1.

B. La télomérase.

1. Historique et introduction.

La découverte de la télomérase a résolu le problème de la réplication terminale chez les eucaryotes. En 1985, dans des extraits cellulaires de Tetrahymena, Greider et Blackburn (Greider et al., 1985)ont découvert une nouvelle activité enzymatique permettant de rajouter des répétitions en tandem, des séquences TTGGG, sur des amorces synthétiques de télomère. En effet. oligonucléotides d'ADN simple brin (TTGGGG)₄ les et TGTGTGGGTGTGTGGGGTGTGTGGGG, qui correspondent aux séquences télomériques respectivement de Tetrahymena et de la levure ont été utilisé comme amorces pour l'élongation par la télomérase. En revanche, les amorces (CCCCAA)₄ et deux séquences d'ADN non télomériques ne sont pas allongées par cette nouvelle enzyme. Ainsi, Greider et Blackburn avaient découvert la télomérase, qu'ils avaient préalablement décider d'appeler «telomere terminal transferase».

De cette façon, l'addition de séquences télomériques aux extrémités des chromosomes par la télomérase contrebalance la perte prévue des nucléotides durant le problème de la réplication terminale (Wellinger *et al.*, 1996), ou potentiellement d'autres dommages à l'ADN (von Zglinicki, 2002) aux extrémités télomériques.

La télomérase est un complexe ribonucléoprotéique avec une activité cellulaire de transcription inverse qui permet la synthèse d'un brin d'ADN télomérique dans le sens 5' 3' de l'extrémité distale des télomères, en copiant une courte amorce oligonucléotidique à partir d'une amorce d'ARN inclue dans le complexe (Greider *et al.*, 1989; Shippen-Lentz *et al.*, 1990; Yu *et al.*, 1990).

2. Structure de la télomérase.

La télomérase humaine est constituée de deux sous-unités formant un complexe protéique de 127 Kda, la télomérase transcriptase inverse (hTERT), et la sous unité d'ARN de 451 nucléotides, la composante ARN de la télomérase (hTERC) servant de matrice pour l'élongation du télomère. (Greider et al., 1989; Feng et al., 1995) (FigI-7). Ces deux composantes sont suffisantes pour reconstituer une activité télomérase in vitro (Weinrich et al., 1997; Masutomi et al., 2000). En plus de ces deux constituants, des études biochimiques et génétiques ont permis l'identification de plusieurs autres facteurs du complexe holoenzyme de la télomérase : Chez Saccharomyces cerevisiae, Est1p est indispensable pour la maintenance du télomère in vivo et permet le recrutement de la télomérase au niveau de l'extrémité chromosomique en se positionnant sur la matrice ARN (Pennock et al., 2001; Seto et al., 2002). Son orthologue humain hEST1 A se fixe sur la télomérase active et devrait être impliquée dans la protection et l'élongation du télomère (Reichenbach et al., 2003; Snow et al., 2003). La délétion chez la levure de Est3p affecte la maintenance du télomère (Lendvay et al., 1996; Lingner et al., 1997). De plus, l'hétérodimère Ku, impliqué dans la réparation des chromosomes est retrouvée au niveau de la matrice ARN de la télomérase (Stellwagen et al., 2003). Chez Tetrahymena, de récents travaux ont permis d'identifier quatre protéines copurifiées avec la télomérase. Dans les cellules de mammifère, TEP1 est aussi une protéine associé à la télomérase bien qu'elle ne soit pas indispensable pour l'activité de la télomérase (Liu et al., 2000). Définir le rôle de ces protéines accessoires au niveau du télomère et l'activité de la télomérase reste des sujets d'étude en pleine expansion.

A

B

TELOMERASE (S. cerevisiae) TELOMERASE (Homo Sapiens)

Figure I-7 : Représentation schématique de la structure du complexe télomérase.

A) Chez S.cerevisiae. B) Chez l'homme. 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). Des analogues de ces protéines ont été retrouvés chez l'homme, parmi lesquelles Est1A, Est1B. Chez l'homme la dyskérine est associée au motif H /ACA de la sous-unité d'ARN. (Smogorzewska et al., 2004).

a) La sous-unité catalytique hTERT :

Le gène codant la protéine TERT a initialement été cloné à partir de la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae* puis à partir du protozoaire cilié Euplotes aediculatus (Lendvay *et al.*, 1996; Lingner *et al.*, 1997). Tous les membres de la famille TERT possèdent les septs motifs conservés de la transcriptase inverse universelle du VIH-1 dans leur région centrale (FigI-8). Toutefois une assez large insertion entre les motifs A et B' permettent de les distinguer. En plus de leur domaine transcriptase inverse, TERT possède une large extension d'environ 400 acides aminés en N-terminal nommée NTE (acid Nterminal extension) et une courte extension en C-terminal d'environ 150-200 acides aminés nommée CTE (C-terminal extension).





Figure I-8 : Structure et organisation des protéines de la famille TERT.

L'organisation des protéines de la famille TERT est illustrée pour Tetrahymena thermophila (tTERT), Saccharomyces certificat (ScEst2p), Homo sapiens ((hTERT), Plasmodium falciparum (PfTERT) et Caenorhabditis elegans (CeTERT), en comparaison avec la transcriptase inverse du HIV-1 (HIV1-RT). Les caractéristiques des protéines TERT incluent les motifs RT (reverse transcriptase) (1,2, A, B', C, D et E), le motif T télomérase-spécifique et les extensions C et N terminales (NTE, CTE). IFD désigne une insertion télomérasespécifique dans le domaine « finger » de la RT, entre les motifs conservés A et B'. Les motifs RT sont réprésentés en orange/rouge. Les domaines de forte affinité de fixation à l'ARN sont indiqués en bleu. Le domaine N-terminale, incluant des domaines de faible affinité pour l'ARN est illustré en vert. Les domaines d'interaction de TERT à d'autres protéines sont aussi représentés. RID = Interaction Domain. (Autexier et al., 2006).

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 de la télomérase 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?
1.22	nt 64–222	hTR processing, localization?

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

b) La sous-unité ribonucléotidique hTR :

hTR comporte 451 nucléotides dont 11 constituent la matrice pour la synthèse des répétitions télomériques (Chen *et al.*, 2000) (FigI-9). Elle est susceptible d'être rétro transcrite ceci conduisant à l'addition d'une ou plusieurs copies du motif d-GGTTAG à l'extrémité 3' du télomère. Le temps de demie-vie de hTR varie entre 4 et 32 jours (Yi *et al.*, 1999). hTR présente une homologie de séquence limitée entre les différentes espèces, or quatre domaines structuraux sont remarquablement conservés au cours de l'évolution.

• Le domaine pseudo-nœud qui est essentiel pour son assemblage avec hTERT (Gilley *et al.*, 1999).

• Les domaines CR4-CR5 et CR7 qui sont impliqués dans la stabilisation de hTR, dans sa localisation cellulaire et pour son assemblage avec hTERT et d'autres composants.

•Le domaine de type H/ACA qui se situe à l'extrémité 3'et qui permet l'accumulation et la localisation de hTR ainsi que sa maturation.

La matrice ARN de la télomérase est transcrite par la Pol III et contient un petit domaine RNP nucléolaire (snoRNP). Comme pour tous les autres complexes SnoRNP, l'assemblage de la télomérase s'effectue dans le nucléole (Collins *et al.*, 2002). L'assemblage de la télomérase nécessite les protéines Hsp90 et p23 et l'interaction avec la dyskerine, ou d'autres protéines snoRNP (Mitchell *et al.*, 1999; Pogacic *et al.*, 2000). Des anomalies dans la structure de hTERT ou de la dyskerine, qui est une protéine nucléolaire ayant une capacité de fixation à l'ARN, sont responsables du syndrome « dyskeratose congénitale » qui touche la moëlle osseuse et la peau. Ces deux syndromes présentent un défaut dans l'assemblage de la télomérase, ce qui déclenche une réduction de la concentration de télomérases actives et donc un raccourcissement prématuré du télomère. (Mitchell *et al.*, 1999; Vulliamy *et al.*, 2001). L'expression d'un antisens hTR conduit à un arrêt de croissance lié à une altération du télomère et l'induction d'une apoptose spontanée (Zhang *et al.*, 2003).



Figure I-9 : Structure secondaire et linéaire de hTR.

hTR présente plusieurs domaines conservés, les domaines pseudo-nœud, CR4-5, le domaine de type H/ACA et CR7 (Autexier *et al.*, 2006).

3. Réplication des télomères par la télomérase.

L'immortalisation cellulaire ou la réplication à l'infinie nécessite que les télomères ne se raccourcissent pas. L'activité catalytique de la télomérase induit le rallongement de l'extrémité 3'simple brin des télomères par un mécanisme processif et contribut ainsi à l'immortalisation cellulaire. L'allongement des télomères se fait en trois étapes (FigI-10). La première consiste en une en une reconnaissance de l'extrémité 3' du télomère. La deuxième consiste en une élongation processive de l'extrémité 3', via la rétro-transcription de hTR. La

troisième étape est celle de la translocation du complexe télomérase afin que plusieurs cycles d'addition de nucléotides puissent avoir lieu.



Figure I-10 : Modèle d'élongation processive par la télomérase

L'extension processive par la télomérase nécessite plusieurs étapes pour la télomérase humaine. (a) Premièrement, l'ADN télomérique est reconnu par le complexe ribonucléoprotéique de la télomérase qui consiste au minimun en la protéine TERT et la matrice ARN, l'extrémité 3' de l'ADN formant un hybride avec la matrice ARN. (b) La matrice ARN sert d'amorce pour ajouter les nucléotides en 3'. (c) translocation de la télomérase qui repositionne la matrice ARN. (d) nouveau cycle d'élongation par la télomérase (Autexier et al., 2006).

L'activité de la télomérase est détectée en fin de phase S ou en phase G2/M mais pas en phase G1. Chez *S.cerevisiae* son activité semble être couplée à la réplication des télomères (Diede *et al.*, 1999; Marcand *et al.*, 2000).

C. La régulation de la télomérase :



Figure I-11 : Hypothèse télomérique.

L'activité télomérase est régulée négativement dans la majorité des cellules humaines, ceci menant à un raccourcissement des télomères jusqu'à un stade ou les cellules ne peuvent plus se diviser (stade de mortalité 1 (M1) ou sénescence réplicative). L'arrêt de la croissance cellulaire en M1 est médiée par les voies de signalisation de dommage à l'ADN. En revanche certaines de ces cellules peuvent échapper à ce stade par inactivation de certaines protéines indispensables au contrôle du cycle cellulaire. Il s'en suit un raccourcissement encore plus prononcé des télomères puis une mort cellulaire massive (stade de mortalité 2 (M2) ou crise). Quelques rares cellules peuvent échapper à ce stade M2 en maintenant la longueur de leur télomère par réactivation de la télomérase. Ces cellules deviennent alors immortelles et cancéreuses. En effet, 90% de toutes les tumeurs humaines réexpriment la télomérase. (Zimmermann et al., 2007).

1. Régulation de la télomérase via l'expression de hTERT.

a) Activation du promoteur de hTERT.

Dans les cellules humaines le premier niveau de régulation de la télomérase se fait par régulation transcriptionnelle de hTERT. La transfection d'un vecteur contenant l'ADNc de hTERT à l'intérieur de fibroblastes humains aboutit à leur immortalisation (Bodnar *et al.*, 1998; Counter *et al.*, 1998; Counter *et al.*, 1998). Ces cellules ont des télomères allongés, un caryotype apparemment normal et n'expriment pas de marqueurs de tumorigénicité (Jiang *et al.*, 1999; Morales *et al.*, 1999). Ainsi cette immortalisation des cellules par introduction de

hTERT généra un nouveau matériel cellulaire de capacité de réplication indéfini pour de diverses études médicales. A l'inverse, des cellules télomérase positives dans lesquelles ont été introduites une télomérase mutée perdent leur immortalité, ceci confirmant une nouvelle fois le lien étroit entre l'immortalité cellulaire et le maintien de la longueur du télomère. De plus, la perturbation de la longueur du télomère par un mutant de hTERT agissant comme un dominant négatif restaure la durée de vie limitée des cellules cancéreuses associée à une perte de tumorigénicité (Hahn *et al.*, 1999; Herbert *et al.*, 1999).

Le niveau d'expression de l'ARNm de hTERT est corrélé au niveau d'activité de la télomérase(Counter *et al.*, 1998; Counter *et al.*, 1998), ceci laissant suggérer que l'expression de hTERT est suffisante pour permettre l'expression d'une activité télomérase dans les cellules tumorales.



Figure I-12 : Schéma représentatif de la régulation transcriptionnelle de hTERT.

Les mécanismes d'activation (en noir) et de répression (en blanc) y sont représentés. c-Myc forme un complexe avec Max et se fixe aux boîtes E sur le promoteur de hTERT. Ce complexe est la cible de nombreux mécanismes d'activation ou de répression de la transcription de hTERT. Er81 est un oncogène membre de la famille du facteur de transcription Ets qui régule les voies de signalisation impliquant des oncogènes. Er81 est un régulateur positif de la transcription de hTERT. L'intégration de génome viral est aussi un cis-régulateur (Newbold, 2002).

La régulation de la transcription de hTERT se fait de façon très complexe (FigI-12). Les principaux mécanismes activateurs qui régulent la transcription de hTERT sont :

• <u>Les hormones stéroïdes à récepteurs nucléaires</u> : les œstrogènes régulent positivement la croissance cellulaire dans plusieurs cas de tumeurs, en particulier dans les tumeurs mammaires. Les anti-oestrogènes comme le tamoxifène sont souvent utilisés dans le

traitement des cancers du sein. Un des effets transformant des oestrogènes serait l'activation de l'expression du gène hTERT. En effet il stimule l'expression endogène de hTERT et induit l'activité télomérase (Kyo *et al.*, 1999). Le promoteur de hTERT contient deux sites qui fixent le récepteur au œstrogène (ER). De même, la progestérone active la transcription de hTERT dans les cellules issues de cancer du sein.

• Les protéines se fixant aux boîtes E :

Les boîtes E (CACGTG) sont des sites de fixation pour les facteurs de transcription Myc/Max/Mad, Max y jouant un rôle central. Max peut soit s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec Myc (complexe activateur de transcription) ou Mad (complexe répresseur de transcription). Sur le promoteur de hTERT deux boîtes E ont été identifiées. Ces boîtes régulent la fixation et la transactivation de Max/Myc (Greenberg *et al.*, 1999; Horikawa *et al.*, 1999; Takakura *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 1999). Ces deux boîtes régulent aussi négativement la transcription de hTERT par fixation de Mad.

Il existe sur le promoteur de hTERT deux sites de fixation canoniques et trois dégénérés pour le facteur de transcription Sp1, la mutation de Sp1 réduisant la transcription de hTERT. De façon intéressante c-Myc coopère avec Sp1 pour activer le promoteur de hTERT et ces deux facteurs de transcription sont surexprimés quand les cellules sont en sénescence réplicative (Kyo *et al.*, 2000). Toutefois Sp1 et la protéine Sp3 sous certaines conditions recrutent des histones désacétylases pour inhiber le promoteur de hTERT (Won *et al.*, 2002). Le gène c-Myc est régulé négativement par la voie de signalisation TGF- β / Smad (Chen *et al.*, 2002; Yagi *et al.*, 2002). Ceci explique donc le fait que la stimulation des cellules par le TGF- β peut supprimer l'expression de hTERT (Zhu *et al.*, 1996; Katakura *et al.*, 1999), et donc exercer son effet antitumoral.

D'autres protéines comme les USF (upstream simulatory factor) se fixent sur les boîtes E et sont capables d'activer la transcription de hTERT (Yago *et al.*, 2002; Goueli *et al.*, 2003).

Cependant il existe sûrement d'autres protéines capables de se fixer sur les boîtes E dont le rôle reste à préciser :

• Les protéines ETS :

Les protéines ETS sont une famille de facteurs de transcription caractérisée par un domaine de fixation à l'ADN qui est conservé. Les deux protéines les plus importantes sont Ets1 et Ets2 et sont activées par phosphorylation par les MAP kinase qui sont elles-mêmes activées par le récepteur à l'EGF et par son homologue le proto-oncogène HER2/Neu (Yarden *et al.*, 2001). La stimulation des cellules par l'EGF mène à la surexpression de hTERT (Maida *et al.*, 2002). Les oncogènes HER2/Neu, Ras et Raf permettent tous l'activation des MAP kinases et de leur substrat, le facteur de transcription ER81, cette cascade permettant l'activation transcriptionnelle de hTERT.

• Les activateurs viraux :

En s'intégrant dans le génome l'ADN viral peut déclencher une expression inappropriée de gènes. Il a été démontré que le virus de l'hépatite B permettait l'activation de l'expression de hTERT. De plus, des protéines virales peuvent contribuer directement à l'activation du gène hTERT.

b) Répression du promoteur de hTERT :

Le promoteur de hTERT est riche en séquence CG localisé sur un îlot CpG, donc est susceptible d'être régulé par des méthylations. Or, aucune corrélation n'a pu être établie entre la méthylation du promoteur de hTERT et l'activité télomérase, ceci démontrant que la méthylation des CpG n'est pas la cause de la répression de la transcription de hTERT dans la plupart des cellules somatiques (Devereux *et al.*, 1999; Dessain *et al.*, 2000; Oikonomou *et al.*, 2007). La méthylation reste tout de même importante pour la régulation négative de la transcription de hTERT dans certaines lignées cellulaires (Bechter *et al.*, 2002; Lopatina *et al.*, 2003) et de façon inattendue dans quelques circonstances l'hyperméthylation contribuerait à l'activation du promoteur d'hTERT (Guilleret *et al.*, 2002). La méthylation du promoteur d'hTERT suggérerait l'implication de modifications au niveau des histones qui réguleraient l'expression du gène hTERT. En effet, l'expression d'hTERT dans les lignées télomérase positives est associée à une hyperacétylation des histones H3 et H4 et de la méthylation de la lysine 20 de l'histone H3 (Atkinson *et al.*, 2005).

Plusieurs facteurs protéiques ont été identifiés comme répresseur de transcription de hTERT. WT1 (Wilm's tumor supressor 1) se fixe sur un site du promoteur de hTERT et inhibe la transcription (Oh *et al.*, 1999). De la même façon la protéine MZF-2 (myeloid specific zinc finger protein 2) interagit avec un cluster de quatre sites du promoteur de hTERT et régule négativement son activité (Fujimoto *et al.*, 2000). P53 serait un répresseur de l'expression de hTERT mais il n'a jamais été réellement prouvé que P53 se fixe sur le promoteur de hTERT. Il semblerait qu'il interagisse avec la protéine Sp1 en l'empêchant de se fixer sur le promoteur de hTERT (Xu *et al.*, 2000). Le facteur de transcription E2F1
possède deux sites de fixation sur le promoteur de hTERT et permet la réduction d'activité du promoteur d'hTERT dans des cellules squameuses de carcinome humain (Crowe *et al.*, 2001) De plus, E2F1 recrute la protéine du rétinoblastome (Rb) au niveau du promoteur d'hTERT ceci suggérant que Rb participerait à la régulation négative de la transcription d'hTERT (Nguyen *et al.*, 1999; Crowe *et al.*, 2001). Deux autres protéines impliquées dans la répression de hTERT sont SIP1, un facteur de transcription de TGF- β , et Menin, un suppresseur de tumeur qui *in vivo* se fixe sur le promoteur de hTERT (Lin *et al.*, 2003).

c) Epissage alternatif de l'ARNm de hTERT.

Chez l'homme le gène hTERT est susceptible de subir un épissage alternatif résultant en différents transcrits actifs ou inactifs, ceci permettant une activation ou inhibition de l'activité télomérase (FigI-13).



Figure I-13 : Représentation schématique du gène hTERT montrant les sites d'insertions (I1 à I4) et de délétion (- α et $-\beta$) de l'épissage alternatif de ce gène

L'épissage alternatif de hTERT conduit à l'apparition d'une forme $-\alpha$ qui présente une délétion de 36 nucléotides à l'extrémité 5' de l'exon 6, une forme $-\beta$ dans laquelle manque les exons 7 et 8 (182 pb), une forme $-\alpha$ et $-\beta$ et des formes d'insertion comme I₁ dans laquelle 38 nucléotides sont insérés dans l'intron 4, I₃ avec une insertion de 159 nucléotides dans l'intron I₄, I₃ avec une insertion dans l'intron I₁ et I₄ avec une insertion d'une partie des exons 15 et 16 dans l'exon 14 (Cong et al., 2002). Les formes $-\alpha$ et $-\beta$ présentent ainsi des délétions dans la région RT de hTERT ce qui conduit à une inhibition d'activité catalytique de la télomérase. Les variants I₁ à I₄ présentent des insertions en aval de la région RT et forment un produit tronqué de la protéine ne présentant pas d'activité biologique fonctionnelle (Gomez et al., 2004).

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 trouvent sous la forme $+\alpha +\beta$, 80 à 90% sous la forme $+\alpha -\beta$, 5 à 15% sous la forme $-\alpha -\beta$ et moins de 1% sous la forme $-\alpha +\beta$ (Yi *et al.*, 2001). En 2003, le groupe de Tsukada a découvert une troisième forme d'épissage alternatif (la forme $-\gamma$) 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 *et al.*, 2003).

d) Régulation post-traductionnelle de hTERT :

La sous-unité hTERT de la télomérase est une phosphoprotéine dont l'activité est modulée par une pléthore de protéines kinases. La protéine kinase C (PKC) est une sérine/thréonine kinase impliquée dans de nombreux processus physiologiques et entre autre dans l'activation de hTERT par phosphorylation. De façon inverse la protéine phosphatase 2A (PP2A) inhibe l'activité télomérase. La proteine kinase B (PKB ou Akt) est aussi impliquée dans la sur-régulation de l'activité télomérase et il semblerait que la télomérase soit un substrat de Akt au cours des processus d'apoptose, de survie et de prolifération de cellules au cours du vieillissement et de la tumorigénèse. Enfin la tyrosine kinase c-abl activée lors de dommages à l'ADN s'associe et phosphoryle hTERT induisant l' inhibition de la télomérase pour revue (Mergny *et al.*, 2002).

2. Régulation de la télomérase via l'expression de hTR.

A l'inverse d'hTERT, hTR n'est pas un facteur limitant pour la télomérase dans le sens ou son expression dans les cellules somatiques normales est retrouvée de façon basale et constitutive, et en quantité plus importante dans les cellules cancéreuses (Feng *et al.*, 1995).

Le promoteur proximal du gène de l'ARN de la télomérase contient quatre sites de fixation au facteur de transcription Sp1 et une boîte CCAAT (FigI-14). Deux des sites de fixation en amont de cette boîte régissent la régulation négative de la transcription alors que les deux autres sites permettent une régulation positive. Néanmoins la mutation de ces quatre sites permettait une activité basale de transcription due à la boîte CCAAT, ceci suggérant que le facteur nucléaire Y (NF-Y) est un régulateur fondamental de la fonction du promoteur hTR (Zhao *et al.*, 2003). NF-Y a un rôle central dans la transcription de hTR. C'est un activateur de transcription hétérotrimérique composé de trois sous-unités (NF-YA, B et C), qui se complexe à la boîte CCAAT. Ces sous-unités sont capables de participer à la formation des octamères d'histone (Motta *et al.*, 1999). Toutefois, des études menées par plusieurs laboratoires ont suggéré que NF-Y interagirait avec d'autres facteurs de transcription ou protéines nucléaires *in vivo* et *in vitro* (Framson *et al.*, 1993; Zwicker *et al.*, 1995). NF-YB et NF-YC interagissent avec des protéines se liant à la TATA box *in vitro* (Bellorini *et al.*, 1997)

et NF-Y aurait un rôle structural en permettant le rapprochement entre TBP et/ou TAFII et des activateurs de la machinerie générale de transcription générale contenant la polymérase II (Coustry *et al.*, 1998; Frontini *et al.*, 2002). Plus récemment, l'équipe de Nicol Keith a montré que la protéine Mdm2 (mouse double minute 2) se fixe sur le promoteur de hTR *in vivo* et inhibe son activité par plusieurs mécanismes. Mdm2 inhiberait l'activation par Sp1 via pRB ou l'activation par NF-Y (Zhao *et al.*, 2005).



Figure I-14 : Représentation schématique du promoteur du gène hTR. Les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 activent ou inhibent l'activité du promoteur de hTR. Quatre sites dénommés Sp1.1, Sp1.2, Sp1.3 et Sp1.4 ont été détectés sur la partie proximale du promoteur. Le facteur nucléaire Y (NF-Y) est un activateur de transcription hétérotrimérique composé de trois sous-unités (NF-YA, B et C) qui se complexe à la boîte CCAAT. (Zhao et al., 2003).

De même que pour hTERT, l'expression d'hTRdans les lignées télomérase positives est associée à une hyperacétylation des histones H3 et H4 et de la méthylation de la lysine 20 de l'histone H3 (Atkinson *et al.*, 2005).

Les lignées ALT sont des modèles intéressants pour l'étude de la régulation de la transcription de gène tel que hTR. L'équipe de Nicol Keith a montré que le promoteur de hTR dans ces lignées contenait des îlots CpG méthylés responsables de la répression de ce gène (Glasspool *et al.*, 2005). L'absence d'expression d'hTR et d'hTERT dans ces lignées est associée à une hypoacétylation des histones H3 et H4 et à une méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (Atkinson *et al.*, 2005). La méthylation de la lysine 20 de l'histone H4 sur les promoteurs d'hTR et d'hTERT n'est pas liée à l'expression de ces gènes mais est spécifiquement retrouvée dans les lignées ALT. Cette méthylation est un marqueur des lignées ALT (Atkinson *et al.*, 2005).

D. La régulation des télomères.

1. Structure en T-loop et protection des télomères.

L'extrémité 3' simple brin du télomère joue un rôle important dans la structure et la régulation de la longueur des télomères (Henderson *et al.*, 1989). L'intégrité et la longueur du simple brin télomérique sont activement contrôlés par la télomérase et les protéines du complexe télomérique (Smogorzewska et al., 2000; Blackburn, 2001). 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 (Greider, 1999; Ancelin et al., 2002) (FigI-15). Cependant, un autre modèle en boucle appelé « T-loop » (Telomeric Loop) a été proposé par JD Griffith en 1999 à partir d'études de microscopie électronique qui ont permis de visualiser une structure en boucle définie comme la T-loop (Griffith 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 Dloop (Displacement loop) (FigI-16 A et B). La formation de cette structure serait permise par une taille relativement longue du simple brin télomérique, et par l'association avec certaines protéines du complexe shelterin. Il est suggéré qu'au moins 100 nucléotides de l'extrémité simple brin participeraient à la formation de cette T-loop (Griffith et al., 1999; Stansel et al., 2001). Cette structure permettrait d'éviter la dégradation du télomère par des nucléases et empêcherait les fusions télomériques (de Lange, 2004).



Figure I-15 : Modèles de structure des télomères.

Modèle classique d'une extrémité chromosomique avec une courte extension 3' et un complexe protéique protégeant l'ADN chromosomique (modèle linéaire). M/S 2004 ; 20 : 207-12.



Figure I-16 : Structure T-loop.

A) Image de T-loop obtenue en microscopie électronique en présence de TRF2 (Griffith et al., 1999). B) Le modèle de la structure télomérique en T-loop : Les télomères de mammifère se terminent par de larges boucles, les t-loops (telomere loops). Le double brin télomérique se replie sur lui-même, l'extension 3' simple brin s'insère dans la portion double brin et engendre la D-loop (displacement loop) (Greider, 1999), M/S 2004 ; 20 : 207-12.

In vitro, la formation de cette structure en T-loop est rendue possible par les protéines du complexe shelterin qui entre autre ont des activités remodelantes (FigI-17). TRF2 peut restructurer un substrat télomérique artificiel en loop (Griffith *et al.*, 1999; Stansel *et al.*, 2001). Toutefois, *in vivo*, il semblerait que TRF2 nécessite l'intervention d'autres composants pour générer la formation de T-loop. En effet la protéine TRF2 favorise la formation de la T-loop et l'altération des fonctions de TRF2 induit la dégradation du simple brin télomérique (Stansel *et al.*, 2001).



Figure I-17 : Modèle spéculatif de la formation de la T-loop par le complexe shelterin. TRF1 a la capacité de courber, replier l'ADN télomérique in vitro et pourrait potentiellement permettre le repliement du télomère. Ensuite, TRF2 pourrait favoriser le maintien de la structure. (de Lange, 2005).

In vitro la protéine P53 est capable de s'associer au simple brin télomérique et aux jonctions des T-loop (FigI-18)(Stansel *et al.*, 2002). Cette localisation de P53 au niveau des jonctions des T-loop est indépendante de la présence de TRF2. Néanmoins l'addition de P53 augmente de deux fois la formation de la T-loop par TRF2 in vitro. Ces résultats suggèrent ainsi que P53 serait impliquée dans la maintenance de la structure télomérique.



Figure I-18 : Visualisation par microscopie électronique de la fixation de P53 sur un modèle d'ADN télomérique et de T-loop.

A) P53 s'associe avec une grande fréquence aux extrémités de l'ADN B) P53 localise avec une forte spécificité au niveau de la jonction de la T-loop. (Stansel et al., 2002).

2. Régulation de la taille des télomères par les protéines du complexe shelterin.

Les protéines du complexe shelterin constitueraient un contrôle en cis de la régulation de la taille du télomère, où l'inhibition de la télomérase serait un processus réalisé de façon stoechiométrique par la quantité de protéines du complexe shelterin fixée au niveau du télomère. Puisque la quantité de protéines du complexe shelterin fixée au niveau du télomère est proportionnelle au nombre de répétition des séquences TTAGGG, les télomères les plus longs ont une probabilité plus grande d'être inhibés par la télomérase. Ce contrôle par la télomérase nécessite l'activité fixatrice de la protéine hPOT1 sur le télomère simple brin (Loayza *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004), la fixation de hPOT1 réduisant l'accès de la télomérase au télomère.



Figure I-19 : Régulation de la taille des télomères par les complexes shelterin.

La formation du complexe shelterin permettrait le repliement de l'extrémité chromosomique sous forme de T-loop, empêchant l'accès de la télomérase au niveau de l'extrémité 3' du télomère, ceci permettant la transition d'un état protégé du télomère vers un état accessible à télomérase. Lors de la phase S du cycle cellulaire, les télomères se retrouveraient sous forme dépliée ou linéaire, la T-loop ayant été déstructurée par des facteurs spécifiques. Sous cette conformation les télomères de longue taille comporteraient un nombre important de protéines du complexe shelterin et donc de protéines hPOT1 fixées à l'extrémité simple brin du télomère qui serait alors masqué, donc inaccessible à la télomérase. A l'inverse les télomères courts ne présenteraient qu'un nombre limité de protéines du complexe shelterin, et le nombre limité de hPOT1 fixées à l'extrémité du simple brin laisserait celui-ci accessible à la télomérase. (de Lange, 2005).

a) TRF1 dans la régulation des télomères.

L'inhibition de la fonction de TRF1 par un dominant négatif résulte en un allongement du télomère, montrant que TRF1 est impliqué dans la régulation de l'activité télomérase (van Steensel *et al.*, 1997). La surexpression de TRF1 provoque un raccourcissement uniquement dans les cellules exprimant la télomérase (van Steensel *et al.*, 1997). Les fonctions de TRF1 sont principalement régulées par les poly(ADP-ribose) polymérases TANK1 et TANK2 (ou tankyrase 1 et 2) (Smith *et al.*, 1998; Kaminker *et al.*, 2001), par TIN2 (TRF1 Interacting Nuclear Protein) (Kim *et al.*, 1999) et par PINX1 (Zhou *et al.*, 2001) (FigI-20).

• Les tankyrases :

L'ADP ribosylation de TRF1 par les tankyrases inhibe sa fixation *in vitro* sur des séquences télomériques (Smith *et al.*, 1998), ceci suggérant que, *in vivo*, les tankyrases devraient être des régulateurs positifs de l'élongation des télomères, apparemment en inhibant TRF1. L'équipe de T. De Lange en 2000 a montré que la surexpression de tankyrases dans des cellules humaines télomérase positive engendrait une diminution de la quantité de TRF1 sur les télomères en interphase et une élongation graduelle et progressive des télomères

(Smith *et al.*, 2000). Ainsi l'ADP ribosylation de TRF1 permettrait de maintenir le complexe télomérique ouvert, favorisant l'accès à la télomérase.

• <u>TIN2</u> :

TIN2 interagit avec TRF1 sur la région d'homodimérisation de TRF1 et peut exister dans un complexe TRF1-hPOT1 (Loayza *et al.*, 2003). La surexpression de la forme sauvage de TIN 2 permet une perte lente des télomères alors que la surexpression d'une forme mutée encore capable de fixer TRF1 mais dépourvu de son domaine N-terminal permet l'élongation des télomères (Rubio *et al.*, 2002). Ces observations permettent de conclure que TIN2 est un régulateur négatif de l'élongation des télomères par la télomérase par sa capacité à protéger TRF1 de son inactivation par les tankyrase1 et 2. Le complexe TRF1 régule négativement la télomérase en permettant la fixation de hPOT1 au niveau de la partie simple brin du télomère. Ainsi l'inhibition de la télomérase aux extrémités terminales de télomères « allongés » est régi par la capacité de TRF1 à recruter hPOT1. De cette façon, les télomères les plus longs contiennent plus de TRF1, TIN 2 et POT 1 (Loayza *et al.*, 2003).

• <u>PINX 1</u> :

PINX 1 est une protéine qui interagit avec le complexe PIN 2/ TRF1. Sa surexpression conduit à un raccourcissement des télomères lié a l'inhibition de la télomérase alors que sa déplétion augmente significativement l'activité télomérase et la longueur des télomères. *In vitro* et *in vivo*, PINX 1 se fixe à hTERT et *in vivo* inhibe son activité. Dans ces conditions il semblerait que la régulation des télomères par PINX1 ait lieu directement en affectant l'activité de la télomérase contrairement aux autres protéines qui modulent la longueur des télomères sans affecter l'activité de la télomérase (Zhou *et al.*, 2001).



Figure I-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 POT1 au simple brin télomérique. Le simple brin devient alors accessible à la télomérase (Riou et al., 2005).

b) TRF2 dans la régulation des télomères.

Le rôle de TRF2 dans la régulation de la taille du télomère est difficilement examinable puisque l'inhibition de ces fonctions à l'aide d'un dominant négatif TRF2^{$\Delta B\Delta M$} conduit immédiatement à un phénotype délétère. Ce phénotype serait la conséquence de la reconnaissance du simple brin télomérique déstructuré par la machinerie de détection de dommage à l'ADN ou de l'intervention de la machinerie de réparation de l'ADN conduisant à l'apoptose. En effet l'absence de TRF2 fonctionnelle entraîne la destructuration de la T-loop et une dégradation de l'extrémité 3' du télomère entraînant la formation de fusions covalentes conduisant à la mort cellulaire programmée.

En revanche la surexpression de TRF2, comme TRF1 résulte en un raccourcissement du télomère, ceci indiquant que TRF2 est un second régulateur négatif de la taille du télomère. La surexpression de TRF2 accélère aussi le raccourcissement des télomères dans les lignées ALT (Smogorzewska *et al.*, 2000). Cependant, bien qu'elle induise un raccourcissement des télomères, la surexpression de TRF2 retarde également l'entrée en sénescence des cellules normales et la formation de fusions télomériques (Karlseder *et al.*, 2002). Puisque TRF2 participe à la formation de la T-loop, il est possible que sa surexpression favorise la formation de cette structure de protection. Théoriquement, le recrutement de TRF2 aux télomères est dépendant du nombre de répétitions télomériques et sa surexpression forcerait son recrutement au niveau de la T-loop, ce qui permettrait pour une taille plus petite une meilleure protection du télomère. TRF2 modifie ainsi le seuil de détection de la taille critique du télomère et possède donc un rôle majeur dans la protection des télomères (pour revue voir (Riou *et al.*, 2005)).

TRF2 est capable d'interagir avec la protéine Rap1p (Repressor-Activator Protein 1) pour réguler la longueur des télomères (O'Connor *et al.*, 2004). Chez la levure, Rap1p fonctionne comme un régulateur négatif de la longueur des télomères (Park *et al.*, 2002). Chez l'homme, hRap1 agit également comme un régulateur négatif de la longueur des télomères et affecte l'hétérogénéité de leur taille (Li *et al.*, 2003). L'inhibition de hRap1 par ARN interférence induit une augmentation de la taille des télomères (O'Connor *et al.*, 2004). TRF2 recrute au niveau du télomère des protéines impliquées dans les systèmes de réparation de cassures double brin de l'ADN et dans la maturation et la conformation de l'ADN télomérique tels que les protéines du complexe MRN, Ku70, WRN et BLM. Ces protéines sembleraient intervenir dans la formation de la T-loop en favorisant l'insertion du simple brin dans le duplexe d'ADN (Wang *et al.*, 2004).

• <u>Le complexe MRN</u> :

Ce complexe est formé des protéines MRE11, Rad50 et NBS1, qui sont impliquées dans la réparation des cassures doubles brin (Jackson, 2002) et le maintien des télomères. (Chai *et al.*, 2006). Des mutations hypomorphes de MRE11 ou NBS1 provoquent des maladies ressemblant à l'A-T (respectivement, A-T-like disease [ATLD] et Nijmegen breakage syndrome [NBS]). Le complexe MRN peut se fixer et établir des ponts entre différentes cassures double brin, mais aussi agir comme une nucléase (Chai *et al.*, 2006).

• <u>Ku 70 :</u>

Ku 70 appartient au complexe DNA-PK (DNA-dependant protein kinase) qui contient trois protéines, Ku70, Ku 86 et ADN-PKcs. Ce complexe se fixe sur les cassures double brin, puis recrute et modifie différentes activités nécessaires à la réparation de l'ADN endommagé. Ce complexe joue également un rôle important dans la stabilisation des télomères (Chai *et al.*, 2002).

• Les hélicases WRN et BLM :

Les protéines WRN et BLM sont des hélicases de la famille REC Q dont l'activité peut être couplée, dans le cas de WRN, à une activité exonucléase.

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 *et al.*, 2002).

TRF2 recrute WRN spécifiquement au niveau des répétitions télomériques et l'interaction entre TRF2 et WRN facilite l'activité exonucléase 3'-5' de WRN (Machwe *et al.*, 2004). 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 *et al.*, 2005). De plus, WRN serait nécessaire pour la réplication du brin G télomérique (Crabbe *et al.*, 2004). Le syndrome de Werner occasioné par une mutation au niveau du gène de la protéine WRN se caractérise par un ralentissement de la croissance cellulaire, d'une sénescence précoce, un raccourcissement accélérer de la taille des télomères, d'un dysfontionnement télomérique et d'une conséquente instabilité génomique (Crabbe *et al.*, 2007).

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 p53BP1, H2AX RAD17, RAD51D et ATM (Harrington, 2004) (voir chapitre VI). Les protéines du complexe NER (Nucleic Excision Repair) XPF/ERCC1 interagissent avec TRF2. Ce sont des exonucléases qui clivent l'extrémité 3' simple brin quand TRF2 n'y est plus fixé (Zhu *et al.*, 2003).

c) Rôle de hPOT1 dans la régulation des télomères.

La protéine hPOT1 possède à son extrémité N-terminale un domaine de fixation à l'ADN simple brin qui reconnaît avec une très grande spécificité la séquence TAGGGTTAG (Loayza *et al.*, 2004). *In vivo*, hPOT1 s'associe aux télomères et sa fixation diminue quand celle de TRF1 est inhibée, ceci conduisant à la dégradation du simple brin télomérique (Loayza *et al.*, 2003). Toutefois la forme de hPOT1 tronqué de son domaine OB (POT1^{Δ OB}) s'associe toujours aux télomères ceci indiquant que le domaine OB de fixation à l'ADN n'est pas indispensable pour l'association de hPOT1 au niveau du télomère (Loayza *et al.*, 2003). Ceci est rendu possible par l'association de hPOT1 avec le complexe TRF1/TPP1/TIN2 qui est déterminant pour la régulation de la taille du télomère et comme pour le complexe TRF1, plus les télomères sont longs et plus POT1 y est fixé. De cette façon hPOT1 est recruté au niveau du télomère par le complexe TRF1 et la quantité de hPOT1 fixée est un indice de la taille du télomère (Loayza *et al.*, 2003).

L'introduction de la forme hPOT1^{ΔOB} à l'intérieur des cellules permet la répression de la forme endogène sauvage par un mécanisme encore non élucidé, ainsi, seule la forme mutée est retrouvée au niveau du télomère. Les lignées télomérase positive qui expriment hPOT1^{ΔOB} dérégulent l'inhibition de la télomérase puisqu'elles montrent un allongement immédiat et important de télomère. Ainsi, il semblerait que le remplacement de la hPOT1 par hPOT1^{ΔOB} inhibe la régulation de la télomérase par le complexe TRF1. L'équipe de De Lange (Loayza *et al.*, 2003) propose un modèle de régulation de la longueur du télomère par hPOT1. Ce modèle établit que TRF1 utiliserait hPOT1 comme un élément de transduction pour inhiber l'activité télomérase en séquestrant le simple brin télomérique (Fig I-21).



Figure I-21 : Modèle de la régulation de la taille du télomère par hPOT1 proposé par T. De Lange

Ce modèle propose que la fixation de la protéine hPOT1 sur le simple brin télomérique inhibe l'élongation du télomère par la télomérase. Plus les télomères sont longs et plus le complexe TRF1 est présent au niveau du télomère, ceci favorisant la présence de la protéine hPOT1 sur le simple brin télomérique et ainsi le blocage de la télomérase. L'expression du dominant négatif hPOT1^{ΔOB} inhibe le contrôle de la télomérase par le complexe TRF1. (Loayza et al., 2003).

Un deuxième modèle propose que hPOT1 se fixe sur les séquences TTAGGG à la base de la T-loop (D-loop) et ainsi favorise la stabilisation de la T-loop et l'inaccessibilité de la télomérase à l'extrémité 3' terminale du télomère (FigI-22). Ce modèle est aussi en accord avec le fait que hPOT1^{ΔOB} abroge la capacité du complexe TRF1 de contrôler la longueur du télomère.



Figure I-22 : Modèle de la régulation de la taille du télomère par hPOT1 proposé par T. De Lange.

Ce modèle est basé sur les structures particulières du télomère. La formation de la structure en T-loop favorisée par TRF2 rendrait innaccessible le simple brin télomérique. Potentiellement, la fixation de hPOT1 sur la D-loop pourrait stabiliser la strucure T-loop et ainsi bloquer l'accès du simple brin télomérique à la télomérase. L'expression du dominant négatif hPOT1^{40B} inhibe le contrôle de la télomérase par le complexe TRF1.(Loayza et al., 2003).

La protéine hPOT1 possède un domaine d'interaction avec d'autres protéines qui lui permet d'interagir avec TIN2 via une troisième protéine appelée PIP1 pour hPOT1-interacting protein 1 (PTOP ou TINT1). PIP1 se lie à la fois à hPOT1 et TIN2 ce qui permet son rapprochement avec TRF1 (FigI-22). La diminution de l'expression de PIP1 par shRNA favorise l'élongation du télomère ceci confirmant sa contribution dans le contrôle de la taille du télomère par recrutement de hPOT1 (Ye *et al.*, 2004).



Figure I-23 : Le complexe TRF1 : TRF1-TIN2-PIP1-POT1.

A) Constituants du complexe TRF1 et leurs interactions avec l'ADN et les protéines. La protéine hPOT1 possède un domaine d'interaction avec d'autres protéines qui lui permet d'interagir avec TIN2 via une troisième protéine appelée PIP1 pour hPOT1-interacting protein 1 (PTOP ou TINT1). PIP1 se lie à la fois à hPOT1 et TIN2 ce qui permet son rapprochement avec TRF1 B) Représentation schématique de la régulation de la longueur du télomère par POT1 Le complex TRF1 permet le recrutement de la protéine hPOT1 sur le simple brin télomériqueet ainsi l'innaccessibilité de la télomérase sur le simple brin télomérique (Ye et al., 2004).

Chez le cilié *Oxytrichia nova*, le simple brin télomérique est protégé par l'hétérodimère TEBP- α/β . TEBP- α est l'homologue de hPOT1 et chez l'homme la protéine TPP1 a très récemment été décrite comme étant l'homologue de TEBP- β (Xin *et al.*, 2007). TPP1 possède un domaine OB fold. Son association avec hPOT1 favorise l'affinité de hPOT1 pour l'ADN télomérique. La rupture de l'interaction entre TPP1/hPOT1 par utilisation d'un dominant négatif de TPP1 ou d'un ARN interférence résulte en une altération de la taille du télomère et au déclenchement des voies de détection des dommages à l'ADN. TPP1-hPOT1 forment un complexe avec l'ADN télomérique qui augmente l'activité et la processivité de la télomérase (Wang *et al.*, 2007).

d) Interconnection de TRF1 et de TRF2.

TRF1 et TRF2 se fixent sur les séquences TTAGGG du télomère double brin et sont indispensables pour le maintien de la taille et de la structure du télomère. Ces deux protéines ont un domaine de type Myb à l'extrémité C-terminale et un domaine central conservé qui inclue des séquences responsables de la formation d'homodimères. Ces deux protéines ne s'hétérodimérisent pas et diffèrent par leur extrémité N-terminale qui est acide pour TRF1 et basique pour TRF2.

Le complexe TRF1 est associé à TRF2/hRAP1 par la protéine TIN2 (Houghtaling *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Ye *et al.*, 2004). TIN2 interagit directement et simultanément avec TRF1 et TRF2 par l'intermédiaire de deux domaines différents : TBD1 et 2 (TRF1 et TRF2 binding domain). La mutation de ces deux domaines entraîne l'inhibition de la fixation de TRF1 et TRF2 au double brin et déclenche une réponse de type dommage à l'ADN. De même, la protéine hPOT1 localisée au simple brin télomérique est régulée par le complexe TRF1-TIN2-TRF2 via la protéine PIP1. Des domaines de reconnaissance à hPOT1 et TIN2 ont également été décrits au niveau de la protéine PIP1 (Houghtaling *et al.*, 2004) (FigI-24A). Le modèle d'interaction TRF1-TRF2-TIN2-hPOT1 permet de faire la connection entre le télomère double brin et sa partie simple brin. De plus, ces interactions protéines/ protéines permettent de relier les fonctions de modulation de la protection des télomères (complexes TRF1/TIN2/PIP1/hPOT1) avec les fonctions de modulation de la protection des télomères (complexes TRF2/TIN2/hRap1/MRE11/ERCC1/WRN) (FigI-24B).



Figure I-24 : Interconnexion entre TRF1, TRF2 et POT1.

A): Représentation schématique des interactions entre TRF1 et TRF2 par l'intermédiaire de TIN2 et entre le complexe TRF1-TRF2 et hPOT1 par l'intermédiaire de PIP1. B) : Les domaines d'interaction du complexe TRF1/TRF2/TIN2/PIP1/hPOT1. TRFH (TRF homology) ; PBR (PIP1 Binding Region) ; RD (POT1 Recruitment Domain);OB: oligonucleotide/oligosaccharide-binding (domaine de fixation au simple Brin télomérique) (Riou et al., 2005).

E. Les structures G-quartet et G-quadruplexe.

1. Structure.

L'organisation structurale des acides nucléiques en G-quadruplexe, aussi retrouvés sous les noms G-ADN ou G4-ADN a donné lieu à d'intenses investigations depuis ces deux dernières décades. La notion de G-quartet, principale organisation du G-quadruplexe est apparue en 1962 lorsque Gellert et ses collègues ont remarqué que de fortes concentrations d'acide guanylique forment un agrégat gélatineux lorsqu'elles étaient mises en solution dans l'eau (Gellert *et al.*, 1962). Cinquante années plus tard des études de diffraction aux rayons X ont permis d'élucider ce phénomène en révélant que les structures impliquées dans ces gels étaient des arrangements tétramériques de guanine ou G-quartet. Un G-quartet consiste en quatre guanines positionnées dans un plan et reliées entres elles par des liaisons hydrogène de type Hoogsteen impliquant leur N₁, N₇, O₆ et N₂ (FigI-25). Chaque guanine est un donneur et un accepteur de deux liaisons hydrogène. Cette structure plane délimite en son centre une zone chargée électronégativement par les liaisons carboxyles et permet ainsi le recrutement de cations. 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 *et al.*, 2003).



Figure I-25 : 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.

La stabilisation des quadruplexes est fortement dépendante du type de cations présents. En l'absence de cations dans le milieu les G-quadruplexe ne peuvent pas se former. Il existe un ordre préférentiel pour la stabilisation de ces structures : $K^+>Rb^+>Na^+>Cs^+>Li^+$. Cette différence peut-être expliquée par la taille du cation et par les niveaux d'interaction entre l'acide nucléique et le cation. Il est à noter que dans le noyau des cellules vivantes, quatre cations sont majoritaires : K^+ (5mM), Na+ (5mM), Mg2+ (0,5 mM) et Ca 2+ (0,2 μ M) et tous les autres cations sont en concentration sub-nanomolaires. Ainsi les structures G-quadruplexe

devraient pouvoir se former naturellement dans les conditions physiologiques en présence de séquences riches en guanine. 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 (FigI-26 E). En présence de K+, il peut adopter une structure dans laquelle les 3 boucles sont diagonales et externes aux plateaux de quartets (Wang *et al.*, 1992; Parkinson *et al.*, 2002) (FigI-26D). Des études ont montré que le type de G-quadruplexe est directement dépendant de la taille de la structure des boucles externes (Hazel *et al.*, 2004).



Figure I-26 : Structure G-quadruplexe.

A) Modèle de G-quadruplexe unimoléculaire. B) G-quadruplexe bimoléculaire antiparallèle. C) G-quadruplexe tétramoléculaire parallèle. D) Structure de g-quadruplexe intramoléculaire en présence de K^+ E) Structure de g-quadruplexe intramoléculaire en présence de Na^+ (Riou et al., 2003).

2. Mise en évidence de l'existence in vivo des G-quadruplexes.

L'existence de motifs riches en G dans des régions « clé » du génome eucaryote incluant la région « switch » des immunoglobulines, quelques régions de promoteurs, l'ADN ribosomal, des minisatellites et des télomères suggèrent que les G-quadruplexes auraient *in vivo* des fonctions importantes. De plus, il a été calculé que le génome humain comprendrait environ 376000 séquences susceptibles de former des structures de type G-quadruplexe (Huppert *et al.*, 2005; Todd *et al.*, 2005).

Les G-quadruplexes se forment in vitro à partir d'oligonucléotides d'ADN ou d'ARN mimant les séquences télomériques, de promoteurs de gènes, de sites de recombinaisons, de sites d'empaquetage et de domaines de dimérisation des ARN (Davis, 2004). Les observations les plus évidentes de l'existence in vivo des structures G-quadruplexe viennent des travaux l'équipe de Plückthün (Schaffitzel et al., 2001). En 2001. ils ont généré des anticorps synthétiques simple chaine (Ab) spécifiquement dirigés contre une structure G-quadruplexe intermoléculaire parallèle et synthétisé à partir de séquences télomériques du cilié protozoaire Stylonichia lemnae. Deux fragments Ab désignés sous les noms Sty 3 et Sty 49 reconnaissent spécifiquement des structures G-quadruplexe parallèle/ parallèle ou parallèle/ antiparallèle respectivement. In vivo l'utilisation de l'anticorps Sty 3 ne donne aucun signal, en revanche l'utilisation de Sty 49 donne un signal très prononcé dans le macro-noyau (dans lequel un grand nombre de chromosomes et donc de télomères sont présents) et aucun dans le micronoyau (intervenant dans la reproduction sexuée des cellules) chez Stylonichia en état végétatif. Puisque l'extrémité simple brin chez cette espèce est de 16 nucléotides, les auteurs déduirent de cette observation que seules les structures G-quadruplexe dimériques antiparallèles existaient in vivo. Or, dans le même laboratoire en 2005 Paeschke (Paeschke et al., 2005) apporta des preuves supplémentaires quant à l'existence des structures Gquadruplexe in vivo. En inactivant par ARN interférence les protéines aTBP et BTBP il démontra que ces deux protéines étaient nécessaires pour la formation des G-quadruplexe in vivo, puisque l'élimination de ces deux protéines ne permettait pas l'obtention d'un marquage avec l'anticorps Sty 49 dans le macro-noyau de Stylonichia. De plus, il démontra que la phosphorylation de l'extrémité terminale de aTBP par la protéine Cdk2 (cylin dependant kinase 2) permettait la résolution de la structure G-quadruplexe. En effet, l'inhibition de la phosphorylation par Cdk2 induit in vivo un marquage par l'anticorps Sty 49 au niveau des régions de réplication dans le macro-noyau de Stylonichia qui n'étaient marquées par l'anticorps. Selon ces observations, les structures d'ADN G-quadruplexe devaient être

résolues pendant la réplication des télomères et cette résolution nécessiterait la phosphorylation de β TBP. Une autre étude menée par Duquette en 2004 montra un autre élément en faveur de l'existence de structures G-quadruplexe in vivo (Duquette *et al.*, 2004). A l'aide de la propagation d'un plasmide contenant un insert dérivé de la répétition de la séquence télomérique TTAGGG humaine chez *E coli*, ils réussirent a obtenir la formation de structures G-quadruplexe repérée par microscopie électronique. Plus récemment, des structures G-quadruplexe télomériques ont été mises en évidence *in vitro* sur des chromosomes humains grâce à l'utilisation du ligand des G-quadruplexe 360A-H³ (Granotier *et al.*, 2005).

3. Fonction des G-quadruplexes.

De nombreux évènements cellulaires incluant la réplication, la recombinaison, la transcription et l'élongation de l'ADN télomérique incluent des étapes dans lesquelles les deux brins d'ADN se séparent localement et transitoirement, ceci favorisant la formation de structures G-quadruplexes sur des régions riches en G (FigI-27). Les régions de promoteurs de quelques gènes importants comme, Rb, c-myc, PDGF-A, c-myb, c-abl, c-ets, c-fes/fps, csrc, c-yes, c-vas et Ki-ras contiennent des séquences riches en G susceptibles de former des G-quadruplexes qui réguleraient en cis la transcription (Maiti et al., 2003; Riou et al., 2003). En plus de la protection des télomères et de la régulation de la transcription les Gquadruplexes joueraient un rôle dans l'alignement des chromosomes, dans la recombinaison et dans la réplication de l'ADN associées à des maladies. La formation des G-quadruplexes permettrait un mécanisme pour l'alignement des chromosomes pendant la recombinaison mais provoquerait aussi des recombinaisons illégitimes (Sen et al., 1988; Fahlman et al., 1998). Plusieurs études ont déjà montré que les régions du génome riches en G sont des points chauds de recombinaison (Katinka et al., 1992; Ashley et al., 1993). Les hélicases de la famille Rec Q comme BLM chez l'homme et sgs1 chez la levure résolvent les structures Gquadruplexes (Sun et al., 1998; Sun et al., 1999). Les cellules déficientes en BLM et sgs1 ont un niveau élevé d'échange des chromatides sœurs et d'instabilité chromosomique. Ces hélicases participeraient alors à la résolution des G-quadruplexes non désirés pour empêcher les recombinaisons illégitimes et d'autres instabilités génétiques. Les patients atteints du syndrome du X fragile possèdent des centaines de répétitions CGG dans une région non codante du gène associé au X fragile (FMR1), alors que chez les individus sains FMR1 ne possède seulement que trente répétitions (Ashley et al., 1995). L'hypothèse formulée est que, pendant la réplication, il se formerait un G-quadruplexe sur le brin riche en G nouvellement synthétisé et que ce brin serait déplacé du modèle.



Figure I-27: Schéma représentant la formation d'un ADN G-quadruplexe pendant des évènements cellulaires normaux.

A) Des séquences télomériques riches en G forment différents types de structure Gquadruplexe à différents stades du cycle cellulaire pour protéger les extrémités chromosomiques. La formation de G-quadruplexes permettrait l'alignement des chromosomes et l'inhibition de la télomérase. B) Des séquences riches en G dans des régions non télomériques du génome peuvent transitoirement former des G-quadruplexes à partir de l'ADN double brin et participer à des évènements cellulaires comme la recombinaison et la transcription ou interférer avec la réplication (Han et al., 2000).

4. G-quadruplexe et télomères.

A l'extrémité des chromosomes eucaryotes, les télomères comprennent des séquences répétées G-riche. La séquence télomérique TTAGGG chez l'homme est capable de former un G-quadruplexe aussi bien en solution qu'en structure cristalisée (Wang *et al.*, 1993; Parkinson *et al.*, 2002). Chez *Oxytricha* et chez *Tetrahymena*, nous retrouvons également des séquences G-riches (T4G4 et T2G4 respectivement) capables de former des G-quadruplexes (Wang *et al.*, 1992; Haider *et al.*, 2002). 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 *et al.*, 2002). Dans la conformation intramoléculaire, les structures G-quadruplexes auraient un rôle de protection et de régulation en empêchant l'accès de la télomérase et des nucléases au simple brin télomérique, ainsi qu'un rôle de protection de l'ADN en structurant les extrémités des chromosomes en une configuration compacte. D'autre part, les G-quadruplexes

intermoléculaires permettraient l'alignement interchromosomique et le clustering des télomères pendant la prophase I de la méiose (pour revue (Oganesian *et al.*, 2007)).

5. Les autres G-quadruplexes potentiels du génome.

En plus des télomères, de nombreuses régions du génome sont riches en G et sont donc potentiellement capables de former, *in vitro*, des structures en G-quadruplexes. C'est le cas notamment, comme nous l'avons décrit précédemment 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 *et al.*, 2003); (Maiti *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 Senet Gilbert 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 50 pb. 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 des G-quartets (Sen *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 *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 *et al.*, 2001).

De même, le gène de l'insuline contient une région polymorphique présentant la séquence répétée d[ACAG4(G/C)(T/C)G4] qui est également potentiellement capable de

former un G-quadruplexe (Catasti *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 *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 (Guittat 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 *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 la 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 (Murchie *et al.*, 1992). Le promoteur le plus connu contenant des structures G-quadruplexes est celui du gène c-myc. Une structure G-quadruplexe parallèle a été identifiée dans l'élément NHE III₁ du promoteur du gène c-myc et cette structure fonctionne comme un répresseur de transcription (Hurley, 2001; Lemarteleur *et al.*, 2004).

De manière étonnante l'intron 6 du gène hTERT possède plusieurs motifs GGG répétés capables d'induire des G-quadruplexes et d'altérer l'épissage alternatif de l'ARNm (Gomez *et al.*, 2004).

6. Quadruplexe et ARN.

Des observations en résonance magnétique nucléaire (RMN) et par cristallographie ont permis de mettre en évidence des G-tétrades, U-tétrades et A-tétrades dans des ARNs (Patel *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2003). Plusieurs ARNm contiennent des séquences riches en guanines (Mergny *et al.*, 2002). L'exemple le mieux connu est celui du motif sc1. Ce motif (GGAAGGAGUGGCUGGG) 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 *et al.*, 2003). Ces ARNm sont reconnus par une protéine, FMRP (Fragile X mental retardation protein). Dans le syndrome du X fragile, cette protéine est absente, induisant un retard mental modéré et une morphologie particulière. Des études ont montré que cette protéine FMRP est capable de reconnaître les ARNs en G-quadruplexe et d'induire des modifications de la traduction des ARNm reconnus (Darnell *et al.*, 2001; Schaeffer *et al.*, 2001; Darnell *et al.*, 2004). Parmi les protéines présentant un motif sc1, nous retrouvons la sémaphorine 3F, l'histone H4 (Riou *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 *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 est rendue possible par la formation de G-quadruplexes (Marquet *et al.*, 1991; Sundquist *et al.*, 1993). De plus, il a été décrit que la structure FLAP du génome du VIH peut former des G-quartets (Lyonnais *et al.*, 2002).

7. Protéines reconnaissant les G-quadruplexes.

De nombreuses protéines ont été décrites comme étant capables de reconnaître spécifiquement les structure G-quadruplexes chez différentes espèces, avec des actions et des activités biochimiques différentes (Tableau3).

G-quadruplex interacting factors

Proteins that bind to G-quadruplexes		
βTBP/TEBPβ ^a	Oxytricha nova	Parallel & anti-parallel intermolecular
	Stylonichia lemnae	Anti-parallel dimer
Rap1 ^a	Saccharomyces cerevisiae	Parallel & anti-parallel intermolecular
TGP1 ^b	Tetrahymena thermophila	Parallel tetramer
TGP3 ^b	Tetrahymena thermophila	Parallel tetramer
TERT ⁶	Tetrahymena thermophila	Parallel intermolecular
Nucleolin ^b	Mouse	Parallel & anti-parallel intermolecular
Topo I ^a	Human	Parallel & anti-parallel intermolecular
Hop1 ^a	Saccharomyces cerevisiae	Parallel & anti-parallel intermolecular
Nucleases		
KEM1/SEP1	Saccharomyces cerevisiae	Parallel tetramer
Mre 11	Saccharomyces cerevisiae	Parallel tetramer & anti-parallel dimer
GQN1	Human	Parallel tetramer & anti-parallel dimer
Helicases		
SV40 large T antigen	Simian Virus 40	Parallel tetramer & anti-parallel dimer
BLM	Human	Parallel tetramer
WRN	Human	Parallel tetramer
Sgs1	Saccharomyces cerevisiae	Parallel tetramer & anti-parallel dimer
RecQ	Escherichia coli	Parallel tetramer & anti-parallel dimer
Rtel	Mouse	Intramolecular ^c
Resolvases		
hnRNP A1/UP1	Human	Intermolecular dimer ^c
hnRNP D/BD2	Human	Parallel & anti-parallel
Pot1	Human	Anti-parallel intramolecular
TERT	Tetrahymena thermophila	Parallel intermolecular

Tableau 3 : Protéines qui interagissent avec les G-quadruplexse in vitro.

a) Indique que les protéines se fixent aux G-quadruplexes et favorisent leur formation. b) Indique que les protéines ne se fixent que sur des conformations spécifiques de Gquadruplexes. c) La conformation du quadruplexe est hypothétique et n'a pas été directement démontrée (Oganesian et al., 2007).

a) Hélicases et topoisomérases.

Quelques protéines de la famille des hélicases RecQ incluant RecQ chez *E.coli*, Sgs1 chez *S.cerevisiae*, Bloom (BLM) et Werner (WRN) chez l'homme, et l'antigène large T du virus simien 40 (SV40) sont capables de résoudre les G-quadruplexes.

Chez la souris, la protéine Rtel est un hélicase DNA like qui modulerait la taille du télomère et la stabilité du génome. Les cellules souches embryonnaires de souris dépourvues de Rtel montrent une érosion très importante des télomères et des fusions des extrémités télomériques (Ding *et al.*, 2004). DOG-1 est l'homologue de Rtel chez *C.elegans* et sa délétion entraîne la délétion de larges séquences d'ADN riches en G à travers le génome. Ainsi le rôle de Rtel par comparaison avec DOG-1 serait de résoudre les structures G-quadruplexes mais son mécanisme d'action reste à élucider.

Des 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 *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2002). La topoisomérase I possède également une activité de fixation des structures G-quadruplexes (Arimondo *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 *et al.*, 2002). De plus la topoisomérase I (topoI), comme RAP 1 chez la levure, est non seulement capable de catalyser la formation de G-quadruplexe mais aussi de se fixer à des structures G-quadruplexe inter et intramoléculaire préformées (Arimondo *et al.*, 2000).

b) Résolvases.

Les travaux de plusieurs équipes réalisés sur différentes espèces ont montré que les Gquadruplexes intramoléculaires sont réfractaires à l'extension par la télomérase *in vitro* (Zahler *et al.*, 1991; Zaug *et al.*, 2005). Toutefois, les G-quadruplexes parallèles intermoléculaires permettent l'extension par la télomérase in vitro (Oganesian *et al.*, 2006). De cette façon il serait concevable que la télomérase elle-même soit une résolvase des structures G-quadruplexes.

Zaug et ses collaborateurs (Zaug *et al.*, 2005) ont montré que la protéine hPOT1 est capable de déstructurer les G-quaduplexes intramoléculaires télomériques, ce qui permet *in vitro* l'allongement du télomère. Les ribonucléoprotéines nucléaires A1 (hnRNP A1) et D (hnRNP D) sont des protéines qui permettent la résolution des G-quadruplexes télomériques (Enokizono *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

c) Nucléases.

Une activité nucléase spécifique des G-quadruplexes a seulement été décrite chez l'homme et la levure. Les produits des gènes KEM1/SEP1 (Liu *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994) chez S.cerevisiae et GQN1 (G-quartet nuclease 1) (Sun *et al.*, 2001) chez l'homme clivent sur de l'ADN simple brin quelques nucléotides en amont du G-quadruplexe et ainsi le libèrent. La délétion de KEM1/SEP1 chez la levure bloque les cellules en méiose avec un ADN à 4N laissant suggérer que ces protéines jouent un rôle dans la séparation des chromosomes (Tishkoff *et al.*, 1991).

Chez la levure, la nucléase Mre11 connue pour être impliquée dans l'établissement de la structure télomérique montre également une capacité à fixer et à cliver les G-quadruplexes. Mre11 se fixe aussi au simple brin télomérique mais son affinité est douze fois plus élevée pour les G-quadruplexes télomériques intramoléculaires (Ghosal *et al.*, 2005).

d) Autres protéines fixant les G-quadruplexes.

β-TBP (TEBPβ) et RAP1 (repressor activator protein 1) chez *Saccharomyces cerevisiae* induisent la formation de G-quadruplexes intermoléculaires(Giraldo *et al.*, 1994; Giraldo *et al.*, 1994). La nucléoline est une protéine majeure des mammifères qui se fixe avec une grande affinité aux G-quadruplexes télomériques dimériques et tétramériques (Hanakahi *et al.*, 1999). Chez le cilié protozoaire *Tetrahymena thermophila* TGP1 et 3 (Lu *et al.*, 2000), ainsi que hop1 chez la levure (Anuradha *et al.*, 2004), ont une capacité de fixation des G-quadruplexes.

F. Télomère/Télomérase et cancer.

L'immortalité cellulaire par le potentiel de réplication à l'infini est une des principales propriétés des tumeurs malignes. La réplication cellulaire est associée avec la maintenance du télomère et dans la grande majorité des cas à la réactivation de la télomérase. Cibler la machinerie télomère/télomérase offre donc une nouvelle stratégie thérapeutique anticancéreuse puisque la télomérase est surexprimée dans la plus grande majorité des cancers humains (85%). Ces stratégies ont pour but d'induire un raccourcissement prématuré des télomères et un arrêt de la prolifération anarchique des cellules (FigI-28). Les télomères sont courts dans la plupart des tumeurs comparées à ceux des tissus normaux. Les stratégies qui prennent en compte ces différences incluent le ciblage direct des composants de la télomérase : La protéine hTERT et sa matrice ARN, hTR. Dans cette stratégie antitélomérase, les cellules ALT, qui ne présentent pas d'activité télomérase, seront normalement épargnées. Une approche alternative consiste à cibler directement le télomère. Certaines stratégies visent préférentiellement les protéines du capuchon télomérique, qui sont aussi bien présentes dans les cellules télomérase positives que dans les télomérase négatives. Une autre stratégie consiste à utiliser plusieurs classes de petites molécules qui sont capables de fixer et stabiliser les G-quadruplexes formés sur le simple brin télomérique. Ces molécules permettent l'inhibition de la télomérase in vitro et induisent la déprotection du télomère.





1. Stratégies ciblant la télomérase.

L'inactivation de la télomérase a pour but d'inhiber l'élongation des télomères, aboutissant au raccourcissement de la taille de l'extrémité chromosomique, à l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'entrée des cellules cancéreuses en sénescence et/ou en apoptose. Il existe plusieurs possibilités pour inhiber la télomérase

a) cibler hTERT.

à l'aide d'un dominant négatif d'hTERT.

Puisque hTERT est un facteur limitant de l'activité télomérase et que son expression est pratiquement restreinte aux cellules tumorales, la stratégie ciblant la télomérase par inhibition de l'expression d'hTERT est ainsi intéressante. En 1999, deux études indépendantes démontrent que la surexpression d'un dominant négatif d'hTERT entraîne l'inhibition de la télomérase associée à un raccourcissement des télomères, avec un arrêt de prolifération des cellules et l'induction de la sénescence et/ou de l'apoptose (Hahn *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999). Or il existe un laps de temps important entre l'inhibition de la télomérase et le moment où les cellules arrêtent de proliférer. Ce temps est proportionnel à la taille initiale des télomères des cellules concernées (Pantic *et al.*, 2005; Pantic *et al.*, 2006). Ainsi les tumeurs cellulaires avec de longs télomères se multiplieront jusqu'à ce que les télomères atteignent une taille critique. Cette stratégie est donc peu appropriée dans le cas de traitement de tumeurs massives.

Cibler hTERT par des analogues nucléosidiques.

Etudiés à l'origine chez le cilié *Tetrahymena*, les analogues nucléosidiques comme le 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) ne montrent pas d'inhibition de la télomérase spécifique et probante (Strahl *et al.*, 1994). Certains autres inhibiteurs de la reverse transcriptase hTERT comme L-dTTP et L-GTP ont aussi peu de spécificité pour la télomérase (Yamaguchi *et al.*, 2000). Il en est de même pour le 6-thio-7-deaza-2'deoxuguanosine 5'-triphosphate (TDG-TP) qui n'est pas plus spécifique et qui a une faible IC₅₀ (0,06 μ M) (Fletcher *et al.*, 2001). Bien que d'autres analogues nucléosidiques triphosphates tels que l'arabinofuranosyl-guanosine (Ara-G), le dideoxyinosine (ddI) et dideoxyguanosine (ddGTP) inhibent la télomérase et induisent le raccourcissement des télomères (Strahl *et al.*, 1996), l'efficacité de ces molécules *in vivo* reste à démontrer.

Cibler hTERT par des inhibiteurs catalytiques non-nucléosidiques.

La découverte la plus prometteuse d'inhibiteurs catalytiques non- nucléosidiques fut celle du composé (2-(E)-3-naphtalen-2-yl-but-2-enolylamino)-benzoique acide (BIBR1532), un inhibiteur puissant et sélectif de la télomérase, capable d'induire le raccourcissement des télomères et l'induction de la sénescence dans des cellules cancéreuses humaines (Damm *et al.*, 2001). BIBR1532 semblerait interférer avec la processivité de la télomérase en se comportant comme un inhibiteur non-compétitif de la télomérase en se fixant sur l'ADN et les amorces d'ADN (Pascolo *et al.*, 2002). Malgré une forte spécificité pour la télomérase et une faible IC₅₀ de l'ordre de 0,093 μ M, le temps entre l'inhibition de la télomérase et le moment où les cellules arrêtent de proliférer est encore plus important qu'avec la stratégie qui utilise les dominants négatifs de hTERT.

Cibler l'ARNm d'hTERT.

Une nouvelle approche génétique consiste à introduire des séquences siRNA (small interfering RNAs) complémentaires à celles de l'ARNm d'hTERT dans le but d'inhiber l'expression de hTERT et l'activité télomérase dans nombreuses lignées cellulaires (de Souza Nascimento *et al.*, 2006) ; (Kurvinen *et al.*, 2006) ; (Zheng *et al.*, 2006) ; (Zou *et al.*, 2006). En plus du raccourcissement des télomères et de l'inhibition de la prolifération cellulaire, la régulation négative de l'expression de hTERT par les siRNA diminue la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe (Zou *et al.*, 2006). Dans les cancers cervicaux, cette stratégie facilite l'induction de l'apoptose par des agents chimiothérapeutiques via l'activation de la protéine proapototique BAX (Massard *et al.*, 2006). Une autre approche basée sur le principe du siRNA consiste à utiliser des oligomères phosphorotioate anti-hTERT qui induisent une diminution rapide de la viabilité des cellules tumorales et l'apoptose indépendamment de l'activité enzymatique de la télomérase (Kraemer *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006; You *et al.*, 2006).

Une troisième approche visant à inhiber l'expression de l'ARNm de hTERT utilise les ribozymes têtes de marteau (hammerhead). Les ribozymes, contraction de acide RIBOnucléique et enZYMES sont des enzymes particulières non pas constituées de protéines mais d'ARN. Elles possèdent la propriété de pouvoir catalyser une réaction chimique, y compris des réactions auto-catalytiques. Cibler l'extrémité 5' de l'ARNm d'hTERT par ces ribozymes inhibe l'activité télomérase dans certaines lignées cancéreuses (Yokoyama *et al.*, 2000).

Cibler hTERT par inhibition de sa phosphorylation.

L'activité de la télomérase peut être modulée par une variété de protéines kinases. La protéine kinase C (PKC) permet d'augmenter l'activité télomérase par phosphorylation de hTERT (Li *et al.*, 1998). Des inhibiteurs de PKC comme le bis-indolylmaleimide I (BIS) et H-7 inhibent l'activité télomérase dans des cellules cancéreuses du cerveau et du nasopharynx (Ku *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2001). La protéine kinase B (Akt) phosphoryle aussi hTERT et permet l'augmentation de l'activité télomérase (Kang *et al.*, 1999). Or la stratégie d'inhibition de ces protéines kinases ne semble pas être la plus spécifique pour supprimer l'activité télomérase étant donné les nombreuses cibles de ces kinases.

Cibler la transcription de hTERT

Puisque l'activité télomérase est principalement contrôlée par la régulation de la transcription de hTERT, une stratégie consiste à cibler ses activateurs de transcription. Des études récentes ont montré que des produits d'origine naturelle comme l'acide gambogique et la génistéine sont capables de réprimer c-Myc, un des activateurs de la transcription de hTERT et de réduire l'activité télomérase dans les cellules cancéreuses (Guo *et al.*, 2006; Jagadeesh *et al.*, 2006). De manière intéressante la génistéine à une double action sur l'activité télomérase puisqu'elle est aussi un régulateur négatif de Akt et donc aussi de la phosphorylation de hTERT (Jagadeesh *et al.*, 2006). Les céramides répriment les activateurs de transcription Sp1 et Sp3 de hTERT (Wooten *et al.*, 2005).

Les acides rétinoïques et leurs analogues (les trans acides rétinoïques), induisent la régulation négative de la transcription du gène hTERT, et, par conséquent, la diminution de l'activité télomérase et la croissance des cellules tumorales (Pendino *et al.*, 2001; Pendino *et al.*, 2006). Les acides rétinoïques sont des molécules de signalisation ayant un rôle important dans la croissance, la différenciation et l'apoptose de nombreuses variétés de tissus embryonnaires et normaux en partie par des mécanismes d'inhibition d'hTERT. Par exemple, les acides rétinoïques induisent une diminution de l'activité télomérase et de l'ARNm d'hTERT dans les cellules cancéreuses de poumon MCF-7 (Choi *et al.*, 2000).

La différentiation terminale de nombreuses cellules est associée à une rapide inhibition de l'activité télomérase par régulation négative de la transcription du gène hTERT. La télomérase peut-être inhibée par l'acide rétinoïque tout-*trans* (ATRA) indépendemment de la maturation terminale pendant un traitement à long terme de la lignée promyélocytaire NB4-R1, résistante à la maturation mais présentant une signalisation fonctionnelle par les récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque. Cette répression, qui résulte d'une forte diminution de l'ARNm de hTERT, conduit au raccourcissement des télomères et à la mort cellulaire en 2 à 3 semaines (Pendino *et al.*, 2001).

Les acides rétinoïques sont utilisés en thérapie pour leur réponse biologique dans de nombreuses variétés de cancers humains tels que les leucémies, les cancers de la peau, de l'utérus, et dans les neuroblastomes (Kraveka *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2004).

Comme la transcription de hTERT est largement restreinte aux cellules tumorales, son promoteur est utilisé dans des constructions plamidiques pour induire l'expression de gènes thérapeutiques létaux pour les cellules. Par exemple l'induction de l'expression de la caspase 6 via le promoteur d'hTERT engendre l'apoptose dans des cellules de gliomes malins mais pas dans les cellules télomérase négatives et une suppression de la croissance de tumeurs chez les souris nude (Komata *et al.*, 2001). 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 *et al.*, 2004).

Cibler hTERT par inhibition de sa translocation nucléaire.

L'activité télomérase peut aussi être régulée par la translocation de hTERT du cytoplasme au noyau (Liu *et al.*, 2001). Le TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) module l'activité télomérase en induisant la translocation de hTERT du cytoplasme vers le noyau par une interaction directe NK-kappaB p65. Cette translocation peut ainsi être bloquée par des inhibiteurs spécifiques de la voie de signalisation NK-kappaB (Akiyama *et al.*, 2003). Puisque NK-kappaB est un facteur clé dans la tumorigénèse, le fait de le cibler pourra être bénéfique dans la prévention et le traitement des cancers.

Il a également été montré que l' H_2O_2 déclenche l'export nucléaire d'hTERT via la phosphorylation de la tyrosine 707 par les kinase Src (Haendeler *et al.*, 2003). L'obtention de lignées cellulaires à partir de la lignée A549 exposée à des concentrations sub-toxiques en H_2O_2 montre que ces cellules présentent une morphologie particulière et allongée. Ces cellules possèdent une activité télomérase mais un raccourcissement du télomère à chaque division du à une inhibition de la translocation nucléaire de hTERT, et, par conséquent, une diminution de leur tumorigénicité (Katakura *et al.*, 2005).

b) Cibler hTR.

La présence de hTERT et hTR est essentielle et suffisante pour reconstituer une activité télomérase (Weinrich *et al.*, 1997). Contrairement à hTERT, hTR est exprimé constitutivement dans la majorité des cellules mais ne semble pas avoir de fonction dans les cellules télomérase négatives. Ainsi hTR serait une cible pour l'inhibition de la télomérase.

Cibler hTR par stratégie antisens.

Des oligonucléotides antisens peuvent être utilisés soit pour cibler la matrice ARN de hTR afin d'inhiber l'activité enzymatique de la télomérase, soit pour cibler une autre région de hTR et ainsi induire une dégradation ou une altération de la conformation de hTR en empêchant la formation du complexe télomérase. Différents oligonucléotides complémentaires à certaines séquences de la matrice ARN (oligonucléotide PNA (peptide nucleic acid)) ont été modifiés et testés afin d'augmenter la stabilité du duplex et d'induire sa dégradation. Certains de ces oligonucléotides ont été décrits comme étant capables d'inhiber la télomérase, d'induire un raccourcissement des télomères et une diminution de la viabilité cellulaire (Kondo *et al.*, 1998; Shammas *et al.*, 1999; Folini *et al.*, 2003). Une de ces molécules, le GRN163L a été autorisé à entrer en phase clinique I/II dans le cas des traitements des leucémies lymphocytaires chroniques.

De plus les ribozymes « tête de marteau » permettent le clivage la matrice hTR et inhibent l'activité télomérase dans des cellules cancéreuses (Yokoyama *et al.*, 1998; Folini *et al.*, 2000). Plus récemment il a été montré que l'utilisation de ces ribozymes dans des cellules cancéreuses issues du poumon induit un racourcissement de la taille des télomères par inhibition de la télomérase et diminution de la prolifération cellulaire (Yeo *et al.*, 2005).

D'autres méthodes sont employées pour inhiber la télomérase. Puisque la synthèse de l'ADN télomérique par la télomérase nécessite la formation d'un duplex entre l'ADN télomérique et la matrice hTR, inhiber la formation de ce duplex par des molécules ou par des mutants de hTR est une stratégie, qui donne à ce jour des résultats prometteurs pour inhiber l'activité télomérase. D'autres stratégies consistent à bloquer l'assemblage du complexe télomérase en utilisant des siRNA dirigés spécifiquement contre des protéines indispensables à cette formation, notamment sur la protéine chaperone Hsp90. Ces siRNA utilisés dans des cellules cancéreuses de prostate provoquent un raccourcissement massif des télomères suivi d'une apoptose (Compton *et al.*, 2006).

2. Stratégies ciblant le télomère.

a) Par les ligands des G-quadruplexes.

Cette stratégie consiste à bloquer l'accès de la télomérase à son substrat (FigI-29). En effet, l'altération de la structure du télomère induit une inhibition plus rapide de la croissance des cellules tumorales que l'inhibition « classique » de la télomérase (Karlseder *et al.*, 1999; Karlseder *et al.*, 2002). Les séquences d'ADN qui sont riches en guanine comme le télomère sont capables de former des structures à quatre brins appelés G-quadruplexes. En 1991 une première étude a montré que les G-quadruplexes télomériques pouvaient être stabilisés par l'ion K⁺, et que cela permettait l'inhibition de l'élongation du télomère par la télomérase (Zahler *et al.*, 1991). En 1997, il a été découvert qu'une molécule de petite taille, le 2,6-diamidoanthraquinone, était capable de stabiliser ces structures G-quadruplexes (Sun *et al.*, 2007).

1997). Depuis, un grand nombre de ligands de l'ADN G-quadruplexe ont été développés capables d'inhiber potentiellement l'accessibilité de la télomérase au télomère. Ces agents stabilisateurs de G-quadruplexes incluent des porphyrines cationiques (TMPyP4), des dérivés de pérylène (PIPER), des acridines trisubstituées (BRACO19), des bisacridines, des acridines pentacycliques (RHSPS4), des produits naturels (télomestatine), des dérivés d'éthidium, des dibenzophenanthrolines, des dévivés triazine (12459), des fluoroquinophenoxazines (QQ58) et des porphyrines anioniques (NMM) (pour revue (Mergny *et al.*, 2002)).



Figure I-29 : Mécanisme de l'inhibition de la télomérase par stabilisation de Gquadruplexe par des ligands spécifiques.

Cette stratégie consiste à inhiber la reconnaissance de la télomérase de son substrat, le télomère. Les télomères sont capables d'adopter une structure en G-quadruplexe, et, la stabilisation de ces structures par des ligands spécifiques permettrait d'inhiber la reconnaissance de la télomérase et d'empêcher l'élongation des télomères (Mergny et al., 1998).

- La Télomestatine



Figure I-30 : Structure de la télomestatine

La télomestatine est un composé naturel extrait de *Steptomyces anulatus* par Kazuo Shin-ya en 2001 (Shin-ya *et al.*, 2001). Elle est très spécifique des G-quadruplexes vis-à-vis des autres conformations des acides nucléiques (Shin-ya *et al.*, 2001). En effet, sa structure plane lui permet une bonne stabilisation des structures G-quadruplexes (FigI-30). La télomestatine est décrite à ce jour comme la molécule induisant la meilleure inhibition de l'activité télomérase. En effet elle permet l'inhibition de l'activité télomérase avec une CI50 de 5 nM et présente une forte affinité pour la séquence d[T2AG3]4 (Kim *et al.*, 2002; Rosu *et al.*, 2003). La télomestatine induit la formation d'un G-quadruplexe intramoléculaire sous forme panier mais s'avère cependant moins efficace pour des G-quadruplexes intermoléculaires (Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003). 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 (FigI-30) (Kim *et al.*, 2002).



Figure I-31 : Structure du modèle le plus stable de l'interaction de la télomestatine avec la séquence télomérique humaine (Kim et al., 2002).

La télomestatine induit l'apoptose dans différentes lignées cellulaires cancéreuses et présente une sélectivité vis à vis des cellules cancéreuses nettement supérieure comparé aux cellules normales. De plus elle permet un raccourcissement télomérique plus précoce que celui observé par l'inhibition directe de la télomérase (Kim *et al.*, 2003; Tauchi *et al.*, 2003; Gomez *et al.*, 2004; Shammas *et al.*, 2004). Le traitement par la télomestatine des cellules U937 dans un modèle de xénogreffe de souris inhibe l'activité télomérase et entraîne une réduction de la masse tumorale (Tauchi *et al.*, 2006). De plus la télomestatine est capable d'induire une augmentation de la sensibilité de cellules leucémiques myéloïdes aux

traitements par la daunorubicine ou la cytosine-arabinoside, molécules classiquement utilisées en chimiothérapie (Sumi *et al.*, 2004). Plus récemment des travaux sur la télomestatine ont montré qu'elle permettait la dissociation des protéines hPOT1 et TRF2 du télomère et une érosion très rapide du télomère simple et double brin (Gomez *et al.*, 2006; Gomez *et al.*, 2006; Tahara *et al.*, 2006).

- Braco 19



Figure I-32 : Formule de l'acridine Braco 19

Le BRACO19 est une acridine 3,6-disubstituée synthétisée par le groupe de Neidle, capable de fixer les structures G-quadruplexes (FigI-32) (Harrison *et al.*, 1999). Cette molécule induit après traitement de cellules de cancer du sein à des concentrations subtoxiques une diminution de l'activité télomérase, un raccourcissement de la taille des télomères, une inhibition de la croissance et une entrée en sénescence (Gowan *et al.*, 2002). Son efficacité *in vivo* a été mise en évidence sur un modèle de xénogreffe de carcinome utérin par une inhibition de croissance de 96% par rapport au contrôle (Burger *et al.*, 2005). Cependant cette molécule possède une mauvaise perméabilité et devrat être modifiée pour permettre un passage efficace à travers la membrane lipidique (Taetz *et al.*, 2006).

- Le TMPyP4



Figure I-33 : Structure de la porphyrine TMpyP4

Le TMPyP4 est une 5, 10, 15, 20-tetra(N-methyl-2-pyridyl)porphine de la famille des porphyrines cationiques (FigI-33). Le TMPyP4 est capable de reconnaître les structures G-quadruplexes parallèles (Han *et al.*, 2001). Cette molécule a cependant une préférence pour les G-quadruplexes intermoléculaires (Kim *et al.*, 2003). Elle est capable d'inhiber l'activité télomérase dans des cellules tumorales de seins MCF7 (Izbicka *et al.*, 1999) et de myélome U266, ARH77 et ARD (Shammas *et al.*, 2004) et d'induire des ponts anaphasiques dans des embryons d'oursins (Kim *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 *et al.*, 2002; Siddiqui-Jain *et al.*, 2002).

- <u>Le 12459</u>



Figure I-34 : Structure de la triazine 12459.

Le 12459 (dérivé du 2,4,6-triamino-1,3,5 triazine) a été synthétisé par Aventis-Pharma S.A. et est composé de résidus de quinolines sur un squelette de triazine (FigI-34). En test TRAP, le 12459 est un inhibiteur efficace de l'activité télomérase *in vitro* avec des CI50 de 130nM et est également sélectif puisque l'inhibition de la *taq* polymérase apparaît à des CI50 de 8400nM et 610nM (Riou *et al.*, 2002). Ce dérivé induit à faible concentration et à long terme la sénescence associée à une dégradation du télomère, et une apoptose à forte concentration et à court terme (Riou *et al.*, 2002).

b) Par les protéines associées au télomère.

Les protéines associées au télomère représentent également des cibles pour inhiber la télomérase. En effet TRF2 joue un rôle fondamental dans la stabilité du télomère et l'expression d'un dominant négatif de TRF2 mène à une perte rapide du télomère suivie de l'induction de la sénescence ou de l'apoptose (Karlseder *et al.*, 1999). De même TRF1 inhibe
l'élongation du télomère par la télomérase. La poly ADP-ribosylation de TRF1 par la tankyrase I inhibe sa fixation au niveau du télomère et permet éventuellement la déstructuration de la T-loop. Par ailleurs des études ont montré que des cibles pharmacologiques de la tankyrase1 induisent le raccourcissement du télomère par inhibition de la télomérase et l'entrée rapide des cellules cancéreuses en crise (Seimiya *et al.*, 2005). De plus l'inhibition de la télomérase en combinaison avec l'inhibition de PARP représente une stratégie potentielle pour palier au problème du laps de temps écoulé entre le moment de l'inhibition de la télomérase et l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses.

G. Déprotection du télomère et dommages à l'ADN.

L'érosion des télomères ou une altération de leur protection par les protéines télomériques génèrerait un signal équivalent à une cassure double brin de l'ADN. Par conséquent, les télomères seraient reconnus comme un dommage à l'ADN (de Lange, 2002). Par exemple, l'inactivation de la fonction de TRF2 induit l'apparition de TIF (Telomere Dysfonction-Induced Foci), localisés au niveau de la majorité des extrémités chromosomiques qui comprennent des facteurs associés à la réponse aux dommages à l'ADN (53BP1, γH2AX, Rad 17, ATM, Mre11) (Takai *et al.*, 2003). La réponse au niveau des télomères apparaît comme une réponse spécifique et localisée mais qui utilise les facteurs impliqués dans le programme de réponses aux dommages à l'ADN.

1. Voies de détection de dommages à l'ADN.

Chez les eucaryotes les réponses aux altérations de l'ADN sont gouvernées par un mécanisme de surveillance appelé « checkpoint DNA damage ». Cette voie conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages de l'ADN en coordonnant la progression du cycle cellulaire avec la capacité de réparation de l'ADN quand cela est possible. De plus, elle permet l'activation et le recrutement sur les sites de dommages à l'ADN de protéines impliquées dans la réparation et la recombinaison de l'ADN. Ces protéines de contrôle permettent aux cellules de surmonter les désagréments occasionnés par les stress génotoxiques et sont garantes de la défense contre l'instabilité génomique. La voie de dommage à l'ADN est constituée d'une cascade de transduction de signaux composée en premier lieu par les senseurs qui ont pour fonction la détection de l'ADN altéré, puis les transducteurs centraux qui agissent dans une cascade de protéines kinases pour réguler une

myriade de protéines effectrices. La protéine P53 « gardienne du génome » joue un rôle central dans cette voie de signalisation puisqu'elle intervient à l'intersection des cascades de reconnaissance en amont et des effecteurs de la réparation et de la recombinaison en aval.

Les protéines centrales de reconnaissance des dommages à l'ADN appartiennent à la famille des PIKK (phosphoinositide 3-kinase related kinase) : la protéine ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (ATM and Rad3 related) et DNA-PK (DNA protein kinase). Il existe deux principales voies de détection des lésions à l'ADN, une faisant intervenir la protéine ATM et l'autre ATR. ATR est activée en réponse aux cassures simple et double brin de l'ADN provoquées par irradiations aux UV, par l'hydroxyurée, ou lors d'anomalies survenant au niveau des fourches de réplication, tandis qu'ATM et DNA-PK sont activées préférentiellement par les cassures double brin (Sengupta *et al.*, 2005). Les DNA-PK régulent la réparation des cassures double brin par la voie NHEJ (non homologous end joining), (pour revue (Burma *et al.*, 2004)).

Reconnaissance des dommages de l'ADN.

Les cassures double brin sont reconnues initialement et transitoirement par le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) (Petrini et al., 2003) qui recrute ensuite la protéine ATM (FigI-35). Ce recrutement est médié par une interaction protéine/protéine entre la partie C-terminale de Nbs1 et les répétitions HEAT d'ATM (Falck et al., 2005; You et al., 2005). Il existe aujourd'hui un débat pour savoir si le recrutement d'ATM par le complexe MRN permet l'activation d'ATM ou si ATM est recrutée dans un état pré-activé (Falck et al., 2005; You et al., 2005). Pour les deux cas cela implique l'activation par autophosphorylation d'ATM sur les résidus sérine S1981 (Bakkenist et al., 2003), S367 et S1893 (Kozlov et al., 2006). Ces trois phosphorylations sont nécessaires pour la fonction d'ATM et la phosphorylation sur la sérine S1981 sert de marqueur d'activation d'ATM in vitro (Bakkenist et al., 2003; Kozlov et al., 2006) et in vivo (Bartkova et al., 2005). Après recrutement du complexe MRN-ATM aux cassures double brin s'opère un réarrangement local de la chromatine qui permettra ensuite la réparation de l'ADN et l'initiation de l'activation des protéines de contrôle du cycle cellulaire. Dans un premier temps ATM phosphoryle la queue C-terminale de l'histone H2AX sur son résidu sérine 139 et cette phosphorylation désignée sous le terme yH2AX est le marqueur universel de cassures double brin. H2AX est massivement phosphorylé sur une région de la chromatine entourant la cassure double brin estimée à deux mégabases (Rogakou et al., 1998). Cette phosphorylation de H2AX permet en retour l'amarrage de la protéine Mdc1 (mediator of DNA-damage checkpoint-1) sur H2AX et la protéine Nbs1 du complexe MRN (Stucki *et al.*, 2006). Cette interaction permet un recrutement graduel de γ H2AX de part et d'autre des cassures double brin et le recrutement des protéines 53BP1 (P53 binding protein-1), BRCA1 (breast cancer susceptibility protein-1) (Bekker-Jensen *et al.*, 2006). L'augmentation de la concentration locale d'ATM est importante pour amplifier la phosphorylation de ces cibles comme la protéine de contrôle du cycle cellulaire CHK2 (Shiloh, 2003). La modification de topologie autour des cassures s'opère très rapidement, à savoir moins d'une minute après l'apparition de la cassure double brin. Dans un second temps les protéines du complexe MRN et ATM sont essentielles pour initier la résection des cassures double brin en un simple brin qui sera reconnu comme une cassure simple brin. Cette résection s'opère par clivage enzymatique des extrémités de l'ADN. En effet la formation de ces extrémités simple brin apparait comme une structure intermédiaire indispensable pour la réparation de l'ADN par recombinaion homologue. Elle implique également la seconde protéine de détection de dommages à l'ADN, la protéine ATR (Adams *et al.*, 2006; Cuadrado *et al.*, 2006; Jazayeri *et al.*, 2006; Myers *et al.*, 2006).

L'extrémité simple brin va être recouverte de la protéine RPA (replication protein A) créant ainsi une plateforme pour le recrutement de l'hétérodimère ATRIP (ATR-interactingprotein)-ATR (Zou *et al.*, 2003). L'activation complète de la kinase ATR nécessite le recrutement de la protéine TopBP1 (topoisomerase binding protein 1) au niveau de la cassure simple brin indépendamment du complexe ATRIP-ATR (Kumagai *et al.*, 2006). Une fois activée ATR peut activer directement par phosphorylation ses substrats H2AX, BLM, 53BP1 et la kinase du cycle cellulaire CHK1 après activation de la claspine (Kumagai *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2006). L'assemblage de la claspine sur la cassure simple brin généré par un stress réplicatif nécessite la phosphorylation ATR dépendante de Rad17, une autre protéine importante qui interagit spécifiquement avec la cassure simple brin (Wang *et al.*, 2006). Cependant il n'est toujours pas prouvé que cette protéine Rad17 est recrutée lors de la génération de cassures simple brin créées lors de la résection de cassures double brin.



Figure I-35: Modèle de reconnaissance des cassures doubles brins par ATM et par ATR

A) Activation d'ATM. Un signal permet aux dimères d'ATM de s'autophosphoryler sur les sérines 1981. Les dimères se monomérisent et changent de conformatio afin de reconnaître et de fixer leurs cibles. B) Activation d'ATR. La fixation d'ATR aux cassures double brin nécessite la récession des extrémités de l'ADN et la génération d'extrémités simple brin recouvertes de la protéine RPA (replication protein A) RPA sert ensuite de matrice pour le recrutement spécifique des hétérodimères ATRIP (ATR-interacting-protein)-ATR. Les médiateurs représentent une classe de protéines impliquées dans la modulation de l'activité des kinases ATM et ATR et dans la facilitation des interactions avec leurs substrats. Les médiateurs d'ATM incluent MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint 1), 53BP1 (P53binding protein-1), BRCA1 (breast cancer susceptibility protein-1). La claspine a un rôle analogue de médiateur pour la voie ATR. (Bartek et al., 2004).



Figure I-36 : P53 est au centre de la voie de réponse aux dommages de l'ADN.

Les signaux de dommages à l'ADN liés aux cassures doubles brins ou aux stress de réplication sont dans un premier temps reconnus par ATM et ATRIP-ATR respectivement. changements de topologie de la chromatine mènent à l'activation par Les autophosphorylation d'ATM, qui est recrutée au niveau des cassures double brin. Le site du dommage contient le complexe MRN et BRCA1. Les protéines H2AX, 53BP1, MDC1, et SMC1 (structural maintenance of chromosomes-1) sont phosphorylées par ATM et sont les protéines clés impliquées dans la transduction du signal de cassures double brin. Le complexe ATRIP-ATR est recruté au niveau des fourches de réplication par la protéine RPA. Le complexe RAD9-RAD1-HUS1 (RAD9 dans la figure) et son facteur associé RAD17 facilite la reconnaissance de la fourche de réplication qui est arrêtée. BLM et H2AX sont phosphorylées par ATR et CHK1 en réponse aux stress de réplication. CHK1 et CHK2, les cibles respectives d'ATM et ATR phosphorylent des protéines transductrices. Les protéines transductices transmettent le signal à des protéines effectrices telles que P53 qui est phosphorylée sur plusieurs résidus spécifiquement par ATM, ATR, CHK1 et CHK2. P53 est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la sénescence. P53 intervient aussi dans des processus qui ne nécessitent pas son activation. L'induction des voies nécessitant ou ne nécessitant pas l'activation de P53 dépendrait du niveau de détection des dommages à l'ADN et du type cellulaire. (Sengupta et al., 2005).

2. Activation des points de contrôle du cycle cellulaire.

La fonction biologique principale des voies de contrôle des dommages de l'ADN est de coordonner la progression du cycle cellulaire avec la réparation de l'ADN. Les protéines effectrices des voies de dommages à l'ADN sont les protéines de contrôle du cycle cellulaire CHK1 et CHK2 (FigI-37).



Figure I-37 : Schéma représentatif de la régulation de CHK1 et CHK2 en condition de stress.

A) Les radiations ionisantes, l'érosion des télomères, et des médicaments radiomimétiques génèrent des cassures double brin au niveau de l'ADN, ce qui active la kinase ATM. ATM phosphoryle CHK2 à son extrémité N-terminale, et plus particulièrement sur la thréonine 68. Cette phosphorylation permet l'homodimérisation de CHK2 puis une transphosphorylation intermoléculaire de CHK2 à son extrémité C-terminale. B) Les ultra-violets, les problèmes de réplication, et certains médicaments activent ATR, la principale kinase responsable de l'activation de CHK1. ATR phosphoryle CHK1 sur la sérine 317 et ATM sur la sérine 345. A) et B) ATX est un nouveau membre de la famille des kinases ATM/ATR activée par les UV et en réponse aux cassures double brin et contribuerait à l'activation de CHK1 et CHK2 suite à de nombreux types de stress génotoxiques. (Bartek et al., 2003).

Comme ATR et ATM, CHK1 et CHK2 sont deux serine/thréonine kinases. En phosphorylant de multiples protéines dont P53, elles permettent l'arrêt des cellules dans le cycle cellulaire aux transitions G1/S, G2/M et en intra-S ce qui permet l'activation de la machinerie de réparation. De manière générale les signaux de cassures double brin détectés par ATM activent CHK2 et ceux des cassures simple brin ATR, cependant ces deux protéines partagent les mêmes fonctions. En effet CHK1 et CHK2 transfèrent le signal émis par la voie

de dommage de l'ADN aux protéines Cdc 25 A, Cdc25B et Cdc25C (cell division cycle) (FigI-38).

Les protéines Cdc25A et C sont actives à l'état déphosphorylé et permettent les transitions G1/S et G2/M par déphosphorylation des CDK (cyclines dependant kinase). CHK1 et 2 inactivent la fonction des Cdc25A et C par phosphorylation et permettent ainsi l'arrêt du cycle cellulaire (Niida *et al.*, 2006).



Figure I-38 : Points de contrôle du cycle cellulaire

Point de contrôle G1/S :

La protéine Cdc25A non phosphorylée permet la transition G1/S. La voie de signalisation exacte d'arrêt dans le cycle cellulaire dépend du type de dommages à l'ADN occasionné. En général, les cassures double brin de l'ADN conduisent à l'activation d'ATM qui ensuite phosphoryle CHK2 sur plusieurs sérines et thréonines. Les cassures simple brin conduisent à l'activation par phosphorylation de CHK1 sur des résidus sérine. CHK1 et 2 permettent la phosphorylation de Cdc25A et son inactivation par exclusion nucléaire et dégradation par la voie du protéasome et ainsi l'arrêt des cellules en phase G1. P53 peut être activée par phosphorylation directement par ATM et ATR soit par les CHK1 et 2, ce qui permet sa stabilisation et son accumulation nucléaire. P53 peut donc agir comme facteur de transcription et activer la protéine P21 (WAF1 ou CIP1), un inhibiteur des CDK qui permet l'arrêt du cycle cellulaire en G1. Le point de contrôle en phase G1 est le seul cas ou la perte de P53 mène à une abrogation totale de ce point de contrôle (North *et al.*, 2000).

Point de contrôle de la phase intra-S :

Il existe deux voies de signalisation qui régulent le point de contrôle de la phase intra-S. La première implique la voie ATM/ATR-CHK1/CHK2-Cdc25A-CDK2 qui est plus ou moins similaire à celle du point de contrôle G1/S. Cette voie permet de retarder la réplication afin de mettre en place la machinerie de réparation. La deuxième voie de signalisation implique la protéine NBS1 qui après phosphorylation par ATM et CHK2, déclenche une cascade d'activation de protéines incluant Mre11 et Rad50 qui non seulement jouent un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire mais aussi dans le processus de réparation (pour revue (Sancar *et al.*, 2004)).

Point de contrôle G2/M :

Quand les cellules subissent des dommages à l'ADN durant la phase G2, le point de contrôle G2/M permet l'arrêt dans le cycle afin de bloquer la progression des cellules en mitose. Comme pour le point de contrôle G1/S, c'est le type de dommage de l'ADN qui détermine la voie de signalisation qui sera activée, à savoir ATM-CHK2-Cdc25C pour les cassures double brin et ATR-CHK1-Cdc25C pour les cassures simple brin. La maintenance de cet arrêt semble être partiellement indépendante de P53/P21 contrairement au point de contrôle G1/S puisque les cellules tumorales sans P53 fonctionnelle ont tendance à s'accumuler en G2 après induction de dommages à l'ADN (Stark *et al.*, 2006).

3. Réparation des dommages de l'ADN.

Les voies de réparation de l'ADN sont activées durant l'arrêt des cellules dans le cycle et sont divisées en cinq catégories (pour revue (Sancar *et al.*, 2004)).

Le base excision repair (BER) :

Le base excision repair (BER) est la principale voie de réparation de l'ADN responsable de la réparation de sites de l'ADN contenant des bases apuriniques et apyrimidiques. Cette voie est catalysée par quatre étapes consécutives faisant intervenir une ADN glycosylase, une AP endonucléase (APE), une ADN polymérase et une ligase.

Le nucléotide excision repair (NER) :

Il permet la réparation de petites régions de l'ADN aux alentours de cassures de l'ADN occasionnées par les UV.

Le mismatch repair (MMR) :

Il permet d'enlever les appariements de nucléotides et l'insertion ou la délétion de boucles.

Le Non-Homologue End-Joining (NHEJ) :

C'est la principale voie de réparation utilisée pour réparer les cassures double brin dans les cellules somatiques. Elle permet la jointure des cassures sans modèle.

La recombinaison homologue (HR) :

C'est un voie de recombinaison de l'ADN qui permet la réparation de cassures double brin et qui utilise une molécule d'ADN double brin homologue comme modèle pour la réparation de la cassure.

4. Rôle de P53 dans la réponse aux dommages de l'ADN.

P53 est un facteur de transcription tétramérique qui est régulé de façon posttraductionnelle par phosphorylation, acétylation, ou sumoylation sur 18 sites différents en réponses à de très nombreux stress. Après exposition des cellules à différents stress, P53 est activée et ainsi peut décider du destin des cellules soit en favorisant leur survie en induisant l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'activation de voie de survie cellulaire, soit déclencher la sénescence ou la mort par apoptose. Des mutations du gène TP53 codant pour la protéine P53 responsables de l'inactivation de cette protéine sont retrouvées dans plus de 50% des tumeurs, ceci indiquant que la perte de fonction de cette protéine est un avantage sélectif pour les cellules tumorales (Weisz et al., 2007). De la même façon, des mutations germinales dans le gène TP53 sont responsables du syndrôme Li-Fraumeni, un syndrôme génétique caractérisé par la formation spontanée de tumeurs. Des cellules fibroblastiques de patients atteints de cette maladie montrent que la perte de la fonction de P53 résulte en des caryotypes anormaux avec une altération du nombre et de la structure des chromosomes (Boyle et al., 1998). Des souris P53 7 développent des tumeurs spontanées, des amplifications de gènes et une polyploïdie (Attardi et al., 2005). De plus des études sur des souris transgéniques comprenant un nombre surnuméraire de copie du gène TP53 montrent une réponse amplifiée des voies de dommages de l'ADN (Garcia-Cao et al., 2002). Ainsi ces études établissent que P53 est un suppresseur de tumeur nécessaire pour l'intégrité du génome.

Dans les conditions normales de croissance, la protéine P53 est associée à une protéine régulatrice HDM2, l'homologue de MDM2 (mouse double minute). MDM2 bloque ainsi P53 de ces interactions avec ses co-activateurs de transcription et permet de la maintenir en faible quantité dans la cellule. MDM2 ubiquityle P53 et permet ainsi sa dégradation via la voie de protéasome (Brooks *et al.*, 2006). Il existe plusieurs mécanismes pour moduler l'interaction P53/MDM2 durant les phases de stress cellulaire. Ceux-ci incluent les modifications post-traductionnelles de P53 et de MDM2 et des interactions avec d'autres facteurs cellulaires tel que ARF (p14 ^{ARF} chez l'homme et p19^{ARF} chez la souris). ARF a initialement été découvert

comme un transcrit alternatif du gène Ink4a/ARF, codant pour la protéine p16^{Ink4a} inhibiteur des CDK (Sherr, 2001). ARF inhibe la croissance de cellules aberrantes en réponse à l'activation d'oncogènes, en partie grâce à l'induction de P53 (Sherr, 2001; Sharpless *et al.*, 2004). L'induction de P53 par ARF est régie par l'inhibition de l'activité de MDM2 (Kamijo *et al.*, 1998; Pomerantz *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998) ou de ARF-BP1, un partenaire de ARF récemment découvert (Chen *et al.*, 2005). Ainsi, un modèle de régulation de P53 est proposé (FigI-39) ou le rôle prédominant de MDM2, dans les cellules non stressées, n'est pas de favoriser la dégradation de P53, mais de contrôler, pendant les réponses aux stress, le niveau d'expression de P53 et son activité.



Figure I-39 : Modèle de stabilisation de P53.

Dans les cellules non stressées, la faible quantité de MDM2 induit seulement une monoubiquitination de P53 qui est insuffisante pour provoquer sa dégradation, alors que ARF-BP1 sont les principales E3 ligases de l'ubiquitination de P53 et de sa dégradation. Dans des conditions d'induction de dommages à l'ADN, P53 est stabilisée et activée par des modifications post-traductionnelles et par d'autres voies de signalisation, ce qui conduit à l'induction de HDM2, et de deux ubiquitine ligases COP1 et PIRH2 (Brooks et al., 2006).

En réponse aux dommages à l'ADN, la protéine P53 s'accumule dans le noyau suite à des changements post-traductionnels, la modification la plus étudiée étant la phosphorylation (FigI-40). La phosphorylation sur des résidus en N-terminal , spécialement sur les Ser¹⁵, Ser²⁰, Ser³⁷, Thr¹⁸ affectent l'interaction de P53 avec son régulateur négatif MDM2, contribuant ainsi à sa stabilisation (Ullrich *et al.*, 1993; Shieh *et al.*, 1997; Chehab *et al.*, 1999; Sakaguchi *et al.*, 2000). En revanche, la phosphorylation en C-terminal sur les Ser³¹⁵,

Ser³⁹² participerait à l'augmentation de la fixation de P53 in vitro sur des séquences d'ADN spécifiques (Hupp et al., 1995; Wang et al., 1995). Les protéines ATM, ATR et DNA-PK augmentent la stabilité de P53 en la phosphorylant sur la sérine 15 et 20 et permettent aussi indirectement la phosphorylation sur la sérine 20 par l'intermédiaire de CHK1 et CHK2. Ces deux sites (sérines 15 et 20) non phosphorylés semblent indispensables à l'interaction de P53 avec MDM2 (Alarcon-Vargas et al., 2002). L'inhibition des fonctions d' ATR dans les cellules conduit en une réduction de la phosphorylation de P53 sur la sérine 15 en réponse aux radiations ionisantes et aux UV (Tibbetts et al., 1999). Bien que la perte d'ATM retarde la stabilisation de P53 en réponse aux radiations ionisantes, la phosphorylation de P53 sur la sérine 15 reste toujours détectée dans les cellules (Siliciano et al., 1997). En plus de la phosphorylation sur la sérine 15, ATR permet aussi la phosphorylation sur les sérines 37 et 392 en réponse aux radiations UV (Kapoor et al., 1998; Tibbetts et al., 1999; Das et al., 2004). La protéine ATM peut également, en phosphorylant directement MDM2, empêcher l'export nucléaire de P53 et donc empêcher sa dégradation dans le cytoplasme.Des mutations au niveau des sérines 15 et 20 altèrent l'activité pro-apoptotique de P53 contrairement à d'autres mutations. Ces deux sérines ont donc un rôle crucial dans l'induction de l'apoptose p53-dépendante. La phosphorylation de P53 sur les sérine 15 et 20 est importante pour sa stabilisation, son induction et sa fonction transactivatrice (Unger et al., 1999) puisqu'elle empêche MDM2 de réguler P53.

La phosphorylation de P53 sur la sérine 392 favorise la stabilité du tétramère et par conséquent son activité transcriptionnelle (Kim *et al.*, 2004). Cette phosphorylation se fait en général suite à des traitements d'agents anticancéreux tels que la doxorubicine et l'étoposide et de même, après exposition de la cellule à des radiations UV qui génèrent des lésions importantes sur l'ADN et non après exposition aux radiations γ (Kapoor *et al.*, 2000). Les radiations UV induisent la phosphorylation de P53 au niveau des sérines des domaines N et C-terminaux alors que les radiations γ induisent une phosphorylation de P53 sur la sérine 15. Les différences de réponses au niveau de P53 face à ces deux types de radiations peuvent s'expliquer par le type de lésions provoquées sur l'ADN. Les radiations UV provoquent des dimères de thymine alors que les radiations γ induisent des cassures de l'ADN double brin. Les données de la littérature nous précisent que plusieurs protéines peuvent être responsables de cette phosphorylation : la protéine CAK (CDK2 activating kinase), la protéine CKII (casein kinase II) associée aux facteurs hSpt16 et SSRP1 (Keller *et al.*, 2001), la protéine PKR (double stranded RNA activated protein kinase) (Cuddihy *et al.*, 1999; Cuddihy *et al.*, 1999), et CDK 9 (Radhakrishnan *et al.*, 2006), la protéine 38MAP kinase directement ou

indirectement puisqu'elle active par phosphorylation CKII après dommage à l'ADN par une voie encore peu étudiée. De plus le fait d'augmenter P14ARF dans les cellules permet la phosphorylation de P53 uniquement sur la sérine 392 (Jackson *et al.*, 2004).

La phosphorylation de la sérine 392 peut être médiée par la caséine kinase II, mais aussi par les kinases de la famille de la MAPK comme P38 qui est activée par les radiations UV (Keller *et al.*, 2001).



Figure I-40 : Modifications post-traductionnelles de la protéine P53 humaine induites par les dommages à l'ADN.

La barre représente les 393 acides aminés du polypeptide P53, les régions associées à une trans-activation (TA), la séquence spécifique de fixation à l'ADN (DBD), la séquence de localisation nucléaire (NLS), le domaine de tétramerisation (TET), et une région de régulation négative de fixation spécifique à l'ADN (REG). Les sites connus de phosphorylation et d'acétylation sont représentés par les ovales et les carrés, respectivement; le nombre d'acides aminés modifié est aussi représenté, ainsi que les possibles enzymes responsables de la phosphorylation et de l'acétylation. La réponse aux radiations ionisantes est initiée par la création de cassures au niveau de l'ADN qui sont reconnues directement ou indirectement par ATM, qui phosphoryle directement P53 et active d'autres kinases (CHK1 et CHK2) qui phosphorylent également P53 et MDM2. Après exposition aux UV, ATR, p38MAPK et le complexe CK2/FACT sont activés et phosphorylent des résidus de P53. P53 et MDM2 sont modifiées par conjugaison à SUMO-1 par un mécanisme impliquant E1/Ubc9. Les dommages à l'ADN suppriment le transfert de SUMO-1 à MDM2, et de cette façon empêche l'ubiquitination, qui stabilise MDM2 et augmente le niveau de dégradation de P53. La phosphorylation de P53 sur Thr55 déstabilise P53, et, les dommages à l'ADN inhibent cette modification post-traductionnelle. PCAF et CBP/p300 sont des acétyl-transférases impliquées dans le remodelage de la chromatine. L'acétylation des résidus en C-terminal est médiée par une cascade initiée par des phosphorylations en N-terminal. Ces phosphorylations modulent la fixation d'acétyl-transférases à P53. De façon similaire, la phosphorylation des Ser6 et Ser15 faciliterait celle des Ser9 et Thr18 par CK1. (Appella et al., 2001).

5. TRF2 dans la réponse aux dommages de l'ADN.

Des données récentes de la littérature ont montré l'implication de la protéine télomérique TRF2 dans les réponses précoces aux dommages de l'ADN. En effet TRF2 est associée aux télomères avec les protéines de réparation des cassures double brin de l'ADN incluant le complexe MRN, les protéines Ku70, WRN et BLM, (Song et al., 2000; Zhu et al., 2000; Opresko et al., 2002) ceci ayant suggéré un rôle de TRF2 dans les processus de réponses aux dommages de l'ADN. Il a été montré que TRF2 s'associait par son domaine basique aux cassures doubles brins de l'ADN non télomérique occasionnées par irradiation γ de fibroblastes. Cette association est transitoire et s'opère quelques secondes après la photo induction des cassures doubles brins, et avant toute activation des protéines kinases ATM et DNA-PK, des protéines du complexe MRN, de Ku70 et de WRN et BLM. (Brooks et al., 2006). Cependant l'association de TRF2 au niveau des cassures double brin de l'ADN engendrée par des sources de faible intensité de radiations UV ou ionisantes reste contreversée (Williams et al., 2007). La surexpression de TRF2 permet une réduction de l'accumulation des formes phosphorylées de ATM, P53, et de yH2AX pendant la première heure d'expositions aux radiations γ , ceci laissant suggérer que TRF2 serait en compétition avec ATM ou atténuerait sa réponse (Bradshaw et al., 2005). L'équipe de Titia De Lange a également montré que la surexpression de TRF2 inhibe la voie de réponse aux dommages à l'ADN et les kinases d'arrêt du cycle cellulaire après radiations ionisantes. Elle a de plus montré que in vitro TRF2 se fixe au niveau de la région d'ATM comprenant la sérine S1981 et propose que TRF2 inhibe l'activation d'ATM au niveau du télomère (Karlseder et al., 2004). L'équipe de D. Gilley a rapporté l'existence d'une forme phosphorylée de TRF2 au niveau de télomère en réponse au dommage de l'ADN (Tanaka et al., 2005).

6. Signal d'arrêt des dommages à l'ADN.

Les voies de dommages à l'ADN peuvent être régulées négativement par une boucle de rétrocontrôle impliquant des phosphatases spécifiques. Les travaux de l'équipe de Donehower (Lu *et al.*, 2005) ont mis en évidence que, une sérine/thréonine phosphatase de type 2C, PPM1D (Protein phosphatase 1D magnesium dependent delta isoforme) aussi appelée Wip1 (wild-type P53-induced phosphatase) était capable de déphosphoryler deux des cibles de ATM et ATR, à savoir P53 et CHK1. Dans les cellules, la transcription de PPM1D

est régulée positivement d'une façon P53 dépendante suite aux dommages àl'ADN incluant des traitement aux UV et aux radiations ionisantes. Le gène codant pour PPM1D est amplifié dans les lignées cellulaires humaine issues d'adénocarcinomes pulmonaires et dans approximativement 11% des tumeurs pulmonaires primaires (Bulavin *et al.*, 2002).

PPM1D a été à l'origine découverte par une étude de transcrits induits dans des cellules suite à un stress aux radiations ionisantes (Fiscella et al., 1997). Cette protéine est induite par les UV, les radiations ionisantes, le méthyl méthane sulfonate, l'anisomycine et l'H₂O₂ d'une façon P53 dépendante (Fiscella et al., 1997; Takekawa et al., 2000). Il existe quatre classes principales de sérine/thréonine phosphatase, le type 1 (PP1), le type 2A (PP2A), le type 2B (PP2B) et le type 2C (PP2Ca) (Mumby et al., 1993). Les séquences de PPM1D montrent des régions spécifiques d'homologie avec les protéines phosphatase de type 2C (Fiscella et al., 1997). In vitro, des études confirment que PPM1D possède une activité sérine/thréonine phosphatase magnésium dépendante et comme les PP2C, elle est insensible à l'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatases (Fiscella et al., 1997). Chez les eucaryotes, un des rôles des PP2C est de réverser la cascade de protéines kinases activée lors d'états de stress cellulaire (Kyriakis et al., 1996). La PP2Cα humaine inhibe la voie de réponse au stress médiée par la P38 MAP (mitogen-activated protein) kinase (Takekawa et al., 1998), et , la première cible identifiée de PPM1D a été la P38 MAP kinase (Takekawa et al., 2000). P38 MAP kinase est activée en réponses à différents stress génotoxiques incluant les UV et les radiations γ , par phosphorylation sur Thr180 et Tyr 182 (Bulavin *et al.*, 2002) *in vivo*, P38 est associée à P53 et ce qui permet la phosphorylation de P53 sur les sérines 33 et 46 en réponse aux UV. La phosphorylation de P53 par P38 stimule son activité de facteur de transcription puis l'induction d'apoptose (Bulavin et al., 1999). PPM1D inhibe sélectivement l'activation de P38 par déphosphorylation sur la thréonine 180 et permettrait ainsi la régulation négative de P53. Par la suite il a été montré que PPM1D était capable d'inhiber la voie de contrôle des dommages à l'ADN initiée par ATM et ATR en déphosphorylant CHK1 sur la sérine 345 et CHK2 sur thréonine 68 (FigI-41). En effet, suite à l'induction de dommages à l'ADN par radiations ionisantes, ATM est activéeet phosphoryle CHK2 sur la thréonine 68, et, PPM1D, en se fixant sur CHK2, permet la déphosphorylation sur cette thréonine (Oliva-Trastoy et al., 2007). De même, ATR et ATM phosphorylent CHK1 sur les sérines 317 et 345 suite à des dommages de l'ADN, PPM1D interagit avec CHK1 et permet sa déphosphorylation sur la sérine 345 (Lu et al., 2005). De plus, in vivo la surexpression de PPM1D induit une déphosphorylation de CHK1 sur la sérine 345 et par conséquent des cibles de CHK1 en réponse aux UV. L'inactivation par ARN interférence de PPM1D permet une hyperphosphorylation de CHK1 sur la sérine 345 suite aux traitements UV (Lu et al., 2005). De plus, comme CHK1 permet la phosphorylation de P53 sur la sérine 20, PPM1D participerait indirectement à cette déphosphorylation via PPM1D. Les travaux de l'équipe de Donehower (Lu et al., 2005) ont montré que la sérine 317 de CHK1, une autre sérine cible majeure de la kinase ATR est modestement déphosphorylée par PPM1D suite à un test phosphatase et suite à une surexpression de PPM1D. Par des tests phosphatase in vitro, PPM1D déphosphoryle yH2AX sur la sérine 139 (Shreeram et al., 2006). En revanche, une autre phosphatase, PP-1 déphosphoryle in vitro et in vivo P53 sur les sérines 15 et 37, ceci favorisant l'inhibition de l'apoptose (Li et al., 2006). De même, la protéine phosphatase PP2A déphosphoryle in vitro y H2AX, et ces deux protéines PP-1 et PP2A colocalisent au niveau des foci de réparation de l'ADN. Cette déphosphorylation est ATM, ATR, DNA-PK indépendante (Chowdhury et al., 2005). PPM1D serait également responsable de l'inhibition de la voie de réparation de l'ADN BER (Base exision repair) en déphosphorylant l'isoforme nucléaire de l'uracile DNA glycosylase (UNG2) après réparation de l'ADN (Lu et al., 2004). Une autre fonction de PPM1D a récemment été trouvée renforçant son rôle dans la croissance tumorale, par stimulation de l'activité de plusieurs récepteurs nucléaires incluant le récepteur de la progestérone et des oestrogènes (Proia et al., 2006).



Figure I-41 : Rôles de PPM1D dans la boucle de rétrocontrôle négative des voies de dommage à l'ADN médiées par ATM et ATR par déphosphorylation de CHK1 et P53. Dans cet exemple, pendant la réponse aux dommages à l'ADN par irradiation aux UV, ATR

Dans cet exemple, pendant la reponse aux dommages a l'ADN par irradiation aux UV, AIR est activée et phosphoryle la kinase CHK1 sur la sérine 345, ceci facilitant son activation. CHK1 permet la stabilisation de P53 par phosphorylation sur la sérine 20. De plus, ATR phosphoryle directement P53 sur la sérine 15 avec pour conséquence une augmentation de son activité de facteur de transcription. P53 activée régule positivement la transcription de PPM1D et permet ainsi l'augmentation du taux de la protéine PPM1D. Par conséquent, PPMID déphosphorylr P53 sur la sérine 15 et CHK1 sur la sérine 345. La diminution de l'activité de CHK1 va permettre une réduction de la phosphorylation de P53 sur la sérine 20, qui facilitera la dégradation de P53 via son régulateur négatif MDM2 (mouse double minute 2). Ainsi l'expression de PPM1D permet une réversion de la voie de réponse des dommages à l'ADN, ceci incluant une réduction de l'activité de réparation de l'ADN, et du contrôle du cycle cellulaire par les protéines de contrôle du cycle cellulaire (checkpoint). Le bu serait le retour à l'état normal des cellules pour revenir à des conditions homéostasiques après la réparation de l'ADN endommagé (Lu et al., 2005).

Ainsi, PPM1D serait responsable du retour de cellules dans un état non stressé après réparation de l'ADN et serait donc un régulateur de l'homéostasie cellulaire après dommages à l'ADN. Alors que la surexpression de PPM1D contribue aux développements de cancers humains en inhibant la fonction suppresseur de tumeur de P53, les souris KO pour PPM1D sont résistantes aux tumeurs spontanées tout au long de leur vie (Nannenga *et al.*, 2006).

7. Dommages à l'ADN conduisant à la sénescence.

La sénescence cellulaire a été définie par Hayflick comme la perte ultime et irréversible de la capacité de réplication des cellules somatiques en culture primaire (Hayflick *et al.*, 1961). En effet, la croissance des cellules est bloquée après un nombre défini de divisions ceci suggérant l'idée « d'horloge biologique » ou d'un « compteur de réplication » qui définit le nombre de divisions qu'une cellule peut effectuer avant qu'un signal ne lui permette plus de se diviser (Hayflick *et al.*, 1961). Cet arrêt de croissance irréversible a été désigné sous le terme de sénescence **réplicative**. Plusieurs mécanismes sont responsables de ce phénomène d'horloge mitotique, et celui induit par la déprotection du télomère est le plus établi et le plus étudié. En 1990, il a été montré que les télomères de cellules issues d'une culture primaire de fibroblastes humains raccourcissaient au fur et à mesure des réplications (Harley *et al.*, 1990). Il a été établi par la suite que l'attrition télomérique déclenchait la sénescence cellulaire (Hayflick, 2000). De plus le raccourcissement des télomères déstabiliserait la T-loop et donc augmenterait la probabilité de déprotection du télomère (Griffith *et al.*, 1999).

Les cellules en sénescence diffèrent des cellules en pré-sénescence par de multiples aspects physiologiques (Campisi, 2000; Itahana et al., 2001). En effet, les cellules en sénescence ont une expression de gènes différente incluant des changements dans l'expression de facteurs de transcription variés. La morphologie des fibroblastes à la fin de leur vie réplicative est principalement caractérisée par un élargissement et un aplatissement des cellules avec une augmentation concomitante de la taille du noyau et du nucléole, une augmentation du nombre de lysosomes et du golgi, l'apparition de vacuoles dans le cytoplasme et le réticulum endoplasmique, et une augmentation d'extensions cytoplasmiques. En plus des changements morphologiques, les populations de cellules en sénescence montrent une augmentation de cellules multinuclées (Cristofalo et al., 2004). Les fibroblastes en sénescence expriment un niveau élévé de protéases permettant la dégradation de la matrice extra-cellulaire : les collagénases, les activateurs du plasminogène (t-PA), et les membres de la famille des MMP (matrix metalloproteinase). En revanche, elles présentent une diminution de la quantité des inhibiteurs des MMP comme TIMP1 et MIG-5 et une diminution de la quantité de protéases de dégradation de la matrice extra-cellulaire comme la laminine et de plusieurs formes de collagène (Cristofalo 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 et al., 1995).



Figure I-42 : Il existe deux types de sénescence chez les cellules de mammifères.

La sénescence induite par le phénomène d'horloge mitotique est désignée sous le terme de sénescence intrinsèque. La sénescence induite par des signaux externes indépendants on non du télomère est désignée sous le terme sénescence extrinsèque. Ces signaux incluent les conditions de culture cellulaire, les dommages à l'ADN causés par des radiations ou produits chimiques, l'expression d'oncogènes et de mitogènes, et la surexpression exogène de suppresseurs de tumeurs tels que P16, P14ARF et P21. (Itahana et al., 2004).

a) La sénescence intrinsèque (FigI-42).

Les fibroblastes normaux en culture rentrent en sénescence après 50 à 100 doublements de populations, ce qui résulte du raccourcissement des télomères en absence d'activité télomérase. P53 détecterait la désorganisation de la structure télomérique (T-loop) ou les fusions chromosomiques qui résultent de ce dysfonctionnement des télomères (Griffith *et al.*, 1999; de Lange, 2002). L'inactivation de P53 permet l'augmentation de l'espérance de vie des fibroblastes humains (Itahana *et al.*, 2001) alors que les cellules en sénescence montrent une forte activité P53 (Itahana *et al.*, 2002), et de sa cible P21, responsable de l'arrêt des cellules en G0/G1 (Noda *et al.*, 1994). La délétion du gène P21 est suffisante pour inhiber l'entrée en sénescence des fibroblastes humains (Brown *et al.*, 1997).

Ainsi la sénescence réplicative des fibroblastes humains est absolument dépendante de P53. Dans les cellules en sénescence P53 est phosphorylée sur la sérine 15, la thréonine 18, la sérine 376 et est déphophorylée sur la sérine 392. Ces phosphorylations démontrent bien un rôle direct de P53 dans l'induction de la sénescence réplicative. Elles sont compatibles avec le modèle de déprotection des télomères reconnus comme des cassures double brin qui déclenchent la voie de réponse aux dommages à l'ADN (Webley *et al.*, 2000). Le raccourcissement télomérique est accéléré dans les fibroblastes de patients atteints du

syndrome ataxia telangiectasia (AT), une maladie héréditaire liée à l'inactivation de la kinase ATM. Ces observations laissant à penser qu'ATM serait la kinase responsable de la reconnaissance de la déprotection du télomère (Vaziri *et al.*, 1997). En effet, l'expression d'un dominant négatif de TRF2 induit l'apoptose des cellules cancéreuses, d'une façon P53 et ATM dépendante (Karlseder *et al.*, 1999). Ainsi ATM aurait un rôle important dans la reconnaissance de la déstructuration du télomère et contribuerait à l'activation de P53.

Le phénotype des cellules en sénescence est similaire à celui observé au cours de la déstabilisation de la T-loop par un dominant négatif de TRF2 (Smogorzewska *et al.*, 2002). Quand ces cellules rentrent en sénescence, le nombre et la fréquence de foci de dommage à l'ADN augmente par cellule (d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003). Dans la majorité des cellules sénescentes , 1 à 5 % des télomères montrent des signes de dysfonctionnement télomérique démontré par leur colocalisation avec les facteurs de dommage de l'ADN γH2AX, 53BP1, MRE11, ATM (S1981), CHK2(T68), et CHK1(S317) (Herbig *et al.*, 2004). De plus des fusions télomériques sont observées lorsque les cellules échappent au point d'entrée en sénescence (Zou *et al.*, 2004). La transfection de siRNA dirigé contre ATM et/ou CHK2 déclenche l'inhibition de la voie de détection des dommages de l'ADN induisant la sénescence associée à l'arrêt des cellules dans le cycle en G1 (Gire *et al.*, 2004; Herbig *et al.*, 2004). Les cellules ATM déficientes activent la voie de dommage de l'ADN ATR/CHK1 induisant l'arrêt des cellules en G2 (Herbig *et al.*, 2004). Ainsi ces données suggèrent que les cellules humaines sénescentes perdent leur structure T-loop à la fin de leur vie réplicative, ce qui conduit à l'activation des points de contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire en G1 (FigI-43).



Figure I-43 : Les dysfonctionnements télomériques induisent l'arrêt du cycle cellulaire via P21 et l'entrée des cellules en sénescence.

Le raccourcissement des télomères entraîne la déstabilisation de la T-loop, ce qui déclenche le recrutement de senseurs des dommages à l'ADN tels que ATM et Mre11 aux extrémités télomériques déprotégées. L'autophosphorylation d'ATM active l'activité kinase qui ensuite phosphoryle d'autres facteurs de réponse de dommage à l'ADN comme CHK1, CHK2 et P53. Les phosphorylations induites par ATM, CHK1 et CHK2 activent P53 quià son tour va activer la protéine P21. (Herbig et al., 2006).

Toutefois nous ne savons toujours pas si ce dommage à l'ADN est lié au raccourcissement du télomère, provoquant ainsi une altération de la structure télomérique, ou au raccourcissement du simple brin télomérique. Or, quand les cellules rentrent en sénescence leur télomères sont raccourcis de même que leur simple brin télomérique (Stewart *et al.*, 2003; Keys *et al.*, 2004). Bien qu'il ait été suggéré que la perte du simple brin télomérique, plutôt que le raccourcissement des télomères, induit la sénescence, l'érosion du simple brin télomère. L'observation du complexe ATR/ATRIP, qui nécessite un ADN simple brin pour être activé, n'est pas détecté aux niveaux des télomères endommagés des cellules sénescentes, ce qui suggère que le simple brin télomérique ne joue pas un rôle central dans l' induction de la sénescence.

La prévention de la sénescence des cellules humaines nécessite l'inactivation des voies P53/Rb (Retinoblastome). Même si le dysfonctionnement télomérique est la principale cause de l'entrée en sénescence, il n'est pas exclu que les protéines P16 et Rb soient activées par la déprotection du télomère, indépendemment de P53. En effet, l'induction de la déprotection du télomère par inhibition de TRF2 provoque l'induction de P16 et de la sénescence spécialement dans des cellules P53 négatives (Jacobs *et al.*, 2005), ceci laissant à penser que P16 soit un second effecteur des dommages des télomères. La protéine polycomb BMI1 est un répresseur du locus *INK4a* qui code les suppresseurs de tumeurs P16 et P14^{ARF}. L'inhibition de P16 ou la surexpression de BMI1 réduit significativement l'inhibition de la prolifération occasionnée par TRF2^{$\Delta B\Delta M$} spécialement dans les cellules P53 négatives (Jacobs *et al.*, 2004).

b) La sénescence extrinsèque (Fig I-42).

La sénescence cellulaire peut aussi être déclenchée par une grande variété de facteurs extrinsèques comprenant les radiations X et UV, l'H₂O₂ et par l'expression ectopique de certains oncogènes et de suppresseurs de tumeur tels que P53, Rb, P16 ou P21. Ce mécanisme de sénescence extrinsèque correspondrait à un programme de protection et de maintien de l'organisme suite à des agressions successives par différents agents carcinogènes (Itahana et al., 2004). Ce mécanisme n'est pas forcément lié au raccourcissement des télomères (Ben-Porath et al., 2004; Ben-Porath et al., 2005). Cependant, ces facteurs extrinsèques déclenchant la sénescence extrinsèque peuvent aussi induire une attrition télomérique ou un dysfonctionnement télomérique. En effet, le traitement par H2O2 de fibroblastes induit préférentiellement des cassures simple brin au niveau des télomères et leur raccourcissement (von Zglinicki et al., 2000; Duan et al., 2005). En effet un traitement H₂O₂ associé à du Cu(II) H2O2 induit des dommages à l'ADN majoritairement sur les séquences télomériques 5'-GGG-3'. Ce traitement induit préférentiellement la formation de 8-oxo-7,8-dihydro-2'deoxyguanosine (8-oxodG) dans les séquences télomériques que non télomériques (Oikawa et al., 1999). De plus, la doxorubicine induit la sénescence par ces effets sur l'ADN génomique et par le déclenchement de dysfonctionnements télomériques sans leur raccoucissement dans les cellules cancéreuses du sein MCF-7 (Elmore et al., 2002).

L'induction de la sénescence extrinsèque nécessite l'activation des voies de signalisation P53/P21 et P16/Rb (FigI-44).



Figure I-44 : Signalisation de la sénescence chez l'homme. Dans les fibroblaste humains, l'érosion télomérique déclenche un signal passant parATM et par P53/P21 alors que la voie P16 est reliée aux stress extrinsèques.(Itahana et al., 2004).

Il n'est pas exclu que d'autres voies encore non identifiées régulent l'induction de la sénescence, étant donné l'observation de l'altération de l'expression de gènes dans les cellules en sénescence (Zhang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2004).

Or nous ne savons pas si ces changements d'expression de gènes sont la cause ou la conséquence de la sénescence. L'expression de la protéine Smurf2, une ubiquitine ligase, est augmentée en réponse au raccourcissement progressif des télomères, et cette expression est suffisante pour induire la sénescence (Zhang *et al.*, 2004). De même l'expression de la protéine antiapoptotique Bcl-2 est retrouvée dans les cellules en sénescence (Wang, 1995), et pendant l'induction de la sénescence par un stress oxydatif (Bladier *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000). L'expression constitutive de Bcl-2 retarde l'apoptose ou accélère l'induction de la sénescence (Crescenzi *et al.*, 2003; Tombor *et al.*, 2003).

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 à la sénescence après plusieurs divisions cellulaires (Roninson *et al.*, 2001).

Les ligands de l'ADN G-quadruplexe ciblant le télomère sont capables d'induire le raccourcissement télomérique et la sénescence (Riou *et al.*, 2002). Le Braco19, un dérivé d'acridine trisubstitué provoque une induction accélérée de la sénescence avec augmentation de P21 et P16. Le traitement des cellules par ce ligand provoque des fusions télomériques, témoins de la déprotection des télomères (Incles *et al.*, 2004). Les ligands de l'ADN G-

quadruplexe dérivés de quindoline provoquent dans les cellules l'inhibition de la croissance et l'apparition d'un phénotype sénescent accompagné d'un raccourcissement télomérique et l'induction de P16, P21 et P27 (Zhou *et al.*, 2006).

8. Dommages de l'ADN conduisant à l'apoptose.

a) Caractéristiques morphologiques.

Une cellule en apoptose active une série d'évènements moléculaires et biochimiques conduisant à des altérations morphologiques. Ces changements morphologiques sont spécifiques à l'apoptose et permettent ainsi l'identification de ce type de mort cellulaire (FigI-45). Un des premiers changements observable est la réduction du volume cellulaire. En effet la cellule se déshydrate et la perte de l'eau intracellulaire conduit à la condensation du cytoplasme qui résulte en une modification de la forme et de la taille cellulaire. Au cours de cette étape, la cellule perd le contact avec ses voisines. Malgré la rétraction cellulaire progressive, les organites intracellulaires restent intacts et gardent leur aspect normal jusqu'à la phase terminale de l'apoptose. Le noyau présente lui aussi des modifications: il s'opère une condensation de la chromatine qui débute à la périphérie de la membrane nucléaire, puis cette enveloppe nucléaire se désintègre et la chromatine se fragmente en petites masses distinctes. Ces caractéristiques morphologiques permettent de différencier l'apoptose de la nécrose, une autre forme de mort cellulaire qui aboutit à un éclatement de la cellule (Ziegler *et al.*, 2004).



Figure I-45 : Modifications morphologiques au cours de l'apoptose.

Au cours de l'apoptose il s'opère une condensation du cytoplasme et de la chromatine, un bourgeonement des membranes plasmiques, une perte de contact puis la fragmentation en vésicules (corps apoptotiques) des cellules.

b) Caractéristiques biochimiques.

Les changements morphologiques survenant lors de l'apoptose sont accompagnés d'altérations biochimiques spécificiques. Parmi celles-ci, la plus remarquable est la fragmentation de l'ADN, qui survient lors de la condensation de la chromatine. Les fragments d'ADN réguliers, générés au cours de l'apoptose, résultent de l'activation d'une endonucléase qui coupe l'ADN entre les nucléosomes. Plusieurs études ont démontré que l'endonucléase CAD/DFF40 est responsable de ce clivage internucléosomal (Liu et al., 1997; Enari et al., 1998). En effet, cette fragmentation endogène n'est pas observée dans les cellules déficientes en CAD/DFF40. Dans les cellules normales, CAD/DFF40 forme un complexe inactif avec son inhibiteur ICAD/DFF45. Lors de l'apoptose, ICAD/DFF45 est clivé par la caspase-3 et se dissocie de CAD/DFF40 qui devient active et migre dans le compartiment nucléaire (Sakahira et al., 1998; Tang et al., 1998). La DNase I est une autre nucléase responsable de la dégradation de l'ADN lors de l'apoptose. C'est une enzyme lysosomale présente dans les macrophages qui interviendrait, avec d'autres enzymes du lysosome, comme les cathepsines, dans une voie auxiliaire de fragmentation de l'ADN, initiée par les macrophages, au moment de la phagocytose des corps apoptotiques (McIlroy et al., 2000). D'un point de vue biochimique, l'apoptose est aussi caractérisée par la perte de l'asymétrie des phospholipides de la membrane plasmique. Les phosphatidylsérines, phospholipides anioniques présents uniquement dans le feuillet interne de la membrane des cellules normales, vont se déplacer dans le feuillet externe et être externalisés à la surface des cellules, ceci permettant aux cellules apoptotiques d'être reconnues comme cibles par les macrophages pour la phagocytose (Fadok et al., 2000). De plus, lors de l'apoptose, certaines protéines cellulaires sont dégradées. C'est le cas des lamines formant la membrane nucléaire ou de certaines protéines comme la fodrine et la gelsoline dont le clivage conduit à une altération du cytosquelette. Cette perte du cytosquelette induit la vésiculation membranaire.

c) Les principaux effecteurs de l'apoptose.

(1) Les caspases :

Les caspases sont une famille de protéines effectrices de l'apoptose dont l'activation représente un marqueur de l'apoptose. Toutefois, il existe une voie conduisant à l'apoptose sans activation de caspases.

L'étude des caspases a commencé par la découverte chez *C. elegans* du gène *ced-3* codant pour un homologue de la protéine ICE (interleukine-1 β processing enzyme) de mammifères (Yuan *et al.*, 1993) Cette protéine est suffisante pour déclencher l'apoptose quand elle est surexprimée dans les cellules de mammifères (Miura *et al.*, 1993). Depuis, un grand nombre de protéines partageant ces similarités a été cloné et désigné sous le nom de la famille des caspases. A l'heure actuelle quatorze caspases ont été identifiées chez les mammifères.

Les caspases sont synthétisées sous forme de zymogène inactif contenant un prodomaine suivi par deux sous-unités, p20 et p10 et ces zymogènes pour être actifs doivent être clivés. Toutes les caspases possèdent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu d'acide aspartique, qu'elles partagent avec la granzyme B, sérine protéase activatrice de caspases. Les caspases possèdent une triade catalytique comprenant Cys285, His237 et un groupement carbonyl sur le résidu 177 (Stennicke *et al.*, 2000).



Figure I-46 : Classification des caspases apoptotiques chez les mammifères.

Les caspases sont des zymogènes contenant un pro-domaine suivi par une large sous-unité catalytique d'environ 20 kD (p20) et d'une petite sous-unité catalytique d'environ 10 kD (p10). La famille des caspases est composée de trois groupes .Le groupe 1 contient les caspases inflammatoires, le groupe2 les caspases initiatrices de l'apoptose. Les caspases des groupes 1 et 2 possèdent un long pro-domaine avec un domaine de mort cellulaire DED (death effector domaine) (caspase 8 et 10) ou un domaine d'activation et de recrutement CARD (caspase activation and recrutment domain), qui permet l'interaction avec des molécules adaptatrices. Le Groupe 3 comprend les caspases effectrices de l'apoptose caractérisée par la présence d'un prodomaine court (Lavrik et al., 2005). Basées sur leurs fonctions, les caspases sont classées en trois groupes (FigI-46). Le premier comprend les caspases inflammatoires 1-4-5-11-12-13 et 14 qui sont impliquées dans l'inflammation au lieu de l'apoptose. Le deuxième inclut les caspases initiatrices de l'apoptose, ces caspases contiennent un long pro-domaine avec un domaine de mort cellulaire DED (death effector domaine) (caspase 8 et 10) ou un domaine d'activation et de recrutement CARD (caspase activation and recrutment domain), qui permet l'interaction avec des molécules adaptatrices. Le troisième groupe contient les caspases effectrices de l'apoptose (caspases 3-6-7) caractérisées par la présence d'un court pro-domaine. Ces caspases exécutrices de l'apoptose sont activées par d'autres caspases en amont et permettent les phases d'éxécution terminale de l'apoptose par clivage de multiples substrats cellulaires (Jin *et al.*, 2005), notamment par celui de la protéine PARP par la caspase 3 et 7 (Lazebnik *et al.*, 1994). PARP est une poly (ADP-ribose) polymérase dont le clivage facilite le désassemblage cellulaire et sert de marqueur pour l'apoptose (Oliver *et al.*, 1998).

Apoptose indépendante des caspases.

Il existe une autre voie conduisant à l'apoptose sans intervention des caspases. Cette voie apoptotique joue un rôle décisif dans les processus d'apoptose embryonnaire. Elle implique comme la voie apoptotique caspase dépendante la mitochondrie et le facteur protéique AIF (Apoptosis InducingFactor), une flavoprotéine de 57 kDa qui possède à la fois des séquences d'adressage mitochondrial et nucléaire (Susin *et al.*, 2000). Ce facteur est capable d'induire la condensation et la fragmentation de la chromatine dans des noyaux isolés. De façon surprenante, il est apparu que cette activité de clivage de l'ADN est insensible aux inhibiteurs des caspases et n'implique donc pas la nucléase CAD. La nucléase impliquée est l'endonucléase G (Endo G) qui est, elle aussi, une protéine mitochondriale (Li *et al.*, 2001). Dans la cellule saine, l'endonucléase G et AIF sont, comme le cytochrome c, confinées dans l'espace intermembranaire des mitochondries (Susin *et al.*, 1999; van Loo *et al.*, 2001). Certains stimuli apoptotiques impliquant des membres proapoptotiques de la famille Bcl-2, induisent leur libération dans le cytoplasme et leur migration dans le noyau.

(2) Les protéines de la famille Bcl-2.

Les protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) représentent le groupe des régulateurs de l'apoptose le plus important et le mieux caractérisé (Fig46). Cette famille est divisée en deux groupes, celui des anti-apoptotiques et celui des pro-apoptotiques. Le groupe de protéines pro-apoptotiques Bcl-2 est divisé en deux sous-groupes. Le premier sous-groupe comprend les protéines qui contiennent seulement dans leur structure, le domaine d'homologie Bcl-2 (Bcl-2 homology domain), et sont appelées protéines BH3. Ces protéines BH3 comprennent des protéines modulatrices pro-apoptotiques Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, Puma, Noxa, etc...... Elles agissent soit en activant la sous-famille Bax ou en interférant avec la famille anti-apoptotique Bcl-2 (Letai *et al.*, 2002). Les protéines multi-domaines BH1, BH2 et BH3, Bax et Bak représentent le deuxième sous-groupe des molécules effectrices pro-apoptotiques (Wei *et al.*, 2001).

Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 contiennent quatre domaines d'homologie Bcl-2 (BH1-BH4) et inactivent les protéines pro-apoptotiques via la formation de dimères (Cheng *et al.*, 2001). Les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 incluent Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-w, , Boo/Diva, A1, etc....La protéine Bcl-2 est une des protéines anti-apoptotiques clé de 26 kDa localisée au niveau des mitochondries, du réticulum endoplasmique et autour des membranes péri-nucléaires (Korsmeyer, 1995). Bcl-2 est impliquée dans le maintien de l'homéostasie et tient un rôle dans la régulation de l'homéostasie du calcium dans la cellule. Les membres de la famille Bcl-2 peuvent inhiber la mort cellulaire par séquestration ou neutralisation des domaines BH1, BH2 et BH3, la réponse à un signal apoptotique dépendant du ratio entre les membres pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.



Figure I-47 : Les protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 sont divisées en deux groupe : les protéines antiapoptotiques et pro-apoptotiques. Les protéines anti-apoptotiques contiennent les quatre domaines d'homologie Bcl-2(Bcl-2 homology domain) BH1-BH4. Le groupe de protéines pro-apoptotiques est divisé en deux sous-groupes. Le premier sous-groupe comprend les protéines qui contiennent seulement dans leur structure, le domaine d'homologie Bcl-2, et sont appelées protéines BH3. Le second sous-groupe contient les protéines multi-domaines (BH1,BH2,BH3), excepté Bcl-Xs qui contient seulement les domaines BH3 et BH4. (Debatin et al., 2002).

Bcl-2, hTERT et apoptose.

Certaines données de la littérature établissent un lien entre l'expression de Bcl-2 et l'activité télomérase. En effet, l'équipe de R.Kumar (Mandal *et al.*, 1997) montra que la surexpression de la protéine proapoptotique Bcl-2, dans des clones de cellules cancéreuses humaines (HeLa et DiFi) ou l'expression basale de Bcl-2 est faible, est accompagnée d'une augmentation de l'activité télomérase. Cette augmentation de l'activité télomérase n'est pas associée à une augmentation de la taille du télomère. Cette équipe a également montré que la diminution de l'expression de Bcl-2 par privation de l'interleukine 2 (IL-2), des lymphocytes T cytotoxiques murins CTLL-2 dépendant à l'IL-2, induit l'inhibition de l'activité télomérase, l'accumulation des cellules en G0/G1 et l'absence d'induction d'apoptose. L'apoptose induite par la methionine aminopeptidase -2 dans les cellules du mesothélium est associée à une diminution de l'activité télomérase et à la diminution de l'expression de Bcl-2 (Catalano *et al.*, 2001).

Un lien entre l'activité télomérase et l'induction de l'apoptose a aussi été établi en réponse aux dommages à l'ADN conduisant à l'apoptose. En effet, l'inhibition de la télomérase par stratégie antisens augmente la sensibilité d'un traitememnt au cisplatine à induire l'apoptose (Kondo *et al.*, 1998). De la même façon, l'inhibition de la télomérase par utilisation de ribozyme amplifie la réponse apoptotique induite par les inhibiteurs de la topoisomérase 1 dans les cellules épithéliales de poumon (Ludwig *et al.*, 2001). D'autre part, les cellules qui expriment fortement la télomérase montrent une résistance à la mort cellulaire induite après exposition aux radiations (Harley *et al.*, 1997). hTERT protègerait de l'induction de l'apoptose induite par un stress oxydatif dans les fibroblastes humains de poumon (Ren *et al.*, 2001).

Cependant, d'autres équipes sont en désaccord avec cette conclusion. En effet, aucune relation n'a été observée entre l'activité télomérase et l'expression de Bcl-2 dans des tissus de cancer du sein (Ohmura *et al.*, 2000), ni dans ceux issus de cancers du poumon (Elkak *et al.*, 2002). Ces différences de conclusions s'expliqueraient peut-être par le modèle cellulaire utilisé.

Il existe deux voies principales d'induction de l'apoptose désignées sous le terme de voie intrinsèque mitochondriale et voie extrinsèque faisant intervenir les récepteurs de « mort cellulaire » (Kroemer et al., 2000). Ces deux voies convergent vers l'étape finale d'exécution de l'apoptose qui se traduit par le clivage de régulateurs cellulaires et de molécules de structure et ces deux voies sont interconnectées par la mitochondrie. L'apoptose est un processus physiologique essentiel tout au long de la vie des organismes multicellulaires. Elle joue un rôle important dans le développement et la maintenance de l'homéostasie cellulaire. L'apoptose est impliquée dans le contrôle du nombre de cellules et de la prolifération pendant l'embryogenèse, la perte des lymphocytes activés à fin de la réponse immunitaire, l'élimination des lymphocytes auto-réactifs et dans la destruction contrôlée de cellules endommagées, infectées, transformées, âgées, ou nuisibles (Nagata, 1997; Testa, 2004). Des défauts dans l'apoptose et dans les mécanismes régulateurs de l'apoptose peuvent mener à des états pathologiques, incluant la transformation maligne, la progression tumorale, des maladies auto-immunes ou neuro-dégénératives. Dans les cellules transformées, la perte de sensibilité à l'apoptose représente une des mécanismes moléculaires de résistance des chimio / immunoradiothérapies.

d) La voie intrinsèque mitochondriale.

De nombreux facteurs peuvent initier la voie apoptotique intrinsèque. Parmi ces facteurs déclenchant on compte des facteurs physiques, biologiques et des lésions chimiques (radiations aux UV, des chocs thermiques ou osmotiques, l'hypoxie), la modification de l'expression d'oncogènes cellulaires et de gènes suppresseurs de tumeurs (c-Myc, c-Fos, P53, PTEN). De même, la dislocation de structures du cytosquelette, les dommages à l'ADN (agents mutagènes, cytostatiques, antimétabolites), la privation de cytokine et de facteurs de croissance, la déficience en nucléotides et en ATP, l'accumulation de protéines mal repliées et d'autres facteurs de stress déclenchent l'apoptose.

La voie mitochondriale de l'apoptose est définie par l'évènement majeur de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, qui conduit à la libération dans le cytoplasme des protéines pro-apoptotiques contenues dans l'espace intermembranaire (FigI-48). Le relargage de ces protéines est suffisant pour induire l'apoptose dans plusieurs types cellulaires (Zhivotovsky *et al.*, 1998). Lors d'une irradiation, P53 est activé par les dommages de l'ADN et peut interagir avec la mitochondrie ou induire l'expression de protéines de la famille BCL-2 qui vont se localiser au niveau de la mitochondrie comme BAX, PUMA, NOXA pour induire la libération des protéines apoptogéniques. Cependant, la mitochondrie exerce des fonctions essentielles pour la survie cellulaire, dans le métabolisme énergétique ou le maintien de l'homéostasie du calcium. Ainsi la perte de fonction de la mitochondrie contribue également au déclenchement de la mort cellulaire. L'irradiation peut aussi causer des dommages directs aux mitochondries et induire l'apoptose par la voie mitochondriale (Battino *et al.*, 1997).

(1) Perméabilisation membranaire.

Les mécanismes responsables de l'augmentation de la perméabilisation membranaire et donc de la libération des protéines apoptotiques restent controversés. Cependant le rôle des protéines de la famille BCL-2 est reconnu. Deux modèles ont été proposés selon l'implication de la membrane mitochondriale interne (Zamzami *et al.*, 2001). Le premier fait intervenir le pore de transition de perméabilité (PTP). Ce pore est constitué de la translocase de nucléotides adényliques (ANT) dans la membrane interne et du canal anionique voltagedépendant VDAC dans la membrane externe et est impliqué dans l'échange d'ADP/ATP entre la matrice mitochondriale et le cytoplasme. Dans une mitochondrie saine, l'imperméabilité de la membrane interne permet à la chaîne de transport des électrons de créer un gradient électrochimique appelé potentiel membranaire mitochondrial (Ψ m). Lors de l'apoptose, la transition de perméabilité débute par une perméabilisation de la membrane interne permettant le passage de molécules de taille inférieure à 1.5 kDa, d'eau et d'ions. Ceci résulte en une chute du Ψ m et à un gonflement de la matrice mitochondriale favorisant la libération des protéines apoptogéniques par le PTP (Ichas *et al.*, 1998; Ly *et al.*, 2003). Alternativement, la perméabilisation initiale de la membrane interne peut conduire à un gonflement important de la matrice mitochondriale et à la rupture de la membrane externe, libérant le contenu de l'espace intermembranaire (Feldmann *et al.*, 2000). Les membres de la famille BCL-2, notamment BID, peuvent interagir avec le PTP et réguler sa perméabilité par ouverture (Marzo *et al.*, 1998; Vander Heiden *et al.*, 2000; Rostovtseva *et al.*, 2004). En revanche, la perméabilisation de la membrane mitochondriale et le relargage du cytochrome c peuvent se produire indépendamment du PTP, la libération de cytochrome c n'étant pas toujours associée à la chute du potentiel mitochondrial (Kim *et al.*, 2000).

Le deuxième modèle de perméabilisation membranaire décrit est basé sur l'interaction directe des protéines de la famille BCL-2 au niveau de la membrane mitochondriale externe. En effet, bien que Bcl-2 apparaise être exclusivement lié a la membrane mitochondriale, d'autres protéines cytosoliques (Bid, Bam, Bim) sont transloquées au niveau de la mitochondrie pendant l'apoptose. Ces protéines jouent un rôle majeur dans la transduction du signal du cytoplasme vers la mitochondrie où elles fixent et régulent l'activité des membres de la famille Bcl-2. Ces protéines de la famille Bcl-2 contrôlent la libération du cytochrome c. La translocation de ces protéines au niveau de la mitochondrie est déclenchée par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation pour Bad et le ciblage par la caspase 8 pour Bid. BAX et BAK, qui présentent des similarités de structure avec les domaines d'insertion membranaire de certaines toxines bactériennes, pourraient, comme le font ces toxines, former des canaux dans la membrane mitochondriale. La protéine Bax dans des conditions normales est majoritairement cytosolique et, dans quelques cellules est associée à la périphérie des mitochondries. Après un signal de mort cellulaire, Bax est activée et se transloque du cytoplasme vers la mitochondrie. Bax s'oligomérise et s'insère dans la membrane mitochondriale et devient une protéine intégrante de cette membrane permettant la libération du cytochrome c (Goping et al., 1998; Eskes et al., 2000). BAX peut également s'oligomériser avec BID ou BAK et former un pore permettant la libération du cytochrome c (Korsmeyer et al., 2000; Roucou et al., 2002; Mikhailov et al., 2003). Il a également été mis

en évidence une coopération entre BAX et le canal VDAC afin de former un pore plus large (Shimizu *et al.*, 2000).

(2) Libération des protéines apoptotiques de l'espace intermembranaire.

L'espace intermembranaire mitochondrial regorge de protéines qui, une fois relarguées dans le cytoplasme, contribuent à l'exécution du processus apoptotique. Parmi ces molécules figurent le cytochrome c et la protéine Smac/Diablo qui interviennent dans l'activité des caspases. En effet, une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c se fixe à APAF 1 (apoptotic protease activating protein1), ce qui servira de plateforme pour le recrutement de la caspase 9. Ce complexe forme ainsi l'apoptosome qui représente la forme active de la caspase 9 et permet l'initiation de la cascade des caspases incluant la caspase 3 (Hill et al., 2003). Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low p1) s'associe aux IAP (inhibitor of apoptosis) et empêche l'inhibition des caspases (Du et al., 2000). Certaines procaspases (procaspases-2, -3 et -9) sont aussi séquestrées dans l'espace intermembranaire et libérées dans le cytoplasme lors de l'apoptose (Susin et al., 1999). Le pool de pro-caspases mitochondriales semble dépendre du type cellulaire. D'autres protéines pro-apoptotiques, n'agissant pas sur les caspases sont également libérées dans le cytoplasme : le facteur AIF (apoptosis inducing factor) et l'endonucléase G. L'AIF est une flavoprotéine qui après sa translocation dans le cytoplasme, migre dans le noyau et induit la condensation de la chromatine et la dégradation oligonucléosomale de l'ADN (Susin et al., 1999). Ce facteur affecte aussi la mitochondrie en provoquant une chute du potentiel membranaire mitochondrial et en favorisant la libération de cytochrome c (Cande et al., 2002). L'endonucléase G provoque également la dégradation de l'ADN nucléaire (Li et al., 2001) (voir chapitre I.G.8.C.1).

(3) Altération de la fonction mitochondriale.

La libération du cytochrome c peut conduire à une inhibition de la respiration et une dépolarisation mitochondriale. Les dommages au niveau de la chaîne respiratoire peuvent générer des radicaux oxygénés (ROS) qui sont excrétés de la mitochondrie (Pham *et al.*, 2001). Ces ROS peuvent produire un stress oxydatif conduisant à la destruction de la cellule comme celle observée pendant la nécrose ou pendant la phase post mitochondriale de

l'apoptose. D'une autre part, les ROS libérés de la mitochondrie sont aussi impliqués dans la phase d'initiation de l'apoptose. Ces ROS peuvent aussi être produits directement par l'irradiation ou suite à l'activation de P53 par les dommages à l'ADN. P53 active alors des gènes entraînant la formation de ces composés au niveau de la mitochondrie (Hwang *et al.*, 2001). Les espèces réactives de l'oxygène amplifient le processus apoptotique en provoquant des lésions de la membrane mitochondriale (Fleury *et al.*, 2002). L'inhibition de l'apoptose par surexpression de Bcl-2 ou Bcl-xl préviendrait l'accumulation de ROS (Kane *et al.*, 1993; Gottlieb *et al.*, 2000).



Figure I-48 : Voie intrinsèque mitochondriale.

De nombreux stimuli pro-apoptotiques convergent au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (MOMP) permettent le relargage de médiateurs pro-apoptotiques. Certaines de ces molécules sont directement impliquées dans l'assemblage de complexes multiprotéiques effecteurs de l'apoptose « l'apoptosome » qui active la caspase 9. D'autres molécules (SMAC/ DIABLO) consolident la propagation du signal apoptotique par bloquage des inhibiteurs de l'apoptose IAP (Klener et al., 2006).

e) La voie extrinsèque des « récepteurs de mort ».

La voie extrinsèque nécessite l'activation des récepteurs extracellulaires tels que les récepteurs Fas/CD95, TNF α et TRAIL (Schmitz *et al.*, 2000) par des ligands spécifiques. La fixation du ligand conduit à l'oligomérisation du complexe ligand/récepteur et le recrutement de molécules adaptatrices au niveau du domaine intracellulaire du récepteur. Des caspases

initiatrices telles que les pro-caspases -8 ou -10, s'associent au complexe récepteur/ligand par le biais des molécules adaptatrices formant ainsi le complexe DISC. La pro-caspase engagée est activée par protéolyse. La caspase initiatrice mature active à son tour les caspases effectrices -3 ou -7. Il existe un lien entre la voie mitochondriale extrinsèque et la voie des « récepteurs de mort », le plus connu impliquant la protéine Bid, membre de la famille Bcl-2. Bid est activée par la caspase 8 active en une forme tronquée dénommée t-Bid. t-Bid va se transloquer au niveau de la mitochondrie, se lier et activer les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, favorisant leur insertion dans la membrane mitochondriale et la libération du cytochrome c (FigI-49). Ainsi, t-Bid va permettre une amplification du signal apoptotique en reliant ces deux voies intrinsèques et extrinsèques (Ruffolo *et al.*, 2000).



Figure I-49 : Interconnexion des voies apoptotiques intrinsèques et extrinsèques par le clivage de Bid.

La fixation de ligands de mort cellulaire sur leurs récepteurs spécifiques conduit à l'aggrégation des récepteurs, ce qui provoque l'assemblage du complexe multiprotéique DISC effecteur de l'apoptose. La formation de ce complexe DISC induit l'activation des caspases 8 ou 10. L'interconnexion entre la voie intrinsèque et extrinsèque est permise par le clivage de bid qui va provoquer des dommages mitochondriaux (MacFarlane et al., 2004).

Outre les voies classiques intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose, il existe la voie apoptotique du granzyme B et celle des céramides, qui ne seront pas décrites dans ce chapitre.

Bilan et présentation des objectifs de l'étude

Cibler l'immortalisation des cellules tumorales due au maintien des extrémités télomériques par l'expression de la télomérase constitue un axe de recherche qui s'est développé en oncologie. Deux types d'approches ont été développées (i) l'une basée sur l'inhibition de l'activité enzymatique de la télomérase en ciblant par exemple hTERT ou hTR (ii) l'autre par l'interaction directe de composés avec les séquences télomériques afin de désorganiser la structure télomérique. Cette seconde approche basée sur la conformation particulière que peut adopter l'ADN télomérique constitue l'activité principale de notre laboratoire depuis quelques années. En effet, le brin G peut se replier en une structure en quadruplexe de guanine (G-quadruplexe). Cette conformation bloque l'activité de la télomérase *in vitro* (Zahler *et al.*, 1991; Mergny *et al.*, 2001; Davis, 2004). Certains de ces ligands ont été décrits comme inducteurs de la sénescence et/ou de l'apoptose dans les lignées cancéreuses, associées à une dégradation télomérique (Riou *et al.*, 2002).

Le but de ce travail a été de caractériser les effets de ligands de l'ADN G-quadruplexe sur l'intégrité des télomères et sur l'induction des voies de dommages à l'ADN conduisant à la sénescence et à l'apoptose.

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes intracellulaires induits par les ligands de l'ADN G-quadruplexe, nous avons étudié dans une première partie l'effet d'un ligand de l'ADN G-quadruplexe, le 12459, sur l'intégrité télomérique, et sur l'induction des voies apoptotiques dans des lignées sensibles ou résistantes à ce ligand.

Dans une deuxième partie nous nous sommes focalisés sur les réponses aux dommages à l'ADN conduisant à la sénescence et l'apoptose induites par ce ligand.

Afin de mieux appréhender l'effet de ligand de l'ADN G-quadruplexe sur le télomère nous avons, dans une troisième partie, étudié l'effet de la télomestatine, autre ligand de l'ADN G-quadruplexe, sur l'intégrité des télomères et sur la localisation de protéines indispensables à leur maintien. Nous avons également caractérisé l'effet de la surexpression de la protéine hPOT1 sur le télomère et sur l'action de la télomestatine.

II. MATERIELS ET METHODES
A. Culture cellulaire.

1. Les lignées cellulaires.

La lignée A549 obtenue auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection) (N° CCL-185) est issue d'un adénocarcinome pulmonaire humain. Ce sont des cellules adhérentes de type épithélial.

Les lignées cellulaires JFD 18 et JFD 9 résistantes au 12459 ont été établies à partir de la lignée parentale A549. Les cellules A549 ont été mises en contact avec 300 μ g de l'agent mutagène EMS puis sélectionnées en présence de 10 μ M de 12459 pendant 30 jours. Après clonage en agar une nouvelle sélection a été réalisée en présence de 10 μ M 12459.

La lignée A54 ::Bcl-2 a été obtenue par transfection de la lignée parentale A549 par le vecteur d'expression pcDNA3Bcl-2 (aimablement fourni par L. Debussche, Sanofi-Aventis, Vitry sur Seine, France) avec le kit LipofectamineTM selon les indications du fabricant.

2. Conditions de culture.

(1) Entretien des cellules.

Les cellules sont cultivées sur plastique dans des boites de 25 cm² (NUNC) dans le milieu DMEM Glutamax (INVITROGEN), supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (INVITROGEN) et 1% d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine) (GIBCO) Les cellules sont cultivées à 37°C dans une étuve saturée en humidité sous une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Toutes les manipulations sont effectuées stérilement sous une hotte à flux laminaire vertical. Après observation de la culture au microscope inversé à contraste de phase, le tapis cellulaire est rincé dans du PBS sans calcium, ni magnésium (INVITROGEN) puis détachées par 500 μ L de trypsine. Les cellules sont ensuite numérées à l'aide d'un hématimètre de Malassez. sous microscopie optique à contraste de phase. Elles sont remises en culture à la concentration de 50 × 10³ cellules/mL.

(2) Prolifération et détermination de la viabilité cellulaire.

La viabilité cellulaire est déterminée par la capacité des cellules à exclure le bleu de trypan 0,4 % (SIGMA) utilisé à 50 % (volume/volume) dans du chlorure de sodium à 0,9 %. Ce colorant vital traverse la membrane plasmique des cellules mortes et colore ainsi leur

cytoplasme en bleu. Un minimum de 400 cellules est compté et 2 numérations indépendantes sont effectuées.

(3) Cryoconservation des cellules.

Après centrifugation des cellules les culot cellulaires sont repris dans du milieu contenant 70% de D-MEM, 20% de SVF et 10% de dimethyl sulfoxide (DMSO) (*SIGMA*®) La congélation des cellules est réalisée dans des cryotubes de 2ml à raison de 1 à 2×10^6 cellules/ml.

3. Agents pharmacologiques utilisés :

Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :

 $[MM=34 \text{ g.mole}^{-1}]$

Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) couramment appelé eau oxygénée, fait partie des espèces réactives de l'oxygène et constitue une des voies intermédiaires de formation des radicaux libres. Il serait également impliqué dans l'oxydation du NADH,H⁺ en NAD^{+.} La solution commerciale utilisée au cours de notre étude se présente à 30%.

Doxorubicine ou chlorhydrate d'adryamicine (Adriblastine ®) (Dox) :

[MM=579,98 g.mole⁻¹]

La Doxorubicine est fabriquée par les laboratoires Roger Bellon. Elle se présente sous la forme d'une poudre rouge et est essentiellemn et utilisée sous sa forme chlorhydrate d'adriamycine. Le chlorhydrate est dissous dans 17,2 mL d'eau stérile. Cette solution à 10⁻³ M déterminée grâce à la mesure de la densité optique est conservée a l'abri de la lumière en différents aliquotes à -20°C. Elle est décongelée extemporanément avant chaque utilisation.

N-Acetyl_L cysteine (NAC) :

$[MM = 163, 2 \text{ g.mole}^{-1}]$

La NAC provient des laboratoires *Sigma*. Elle est généralement connue pour moduler les propriétés oxydantes de molécules responsables du stress oxydant. Elle protège aussi la cellule en diminuant le taux d'entités radicalaires produites lors du stress oxydant. La solution de N-acétyl cystéine est préparée extemporanément en dissolvant 163,27 mg dans 1 mL de PBS stérile afin d'obtenir une solution limpide concentrée à 1M. Cette solution étant très

limpide au départ, le pH est ajusté à 7,3 grâce à une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH). La concentration finale est établie par une dilution directe dans le milieu de culture.

Campthotécine :

 $[MM = 348,35 \text{ g.mole}^{-1}]$

La camptothecine provient des laboratoires *sigma* et est préparée à 1 mM dans du DMSO.les dilutions sont effectuées dans de l'eau stérile.

Téloméstatine :

La télomestatine est préparée à 5 mM dans MeOH/Me₂SO4 (50:50). Les dilutions sont effectuées dans de l'eau stérile.

12459 :

Le 12459 (2,4,6-triamino-1,3,5-triazine), synthétisé selon le brevet WO-0140218 est mis en solution dans le DMSO à une concentration finale de 10 mM. La solution stock est aliquotée et conservée à -20° C. Les dilutions sont réalisées dans l'eau. Le ligand est ajouté aux cultures cellulaires en phase exponentielle de croissance.

B. Etude de la prolifération cellulaire en présence de 12459.

Pour réaliser les études de viabilité cellulaire, les cellules sont cultivées dans des plaques de 24 puits à raison de 2 mL de milieu par puits (50000 cellules/ml) conditions décrites ci-dessus.

La solution de 12459 est ajoutée 24 heures après l'ensemencement, une fois que les cellules adhèrent au support. Les lignées cellulaires sont réparties dans des plaques de 24 puits dans des conditions identiques. Le traitement peut être poursuivi jusqu'à quatre jours. A la fin du traitement, les cellules sont rincées par 1 ml de PBS, récoltées après hydrolyse trypsique à 37°C (100µl de trypsine) et remises en suspension dans 2 ml de milieu. Le dénombrement cellulaire s'effectue par comptage sur cellule de Malassez à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase (les cellules viables sont réfringentes alors que les cellules mortes ont un aspect bleugrisâtre non réfringent).

C. Mise en évidence de l'apoptose par coloration au Hoechst.

Les cellules sont mises en culture à 50000 cellules/ml dans une plaque 24 puits contenant des lamelles de verre. Le traitement se fait à l'identique du test de viabilité cellulaire. Les cellules sont fixées 5 min dans un mélange éthanol/acide acétique (3:1 v/v) ajouté directement au milieu de culture. Après avoir enlevé le surnageant, une deuxième fixation de 5 min est effectuée directement sur les lamelles par addition de 200 μ l du mélange fixateur. Les lamelles sont ensuite rincées par 3 bains successifs de PBS. Pour la coloration, le Hoescht 33342 (Sigma) est ajouté à la concentration finale de 1 μ M pendant 30 minutes. L'excès de colorant est éliminé par 3 lavages au PBS avant de monter les lames avec une goutte de cytifluor (antifading) et de souder le pourtour de la lamelle.avec un verni.

Le Hoechst est un colorant vital spécifique de l'ADN. Les cellules marquées sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence après excitation dans l'UV (330-385nm) Les cellules sont considérées comme apoptotiques si elles fluorescent uniquement dans le bleu et si elles présentent les caractéristiques morphologiques définies par Kerr (Kerr *et al.*, 1994) chronologiquement un contour irrégulier, une condensation nucléaire, une condensation du cytoplasme, et éventuellement la présence de corps apoptotiques.

Pour l'expression des résultats on définit des champs aléatoires et on dénombre environ 200 cellules par champ. Les résultats sont exprimés en % de cellules apoptotiques par rapport à la population totale dénombrée.

D. Inhibition de l'apoptose par le DEVD-FMK et l'IETD-FMK.

Afin de déterminer le rôle fonctionnel des caspases 3 et 8 dans le processus d'induction de l'apoptose de la lignée A549, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de ces caspases. Le DEVD-FMK bloque spécifiquement la caspase 3 et le IETD-FMK la caspase 8. Les cellules A549 sont traitées pendant 48 H en présence de 12459 et de l'inhibiteur de caspase. Le pourcentage de cellules apoptotiques est déterminé par coloration au hoechst comme décrit précédemment.

E. 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 A549 sont ensemencées

à 15000 cellules/ml dans des boites de culture de 25 cm², en présence ou absence de 0,5 μ M de 12459. Tous les 4 jours, les cellules sont trypsinées, comptées et réensemencées à 15000 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.

F. Etude du potentiel membranaire mitochondrial par microspectrofluorométrie.

Pour mesurer le potentiel membranaire mitochondrial (φ m), on utilise une sonde cationique (JC-1), fortement lipophile, de la famille des carbocyanines (référence T-3168 faible, Molecular Probes). La solution stock à 1.3 x 10⁻³ M est préparée dans le DMSO et conservée à – 20°C. Cette sonde s'accumule préférentiellement au niveau des mitochondries et permet ainsi une mesure du potentiel mitochondrial membranaire ($\Delta\varphi$ m)) (Reers *et al.*, 1991). La sonde JC-1 intracellulaire est excitée à 488 nm et donne naissance à deux émissions de fluorescence (Smiley *et al.*, 1991).

- Une fluorescence verte (525-530 nm) qui correspond au JC-1 sous forme monomérique caractéristique d'un faible $\Delta \varphi m$.
- Une fluorescence rouge- orange (585-595 nm) correspondant au JC-1 sous forme agrégée caractéristique d'un fort Δφm.

La force protomotrice (Δp) qui résulte de l'éjection des protons par la chaîne respiratoire mitochondriale et de leur distribution asymétrique de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale comprend un gradient chimique (ΔpH) et un gradient électrique élevé ($\Delta \phi m$) essentiel pour la production d'ATP par les mitochondries. Lors de l'induction de l'apoptose, l'effondrement du $\Delta \phi m$ entraîne une forte charge négative intra mitochondriale réduisant ainsi l'accumulation du JC-1.

La dissipation du potentiel membranaire mitochondrial est induite par incubation des cellules avec 1 μ M ou 10 μ M de 12459. Pour la mesure du $\Delta \phi m$, 10⁶ cellules sont traitées par 2.5x10⁻⁶ M de sonde JC-1 et incubées 30 min à 37°C.

Les résultats sont exprimés sous forme de rapport des intensités de fluorescence (I590nm)/(I590nm)+(I530nm) de la sonde JC-1. Ce rapport est pris comme base 100 dans les

cellules témoins et les valeurs des cellules traitées sont exprimées en % de diminution par rapport aux cellules contrôles.

G. Etude de la production des ROS par microspectrofluorométrie.

La production intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) après traitement par le 12459 est mesurée à l'aide d'une sonde fluorescente, la 6-carboxy-2',7'- dichlorodihydro-fluorescéine diacétate, diacetoxyméthylester (C-2938, Molecular Probes). La solution mère à 10^{-2} M est préparée dans le DMSO, aliquotée et conservée à -20° C. Cette sonde n'émet pas de fluorescence en solution. Par contre, dans la cellule, des estérases endogènes coupent les fonctions esters des biomolécules, ceci favorise l'oxydation du C-2938 en un dérivé de structure proche de celle de la fluoresceine qu'il est possible de quantifier en fluorescence. Excitée à 488 nm, la forme oxydée émet une fluorescence verte dont le maximum d'intensité se situe vers 518 nm. Comme précédemment les résultats sont exprimés en pourcentage de variation par rapport aux cellules contrôles.

H. Restriction des fragments télomériques (TRF).

1. Principe du TRF.

Le principe de ce test est de déterminer la taille totale du télomère. Le télomère est séparé du reste de l'ADN génomique par digestion enzymatique par Hinf I (5'-G↓ANTC-3' / 3'-CTNA↑G-5') et RSA I (5'-GT↓AC-3' / 3'-CA↑TG-5') qui permettent la libération du télomère du reste de l'ADN. Après l'hybridation d'une sonde complémentaire au brin G marquée au P^{32} et migration sur gel d'agarose 0,8% en condition non dénaturante la taille du télomère peut être évaluée grâce à un marqueur de poids moléculaire. (Gomez *et al.*, 2003).

2. Préparation de la sonde brin C radiomarquée.

La sonde radiomarquée est préparée en incubant, pendant 1 heure à 37°C, 20 pmol d'oligonucléotides brin C ; 80 μ Ci de γ [32P] ATP ; et 1 μ l de T4 PNK (polynucleotide kinase). La réaction est réalisée dans un volume final de 30 μ l de T4 PNK 1X (70 mM Tris-HCl ; 10 mM MgCl2 ; 5 mM dithiothreitol ; pH 7.6 à 25°C). Les amorces radiomarquées sont ensuite purifiées sur colonnes *Quiagen* (nucleotide removal kit).

3. Préparation des ADN.

 10^5-10^6 cellules sont trypsinées, lavées deux fois au PBS et sédimentées par centrifugation à 1000 rpm pendant 5 min. Les ADN sont extraits à partir de colonnes *Quiagen* (DNA extraction kit) et sont repris dans du tampon TE (Tris EDTA) puis quantifiés par spectrophotométrie à 280 nM. Les concentrations sont ensuite réévaluées par migration de 1 μ g d'ADN dans un gel d'agarose 1% afin de réajuster les concentrations des échantillons.

4. 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. L'hybridation est effectuée à 37°C pendant 12 heures puis la réaction est stoppée par addition par 6µl de tampon échantillon (20% glycérol, 1mM dans du EDTA, et 0,2% bleu de bromophénol). Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'agarose à 0,8% dans du tampon TBE 1 X contenant 0,01% de bromure d'éthidium, pendant 1h30 à 80V. Le gel est séché sur du papier filtre Whatman pendant 30 min à 42°C. puis le signal de fluorescence du bromure d'éthidium est révélé dans le phosphoimager (Typhoon 9210, Amersham) pour apprécier la digestion de l'ADN et la quantité du matériel déposée. Le gel est ensuite mis en contact avec un écran photosensible dans une cassette pendant au moins 24 heures et la radioactivité est numérisée.

I. Expérience d'hybridation en solution.

1. Principe.

Ce test d'hybridation en solution non dénaturante permet de mesurer la taille du simple brin télomérique (Gomez *et al.*, 2003). Cette technique est basée sur la quantité d'hybridation d'une sonde brin C (5'-CCC-TAA-CCC-TAA-CCC-TAA-CCC-TAA-3') radiomarquée sur la partie simple brin télomérique. Plus la quantité de radiomarquage est importante et plus le simple brin est long. 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 MgCl2 ; 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. radiomarquée. Les échantillons sont séparés par migration sur un gel d'agarose 0,8% dans du TBE 1X contenant 0,01% de bromure d'éthidium, pendant 1h30 à 80V. Le gel est séché sur du papier filtre Whatman pendant 30 min à 42°C, puis le signal de fluorescence du bromure d'éthidium est révélé et quantifié par le phosphoimager (Typhoon 9210, Amersham) afin de déterminer la quantité d'ADN génomique. Le gel est ensuite mis en contact avec un écran radiosensible dans une cassette pendant au moins 24 heures et la radioactivité est quantifiée. Le pourcentage d'hybridation est calculé en faisant le rapport : quantité de sonde P³² hybridée / quantité totale ADN génomique.

3. Expériences de compétition avec le Pu22myc.

La séquence oligonucléotidique Pu22myc 5'-GAG-GGT-GGG-GAG-GGT-GGG-GAA-G-3' capable de former un G-quadruplexe est ajouté à la concentration finale de 10 μ M. Cette séquence sert de compétiteur pour les ligans de l'ADN G-quadruplexe dans les expériences de TRF et d'hybridation en solution.

J. Identification des protéines par western blot.

1. Principe.

Le western blot ou immuno-empreinte est une méthode permettant de détecter, par immunomarquage, une protéine spécifique dans un échantillon à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre cette protéine. Après extraction, les protéines de l'échantillon sont séparées selon leur masse moléculaire par électrophorèse en condition dénaturante appellée SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Après séparation électrophorétique les protéines sont alors électrotransférées à partir du gel de polyacrylamide vers une membrane de PVDF (Polyvinylidin DiFluoride) ou nitrocellulose sur lesquelles la détection spécifique des protéines est effectuée par une réaction immunochimique. Un anticorps primaire reconnaît la protéine d'intérêt qui est lui-même reconnu par un anticorps secondaire, le plus souvent couplé à la peroxydase. Un substrat chimioluminescent permet une révélation sur un film photographique par émission d'un signal luminescent de l'anticorps secondaire.

Réactifs

<u>PBS-T</u> : pour 11 de solution	
PBS 10X	100 mL
Tween 20	1ml
Tampon de migration électrophorétique 10x pH 8,3 qsp 1000 ml :	
Tris (250mM final)	30g
Glycine (2M final)	144g
SDS (1% final)	10g
Tampon de tranfert 1X qsp 1000ml :	
Tris base (25 mM final)	3,03g
Glycine (192 mM final)	14,4g
(Méthanol 20%) selon la membrane	200 mL
Gel de polyacrylamide de concentration à 4% (pour 10 ml) :	
H2O	6,1 mL
Polyacrylamide (mono/bis 29 :1) 30%	1,3 mL
Tris HCl 0,5M pH 6,8	2,5 mL
SDS 10%	100 µL
Persulfate d'ammonium 10%	50 µL
TEMED	10 µL
Gel de polyacrylamide de séparation à 12% (pour 10 ml) :	
H2O	3,33 mL
Polyacrylamide (mono/bis 29 :1) 30%	4 mL
Tris HCl 0,5M pH 6,8	2,5 mL
SDS 10%	100 µL
Persulfate d'ammonium 10%	55 µL
TEMED	10 µL
<u>Bleu de charge 5x (10 ml)</u> :	
SDS 10X	1g
Tris HCl 0,5 M pH 6,8	6,25 mL
Glycérol	3,75 mL
Bleu de bromophénol	25 mg

La solution est aliquotée et conservée à -20° C. Avant utilisation ajouter $1/5^{ième}$ du volume de β -mercaptoéthanol.

2. Extraction des protéines cellulaires.

Après les différents temps d'incubations, les cultures cellulaires sont placées à 4°C, les cellules sont rincées par du PBS1X puis récupérées à l'aide d'un racloir à partir de la boite de culture dans du PBS 1X contenant des inhibiteurs de phosphatases (NaF 5mM et Na₃VO₄ 1 mM). Après centrifugation à 1500 rpm 5 min le culot cellulaire est repris dans 50 μ L de tampon de lyse RIPA (Tris Hcl pH 7,4 50 mM; sodium desoxycholate 0,25%; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; PMSF 1 mM) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (leupeptine, aprotinine et pepstatine à 1 μ g/mL chacun) et des inhibiteurs de phosphatase (NaF 5mM et Na₃VO₄ 1 mM). La suspension est maintenue dans la glace pendant 30 min afin d'obtenir la lyse complète des cellules. Le lysat est ensuite centrifugé à 12500 rpm, 30 min à 4°C pour sédimenter les débris cellulaires. Le surnageant contenant les protéines est ensuite récupéré (un petit aliquote est gardé pour quantifier les protéines) et additionné de tampon échantillon 5X, puis dénaturé 5 min à 99°C. Les échantillons protéiques sont aliquotés et conservés à -20°C.

Dosage des lysats protéiques.

La concentration protéique des échantillons est déterminée par dosage colorimétrique selon la méthode de bradford (1996).

Principe

La méthode de bradford est un dosage colorimétrique, basé sur le changement de longueur d'onde d'absorbance, se manifestant par le changement de la couleur d'un colorant, le bleu de Coomassie, après liaison avec l'arginine et les résidus hydrophobes des acides aminés présent dans la ou les protéines. La forme anionique (liée) du colorant est bleue, et possède un spectre d'absorption maximal estimé à 595 nm. Les formes cationiques (libres) du colorant sont rouges et vertes, absorbant à 595 nm. Le changement d'absorbance est proportionnel à la quantité de colorant lié, indiquant donc la concentration en protéines de l'échantillon. La concentration de protéines des échantillons est calculée par rapport à une droite d'étalonnage réalisée à partir d'une solution de sérum albumine bovine (SAB) dont la concentration est connue.

Brièvement, 800 µl de solution protéique diluée environ 1000 fois sont ajoutés à 200 µl de réactif de Bradford (Biorad Protein Assay, BIO-RAD). L'absorbance de la solution est mesurée à 595 nm. On détermine alors la quantité de protéines contenue dans 1 ml de lysat en se référant à la courbe de calibration réalisée à partir d'une solution étalon (1 à 10 μ g / mL) de Sérum Albumine Bovine (Sigma).

3. Obtention des protéines nucléaires par extraction acide.

Après les différents temps d'incubations les cultures cellulaires sont placées à 4°C, les cellules sont rincées par du PBS1X°puis récupérées à l'aide d'un cell scrapper à partir de la boite de culture dans du PBS 1X. Après centrifugation à 200g pendant 10 min le culot est repris avec 10 à 15 volumes de PBS 1X. Le culot cellulaire est ensuite récupéré par centrifugation à 4°C, pendant 10 min à 200 g et remis en suspensiondans 500 µL de tampon de lyse nucléaire (10 mM Hepes pH 7,9 ; 1,5 mM MgCl2 ; 10 mM Kcl ; 0,5 mM DTT ; 0,1 mM PMSF contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (leupeptine, aprotinine et pepstatine à 1 µg/ml chacun) et des inhibiteurs de phosphatase (5mM NaF et 1 mM Na₃VO₄). Afin d'extraire les histones, 500 µL d'une solution froide de HCl 0,8 M y sont alors rajoutés et le mélange est gardé pendant 2 h dans la glace en vortexant le tube de temps en temps. Après 10 min de centrifugation à 4°C et à 12000 g, le surnageant est alors récupéré et les histones précipitées dans 8 volumes d'acétone (soit 8 mL) pendant une nuit à -20°C. Le lendemain, les histones sont collectées par centrifugation à 4°C, pendant 10 min à 2000 g. L'excès de sels est éliminé en lavant le culot 2 fois avec 10 volumes (soit 1 mL) d'un mélange acétone/HCl 100 mM (10/1) préparé extemporanément puis 2 fois avec 10 volumes (soit 1 mL) d'acétone, à température ambiante. Après chaque lavage, le culot d'histones est récupéré par centrifugation pendant 10 min à 2000 g. Le culot est séché à l'air pendant 5 à 10 min puis remis en solution dans 100µL d'eau et conservé à -20°C.

4. Quantification des histones.

Les histones sont des protéines nucléaires pauvres en résidus aromatiques (tyrosine, tryptophane et phénylalanine). Ainsi, leur dosage par spectrophotométrie est réalisé par mesure de l'absorbance à 230 nm (absorbance des liaisons peptidiques) et non à 280 nm comme pour la majorité des protéines (Manchester, 1996), sachant qu'une solution d'histones à 1 mg/mL correspond à une densité optique de 3,3 à 230 nm.

5. Migration et électrotransfert.

 $30 \ \mu g$ de protéines préalablement extraites sont dénaturées pendant 5 min à 99°C puis déposé sur gel de polyacrylamide. Un gel de concentration à 4 % du mélange acrylamide/bisacrylamine (37:1) est coulé sur un gel de séparation à 10-18 %. Le pourcentage d'acrylamide dépend de la taille de la protéine d'intérêt à visualiser. Après addition du tampon de migration 1X dans la cuve, un même volume ajusté aux échantillons est déposé. L'électrophorèse est alors réalisée à température ambiante. La migration s'effectue sous tension de 200 V pendant $\frac{3}{4} d'h - 1h$.

Après séparation, les protéines sont électrotransférées sur membrane PVDF (porablot, Macherey Nagel). Cette manipulation exothermique est effectuée à 4°C pendant une nuit sous 30 V dans du tampon de transfert (Tris base 9,09 g (25 mM) ; glycine 42,2 g (192 mM) ; SDS 3g (0,1 %) ; qsp 3L H₂O ; ajuster le pH à 6,8.)

A la fin du transfert, la membrane est rincée dans du tampon TBS-T puis colorée dans une solution de rouge ponceau S (Sigma Chemical Co, USA) à 10 % dans de l'eau distillée pendant 5 min. Ceci permet de visualiser les bandes qui correspondent aux protéines présentes dans les échantillons et de les identifier par le marqueur de poids moléculaire.

Hybridation

Avant de réaliser l'hybridation de la membrane avec les anticorps spécifiques, il est important de prévenir toute possibilité de fixation non spécifique. La membrane est donc saturée par incubation pendant un minimum d'une heure dans du tampon TBS additionné de 0,1 % de Tween 20 (TBS-T) (Bio Rad) et contenant 5 % de lait écrémé en poudre ou 5% de SAB.

Après saturation, la membrane est alors incubée pendant 2-3 heures à température ambiante ou sur la nuit en présence d'un anticorps spécifique de la protéine recherchée dans du TBS-T contenant 5 % de lait écrémé en poudre ou 5% de SAB. Après trois lavages dans du TBS-T, la membrane est incubée pendant une heure à l'obscurité en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (dilué dans du TBS-T contenant 5 % de lait écrémé).

6. Immunodetection.

Le complexe [protéine-anticorps Iaire-anticorps IIaire] est révélé par le kit SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce). Ce réactif, contenant du luminol, est hydrolysé par la peroxydase couplée à l'anticorps IIaire. La réaction de clivage s'accompagne d'une émission de lumière qui va impressionner un film photosensible (Kodak BMS).

Les différents anticorps, leur spécificité, leur concentration et le temps d'incubation sont repris dans le tableau ci-dessous.

ANTICORPS	SOURCE	DILUTION	INCUBATION
Monoclonal Anti forme active Caspase3	Imgenex	1/500	Sur la nuit
Monoclonal anti β-actine clone AC-15	Sigma	1/10000	2Н
Monoclonal anti Bcl-2 clone 100	Sigma	1/800	2H
Monoclonal anti PARP clivé asp 214	Cell Signaling	1/1000	Sur la nuit4°C
Monoclonal anti Bax	Santa Cruz	1/1000	2H
Anticorps II ^{aire} IgG de chèvre anti-souris HRP conjugate	Upstate	1/2500	1H
Anticorps II ^{aire} IgG de chèvre anti-lapin HRP conjugate	Upstate	1/2500	1H
Anti phospho Chk2(Thr68)	Cell Signaling	1/1000	Sur la nuit 4°C
Anti P38 MAP Kinase	Cell Signaling	1/1000	Sur la nuit 4°C
Anti Phospho P38 MAP Kinase(Thr180/Tyr182)	Cell Signaling	1/1000	Sur la nuit 4°C
Anticorps Phosphosérine	abCAM	1/125	Sur la nuit 4°C
Anticorps PPM1D	Bethyl laboratories	1/10000	Sur la nuit 4°C
AntiPhospho- Chk1(Ser317)	Cell Signaling	Cell Signaling	Sur la nuit 4°C
Anti phosphoHistone H2A.X (Ser139)	Upstate	1/1000	Sur la nuit 4°C
Anti P53	Upstate	1/1000	Sur la nuit 4°c ou 2H T°C ambiante
Anti P21	BD Pharmingen	1/1000	Sur la nuit 4°C
Phospho P53 Sampler kit	Cell Signaling	1/1000	Sur la nuit 4°C

K. Etude de la transcription par RT-PCR.

La technique de RT-PCR permet de visualiser et de quantifier la présence d'ARNm en amplifiant l'ADN complémentaire (ADNc) correspondant par PCR.

Après extraction des ARN totaux, une réaction de synthèse par la transcriptase inverse permet l'obtention d'ADN complémentaire (ADNc) de chaque ARN messager (ARNm) exprimé. Les ADNc obtenus sont ensuite amplifiés par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en présence de produits d'amplification et d'amorces oligonucléotidiques spécifiques des gènes recherchés. Les ADNc spécifiquement amplifiés sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 2 % en présence de bromure d'éthidium (BET). La quantification des produits d'amplification est réalisée à l'aide du logiciel ImageQuant du phosphoimager (Typhoon 9210, Amersham)

1. Extraction des ARNs totaux.

Les ARN totaux sont extraits selon une méthode dérivée de celle de (Chomczynski *et al.*, 1987) à l'aide du réactif Tri ReagentTM (Sigma Biochemical Co, USA) qui est un mélange de guanidine, de thiocyanate et de phénol. Les culots de $1-10 \times 10^6$ cellules sont traités pendant 5 min à température ambiante par 1 mL de réactif Tri ReagentTM froid afin de bien lyser les cellules, puis par 200 µL de chloroforme froid (Sigma). Après plusieurs homogénéisations, les échantillons sont centrifugés à 11 000 g pendant 20 min à 4°C. La phase aqueuse supérieure contenant les ARN est récoltée et additionnée de 500 µL d'isopropanol froid (Prolabo, France). Après agitation par inversion et incubation de 5 min dans de la glace, les ARNs sont précipités une nuit à -20° C. Les précipités d'ARN sont récupérés après centrifugation à 11 000 g pendant 10 min à 4°C. Les culots d'ARN ainsi obtenus sont lavés par de l'éthanol à 75 %, puis séchés après une centrifugation à 7500 g, 5 min à 4°C. Ils sont ensuite dissous dans 50 µL d'eau exempte de DNase et de RNase puis incubé pendant 10 min à 56°C pour résorber les structures secondaires.

Les ARNs sont conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

a) Quantification et contrôle de qualité.

Avant chaque RT-PCR, les ARN extraits sont quantifiés et leur intégrité est contrôlée. Les ARNs sont dosés par spectrophotométrie (Ultrospec 3000 pharmacia LKB) à 260 nm, la contamination protéique est estimée par une lecture à 280 nm. Le rapport des DO mesurées à 260 nm et à 280 nm (DO_{260}/DO_{280}) indique la pureté des échantillons, il doit se situer entre 1,6 et 2 (<1,6 : contamination par les protéines; >2 : contamination par l'isothiocyanate de guanidine ou le phénol). La densité optique mesurée à 260 nm permet de calculer la concentration d'ARN sachant qu'une unité de DO est égale à 40 µg/µL.

De plus, avant chaque expérience, l'intégrité des ARNs est contrôlée par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % (Euromedex, ADN grade) dans du TBE $1X^{(1)}$ contenant 0,04 % de bromure d'éthidium (BET) (Sigma Biochemical Co, USA). Un μ L de solution d'ARNs est mélangé à 5 μ L de bleu de charge⁽²⁾. La migration s'effectue pendant 90 min à 80V. La présence, après révélation sous UVs, de deux bandes nettes et distinctes reflète la qualité des ARNs ribosomaux majoritaires (18S et 28S) et donc, par extrapolation, la qualité des ARNs totaux.

2. Transcription inverse (« Reverse-Transcription », RT) kit promega.

Tous les ARNm sont réverse transcrits en ADN complémentaire (ADNc) correspondant aux ARNm exprimés.

Toutes les manipulations sont effectuées à 4°C. Selon le protocole fourni, 1 μ g d'extraits d'ARNs totaux dans 9,75 μ l d'eau DEPC sont incubés 10 min à 70°C puis placé dans la glace 1 min pour éviter la formation de structures secondaires. Ensuite 10,25 μ l de mix RT sont ajoutés (MgCl₂ 5 mM ; dNTP 1x ; RNasin 1U/ μ l; 1 μ L d'enzyme transcriptase inverse à 200 U/ μ L (M-MLV Reverse Transcriptase); Random Amorce (mélange d'hexanucléotides correspondant à toutes les combinaisons de bases possibles) ou polyDT 25 μ g/ml). Les échantillons sont incubés 1 h à 42°C (température optimale de l'enzyme) puis 5 min à 65°C (arrêt de la réaction). Les échantillons sont dilués au 1/10^{ième} puis congelés à – 20°C.

3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) classique.

Mises au point des conditions de PCR classique

Pour chaque PCR, une mise au point est nécessaire afin d'obtenir un signal spécifique pour chaque gène sans signaux parasites et pour définir les conditions de linéarité des PCR semi-quantitatives. Pour cela, nous avons fait varier la température d'hybridation des amorces et le nombre de cycles d'amplification.

Contrôle de qualité

L'ADNc d'un gène ubiquitaire (la β2microglobuline) est amplifié et est utilisé comme contrôle de la qualité des ADNc mais aussi comme référence de la quantité d'ADNc. Pour chaque réaction de PCR, un blanc sans ADNc est réalisé parallèlement aux échantillons et au blanc de RT, pour vérifier l'absence de contamination par de l'ARN ou de l'ADN étranger ou

par d'autres produits post-PCR. Un témoin positif avec de l'ADNc de cellules exprimant le gène d'intérêt est également effectué pour s'assurer de la qualité de la PCR.

Amplification des ADNc

Dans un premier temps, le « mix PCR»⁽¹⁾ est préparé pour (n + 1) tubes ; 15 μ L de ce mix sont ajoutés par tube à 5 μ L d'ADNc (qui ont été préalablement dilués au 1/10).

Les étapes d'amplification sont réalisées selon le protocole suivant :

- un premier cycle : de dénaturation de 2-5 minutes à 95°C
- puis 30-35 cycles composés de trois phases :
 - une première phase de dénaturation de 30 secondes à 95°C,
 - une deuxième d'hybridation de 30 secondes à la température d'hybridation des amorces
 - et une troisième d'élongation de 30-40 secondes à 72°C
- suivie d'une phase d'élongation supplémentaire de 5-7 min à 72°C

Mix PCR pour la Taq invitrogen par tube : tampon 10X 2 µL ; MgCl2 1,2 µL ; dNTP 0,4 µL ; amorces 10 pmol/µL, 1 µL de chaque ; enzyme Taq polymérase 5U/µL 0,2 µL ; eau stérile qsp 15 µL .

Détection des produits de PCR

Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose à 2 % dans du TBE 1X contenant 0,04 % de BET, sous une tension de 100 V pendant 90 min. Les gels sont ensuite exposés sur une plaque UVs. L'analyse densitométrique des bandes obtenues est réalisée à l'aide du système Le rapport entre le volume densitométrique dusignalcorrespondant aux gènes cibles logiciel ImageQuant du phosphoimager (Typhoon 9210, Amersham) sur le volume densitométrique du signal correspondant au gène ubiquitaire permet d'estimer et de comparer l'expression des gènes.

L. PCR en temps réel.

1. Extraction des ARNs totaux.

Les ARNs sont extraits à l'aide du kit "RNeasy® mini kit" à partir d'un culot de 5×10^6 cellules. Les ARNs extraits sont resuspendus dans 50 µl d'eau DEPC, quantifiés par spectrophotométrie en UV. La DO mesurée à 260 nm permet de calculer la concentration d'ARN sachant qu'une unité de DO est égale à 40μ g/ml si le rapport des DO à 260/280 est supérieur à 1,7. L'intégrité des ARNs est contrôlée par migration en gel d'agarose à 1% (Euromedex, ADN grade) en tampon TBE 1x (Tris 89 mM. EDTA 2 mM ; acide borique 0,1 M) contenant 0,04% de bromure d'éthidium (Sigma France). Un µL de solution d'ARN est mélangé à 5 µl de bleu de charge. La migration s'effectue pendant 90 min à 80 V. La présence après révélation sous UV de 2 bandes distinctes reflète la qualité des ARNr (18S et 28S) et par extrapolation celle des ARNs totaux.

2. Réaction de transcription inverse : idem PCR classique.

3. Réaction de polymérisation en chaine.

La réaction de PCR a pour but d'amplifier un fragment d'ADNc en utilisant une paire d'amorces spécifiques de la séquence considérée. La PCR en temps réel, contrairement à la PCR classique, permet la détection des produits de PCR en temps réel et leur quantification Le mélange PCR utilisé est celui préconisé par le fabricant : "LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I" prêt à l'emploi. Il contient outre les tampons et l'ADN Taq polymérase, le SYBR Green I, agent intercalant de l'ADN double brin qui permet de suivre l'évolution de la fluorescenceen fonction de la quantité d'ADN synthétisé à chaque cycle de PCR.

La technologie Roche utilise des capillaires dans lesquels sont introduit 2 µl d'ADNc (non dilué provenant de la réaction de RT) et 18 µl de mélange PCR contenant les amorces spécifiques dont les séquences sont données ci-dessous

Amorces	Sens	Anti-sens
$\beta_2 m$	5'- AGCAGAGAATGGAAAGTCAAA-3'	5'- TGTTGATGTTGGATAAGAGAAT-3'
Bax	5'-TTCCGAGTGGCAGCTGACAT-3'	5'- TTCCAGATGGTGAGTGAGGC-3'
Bcl-2	5'-GGTGAACTGGGGGGGGGGATTGT-3'	5'-CTTCAGAGACAGCCAGGAGAA-3'

L'étape de dénaturation de l'ADN est réalisée à 95°C pendant 8 min. L'étape d'amplification est programmée sur 30 cycles qui se déroulent de la façon suivante : activation de la Taq polymérase (Hot start) à 95°C pendant 10 sec, hybridation des amorces à 60°C pendant 5 sec et élongation à 72°C pendant 7 sec. La PCR est suivie d'une étape de fusion des produits de PCR ce qui permet de les caractériser par leur point de fusion et de contrôler la spécificité de la réaction.

M. Immunofluorescence.

L'immunofluorescence est une technique basée sur une réaction immunologique de type antigène-anticorps. Le principe en est le suivant : après marquage spécifique de l'antigène d'intérêt par son anticorps spécifique, un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome va se fixer sur la partie Fc de l'anticorps primaire. Sous microscope à fluorescence, on peut ainsi observer la localisation du marquage dans la cellule par rapport au noyau dont l'ADN a été coloré

Préparation du matériel cellulaire

Les cellules A549 sont ensemencées à raison de 10000 cellules/ml sur lamelles de verre préalablement déposées au fond de puits d'une plaque 6 puits. Après 2 jours de croissance les cellules sont traitées par différentes concentrations de 12459.

Fixation et perméabilisation des cellules

Les fixateurs aldéhydiques sont dits pontants car ils établissent notamment des ponts diamines interchaînes au niveau des structures protéiques.

La fixation aldéhydique est effectuée par du paraformaldéhyde préchauffé à 37°C à 4 % dans du PBS pH 7,4 (bioMérieux) pendant 10 min. Après 3 lavages de 5 min dans du PBS, elle est suivie par l'étape de perméabilisation dans un tampon : (Tris-HCl 20 mM (pH 8) ;50 mM NaCl ; MgCl2 3mM ; sucrose 300 mM et 0,5% triton X-100).

> <u>Saturation</u>

Pour éviter de la fixation non spécifique des anticorps, les préparations sont saturées 1 heure dans une solution de sérum albumine bovine à 5% dans du PBS 1X.

Hybridation

Les échantillons sont ensuite incubés pendant 2 heures en présence de l'anticorps primaire dans du PBS contenant 5 % de sérum albumine bovine sous légère agitation. Après 3 lavages dans du PBS, l'incubation en présence d'anticorps secondaire couplés à l'Alexa 569 ou 488 (Molecular Probes) est réalisée à température ambiante pendant 1 heure.

Trois lavages dans du PBS précèdent une incubation de 10 min en présence d'1 μ M de Hoechst 33342 afin de marqué le noyau l'excès est éliminé par 3 lavages de 5 min dans du PBS.

Les différents anticorps, leur spécificité, leur concentration et les temps d'incubation sont repris dans les tableaux

➢ Montage

Les lamelles sont montées sur les lames avec une goutte de cytifluor (antifading) puis lutées.

Les différents anticorps, leur spécificité, leur concentration et le temps d'incubation sont repris dans le tableau ci-dessous:

Anti P53	Upstate	1/1000	2H
Anti phosphoHistone H2A.X (Ser139)	Upstate	1/1000	2H
Anticorps TRF1 (C-19) :sc-1977	Santa cruz	1/1000	2H

N. Détection de l'activité SA β-galactosidase.

Les fibroblastes humains en sénescence expriment la SA β -galactosidase, celle-ci est détectée au sein des cellules grâce au X-Gal qui après clivage forme localement un précipité bleu (Dimri *et al.*, 1995).

Les cellules sont lavées 2 fois dans du PBS 1 X puis fixées pendant 5 min à température ambiante dans une solution de 1% formaldéhyde/ 0,2% glutaraldéhyde. Après 2 lavages PBS

1X les cellules sont incubées à 37°C (sans CO₂) dans une solution de coloration : 0,4 mg/ml de X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl–β-D-galactopyranoside) ,4mM potassium ferrocyanide, 4mM potassium ferricyanide et 2 mM MgCl₂. La solution de X-Gal est préparée extemporanément à une concentration de 10 mg/ml dans du DMSO.La coloration est optimale après 16 heures. Les cellules sont observées sous microscope inversé (Nikon TE300) grossissement X20. Les images sont enregistrées 650 X 515 pixel avec une caméra CCD refroidie (Coolsnap, Ropper scintific).

O. Transfection des cellules avec les siRNA PPMID.

1. Principe.

Le phénomène d'ARN interférence (RNAi, RNA interférence) est une technique d'inactivation des gènes dans les cellules eucaryotes. C'est un processus post-transcriptionnel qui est déclenché par l'introduction d'ARN double brin dirigé contre un ARN particulier dans la cellule et qui mène à l'inactivation d'un gène d'une manière séquence spécifique. C'est un mécanisme en deux temps qui se déroule dans le cytoplasme.



Figure II-1 : Principe de l'ARN interférence par siRNA.

1) <u>Génération des siRNA</u>: Après introduction de l'ARNdb dans la cellule, il y a dégradation de cet ARNdb en petits ARN interférents (siARN, small interfering RNA) d'une longueur de 21 à 25 nucléotides. Cette dégradation se fait par une RNAse III spécifique des ARNdb appelée Dicer. Celle-ci génère des siRNA double brin avec une extrémité 5'phosphate et une extrémité 3'OH et 2 ou 3 nucléotides non appariés à l'extrémité 3'.2) <u>Activation du complexe RISC</u>: Ces siRNA servent alors de signaux pour activer le complexe protéique appelé RISC (RNA-Induced Silencing Complex) qui contient les protéines nécessaires au clivage de l'ARNm cible. Ceux-ci sont incorporés dans le complexe RISC où ils sont déroulés grâce à l'activité hélicase du complexe. Cette étape est dépendante de l'ATP. Une fois déroulé, le simple brin anti-sens guide le complexe RISC à l'ARNm de séquence complémentaire et il en résulte un clivage endonucléolytique de l'ARNm, ce qui conduit à l'inhibition de l'expression des protéines correspondantes.

Les séquences de siRNA PPM1D sont :

5'GGCUUUCUCGCUUGUCACC 3'

3'CCGAAAGAGCGAACAGUGG5'

Les séquences de siRNA controles sont :

5'UGCGCUACGAUGGACGAUG 3'

3'ACGCGAUGCUACCUGCUAC 5'

2. Mode opératoire.

La veille de la transfection les cellules A549 sont réparties en plaque 6 puits à raison de $1,5.10^5$ cellules par puit dans 2 mL de milieu DMEM dépourvue d'antibiotique. Le lendemain la transfection est réalisée sur les cellules qui doivent alors être à 60% de confluence, de la façon suivante pour un puit :

D'une part 2,5 μ L de siRNA à 100 μ M sont ajouté à 250 μ L de mileu DMEM dépourvu de SVF et d'antibiotique et de l'autre 5 μ L de lipofectamine 2000 (Invitrogen) sont ajoutés à 250 μ L de DMEM également dépourvu SVF et d'antibiotique. Les 2 solutions sont doucement homogénéisées puis incubées à température ambiante pendant 15 minutes. Après ce temps d'incubation la solution contenant les siRNA est ajouté à celle contenant la lipofectamine, puis le mélange est doucement agité puis incubé pendant 15 minutes à température ambiante afin de permettre la formation de complexes siRNA/Lipofectamine 2000. 1,5 mL de milieu DMEM sans SVF et sans antibiotique est ajouté à la solution siRNA/lipofectamine 2000. Après homogéinisation la solution est répartie dans un puit et la plaque est mise à l'étuve à 37°C. Le milieu est remplacé au minimun après 4 heures de transfection par du milieu DMEM avec du SVF et, le lendemain, les antibiotiques peuvent être ajoutés. Après deux jours de transfection les cellules sont trypsinées puis réparties en plaque 6 puits à raison de 1,5.10⁵ cellules par puit dans 2 mL. Les cellules sont traitées 4 jours après la transfection.

P. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.

1. Principe de la cytométrie en flux.

La cytométrie en flux est une technique permettant l'analyse individuelle et multiparamétrée de cellules ou d'éléments subcellulaires, à une vitesse variant entre 500 et 5000 objets par seconde. Elle donne des indications sur la taille, la structure interne (granulométrie, rapport nucléo-cytoplasmique...) et la fluorescence d'un système cellulaire. Les résultats obtenus se présentent sous la forme d'histogrammes mono ou biparamétrés, donnant la répartition des cellules en fonction du ou des paramètres étudiés. De plus, la cytométrie en flux permet de trier et de séparer physiquement les sous-populations mises en évidence par l'analyse. Cette analyse devant se faire pour chaque objet individuellement, il est nécessaire que l'échantillon se présente sous la forme d'une suspension. Une fois mises en suspension, les cellules ou les particules subcellulaires peuvent être analysées après ou en l'absence de fixation. La mesure de composants particuliers de la cellule nécessite leur marquage préalable, soit à l'aide de fluorochromes spécifiques (intercalants...), soit par

immunomarquage fluorescent (anticorps marqués). Les cellules sont ensuite injectées au centre d'une gaine liquide réalisée par l'intermédiaire d'une buse de 50 à 100 µm de diamètre. Le jet résultant va permettre aux cellules de défiler l'une derrière l'autre, avec suffisamment d'espace entre elles pour être analysées séparément. A la sortie de la buse, les cellules passent dans un faisceau lumineux focalisé sur le centre du jet et généralement fourni par un laser. L'interaction entre le faisceau et les particules est à l'origine de signaux lumineux, lesquels sont séparés et sélectionnés par un jeu de miroirs et de filtres puis collectés par des photo-détecteurs (photodiodes et photomultiplicateurs) qui vont les transformer de façon proportionnelle en signaux électriques. Enfin, l'analyseur multicanaux va permettre le traitement des signaux électriques afin d'obtenir un histogramme de la répartition de la population analysée, en fonction du ou des paramètres étudiés.

2. Application de la cytométrie en flux à l'étude du cycle Cellulaire.

La mesure du cycle cellulaire par cytométrie en flux divise le cycle en trois phases : Go/G1, phase d'activation des cellules, S, phase de synthèse de l'ADN et G2/M, phase de mitose. Ces trois phases sont différentes par leur quantité d'ADN. Les cellules en Go/G1contiennent 2n chromosomes, les cellules en G2/M contiennent 4n chromosomes et les cellules en phase de synthèse possèdent une quantité d'ADN intermédiaire. La distinction entre G0 (phase quiescente) et G1 (phase de préparation à la synthèse d'ADN) ainsi que G2 (phase de préparation de la mitose) et M (mitose) est impossible avec une méthode utilisant un intercalant comme l'iodure de propidium. La cytométrie en flux permet de suivre la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle en fonction du traitement appliqué. Elle nécessite l'emploi de fluorochromes spécifiques de l'ADN possédant deux qualités essentielles : combinaison stoechiométrique avec l'ADN et bonneémission defluorescence après liaison à l'ADN. Les fluorochromes utilisés sont regroupés en deux catégories principales :

- Les agents intercalants : iodure de propidium, bromure d'éthidium.

- Les colorants spécifiques de paires de bases : Hoechst 33342/33258 (A-T) et mithramycine (G-C).

3. Conditions expérimentales.

Les cellules A549 ont été incubées en présence 10 µM de 12459 pendant 1, 2, 3 et 4 jours avec un contrôle sans traitement pour chaque jour d'incubation. Après récolte par

trypsination 1.10^6 cellules sont rinçées dans du PBS 1X puis centrifugées à 1500 rpm pendant 5 minutes. Le culot est ensuite récupéré et vortexé pendant qu'on y rajoute goutte à goutte 1mL d'éthanol à 70% froid afin de permetrre la fixation des cellules. Le mélange peut alors être gardé 30 min dans la glace ou conservée à 4°C si la manipulation doit être interrompue. Après une centrifugation de 5 min à 1500 rpm, le culot est vortexé, rincé dans 1 ml de PBS et la suspension cellulaire est ensuite centrifugée 5 min à 1500 rpm. Le culot est ensuite remis en suspension dans 1 mL d'une solution de PBS comprenant 40 µg/mL d'iodure de propidium et 100 µg/mL de RNase. La suspension cellulaire est ensuite incubée à température ambiante à l'obscurité pendant 20 minutes et analysée aussitôt au cytomètre en flux BD FACSAria .Flow cytometer. Les résultats sont analysés à l'aide du logiciel « FACS DIVA ».

III. RESULTATS

PARTIE 1

Altération du simple brin télomérique et modulation par Bcl-2 de l'apoptose induite par le 12459, ligand de l'ADN G-quadruplexe

Introduction

Plusieurs séries de molécules qui stabilisent les G-quadruplexes (ligands des G-quadruplexes) ont été décrites et leur efficacité en tant qu'inhibiteur de la télomérase a été démontrée *in vitro* (Gomez *et al.*, 2002; Riou, 2004). Par ailleurs, plusieurs de ces composés induisent la sénescence réplicative des cellules cancéreuses après un traitement à long terme (Gowan *et al.*, 2002; Riou *et al.*, 2002).

Parmi les molécules étudiées par notre groupe, le 12459 (dérivé de la triazine disubstituée) est un des ligands de G-quadruplexes les plus actifs et sélectifs. Ce ligand induit l'inhibition de l'activité télomérase dans la lignée d'adénocarcinome pulmonaire A549. De faibles doses de 12459 (inférieures à 1 μ M) en traitement à long terme induisent un arrêt de croissance des cellules A549 avec un phénotype de sénescence. En revanche, des traitements à court terme avec des concentrations supérieures à 4 μ M induisent l'apoptose (Riou *et al.*,



Figure III-1 : Induction de la sénescence et de l'apoptose par le 12459 dans la lignée A549. A) Courbe représentant les doublements de population de la lignée A549 témoin ou traitée par 0,04 μ M de 12459. Chaque passage correspond à quatre jours de croissance cellulaire en présence ou non du ligand. Le traitement par 0,04 μ M de 12459 de la lignée A549 induit un plateau de croissance à 45 jours, les cellules rentrent en sénescence à 60 jours (Gomez et al., 2003). B) Les cellules A549 ont été traitées par 10 μ M de 12459, fixées puis marquées au Hoechst 33342. Le pourcentage de cellules apoptotique est déterminé par rapport aux cellules non traitées. Le traitement par 10 μ M de 12459 induit l'apoptose après un délai de 72 heures.(Gomez et al., 2003).

Des résultats antérieurs obtenus au laboratoire ont montré que le traitement par le 12459 induit l'apoptose à court terme indépendamment de l'inhibition de l'activité télomérase (Gomez *et al.*, 2003). En effet, la surexpression d'hTERT ou l'introduction d'un dominant négatif d'hTERT dans la lignée A549 ne modifie pas la réponse au traitement court terme par le 12459. Ces résultats sugèrent ainsi que la modulation de l'activité télomérase n'est pas un élément majeur pour l'activité antiproliférative du 12459.

De plus, grâce à l'établissement, à partir de la lignée A549, de clones résistants à l'apotose induite par traitement à court terme au 12459, nous avons pu associer les effets de cette résistance à une altération du « *capping* » des télomères (coiffe et protection des télomères), pour laquelle l'expression de hTERT est essentielle (Gomez *et al.*, 2003). En effet, ces clones montrent une modification de l'épissage alternatif d'hTERT et/ou une surexpression d'hTERT (de 2 à 4 fois) et sont capables de maintenir un taux élevé de transcrits d'hTERT et une activité télomérase même sous traitement par le 12459 (Gomez *et al.*, 2004). Le clone JFD18 étudié dans ce travail présente une surexpression de l'activité transcriptionnelle du gène codant hTERT, et une forte augmentation de la longueur du télomère. L'introduction d'un dominant négatif d'hTERT dans ce clone JFD18 restaure la sensibilité aux concentrations en 12459 induisant l'apoptose, ceci suggérant que la télomérase participe à la résistance aux ligands des G-quadruplexes. En revanche, le clone JFD9 également étudié au cours de ce travail possède une expression normale de hTERT, mais une augmentation de la longueur du télomère. Ces résultats suggèrent que les évènements associés à cette résistance sont multiples et complexes.

Afin de mieux comprendre les mécanismes associés à l'activité cellulaire du traitement par le 12459 et à la résistance, nous avons dans cette étude analysé les caractéristiques de l'apoptose induite par ce traitement dans les cellules A549 sensibles et dans les deux clones JFD 18 et JFD9 résistants. L'effet de ce ligand sur le brin G télomérique. sera également étudié. Ces données permettront de définir les voies apoptotiques activées en réponse au traitement par le ligand 12459, d'établir s'il existe des voies indépendantes du contrôle de la télomérase dans le mécanisme d'action de ce ligand et le rôle de la longueur du télomère simple brin dans le mécanisme d'apoptose. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue Nucleic Acids Research (Douarre *et al.*, 2005).

PUBLICATION 1

Overexpression of BcI-2 is associated with apoptotic resistance to the G-quadruplex ligand 12459 but is not sufficient to confer resistance to long-term senescence

Céline Douarre¹, Dennis Gomez^{1,2}, Hamid Morjani¹, Jean-Marie Zahm³, Marie-Françoise O'Donohue⁴, Lahcen Eddabra¹, Patrick Mailliet⁵, Jean-François Riou^{1,*} and Chantal Trentesaux¹

¹Laboratoire d'Onco-Pharmacologie, JE 2428, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France, ²Laboratoire de Biophysique, Muséum National d'Histoire Naturelle, USM503, INSERM U565, CNRS UMR 5153, 43 rue Cuvier, 75231 Paris cedex 05, France, ³INSERM UMR 514, CHU Maison Blanche, 45 rue Cognacq-Jay, 51092 Reims, France, ⁴CNRS UMR 6142, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096, Reims, France and ⁵Sanofi-Aventis SA, Département de Chimie, Centre de Recherche de Paris, 13 quai Jules Guesde, 94403 Vitry sur Seine, France

Received February 11, 2005; Revised and Accepted March 29, 2005

ABSTRACT

The triazine derivative 12459 is a potent G-quadruplex interacting agent that inhibits telomerase activity. This agent induces time- and dose-dependent telomere shortening, senescence-like growth arrest and apoptosis in the human A549 tumour cell line. We show here that 12459 induces a delayed apoptosis that activates the mitochondrial pathway. A549 cell lines selected for resistance to 12459 and previously characterized for an altered hTERT expression also showed Bcl-2 overexpression. Transfection of Bcl-2 into A549 cells induced a resistance to the shortterm apoptotic effect triggered by 12459, suggesting that Bcl-2 is an important determinant for the activity of 12459. In sharp contrast, the Bcl-2 overexpression was not sufficient to confer resistance to the senescence-like growth arrest induced by prolonged treatment with 12459. We also show that 12459 provokes a rapid degradation of the telomeric G-overhang in conditions that paralleled the apoptosis induction. In contrast, the G-overhang degradation was not observed when apoptosis was induced by camptothecin. Bcl-2 overexpression did not modify the G-overhang degradation, suggesting that this event is an early process uncoupled from the final apoptotic pathway.

INTRODUCTION

Telomeres play an important role in chromosome structural integrity to cap and protect their extremities from illegitimate recombination, degradation and end-to-end fusion (1). Telomere replication is sustained in proliferative somatic cells and in most cancer cells by telomerase, a ribonucleoprotein complex that elongates the chromosome ends to compensate losses occurring at each cell division, due to the inability of polymerase to fully replicate telomeric extremities (2). In somatic cells, the absence of telomerase provokes a progressive shortening of the telomeric DNA at each round of division that ultimately leads to replicative senescence, once a critical telomere length has been reached (3). Numerous observations, notably that inhibition of telomerase activity limits tumour cell growth (4), have led to the proposition that telomere and telomerase are potential targets for cancer chemotherapy (3,5,6).

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 the duplex to form a 130–210 base overhang (G-overhang) (7,8). Telomeres are believed to exist in different conformations together with several telomereassociated proteins, such as TRF1, TRF2 and Pot1 (9). The G-overhang is either accessible for telomerase extension in an open state, or inaccessible in a capped (or closed) conformation that involves the formation of a T-loop motif (9). Although the T-loop structure has not been defined in detail, it may be created by the invasion of the G-overhang into the

^{*}To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 3 26 91 80 13; Fax: +33 3 26 91 89 26; Email: jf.riou@univ-reims.fr

[©] The Author 2005. Published by Oxford University Press. All rights reserved.

The online version of this article has been published under an open access model. Users are entitled to use, reproduce, disseminate, or display the open access version of this article for non-commercial purposes provided that: the original authorship is properly and fully attributed; the Journal and Oxford University Press are attributed as the original place of publication with the correct citation details given; if an article is subsequently reproduced or disseminated not in its entirety but only in part or as a derivative work this must be clearly indicated. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oupjournals.org

duplex part of the telomere (10). Uncapping of the telomere ends by different means leads to telomeric dysfunction characterized by end-to-end fusion, inappropriate recombination, anaphase bridges and G-overhang degradation that either lead to apoptosis or senescence (11–14).

Because of the repetition of guanines, the G-overhang is prone to form a four-stranded G-quadruplex structure that has been shown to inhibit telomerase activity in vitro (15,16). Small molecules that stabilize G-quadruplex are effective as telomerase inhibitors and several series of compounds have been reported to date to induce replicative senescence after long-term exposure of tumor cell cultures (17-24). Among them, the 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine derivative 12459 (Figure 1a) is one of the most active and selective ligands that bind to the telomeric G-quadruplex. The triazine derivative 12459 was shown to induce both telomere shortening and apoptosis in the human lung adenocarcinoma A549 cell line (17). Recent results have indicated that 12459 induces short-term apoptotic effects independent of the presence of telomerase activity and that resistance to 12459 is associated with telomere capping alterations in which hTERT overexpression is essential (25). Clones selected for resistance to 12459-induced apoptosis also presented hTERT splicing alterations and/or hTERT overexpression suggesting that cellular events associated with 12459 resistance are complex (26). These resistant clones were able to maintain a high level of hTERT transcript and telomerase activity under 12459 treatment (26).

Our studies have demonstrated that another G-quadruplex ligand, telomestatin, interfered with the conformation and the length of the telomeric G-overhang, an effect that is thought to be more relevant than the double-stranded telomere erosion as a marker for telomestatin cellular activity (27). G-overhang degradation was found to be associated with the onset of senescence. Interestingly, telomestatin presented the remarkable property to remain bound to the telomere ends (27).

In an effort to better understand the mechanism(s) associated with the cellular activity of 12459, we have analyzed in this study the characteristics of the apoptosis induced by 12459 in A549 cells and the effect of this ligand on the conformation and the length of the telomeric G-overhang. Our results indicate that the apoptotic protein Bcl-2 also plays a role in the resistance to the short-term treatment of 12459. In contrast, Bcl-2 was not found to be a critical determinant of the long-term senescence induced by 12459. We also observed a rapid degradation of the telomeric G-overhang induced by short-term treatment with 12459 that paralleled the apoptotic induction, which was not observed in A549 cells undergoing apoptosis by camptothecin.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and drug treatments

Human A549 lung carcinoma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) and 12459 resistant A549 clones, JFD18 and JFD9 were obtained as described previously (25). Cells were cultured in DMEM with Glutamax (Invitrogen) and supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics. A549::Bcl-2 cell line was obtained by transfection of parental A549 cells by pcDNA3Bcl-2 vector



Figure 1. (a) Chemical formula of 12459. (b) Effect of 12459 (10 μ M) on the growth of human A549 lung carcinoma parental cells, and resistant A549 cells JFD18 and JFD9 for the indicated times. Mean \pm SD of triplicate independent experiments. (c) Apoptosis induction by 12459 (10 μ M) in A549, JFD18 and JFD9 cells after 96 h of treatment. Cells were fixed and stained with Hoechst 33342, and the percentage of cells exhibiting apoptotic nuclei was calculated relative to untreated cells.

(a gift from L. Debussche, Sanofi-Aventis, Vitry sur Seine, France) with LipofectamineTM 2000 kit and further selection with geneticin was done for 3 weeks.

For drug treatment, the triazine derivative 12459 (synthesized according to patent WO-0140218) was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 10 mM. This stock solution was kept at -20° C in aliquots. Further dilutions were performed in water to be added at the appropriate concentration to cell cultures in the exponential phase of growth. Due to an interference of 12459 with the coloration induced by MTT, the survival assay for this compound was performed in 12-well plates, each point in triplicate. The number of viable cells was counted for trypan blue dye exclusion in a hematocytometer.

Camptothecin was commercially available (Sigma) and was dissolved in DMSO at 1 mM. Further dilutions were made in water.

Detection of apoptotic cells

Cells were grown in 12-well plates and were treated with appropriate concentrations for 1-4 days. During apoptosis, some adherent A549 cells rounded and detached themselves from the layer. Thus apoptosis was monitored on both attached and floating cells. Cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and stained with Hoechst 33342 at 1 µg/ml. Cells with apoptotic morphology (cell shrinkage, nuclear chromatin condensation or apoptotic bodies) were counted in different parts of the slide by fluorescence microscopy. For camptothecin, in parallel to single-strand overhang experiments, A549 cells were grown for apoptotic evaluation. After 48 h, control cells or cells treated with 5 µM camptothecin were fixed with 5% paraformaldehyde in PBS, and then dyed with DAPI. After mounting in Citifluor (Sigma), cells were observed with an Axiovert 200M inverted microscope (Zeiss) equipped with an LD achroplan 40× objective. Images were collected with a CCD cooled camera (Coolsnap HQ, Ropper Scientific).

Long-term culture

For long-term cell growth studies, cells were seeded at 15×10^3 cells/ml into a 25 cm² tissue culture flask, in the presence or the absence of 12459 (0.5 μ M), cultured for 4 days, then trypsinized and counted. At each passage, 15×10^3 cells/ml were replated onto a new culture flask with fresh medium containing drug solution. Results were expressed as the cumulated population doubling (PD) as a function of the time of culture as previously described (17).

Detection of SA β-galalactosidase activity

At 4 and 7 days after plating on 24-well microplate in the presence of 0.1 to 10 μ M 12459, the endogenous senescenceassociated β -galactosidase activity was assessed by a staining using X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) as described previously (28).

 β -galactosidase activity was also evaluated at day 20 for long-term culture with 0.5 μ M 12459. The culture plates were placed on the stage of an inverted microscope (Nikon TE300) and observed at 20× magnification. Images were recorded as a 650×515 array with a CCD cooled camera (Coolsnap, Ropper Scientific).

Western blot analysis

All experiments were performed with cells in a logarithmic phase by controlling the plating density. Cells were washed with ice-cold PBS and lysed in RIPA buffer (50 mM Tris–HCl (pH 7.4), 0.25% sodium desoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM PMSF), including a protease inhibitor cock-tail at 1 μ g/ml (Mini complete protease, Roche Diagnostics). After 30 min on ice, lysates were cleared by centrifugation.

Protein concentration was routinely measured with the Bio-Rad protein assay. Cell lysates containing equal amounts of total protein (25-40 µg) were resolved on a 12% or 10% SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane (Macherey-Nalgel) by electroblotting in 25 mM Tris (pH 8.3), and 192 mM glycine. Membranes were blocked for 3 h at room temperature in 10 mM Tris (pH 7.5) containing 0.15 M NaCl, 0.1% Tween-20 and 5% non-fat dry milk. Primary and secondary immunodetection, as well as washes, were performed in the same buffer using 5% dry milk. Western blot analysis was accomplished according to standard procedure using SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce). The following primary antibodies were used (1:1000 unless otherwise indicated): Monoclonal antibody to active Caspase 3 (Imgenex), Monoclonal anti-β-actin clone AC-15 (1:10000) and anti-Bcl-2 clone 100 (Sigma), monoclonal anti-cleaved PARP asp 214 (Cell signalling) and anti-Bax (Santa Cruz).

Mitochondrial membrane potential $(\Delta \psi_m)$ and Reactive Oxygen Species (ROS) production

Fluorescence from JC1 monomers (green) and J-aggregates (red) was specific to the mitochondrial membrane potential $(\Delta \Psi_m)$ state (low and high, respectively). Therefore, the red/ green fluorescence intensity ratio allowed the characterization of mitochondrial function. After washing twice, JC-1 emission was recorded by spectrofluorimetry to follow the quantitative evolution of $(\Delta \psi_m)$ in treated cells compared with control cells. Cells were seeded into 25 cm² tissue culture flasks. After 24 h, cells were treated with appropriate concentrations of 12459 for different incubation times. The cells were washed and labeled with 3 µM JC1 in 5 ml final volume for 45 min. Cells were then trypsinized and resuspended in 2 ml RPMI without phenol red for spectrofluorimetric analysis using 488 nm as excitation wavelength. Relative membrane potential was expressed as: $(I_{590} \text{ nm}/I_{530} \text{ nm} + I_{590} \text{ nm}) \times 100$. The protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP, Sigma) was used as positive control for potential disruption.

ROS production was determined using carboxy fluorescein-AM (CF). After cell treatment, 5 μ M CF was added to 5 ml final volume for 30 min. Trypsinized cells were then analyzed by spectrofluorimetry using 488 nm for excitation and 515 nm for fluorescence emission measurement.

Solution hybridization experiments

The non-denaturing hybridization assay to detect the 3' telomere G-overhang was performed as described previously (27). A total of 2.5 µg aliquots of undigested genomic DNA was hybridized at overnight 50°C with 0.5 pmol of $[\gamma - {}^{32}P]ATP$ labeled (5'-CCCTAA-3')₄ oligonucleotide (21C) in sodium hybridization buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 50 mM NaCl, and 1 mM EDTA) in a volume of 20 µl. For competition the reactions were performed in the presence of 10 μ M Pu22myc. Reactions were stopped by the addition of 6 µl of loading buffer (20% glycerol, 1 mM EDTA, and 0.2% bromophenol blue). Hybridized samples were size-fractionated on 0.8% agarose gels in 1× TBE buffer containing ethidium bromide (EtBr). Gels were dried on Whatman filter paper. Ethidium fluorescence and radioactivity were scanned in a phosphorimager (Typhoon 9210, Amersham). The procedure allows detection of the amount of single-strand overhang available for hybridization. Results were expressed as the relative hybridization signal normalized to the fluorescent signal of EtBr.

Real-time PCR analysis

Total RNA was isolated from 1×10^6 cells using RNeasy Mini Kit (Quiagen). An aliquot of 1 µg RNA was reverse transcribed using a reverse transcription kit (Promega). Real-time PCR was performed with QuantiTectTM SYBR-Green PCR Kit (Quiagen) on the LightcyclerTM system (Roche diagnostics). The expression level of Bax and Bcl-2 were normalized by 18S ribosomal RNA level of the same sample. Reaction mixtures contained 10 µl of 2× Quantitect SYBR-Green PCR Master Mix, 2 µl of reverse-transcriptase-generated cDNA in a final volume of 20 µl containing primers (Proligo, Paris, France) at 125 nM. The primer sequences for 18S ribosomal RNA gene were: 5'-CCCTCCAATGGATCCTCGTT-3' for the forward primer, and 5'-AGTGACGAAAAATAACAATACAGGAC-TCT-3' for the reverse primer. The primer sequences for Bax were: 5'-TTCCGAGTGGCAGCTGACAT-3' for the forward primer, and 5'-TTCCAGATGGTGAGTGAGGC-3' for the reverse primer. The primer sequences for Bcl-2 were: 5'-GGTGAACTGGGGGGGGGGGGGGGTTGT-3' for the forward primer, and 5'-CTTCAGAGACAGCCAGGAGAA-3' for the reverse primer. After an initial incubation step at 95°C for 8 min, 25–30 PCR cycles were performed. The cycling conditions consisted of a denaturation at 95°C for 10 s, annealing either at 60°C for 5 s for 18S and Bax, or at 58°C for Bcl-2 and extended at 72°C for 7 s. To confirm amplification specificity, the PCR products were subjected to a melting curve analysis. Relative gene expression was expressed as a ratio of the expression level of the gene of interest to that of 18S ribosomal RNA, with values in untreated A549 cells defined as 100%.

RESULTS

12459 induces delayed apoptosis mediated by the mitochondrial pathway

We have previously shown that the triazine derivative 12459 (Figure 1a) has a dose-dependent dual antiproliferative effect on the A549 human tumor cell line (17). Apoptosis occurred after short-term treatments with concentrations >4 μ M and a senescence-like delayed growth arrest was observed after longterm treatments with concentrations <1 μ M (17,18). A characteristic feature of the short-term effect of 12459 on A549 cells is a delayed action, since both antiproliferative effects and final morphological changes associated with apoptosis were observed at 48 h. As shown in Figure 1b, a significant decrease in A549 cell proliferation was observed at 48 h but not at 24 h in the presence of 10 µM 12459. In agreement, nuclear morphological changes characterizing apoptosis were detected after 48 h and reached 20% of the total cells at day 4 (Figure 1c). Therefore, 12459-induced apoptosis presents a significant and characteristic delay, as compared with other well known antitumor agents, such as camptothecin.

In order to further characterize the apoptotic response triggered by 12459, we have also used A549 cells with an acquired resistance to 12459. The resistant clones JFD18 and JFD9 were obtained after an EMS mutagenesis and a soft agar cloning in the presence of 10 μ M 12459 (25). In agreement with the delayed apoptotic response induced by 12459, differences in the cell viability characterizing the resistance of these clones were observed after a 48 h delay (Figure 1b).

JFD clones were also found to be resistant to 12459-induced apoptosis, as evaluated by Hoechst staining. Apoptotic nuclear bodies were observed in 5–8% of resistant JFD18 and JFD9 cells, as compared to 20% of sensitive A549 cells after 96 h of drug treatment with 10 μ M 12459 (Figure 1c), thus indicating a steep decrease in the final steps of the apoptotic pathway.

The resistance to 12459 might represent upstream processes such as accessibility to the ligand, modifications of the intracellular targets, or direct relationship to the final apoptotic pathway itself. We have previously shown that the expression of the multidrug resistant factors (MDR1, MRP1, MRP2, MRP3 and BCRP) was not modified in these resistant clones [(25) and data not shown]. Telomerase, which is thought to be one of the intracellular targets of this G-quadruplex ligand, was found to be overexpressed in JFD18 cells but remained at a normal level in JFD9 cells (25,26), suggesting that additional mechanisms might be involved in 12459 resistance.

We have examined here some of the characteristics of the apoptotic pathway induced by 12459. The expression of anti- or pro-apoptotic proteins belonging to the Bcl-2 family is known to determine events associated with the mitochondrial onset of apoptosis. Western blot analysis indicated a significant increase of Bax after 24 h of 12459 treatment (Figure 2b); and under the same conditions, a decrease of Bcl-2 was observed after 48 h of drug treatment (Figure 2a and b). Similar results were found at the transcriptional level by using quantitative RT–PCR analysis (Figure 2c and d). An alteration in the Bcl-2/Bax balance at both protein and mRNA levels was provoked by 12459, as previously reported for DNA damaging agents (29).

Western blot analysis indicated that Bax protein levels were unchanged in untreated JFD18 and JFD9 clones, as compared with A549 cells (Figure 2b). In addition, 12459-induced overexpression of Bax was not modified in these clones after 24 and 48 h of drug treatment. In contrast, the Bcl-2 protein level was increased in untreated JFD9 and JFD18 clones (Figure 2b). Furthermore, JFD18 and JFD9 cells maintained a high level of Bcl-2 under 12459 treatment. Quantitative RT–PCR analysis of the transcripts of these genes confirmed these findings at the transcriptional level (result not shown) and suggested that activation of Bcl-2 activation, and not of Bax, is associated with the resistance phenotype.

We also studied the time course of caspase-3 activation. Western blot analysis revealed a delayed and time-dependent appearance of the active proteolytic fragment of caspase-3, which was detected after 36 h of treatment with 12459 (Figure 3b, see also Figure 4c). In agreement, caspase degradation of the native 116 kDa PARP yielding a 89 kDa proteolytic fragment was evident after 36 h of treatment with 12459 (Figure 3a, see also Figure 4b). In contrast, the activation of caspase-8, which is involved in the death receptor pathway of apoptosis, was very low and remained at background levels under 12459 treatment (result not shown). In addition, 12459-induced apoptosis was inhibited in the presence of the DEVD-FMK caspase-3 inhibitor but not with the IETD-FMK caspase-8 inhibitor (Figure 3c), suggests that 12459 triggers



Figure 2. (a and b) Western blot analysis of Bcl-2 and Bax protein expression performed in A549, JFD18 or JFD9 control cells (0) or cells treated with 10 μ M 12459 for 24 or 48 h, as indicated. β -actin was used as a control for protein loading. (c and d) Analysis of Bcl-2 and Bax mRNA expression by quantitative RT–PCR in untreated A549 cells (0) and in A549 cells treated with 10 μ M 12459 for 24 or 48 h. Results (mean \pm SD of triplicates) were normalized relative to 18S ribosomal RNA level, and expressed relative to untreated A549 cells, defined as 100%, as described in Materials and Methods.

the apoptotic cascade essentially through the mitochondrial pathway.

PARP cleavage was also found to be significantly reduced in JFD resistant clones, as compared to sensitive A549 cells (Figure 3a). Taken together, these results indicate that the resistant phenotype of these clones is associated with a reduction of apoptosis.

We also observed a time-dependent decrease of the mitochondrial membrane potential to 75% of control after 12 h of treatment and to 28% of control after 6 h of treatment with 1 and 10 μ M 12459, respectively (Figure 3d). Interestingly and despite the delay of the final onset of the apoptotic cascade (>36 h), such an effect upon mitochondria reflects a rapid action of the compound that might be related to consequences of its action on cellular DNA. An increase in ROS was also induced by 12459 that was detectable after 4 h of treatment in A549 cells (Figure 3e). The maximal increase in ROS (100%) was observed after 8 h of treatment (Figure 3e).

Together, our results indicate that 12459 induces a delayed apoptosis (>36 h) mediated by caspase effectors after an early mitochondrial response and that the resistant phenotype of the JFD clones is associated with a reduction of apoptosis which involves an activation of Bcl-2.

Bcl-2 overexpression induces apoptotic resistance to 12459

To determine whether the Bcl-2 overexpression is directly related to the resistance phenotype, we transfected A549 cells with an expression vector containing Bcl-2 cDNA under the cytomegalovirus (CMV) promoter (pCDNA3Bcl-2). After 3 weeks of selection, a stable A549::Bcl-2 transfected cell line was established that presented a 10-fold overexpression of the Bcl-2 protein, as determined by western blot analysis (Figure 4a).

Cell viability experiments indicated a marked and delayed resistance of the transfected cell line to the effect of 12459. A resistance was observed after a 48-h drug treatment for 10 and 20 μ M 12459, and after 72 h for 5 μ M (Figure 4d). In addition, PARP cleavage was found to be significantly reduced in A549::Bcl-2 cells treated with 10 μ M 12459 since only a faint cleavage was detected after a 48-h treatment, as compared to A549 parental cells (Figure 4b). Similar results were found for caspase 3 cleavage (Figure 4c). These data indicate that the overexpression of Bcl-2 in A549 cells is sufficient to confer a resistance to the apoptotic effect of 12459. Therefore, overexpression of Bcl-2 in JFD clones is likely to represents a modification of the apoptotic pathway involved in the resistance to this ligand.

Bcl-2 overexpression is not sufficient to confer resistance to senescence induced by long-term treatment with 12459

Previous studies have indicated that G-quadruplex ligands can induce a senescence-like phenotype, in which cells arrest their growth and display important morphological modifications, associated with the expression of SA β -galactosidase activity (17,22,30). Such phenotype has been previously characterized during long-term treatment with low concentrations of 12459 and was associated with telomere shortening (17). Whether higher concentrations of 12459 and shorter exposures could induce senescence, also representing an alternative to the apoptotic death of the cells, has not been evaluated. We have therefore studied the appearance of these senescent cells in both A549 and A549::Bcl-2 cell lines for 12459 concentrations ranging from 0.1 to $10 \,\mu\text{M}$ and up to 7 days of drug treatment. SA β -galactosidase positive cells were observed after a four day delay, with 12459 concentrations as low as 0.3 µM in both A549 and Bcl-2 transfected cells (Figure 5a). However, the amount of SA β -galactosidase positive cells remained unchanged for A549 and A549::Bcl-2 cell lines and corresponded to a small percentage of the treated-cell population (in the range of only 3–5%). After 7 days of treatment up to 10 μ M, some SA β -galactosidase positive cells were still observed but represented a small proportion of the remaining cells, as compared to those undergoing apoptosis (Figure 5b). These results suggested that senescence induction is a minor



Figure 3. (a and b) Western blot analysis of PARP cleaved form (89 kDa) protein expression (a) or Caspase 3 cleaved form (17 kDa) protein expression (b) performed in untreated A549, JFD18 or JFD9 cells (0) and in cells treated with 10 μ M 12459 for 24 or 48 h. β -actin was used as a control for protein loading. Relative PARP cleavage (a) or Caspase 3 cleavage (b) was measured by densitometry scanning of the films, normalized relative to β -actin protein expression and results were expressed relative to untreated A549 cells defined as 100% for PARP or relative to A549 cells treated for 48 h with 12459 for caspase 3 (see bottom of each panel). (c) Effect of caspase inhibitors on apoptosis induced by 12459 (10 μ M, 48 h) on A549 cells. DEVD-FMK and IETD-FMK at 2 μ M were added to 12459 and apoptosis was revealed by Hoechst 33342 staining. (d) Mitochondrial membrane potential was measured by spectrofluorimetry of the JC1 dye in A549 control cells (0) or in cells treated with 10 μ M 12459 for 2, 4, 6, 8 and 14 h. Results represent the mean \pm SM of duplicate determinations.

event, as compared to the apoptosis induced by 12459 treatment at this concentration (10 μ M).

Despite the small amount of cells in which senescence was induced, a long-term administration of 12459 at a sub-apoptotic concentration is able to induce cumulative events able to impair cell growth. To determine whether Bcl-2 overexpression is able to protect from the long-term effect of 12459, we have used 0.5 μ M of the ligand,



Figure 4. (a) Western blot analysis of Bcl-2 protein expression performed in A549 parental cells and A549 cells transfected by Bcl-2 (A549::Bcl-2). β -Actin was used as a control for protein loading. (b and c) Western blot analysis of PARP cleaved form (89 kDa) protein expression (b) or Caspase 3 cleaved form (17 kDa) protein expression (c) performed in untreated A549 and A549::Bcl-2 cells (0) and in cells treated with 10 μ M 12459 for 24, 36 or 48 h. β -Actin was used as a control for protein loading. Relative PARP cleavage (b) or Caspase 3 cleavage (c) was measured by densitometry scanning of the films, normalized relative to β -actin protein expression. Results were expressed relative to untreated A549 cells defined as 100% for PARP, or relative to A549 cells treated for 48 h with 12459 for caspase 3 (see bottom of each panel). (d) Effect of 12459 (5, 10 and 20 μ M) on the growth of human A549 lung carcinoma parental cells (open circle), and transfected A549::Bcl-2 cells (closed triangle) for the indicated times. Mean \pm SD of three independent experiments.

a concentration able to induce senescence but unable to trigger apoptosis during short-term treatment of A549 and Bcl-2 transfected cells. In these conditions, A549 cells reached a growth plateau after 12 days and a complete growth arrest was observed after 20 days of treatment (Figure 6a). For A549::Bcl-2 cells, although a significant resistance was observed after 4 days, the complete growth arrest of the culture was also observed after 20 days of treatment. At this time, the proportion of SA β -galactosidase cells was also found to be identical in A549- and A549::Bcl-2-treated cells (Figure 6b).

These experiments indicate that Bcl-2 overexpression is not sufficient to confer resistance to long-term treatment with 12459.

12459 induces an alteration of the telomeric G-overhang

Recent studies with telomestatin indicated that the telomeric G-overhang represents one of the direct targets of this ligand.

We have determined here the effect of 12459 on the telomeric G-overhang from A549 and A549::Bcl-2 cell lines. Hybridization of a telomeric C-rich probe (21C) under nondenaturing conditions allowed the measurement of the single-stranded G-overhang signal in undigested genomic DNA samples (27). A quantification relative to the EtBr staining of total genomic DNA indicated that the G-overhang hybridization signal was similar in A549 and Bcl-2 transfected cells (Figure 7a and b). Treatment of A549 cells with 10 μ M 12459 induced a decrease of the overhang signal to 50-55% of the control after 72 h (Figure 7a and b). An identical result was found in A549::Bcl-2 cells (Figure 7a and b), suggesting that the Bcl-2 overexpression has no influence on the action of 12459 at the telomeric ends. Interestingly, we noticed that 12459 had a very rapid effect on the telomeric overhangs of A549 cells since the decrease was detectable within 24 h of drug treatment.

Previous studies with telomestatin have shown that such a rapid decrease was on account of a tight binding of the


Day 7 12459 10 µM

Figure 5. SA β -galactosidase activity in untreated A549 or A549::Bcl-2 cells (control) or in cells treated with 12459 for 4 days (0.3 μ M, panel **a**) or for 7 days (10 μ M, panel **b**). Observed by phase contrast microscopy, the cells with 4 days' treatment show the appearance of senescent β -galactosidase positive cells, while 7 days' treatment induces the appearance of round apoptotic cells.

ligand to the telomeric overhangs, which is mediated by a G-quadruplex stabilization that further impairs the hybridization reaction (27). In order to distinguish between a degradation and a binding of 12459 to the telomeric overhangs, we have examined the in vitro effect of 12459 on the hybridization of the 21C probe to the telomeric overhangs from purified genomic DNA. Adding to the hybridization reaction an overnight incubation of up to 10 µM 12459 did not significantly inhibit the G-overhang signal (Figure 7d). A further increase of the 12459 concentration to 100 µM resulted in a complete inhibition of the probe hybridization to the telomeric overhangs (Figure 7d and e). Competition experiments with a *c-myc* promoter quadruplex (Pu22myc) that is efficiently stabilized by 12459 were used to investigate the mechanism of such hybridization inhibition (31). The addition of Pu22myc oligonucleotide to the reaction reversed most of the 12459induced inhibition (Figure 7d and e). This suggested that 12459 is able to inhibit the hybridization reaction through the formation of G-quadruplexes at telomeric overhangsas previously reported for telomestatin (27)-but at a higher concentration. Such differences between these two ligands could be explained, in part, by their potency to stabilize telomeric quadruplexes. FRET experiments showed that ΔTm is only 8°C for 12459 and >20°C for telomestatin (17,27).



Figure 6. (a) Long-term proliferation curve of A549 or A549::Bcl-2 cells in the absence (open and closed circles, respectively) or presence of 12459 (0.5 μ M) (open and closed triangles, respectively). A cell growth plateau appears at day 8 and cells enter senescence at day 20 for both 12459-treated cell lines at a population doubling equal to 5. (b) Expression of SA β -galactosidase activity in untreated A549 or A549::Bcl-2 cells (A549, A549Bcl-2) or in cells treated with 0.5 μ M 12459 (+ 12459) for 20 days.

The hybridization reaction of 21C to the telomeric overhang, in the presence of ligands, corresponded to a competition between 21C and ligands for the telomeric overhang. The resultant products of the reaction reflected the ability of 21C to destabilize telomeric G-quadruplexes as well as to form a duplex. In the absence of ligands, such equilibrium was in favour of the duplex formation as previously reported for oligonucleotides (32). Our result suggests that 12459 induces much less stable G-quadruplexes than telomestatin at telomeres.

In the presence of 10 μ M Pu22myc competitor, the hybridization reaction on DNA samples from 12459-treated A549 cells did not display a reversion of the G-overhang signal decrease (Figure 7c). Therefore, we conclude that the G-overhang signal loss in 12459-treated A549 cells corresponds to an effective degradation of the telomeric G-overhang.

Interestingly, the G-overhang degradation seems to correlate with the appearance of the apoptosis in A549 and is also observed in Bcl-2 transfected cells. This would suggest that



Figure 7. (a) Non-denaturing solution hybridization analysis of the 3' telomeric overhang in A549 or A549::Bcl-2 control cells (C) or in cells treated with 10 μ M 12459 for 24, 48 or 72 h, as indicated. G-strand hybridization signal of the gel with 21C telomeric probe and EtBr staining of the gel. (b) Quantification of the 12459 effect. G-overhang hybridization signal is normalized relative to the EtBr signal. The results are expressed relative to untreated A549 DNA (defined as 100%) and corresponded to mean ± SD of triplicate independent experiments including data presented in panel a (c) Non-denaturing solution hybridization analysis of the 3' telomeric overhang in A549 control cells (0) or cells treated with 10 μ M 12459 for the indicated time, in the absence (0) or in the presence of 10 μ M Pu22myc quadruplex competitor (10). The addition of Pu22myc does not inhibit the 12459-induced decrease of the G-strand signal at 72 h (compare with panel a). (d) Non-denaturing solution hybridization analysis of the telomeric G-overhang from purified A549 DNA treated with different concentrations of 12459 (100, 10, 3, 1 μ M) in the presence or the absence of 10 μ M Pu22myc quadruplex competitor, as indicated at the top of the panel. (e) Quantification of the effect of 12459 *in vitro*. G-overhang hybridization signal is normalized relative to the EtBr signal. The results are expressed relative to untreated A549 DNA (defined as 100%) and corresponded to mean ± SD of three independent experiments, including data presented in panel d.

the G-overhang degradation is an early event uncoupled from the apoptotic processes. However, that apoptosis could trigger the degradation of the telomeric ends through the liberation of nucleases during the final stages of nuclear fragmentation cannot be excluded. We, therefore, used camptothecin to induce apoptosis in A549 cells in order to examine the status of the telomeric G-overhang. Treatment of A549 cells for 24 h with up to 5 μ M camptothecin induced a significant apoptotic process with caspase activation, chromatin condensation and formation of nuclear bodies (Figure 8c) but did not generate any significant decrease of the telomeric G-overhang signal (Figure 8a and b). This result suggests that the G-overhang degradation is a process selectively induced by 12459 at telomeric ends that is not observed during the apoptotic response to camptothecin.

DISCUSSION

The induction of replicative senescence has been described as one of the characteristics of G-quadruplex ligands. It is now well established that different series of G-quadruplex ligands, including 12459, telomestatin, BRACO-19 and RHSP4 induce



A549 + CPT 5µM

Figure 8. (a) Non-denaturing solution hybridization analysis of the 3' telomeric overhang in untreated A549 cells untreated (0) or in cells treated with 0.2, 0.5, 1 or 5 μ M camptothecin (CPT) for 48 h (duplicate loading of a representative experiment). G-strand, hybridization signal of the gel with 21C telomeric probe and EtBr staining of the gel. (b) Quantification of the CPT effect. G-overhang hybridization signal is normalized relative to the EtBr signal. The results are expressed relative to untreated A549 DNA (defined as 100%) and corresponded to the mean ± SD of two independent experiments in duplicate. (c) Apoptosis induction by CPT (5 μ M) in A549 cells after 48 h of treatment (A459 + CPT 5 μ M). Cells were fixed and stained with DAPI and examined for nuclei microscope (Zeiss) equipped with a 40× objective.

the appearance of positive β -galactosidase cells and telomere shortening after a long-term treatment of a range of tumor cell lines (19,21–24,30,33,34). We also show here that 12459 induces the appearance of senescent cells after short-term treatment, in agreement with previous findings with RHSP4 and BRACO-19 (22,30). However, these senescent cells represent only a small percentage of the cell population. This suggests that senescence induction is not the major mechanism responsible for the short-term biological effect of these ligands.

Besides senescence, apoptosis was also observed after treatment with these G-quadruplex ligands. A characteristic feature of this apoptosis is its delayed appearance varying as a function of the ligand and the cell line used. Recent studies with RHSP4, telomestatin and 307A showed that apoptosis occurred after a 5-12 day delay (22,33-35). Although not formally shown, the in vivo antitumor effect of BRACO-19 against UXF1138L xenograft is compatible with a rapid apoptotic tumor kill response (36). We demonstrate here that 12459 induces apoptosis after a 48-h delay for high drug concentrations (>5 μ M). The apoptotic pathway generated by 12459 is characterized by a dysfunction of the Bcl-2/Bax balance, caspase 3 and PARP cleavage, suggesting that this ligand triggers the mitochondrial apoptotic pathway. We also show here that for short-term treatment, apoptosis predominates over the appearance of senescent cells, this result represents the most striking difference from other G-quadruplex ligands described, which needed a longer delay to achieve massive apoptosis(22,33–35).

Previous findings indicated that JFD clones resistant to the apoptotic effect of 12459 displayed telomere capping alterations (25). We show here that these clones present an overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-2. In addition, A549 cells transfected with Bcl-2 show a resistance to the apoptotic action of 12459. This correlates with a delayed activation of the mitochondrial apoptotic cascade (PARP and Caspase 3 cleavage), indicating that Bcl-2 is one of the determinants of the apoptotic resistance to this ligand.

Interestingly, we demonstrate that Bcl-2 overexpression is not sufficient to confer resistance to the long-term effect of 12459. The Bcl-2-transfected A549 cell line entered into a senescent growth arrest in a similar manner to parental A549 cells. These data suggest that senescence, which is not predominant for 12459 short-term treatment, becomes a critical determinant for responses to a prolonged treatment with this ligand, as previously reported, under treatment with other anticancer therapies (37). Thus, we also conclude that G-quadruplex ligand-directed senescence is uncoupled from apoptosis.

However, since Bcl-2 is a downstream mitochondrial effector, and because of the rapid onset of apoptosis by this 12459, the relationship between the short-term effect of this ligand and its molecular action against telomeres becomes questionable.

It has been hypothesized that the induction of a quadruplex structure at the end of the telomeric G-overhang results in telomere uncapping (6). End-to-end chromosomal fusions or anaphases bridges, consistent with this hypothesis, have been reported for G-quadruplex ligands (22,30,35). A recent report from our group also indicated that telomestatin directly interacts with the telomeric G-overhang from A549 cells and induced its degradation concomitantly with the delayed loss of cell viability (27). We have shown here that 12459 presents a major difference with telomestatin as it induced a rapid degradation of the telomeric G-overhang that paralleled the induction of apoptosis in A549 cells.

Since the telomeric G-overhang degradation paralleled the apoptotic response of A549 cells to 12459, such a degradation might reflect a telomeric damage response to 12459 associated with the final growth arrest of the cells. On the other hand, the G-overhang degradation could be a consequence of the nuclease release from apoptotic cells. Our results present two pieces of evidence that the G-overhang degradation rather reflects a specific telomeric response to 12459. First, the over-expression of Bcl-2 that counteracts the apoptosis induced by 12459 is not able to modify the G-overhang degradation mediated by 12459. Second, the antitumor agent camptothecin is not able to trigger the G-overhang degradation in conditions that induce a massive apoptosis.

Interestingly, the G-overhang degradation was detected within 24 h of treatment, suggesting that this response to the ligand precedes the onset of the final apoptotic cascade. However, 12459 is able to trigger other rapid cellular events, such as a decrease of the mitochondrial membrane potential and an increase of ROS within few hours. Preliminary studies also indicate that 12459 treatment triggers a p53 response detectable in <6 h (C. Douarre, unpublished results). Whether these events are associated with the loss of the telomeric overhang remains to be determined. Although the combined effect of ROS and 12459 involved in the G-overhang loss could not be excluded, the effects of ROS alone are unlikely to explain it since campthothecin, a known activator of ROS (38), does not alter the G-overhang. Future work will aim at determining the importance of this early cellular response in triggering events involved in the G-overhang degradation.

Finally, G-overhang degradation under the 12459 treatment would reflect the uncapping of the telomeric ends and represent the alteration of the binding of specific telomeric factors or effectors of the G-overhang during the replication. It is noteworthy that dominant negative TRF2 mimics the effect of a G-quadruplex ligand; and since TRF2 is involved in the formation of the T-loop, it is possible that 12459 alters such a telomeric structure or impairs the transitions between linear and T-loop states mediated by telomeric proteins (9).

In conclusion, our results demonstrate that the G-quadruplex ligand 12459 induces a delayed apoptosis involving the mitochondrial pathway and that this ligand is effective in the long-term independent of the Bcl-2 status of the cells. Its biological effect is associated with a specific degradation of the telomeric overhang. This finding supports the notion that alteration of telomeric ends is one of the main consequences of the intracellular action of G-quadruplex ligands.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank J.L. Mergny and E. Segal for helpful discussion, T. Wenner and C. Morrison for critical reading of the manuscript. The pcDNA3Bcl-2 vector is a kind gift from L. Debussche and M.N. Mary (Sanofi-Aventis, Vitry-sur-Seine, France). This work was supported by the 'Ligue Nationale contre le Cancer, Comités de la Marne et de la Haute Marne' and by the 'Association pour la Recherche contre le Cancer', grant no. 3644. C.D. is supported by a student fellowship from 'l'Association Régionale pour l'Enseignement et la Recherche Scientifique et technologique ARERS and by the 'Ligue contre le Cancer, Comité de l'Aisne'. Funding to pay

the Open Access publication charges for this article was provided by the University of Reims.

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- 1. Blackburn,E.H. (2001) Switching and signaling at the telomere. *Cell*, **106**, 661–673.
- McEachern, M.J., Krauskopf, A. and Blackburn, E.H. (2000) Telomeres and their control. *Annu. Rev. Genet.*, 34, 331–358.
- Shay, J.W. and Wright, W.E. (2002) Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 2, 257–265.
- Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W. and Weinberg, R.A. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400, 464–468.
- Lavelle, F., Riou, J.F., Laoui, A. and Mailliet, P. (2000) Telomerase: a therapeutic target for the third millennium? *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 34, 111–126.
- Neidle,S. and Parkinson,G. (2002) Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. *Nature Rev. Drug Discov.*, 1, 383–393.
- Makarov,V.L., Hirose,Y. and Langmore,J.P. (1997) Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell*, 88, 657–666.
- Wright, W.E., Tesmer, V.M., Huffman, K.E., Levene, S.D. and Shay, J.W. (1997) Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev.*, **11**, 2801–2809.
- 9. Smogorzewska, A. and de Lange, T. (2004) Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **73**, 177–208.
- Griffith,J.D., Comeau,L., Rosenfield,S., Stansel,R.M., Bianchi,A., Moss,H. and de Lange,T. (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, **97**, 503–514.
- Blackburn, E.H., Chan, S., Chang, J., Fulton, T.B., Krauskopf, A., McEachern, M., Prescott, J., Roy, J., Smith, C. and Wang, H. (2000) Molecular manifestations and molecular determinants of telomere capping. *Cold Spring Harb. Symp. Quant Biol.*, 65, 253–263.
- Li,G.Z., Eller,M.S., Firoozabadi,R. and Gilchrest,B.A. (2003) Evidence that exposure of the telomere 3' overhang sequence induces senescence. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 527–531.
- Duan, W., Rangan, A., Vankayalapati, H., Kim, M.Y., Zeng, Q., Sun, D., Han, H., Fedoroff, O.Y., Nishioka, D., Rha, S.Y. *et al.* (2001) Design and synthesis of fluoroquinophenoxazines that interact with human telomeric G-quadruplexes and their biological effects. *Mol. Cancer Ther.*, 1, 103–120.
- 14. Karlseder, J., Smogorzewska, A. and de Lange, T. (2002) Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science*, **295**, 2446–2449.
- Davies, J.T. (2004) G-quartet 40 years later: from 5'-GMP to molecular biology and supramolecular chemistry. *Angew. Chem. Int. Edit.*, 43, 668–698.
- 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.
- 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.
- Gomez, D., Aouali, N., Renaud, A., Douarre, C., Shin-Ya, K., Tazi, J., Martinez, S., Trentesaux, C., Morjani, H. and Riou, J.F. (2003) Resistance to senescence induction and telomere shortening by a G-quadruplex ligand inhibitor of telomerase. *Cancer Res.*, 63, 6149–6153.
- 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-quadruplex structures. *Cancer Res.*, 63, 3247–3256.
- Nakajima,A., Tauchi,T., Sashida,G., Sumi,M., Abe,K., Yamamoto,K., Ohyashiki,J.H. and Ohyashiki,K. (2003) Telomerase inhibition enhances apoptosis in human acute leukemia cells: possibility of antitelomerase therapy. *Leukemia*, 17, 560–567.
- Gowan,S.M., Heald,R., Stevens,M.F. and Kelland,L.R. (2001) Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes. *Mol. Pharmacol.*, 60, 981–988.

- Leonetti, C., Amodei, S., D'Angelo, C., Rizzo, A., Benassi, B., Antonelli, A., Elli, R., Stevens, M., D'Incalci, M., Zupi, G. *et al.* (2004) Biological activity of the G-quadruplex ligand RHPS4 is associated with telomere capping alteration. *Mol. Pharmacol.* 8, 1063–1074.
- Incles, C.M., Schultes, C.M., Kelland, L.R. and Neidle, S. (2003) Acquired cellular resistance to flavopiridol in a human colon carcinoma cell line involves up-regulation of the telomerase catalytic subunit and telomere elongation. Sensitivity of resistant cells to combination treatment with a telomerase inhibitor. *Mol. Pharmacol.*, 64, 1101–1108.
- 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.
- 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.
- Gomez, D., Lemarteleur, T., Lacroix, L., Mailliet, P., Mergny, J.L. and Riou, J.F. (2004) Telomerase downregulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing. *Nucleic Acids Res.*, 32, 371–379.
- Gomez, D., Paterski, R., Lemarteleur, T., Shin-Ya, K., Mergny, J.L. and Riou, J.F. (2004) Interaction of telomestatin with the telomeric single-strand overhang. J. Biol. Chem., 279, 41487–41494.
- Dimri,G.P., Lee,X., Basile,G., Acosta,M., Scott,G., Roskelley,C., Medrano,E.E., Linskens,M., Rubelj,I., Pereira-Smith,O. *et al.* (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo. Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 9363–9367.
- Leung,L.K. and Wang,T.T. (1999) Differential effects of chemotherapeutic agents on the Bcl-2/Bax apoptosis pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Breast Cancer Res. Treat.*, 55, 73–83.

- Incles, C.M., Schultes, C.M., Kempski, H., Koehler, H., Kelland, L.R. and Neidle, S. (2004) A G-quadruplex telomere targeting agent produces p16-associated senescence and chromosomal fusions in human prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.*, 3, 1201–1206.
- Lemarteleur, T., Gomez, D., Paterski, R., Mandine, E., Mailliet, P. and Riou, J.F. (2004) Stabilization of the c-myc gene promoter quadruplex by specific ligands inhibitors of telomerase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323, 802–808.
- 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.
- Shammas, M.A., Reis, R.J., Li, C., Koley, H., Hurley, L.H., Anderson, K.C. and Munshi, N.C. (2004) Telomerase inhibition and cell growth arrest after telomestatin treatment in multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.*, 10, 770–776.
- Tauchi, T., Shin-Ya, K., Sashida, G., Sumi, M., Nakajima, A., Shimamoto, T., Ohyashiki, J.H. and Ohyashiki, K. (2003) 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, 5338–5347.
- 35. Pennarun,G., Granotier,C., Gauthier,L.R., Gomez,D., Hoffschir,F., Mandine,E., Riou,J.F., Mergny,J.L., Mailliet,P. and Boussin,F.D. (2005) Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands. *Oncogene*, doi:10.1038/sj.onc.1208468.
- Burger,A.M., Dai,F., Schultes,C.M., Reszka,A.P., Moore,M.J., Double,J.A. and Neidle,S. (2005) The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function. *Cancer Res.*, 65, 1489–1496.
- Roninson, I.B. (2003) Tumor cell senescence in cancer treatment. Cancer Res., 63, 2705–2715.
- Palissot, V., Morjani, H., Belloc, F., Cotteret, S., Dufer, J. and Berchem, G. (2005) From molecular characteristics to cellular events in apoptosis-resistant HL-60 cells. *Int. J. Oncol.*, 26, 825–834.

Résultats

Le 12459 induit une apoptose retardée médiée par la voie mitochondriale :

Les résultats obtenus montrent que le dérivé triazine induit dans la lignée A549, une apoptose retardée qui passe par la voie mitochondriale. En effet, le traitement par 10 μ M de 12459 déclenche l'augmentation de la protéine pro-apoptotiques Bax et une diminution de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dès 24 heures de traitement. Ces résultats s'observent égalemment au niveau transcriptionnel. Puis, plus tardivement, s'opère le clivage de la procaspase 3 et de son substrat effecteur de l'apoptose, PARP à 36 heures de traitement Ainsi le traitement par 10 μ M de 12459 induit un déséquilibre de la balance Bax/Bcl-2 impliquée dans l'induction de l'apoptose provoquée par la voie mitochondriale. L'apoptose induite par le 12459 est inhibée en présence du DEVD-FMK (inhibiteur de caspase 3) et ne l'est pas avec le IETD-FMK (inhibiteur de caspase 8), ce qui exclut l'activation de ce processus via les récepteurs de mort et confirme l'activation par la voie mitochondriale. Néanmoins ce processus apoptotique apparaît tardivement, vers 48 heures de traitement, alors que dès 4 à 6 heures de traitement, on observe une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui s'accompagne d'une chute du potentiel membranaire mitochondrial.

Ainsi ces résultats indiquent que le 12459 induit une apoptose retardée, générée par des caspases effectrices après une activation précoce des mitochondries.

La surexpression de Bcl-2 induit une résistance à l'apoptose induite par le 12459.

D'autre part, les clones résistants JFD 9 et JFD 18, sélectionnés par notre groupe (Gomez et al., 2003), montrent une résistance à l'apoptose qui se traduit par une apparition plus tardive et une diminution du nombre de cellules apoptotiques comparées aux cellules de la lignée parentale. Au niveau moléculaire, l'expression de Bax est identique à celle de la lignée A549 sensible, alors qu'une forte expression de la protéine Bcl-2 est observée. Ces résultats, confirmés par PCR en temps réel, suggèrent que l'activation de Bcl-2, et non de Bax, est associée au phénotype de résistance et pourrait être responsable de la résistance à l'apoptose de ces clones.

Pour déterminer si la surexpression de Bcl-2 est liée au phénotype de résistance, la lignée parentale A549 a été transfectée par un vecteur contenant l'ADNc de Bcl-2. A partir de 48h de traitement à des concentrations de 10 et 20 μ M, on observe dans ces cellules transfectées A549::Bcl-2, une résistance au niveau de la viabilité cellulaire et d'apparition de

l'apoptose par rapport à la lignée A549. De plus, le clivage de la procaspase 3 et de PARP est très réduit dans la lignée transfectée par rapport à la lignée A549. Ceci permet de conclure que la surexpression de Bcl-2 est suffisante pour conférer une résistance au traitement par le 12459.

La surexpression de Bcl-2 n'est pas suffisante pour conférer une résistance à la sénescence induite par un traitement long terme e au 12459

Dans l'optique de vérifier si la surexpresion de Bcl-2 est capable de protéger des effets à long terme du 12459, les cellules A549 et A549::Bcl-2 ont été traitées par $0,5\mu$ M de 12459, concentration subapoptotique induisant une sénescence à long terme, sans induction d'apoptose à court terme. Dans ces conditions les cellules A549 atteignent un plateau de croissance après 12 jours de traitement et un arrêt complet de la croissance après 20 jours de traitement. Bien que les lignées A549::Bcl-2 montrent une résistance significative après 4 jours, l'arrêt total de croissance est observé a 20 jours de traitement comme la lignée A549. A 20 jours de traitement, la proportion de cellules positive à la SA β -galactosidase est identique dans les lignées A549 et A549::Bcl-2. Ainsi ces résultats indiquent que **la surexpression de Bcl-2 n'est pas suffisante pour conférer une résistance à un traitement long terme au 12459.**

Le 12459 induit une dégradation du simple brin télomérique.

Il n'est pas exclu que l'apoptose observée après le traitement des cellules par le 12459 puisse être la conséquence d'un raccourcissement des extrémités télomériques, comme cela a été démontré avec la télomestatine, un autre ligand des G-quadruplexes (Gomez et al., 2004). Pour vérifier cette hypothèse, l'effet du 12459 sur le brin G télomérique des lignées A549 et A549::Bcl-2 a été étudié en mesurant leur longueur par la technique d'hybridation en condition non dénaturante des échantillons d'ADN génomique avec une séquence complémentaire au motif TTAGGG, radiomarquée au ³²P. Les signaux d'hybridation obtenus sont similaires pour la lignée parentale et transfectée par Bcl-2. Après traitement par 10 μ M de 12459, une diminution du signal d'hybridation est détectable à partir de 24h et atteint 50-55% de la valeur du contrôle après 72 h. Des expériences analogues mais en présence du compétiteur Pu22myc, séquence oligonucléotidique formant un G-quadruplexe, ont permis d'affirmer que la diminution du signal résultait d'une érosion du brin G télomérique et non d'une inhibition de la réaction d'hybridation par une fixation du 12459 sur le brin G, comme

c'est le cas pour la télomestatine. En conclusion, le 12459 induit une dégradation précoce (dès 24 h) du simple brin télomérique et la surexpression de Bcl-2 n'a pas d'influence sur ce processus, ce qui suggère que la dégradation du simple brin précède l'induction de l'apoptose et pourrait ainsi l'expliquer.

Par ailleurs, la campthotécine (un inhibiteur spécifique de la topoisomérase I) ne provoque pas de dégradation du simple brin télomérique à des concentrations induisant une forte réponse apoptotique. Ces résultats indiquent **que la dégradation du simple brin est un processus spécifique de la réponse au 12459 non lié aux processus endo-nucléolytiques générés au cours de l'apoptose**

Discussion et Conclusion

L'induction de la sénescence réplicative est une des conséquences du traitement par les ligands de l'ADN G-quadruplexe, comme le Braco-19, la télomestatine, le RHPS4 et le 12459. En effet, à long terme, ils induisent le raccourcissement des télomères et l'apparition de cellules exprimant la SA- β galactosidase sur une grande variété de lignées cellulaires tumorales (Gowan *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Incles *et al.*, 2004; Shammas *et al.*, 2004; Sumi *et al.*, 2004) (Riou *et al.*, 2002).

Dans cette étude, nous avons montré que le 12459 induit après un traitement à court terme la **sénescence**, ces résultats sont en accord avec les études réalisées sur d'autres lignées cellulaires avec les ligands RHPS4 et BRACO-19 (Incles *et al.*, 2004; Leonetti *et al.*, 2004). Toutefois ces cellules en sénescence ne représentent qu'un faible pourcentage de la population cellulaire (3-5%), suggérant que l'induction de la sénescence n'est pas le principal mécanisme responsable de l'effet biologique à court terme induit par ces ligands. Dans la lignée A549, le traitement par de fortes concentrations en 12459 (> 5 μ M) induit une apoptose qui apparaît après un délai de 36 heures. Cette apoptose observée à court terme prédomine par rapport à l'induction de la sénescence. Le délai nécessaire à l'induction d'apoptose est relativement moins important que celui nécessaire aux autres ligands de l'ADN G-quadruplexe pour induire une apoptose massive. En effet, le traitement par ces ligands induit également une **apoptose retardée**, après un délai de 5 à 12 jours qui est fonction du ligand et de la lignée cellulaire utilisée (Tauchi *et al.*, 2003; Leonetti *et al.*, 2004; Shammas *et al.*, 2004; Pennarun *et al.*, 2005). Sur ces cellules le processus apototique a pour origine un déséquilibre de la balance pro/anti apoptotique Bax/Bcl-2 qui implique le clivage de la pro-

caspase 3 et de son substrat PARP dès 36 heures de traitement. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la caspase 3 et de la caspase 8 indique que l'apoptose induite par le 12459 implique la voie mitochondriale et non celle des récepteurs de mort cellulaire. Ces résultats semblables à ceux obtenus ligand DODC sont avec le (3,3'diethyloxadicarbocyanine Iodide) décrit comme un inducteur de l'apoptose provoquée par la voie mitochondriale (Li et al., 2004).

Par ailleurs, les clones JFD18 et JFD9 préalablement sélectionnés dans le laboratoire pour leur résistance à l'apoptose induite par le 12459, ont été décrits comme présentant une altération de la protection des télomères. L'étude de ces deux clones montre une surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 qui est maintenue après traitement par le 12459. De plus, la transfection de la lignée parentale A549 par pcDNA₃ :Bcl-2 permet la surexpression de la protéine Bcl-2 et l'induction d'une résistance à l'apoptose induite par le 12459. Cette résistance se traduit par un délai dans l'induction du clivage de la procaspase 3 et de PARP par le 12459, ce qui met en évidence un rôle clé de la protéine Bcl-2 dans la résistance à l'apoptose induite par le 12459. La surexpression d'hTERT, et, par conséquent, l'augmentation de la taille ses télomères est une des explications de la résistance de ce clone JFD18 (Gomez *et al.*, 2003). La surexpression de Bcl-2 dans ce clone est un deuxième élément en faveur de cette résistance. En revanche, pour le clone JFD9, qui ne présente pas d'augmentation du transcrit hTERT mais une modification de la taille des télomères, la surexpression de Bcl-2 dans ce clone pourrait aussi expliquer cette résistance.

En revanche, la surexpression de Bcl-2 n'est pas suffisante pour conférer une résistance à la sénescence observée à long terme en présence de faibles concentrations de 12459. En effet, la lignée A549 et la lignée A549 surexprimant Bcl-2 ne montrent aucune différence sur l'entrée en sénescence des cellules. Ces observations suggèrent que le processus apoptotique n'est pas couplé à l'induction de la sénescence. Toutefois, des données de la littérature précisent que l'expression de Bcl-2 a été retrouvée dans les cellules en sénescence (Wang, 1995), et pendant l'induction de la sénescence par un stress oxydatif (Bladier *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2000). De même il a été montré que l'expression constitutive de Bcl-2 accélère l'induction de la sénescence (Crescenzi *et al.*, 2003; Tombor *et al.*, 2003).

Le clone JFA2 sélectionné dans le laboratoire présente une surexpression du transcrit hTERT, une augmentation de l'activité télomérase et de la taille des télomères (Gomez *et al.*, 2003). Ce clone est résistant à la sénescence induite par un traitement long terme au 12459 et

à l'apotose induite à court terme. Il est intéressant de noter que ce clone présente une surexpression de Bcl-2.

Nous avons également montré que le 12459 permet une **dégradation rapide du simple brin télomérique** qui est concomitante à l'induction de l'apoptose. Cette dégradation télomérique pourrait être reconnue comme un signal de dommage à l'ADN à l'origine de l'arrêt de la croissance cellulaire. Toutefois, il n'est pas exclu que les nucléases libérées au cours de la réponse apoptotique puissent être responsables de cette dégradation. Cette hypothèse a pu être exclue par l'étude des cellules surexprimant Bcl-2, (ou l'apoptose est inhibée), et où le 12459 déclenche un profil de dégradation du simple brin télomérique similaire à celui des cellules parentales A549 traitées. L'apoptose massive induite par la camptothécine, un agent anticancéreux ne s'accompagne pas d'une érosion du simple brin télomérique. Par ailleurs pour le 12459, la dégradation du simple brin télomérique est détectée dès 24 heures, ce qui suggère que la réponse au ligand précède la phase terminale effectrice de l'apoptose. L'ensemble de ces résultats exclut l'implication de nucléases libérées au cours de l'apoptose dans le processus de dégradation du simple brin télomérique.

Toutefois, dès les premières heures de traitement, le 12459 induit également des évènements cellulaires précoces caractérisés par un effondrement du potentiel membranaire mitochondrial et une libération des espèces réactives de l'oxygène. Or, les ROS, à eux seuls ne peuvent être responsables de la dégradation du simple brin télomérique, puisque les traitements par la camptothécine, puissant inducteur d'apoptose médiée par la voie mitochondriale et connu pour produire des ROS n'induit pas la dégradation du simple brin télomérique. De plus, il est admis dans la littérature que la surexpression de Bcl-2 bloque l'apoptose en agissant sur la mitochondrie, ce qui empêche la chute du potentiel membranaire mitochondrial, la génération des ROS et la libération du cytochrome c et de la protéine AIF (Chakraborti et al., 1999; Gupta et al., 2003). Bcl-2 a aussi été décrite comme une protéine antioxydante capable de protéger de la génération des ROS en augmentant les défenses antioxydantes et les dommages oxydatifs (Howard et al., 2002). De cette façon la surexpression de Bcl-2 dans les cellules A549 protègerait des effets des ROS et inhiberait leur libération. Etant donné que le traitement par le 12459 des cellules surexprimant Bcl-2 permet une dégradation du simple brin télomérique identique à celle des cellules parentales A549, on pourrait admettre que les ROS libérés suite au traitement ne participent pas à la dégradation du simple brin télomérique. En revanche, il serait intéressant de confirmer l'absence de leur libération dans ces cellules après traitement par le 12459.

PARTIE 2

Etude des voies de dommages à l'ADN induites par le 12459 au cours de la sénescence et de l'apoptose

Introduction

Les télomères protègent les extrémités naturelles des chromosomes d'être reconnus comme des cassures double brin. Le raccourcissement télomérique où la perte de protéines de protection du télomère telles que TRF2, Tin2, et hPOT1 active une réponse de type dommage à l'ADN médiée par la kinase ATM. Cette réponse est caractérisée par la formation de TIFs (telomere–induced foci) incluant les facteurs 53BP1, γH2AX, Rad17, p-ATM (d'Adda di Fagagna *et al.*, 2003; Takai *et al.*, 2003). Cette réponse de dommages à l'ADN est associée à une érosion télomérique et à une dégradation du simple brin télomérique.

Comme nous l'avons vu précédemment, le traitement des cellules A549 par le 12459 induit selon la concentration et le temps d'exposition, la sénescence ou l'apoptose, associée à un raccourcissement du télomère. Dans les conditions de traitement qui déclenchent l'apoptose, le raccourcissement du simple brin télomérique s'opère dès 24 heures et n'est pas la conséquence de l'entrée des cellules en apoptose. La dégradation du simple brin télomérique dûe aux traitements par le 12459 pourrait induire la déprotection du télomère et une altération de la fixation de facteurs télomériques.

En effet, puisque l'introduction d'un dominant négatif de TRF2 induit le même effet que la télomestatine, à savoir un raccourcissement télomérique et la formation de fusions télomériques, et, dans la mesure où TRF2 est impliquée dans la formation de la T-loop, il serait possible que le 12459 puisse altérer une telle stucture (van Steensel *et al.*, 1998; Tauchi *et al.*, 2003; Smogorzewska *et al.*, 2004). De même, la télomestatine et le dominant négatif de TRF2 induisent l'activation de la kinase de reconnaissance de dommage à l'ADN ATM (Karlseder *et al.*, 1999; Tauchi *et al.*, 2003). Ainsi, la dégradation télomèrique induite par le 12459 pourrait être identifiée par la cellule comme un signal de dommage de l'ADN où le télomère ne serait plus protégé par le complexe des protéines télomériques et serait reconnu comme une cassure double brin., comme c'est le cas pour la télomestatine

Pour répondre à cette question, nous nous sommes intéressé dans un premier temps à mettre en évidence la formation de foci γ H2AX, décrits comme marqueurs précoces de cassures doubles brin au niveau de l'ADN et impliqués dans l'initiation et le déclenchement des voies de dommages à l'ADN. La détection de foci γ H2AX a été réalisée dans les cellules traitées par le 12459 dans les conditions induisant l'apoptose ou la sénescence.

A. Détection des foyers γ H2AX au niveau de l'ADN de cellules traitées par différentes concentrations de 12459 induisant la sénescence ou l'apoptose.

Afin de vérifier la présence de foci γ H2AX au niveau de l'ADN de cellules traitées par des concentrations en 12459 déclenchant la sénescence, les cellules A549 ont été traitées par 0,5 μ M, 1 μ M ou 5 μ M de 12459 pendant quatre jours, fixées puis incubées avec un anticorps reconnaissant la forme phosphorylée de l'histone H2AX sur la sérine 139. Parallèlement, la doxorubicine a été utilisée comme témoin positif de formation de foci γ H2AX. En effet, la doxorubicine, un agent anticancéreux intercalant de l'ADN appartenant à la famille des anthracyclines agit en se liant à la topoisomérase II pour former un complexe ADN-topoisomérase II- doxorubicine. La topoisomérase li est une enzyme qui permet de résoudre les contraintes et torsions de l'ADN occasionnées lors des processus de réplication ou de traduction, en coupant de façon transitoire l'hélice d'ADN et en la ressoudant rapidement. Les anthracyclines permettent le clivage de l'ADN mais perturbent sa religature, entraînant ainsi de multiples cassures double brin qui sont irréparables au-delà d'un certain nombre. Les cassures double brin crées par la doxorubicine sont très rapidement reconnues par γ H2AX, ce qui engendre le déclenchement des voies de dommage de l'ADN dépendantes d'ATM et ATR (Kurz *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2005).



12459 96H

Figure III-2 : Détection des foyers γ H2AX par immunofluorescence sur les cellules A549 traitées par 0,5, 1 et 5 μ M de 12459 pendant 4 jours puis fixées au paraformaldéhyde. Le témoin positif utilisé est un traitement de 24 H avec 0,5 μ M de Doxorubicine. La barre blanche correspond à 20 μ m.

Dans les conditions de traitement déclenchant la sénescence, les cellules présentent de nombreux foyers γ H2AX au niveau de l'ADN et le nombre de ces foyers diminue au fur et à mesure de l'augmentation de la concentration en 12459 (FigIII-2). Pour confirmer la présence de foci γ H2AX au niveau des télomères un immunomarquage avec un anticorps spécifique anti TRF1 a été réalisé conjointement avec un anticorps anti γ H2AX. (FigIII-3).



Figure III-3 : Détection des foyers γ H2AX et de TRF1 par immunofluorescence sur les cellules A549 traitées par 0,5, 1 et 5 μ M de 12459 pendant 4 jours puis fixées au paraformaldéhyde.

Le témoin positif utilisé est un traitement de 24 H avec 0,5 µM de Doxorubicine.

Les foci γH2AX colocalisent en partie avec TRF1, protéine de fixation de l'extrémité télomérique (FigIII-3). Ainsi, les traitements par des concentrations de 12459 déclenchant la sénescence induisent une réponse de type dommage à l'ADN notamment au niveau des télomères qui seraient reconnus comme des cassures double brin.

Après un traitement par 10 μ M de 12459, condition déclenchant l'apoptose la formation de foci γ H2AX a été examinée dans les cellules A549. Quelque soit le temps de traitement, aucune formation de foci γ H2AX n'est observée en immunofluorescence. Dans le but de confirmer ce résultat, un western blot à été réalisé sur des extraits cellulaires de A549

traitées par 10 μ M de 12459 à différents temps d'incubation, à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme phosphorylée de H2AX sur la sérine 139 (FigIII-4).



Figure III-4 : Détection de la phosphorylation de H2AX par western-blot après traitement par différents temps d'incubation avec 10 μ M de 12459. Le témoin positif utilisé est 0,5 μ M de doxorubicine pendant 24H.

De même, quelque soit le temps de traitement par le 12459, la phosphorylation de H2AX sur la sérine 139 n'a pu être détectée.

En condition de sénescence, le 12459 induit un recrutement de γ H2AX au niveau du télomère, probablement suite au déclenchement par le 12459 d'un dysfonctionnement télomérique, alors que, paradoxalement pour les concentrations induisant l'apoptose, aucun foyer γ H2AX n'a pu être détecté. Selon les effets induits par le 12459, sénescence ou apoptose, il existerait des différences, dans les mécanismes de détection et d'induction des voies de dommages à l'ADN. Afin de préciser ces différences, nous nous sommes intéressés à déterminer dans ces deux conditions, l'expression de protéines directement impliquées dans le processus d'activation des voies de dommages à l'ADN.

B. Mise en évidence des voies de contrôle des dommages à l'ADN en condition de sénescence.

Les deux principales voies d'induction des dommages de l'ADN (ATM, ATR) aboutissent à l'activation de la protéine P53, protéine qui possède un rôle central dans la propagation du signal des dommages à l'ADN, et qui décide de la survie des cellules. P53 activée peut agir comme facteur de transcription et activer à son tour l'expression de la protéine P21 (WAF1 ou CIP1), un inhibiteur des CDK (cyclin dependent kinase), qui permet l'arrêt du cycle cellulaire en G0/G1. L'expression de la protéine P21 est classiquement utilisée comme marqueur d'entrée des cellules en sénescence.



1. Etude de l'expression des protéines P53 et P21 par western blot.

Figure III-5 : Expression de P53 et de P21 par western blot après traitement des cellules A549 par 0,5, 1 et 2µM de 12459.

Le traitement des cellules A549 par 0,5 μ M de Doxorubicine pendant 24 heures est utilisé comme témoin positif pour l'induction de P53 et de P21.

Aux concentrations induisant la sénescence, le traitement des cellules A549 par le 12459 permet l'expression de P53 à 4 et 8 jours pour les trois concentrations utilisées ; toutefois, son expression à 8 jours s'avère plus faible (Fig.III-5). En revanche, l'induction de P21, cible de P53, n'apparaît qu'à 8 jours de traitement (Fig. 4). Au vu de l'expression de P21, ces résultats sont en faveur de l'entrée des cellules en sénescence dès 8 jours. L'induction de P53 apparaît plus précocement que celle de P21.

Afin de préciser la voie de détection induite au cours de la sénescence, l'expression de plusieurs protéines impliquées dans les voies de dommage à l'ADN a été étudiée.

2. Etude de l'expression des protéines impliquées dans la cascade de signalisation des dommages à l'ADN.

Parmi les protéines impliquées, les protéines kinases ATM et ATR, intervenant en amont de la voie d'activation des dommages de l'ADN, devraient être étudiées en priorité. Toutefois, en raison d'un poids moléculaire très élevé, respectivement 370 et 317 kDa, l'étude par western blot de leur phosphorylation est plus délicat à mettre en oeuvre. Or, l'étude de l'état de phosphorylation de P53 sur des sérines spécifiques, et celui des kinases du cycle cellulaire CHK1 et CHK2 sont déterminants pour la caractérisation de la où les voie(s) de dommage à l'ADN activée(s) suite au traitement par des molécules susceptibles d'affecter la structure de l'ADN (anticancéreux, stress oxydatifs...). Il est théoriquement admis que la voie de dommage de l'ADN initiée par ATR implique l'activation de CHK1, notamment sur la

sérine 317, et celle de P53 sur la sérine 15. Quant à la voie initiée par ATM, elle met en jeu la phosphorylation de CHK2 sur la thréonine 68, et celle de P53 sur la sérine 20.



Figure III-6 : Expression des protéines P53, P21, CHK2 Tr68, CHK1 S317, P53 S15 et P53 S20 des cellules A549 en condition de sénescence.

A) Expression par western-blot des protéines P53, P21, CHK2 Tr68, CHK1 S317 et P53 S15 sur des lysats de cellules A549 traitées par différentes concentrations de 12459 induisant la sénescence, à 4 et 8 jours. Les différentes incubations avec les anticorps primaires ont été réalisées sur la même membrane. *B)* Expérience indépendante. Expression des protéines P53, P53 S20.

A 4 jours, le traitement des cellules par différentes concentrations de 0,5 μ M, 1 μ M et 2 μ M de 12459, le 12459 induit la phosphorylation de P53 sur la sérine 15. Dans ces conditions, le 12459 n'induit pas la phosphorylation de P53 sur la sérine 20, ni les phosphorylations de CHK1 et CHK2 respectivement sur la sérine 317 et la thréonine 68 (FigIII-6A). En revanche, à 8 jours de traitement, lorsque les cellules entrent en sénescence, CHK1 est phosphorylé sur la sérine 317, et P53 sur les sérines 15 et 20 (FigIII-6B).

Au cours de la sénescence induite par le 12459, l'activation de CHK1 par phosphorylation de la sérine 317, la phosphorylation de P53 au niveau des sérines 15 et 20,

sont en accord avec l'implication de la voie ATR en réponse aux dommages à l'ADN induits par le 12459.

C. Mise en évidence des voies de contrôle des dommages à l'ADN aux concentrations de 12459 induisant l'apoptose.

En condition de sénescence, le traitement par le 12459 provoque une réponse aux dommages à l'ADN mise en évidence par la formation de foci γ H2AX, la phosphorylation de CHK1 et l'activation par phosphorylation de P53 sur les sérines 15 et 20. Ces résultats sont caractéristiques de l'induction de la voie de dommage à l'ADN initiée par ATR, impliquée dans la reconnaissance des dommages à l'ADN liés aux problèmes de réplication. En revanche, après traitement des cellules A549 par le 12459 en condition apoptotique, aucune formation de foci γ H2AX n'a été détectée par immunofluorescence, ni par western blot. Ceci suggère que le traitement par le 12459 ne permet pas la création de cassures double brin, ou la reconnaissance de ces cassures double brin par γ H2AX. Toutefois, le déclenchement de l'apoptose par le 12459 implique un déséquilibre de la balance pro/anti-apoptotique théoriquement initiée par P53. De cette façon P53 serait activée, induisant l'apoptose médiée par la voie mitochondriale. Dans un premier temps il a été intéressant de mettre en évidence cette activation de P53.

1. Mise en évidence par immunofluorescence de l'activation de P53.

12459 10 µM

Les cellules A549 ont été traitées par 10 μ M de 12459, fixées puis incubées avec un anticorps reconnaissant la forme totale de P53. La localisation intra-cellulaire de P53 est visualisée par immunofluorescence.



Figure III-7 : Localisation par immunofluorescence de P53 dans les cellules A549 après traitement par 10 μ M de 12459, pendant 14 et 24 heures.

Un traitement par $0.5 \ \mu M$ de doxorubicine est utilisé comme témoin positif pour l'observation de la translocation nucléaire de P53. La barre blanche correspond à 20 μm .

Comme le montre la figure III-7, le traitement par 10 μ M de 12459 induit une translocation nucléaire de P53 à 14 heures, témoin de son activation, et une translocation nucléolaire à 24 heures.

Pour déterminer plus précisément le délai d'activation de P53, l'activation de cette protéine a été étudiée en fonction du temps de traitement. L'expression de cette protéine a été étudiée par western blot, ainsi que l'expression de sa cible directe P21.

A
12459 10 μM

Té
2H
4H
8H
14H
24H
48H
Dox

P53
P53
P21
<t







Figure III-8 : A) Expression de P53 et de P21 par western blot après traitement des cellules A549 par 10 µM de 12459.

Un traitement par 1 μ M de doxorubicine est utilisé comme témoin positif pour l'expression de P53 et de P21.B) Quantification des western blots.

Sur le western blot (FigIII-8A) on observe une induction de l'expression de P53 qui commence dès 2 heures de traitement et atteint un maximum à 24 heures, ou la quantité de P53 est double comparée aux cellules contrôle. Bien que faible, l'expression de P21 est maximale à 24 heures de traitement et est environ 2,4 fois plus importante que dans le témoin, et coïncide avec l'expression maximale de P53. Cependant, l'expression de P21 dans les cellules traitées par le 12459 est 2,6 fois plus faible que celle retrouvée dans les cellules contrôles traitées par la doxorubicine, même si l'expression de P53 est identique. Ceci suggère une faible induction de P21.par le 12459. Sachant que la protéine P21 permet l'arrêt des cellules dans la phase G0/G1, la répartition des cellules A549 traitées par 10 µM de 12459

est analysée par cytométrie en flux, afin de déterminer si cette expression de P21 est suffisante pour permettre l'arrêt de ces cellules dans la phase G0/G1.



Figure III-9 : Analyse de la répartition dans le cycle cellulaire des cellules A549 traitées par 10 μ M de 12459 aux jours 1, 2, 3 et 4 par cytométrie en flux.

Le traitement par $0,2 \mu M$ de Dox est utilisé comme témoin positif d'arrêt dans le cycle cellulaire en G2/M.

L'analyse par cytométrie en flux de la répartiton des cellules dans le cycle après traitement par 10 μ M de 12459 ne montre aucune accumulation dans les phases G0/G1, S ou G2/M (FigIII-9). Toutefois, à partir de trois jours de traitement, les cellules commencent à s'accumuler en phase sub G1, avec une diminution des cellules en phase G1, S et G2M. Les cellules en phase sub G1 correspondent aux cellules mortes par apoptose ou nécrose et aux débris d'ADN.

En conclusion, l'augmentation de l'expression de P21 à 24 heures de traitement ne permet pas l'arrêt des cellules en G0/G1. Pour vérifier l'absence d'accumulation des cellules A549 traitées par 10 μ M de 12459 dans les phases du cycle cellulaire, l'activation par phosphorylation des kinases de contrôle du cycle cellulaire CHK1 et CHK2 a été étudiée par western blot.

3. Etude de l'activation des kinases de contrôle du cycle cellulaire CHK1 et CHK2 par western blot.

Nous avons montré que la phosphorylation de CHK1 sur la sérine est impliquée dans le processus de sénescence déclenché par le 12459 utilisé à faible concentration. Dans l'optique de vérifier si cette phosphorylation est retrouvée dans les conditions déclenchant l'apoptose, les cellules A549 ont été traitées par 10 μ M de 12459 pendant des temps variants de 2 heures à 48 heures et les protéines ont été analysées et identifiés par western blot avec les deux anticorps dirigés contre CHK1 Ser ³¹⁷ et CHK2 Thr ⁶⁸.



Figure III-10 : Expression par western-blot des protéines P53, CHK2 Thr68, CHK1 S317 dans les cellules A549 traitées par 10 µM de 12459.

Dans ces conditions aucune phosphorylation de CHK1 sur la sérine 317 et de CHK2 sur la thréonine 68 n'a été révélée (FigIII-10). Ces résultats indiquent que le traitement par 10 μ M de12459 ne permet pas l'activation de ces kinases responsables de l'arrêt des cellules dans le cycle. Ces kinases étant théoriquement activées lors de dommages à l'ADN par ATM et/ou ATR, ceci suggère que le traitement par 10 μ M de 12459 ne déclenche pas de voie de détection de dommage à l'ADN. Toutefois, il est intéressant de constater pour les temps de traitement précoces 2 heures et 4 heures une déphosphorylation de CHK1 sur la sérine 317, qui réapparaît à 14 heures de traitement sans être toutefois aussi importante que dans les cellules non traitées. De plus, ces résultats sont en accord avec l'absence d'arrêt des cellules dans le cycle.

4. Etude de l'état de phosphorylation de P53 après traitement par 10 μM de 12459.

Au vu de ces résultats, on peut se demander si l'activation de la protéine P53, suite au traitement par 10 μ M de 12459 est réalisée par phosphorylation.

Un western blot a été effectué en présence d'un anticorps dirigé contre les phosphorylations spécifique des sérines.



Figure III-11 : Analyse par western blot de l'expression de P53 et de sa phosphorylation sur les sérines sur des échantillons cellulaires traités par 10 μ M de 12459.

La membrane a initialement été hybridée avec l'anticorps phosphosérine, déshybridée puis hybridée de nouveau avec un anticorps reconnaissant la forme totale de P53. Après incubation avec l'anticorps phophosérine une bande apparaît aux environs de 53 Kda dès 2 heures de traitement (FigIII-11). Après déshybridation puis hybridation avec l'anticorps reconnaissant la forme totale de P53 apparaît une bande qui colocalise avec celle obtenue avec l'anticorps phosphosérine. Ainsi, P53 serait, après traitement par 10 μ M de 12459, activé par phosphorylation sur des sérines. Nous avons ensuite cherché à identifier quelles étaient les sérines phosphorylées.

5. Identification des sérines phosphorylées responsables de l'activation de P53.

L'identification des sérines phosphorylées responsables de l'activation de P53 peut donner des informations sur les voies induites par le 12459 utilisé dans des conditions qui déclenchent l'apoptose des cellules A549. L'étude de ces phosphorylations a été réalisée par western blot sur des extraits protéiques de cellules A549 traitées par 10 µM de 12459 pendant

24 heures. Le traitement par 1 μ M de doxorubicine est utilisé comme témoin positif puisque cette anthracycline permet la phosphorylation de P53 sur de très nombreux sites (Saito *et al.*, 2003). 12459



Figure III-12: Etude par western blot de la phosphorylation de P53 à partir d'extraits protéiques de cellules A549 traitées par 10 μ M de 12459.

Les incubations ont été réalisées avec des anticorps dirigés contre des sérines phosphorylées spécifiques des voies d'activation de P53.

Lors du déclenchement de la voie classique de dommages à l'ADN, ATM phosphoryle spécifiquement P53 sur la sérine 20, ATR sur la sérine 15, CHK1 et CHK2 sur la sérine 20, les DNA-PK sur la sérine 37, HIPK2 sur la sérine 46. La protéine caséine kinase I (CKI) permet la phosphorylation de P53 sur les sérines 6 et 9. Après 24 heures de traitement des cellules A549 par 10 µM de 12459, aucune de ces sérines analysées par western blot n'est phosphorylée. Ces observations sont en faveur d'une réponse de type dommage à l'ADN « non classique ». En revanche, dans ces conditions, le traitement par le 12459 induit la phosphorylation de sur la **sérine 392** (FigIII-12). Au vu de la littérature, cette phosphorylation est retrouvée après traitements par des agents anticancéreux tels que la doxorubicine, l'étoposide, ou en réponses à l'exposition aux UV (mais pas aux rayons X).



Figure III-13 : Analyse par western blot de la phosphorylation de P53 sur la sérine 392. Les culots cellulaires des cellules A549 exposées à 0,005 J/cm² d'UVC sont utilisés comme témoins positifs de phosphorylation de P53 sur la sérine 392 et 15.

De même comme le montre la figure III-13, on observe une phosphorylation de P53 sur la sérine 392, dans les extraits de cellules traitées par 10 μ M de 12459 pendant 48 heures ou par 0,5 μ M de doxorubicine pendant 24 heures, ou après exposition aux UV. En revanche, l'exposition des cellules A549 aux UV provoque également une phosphorylation de P53 sur la sérine 15 contrairement au 12459, comme cela a été vérifié précédemment (FigIII-13)

D'après la littérature, plusieurs protéines peuvent être responsables de la phosphorylation de P53 sur la sérine 392 : la protéine CAK (CDK2 activating kinase), la protéine CKII (casein kinase II) associée aux facteur hSpt16 et SSRP1, la protéine PKR (double stranded RNA activated protein kinase), et CDK 9, la protéine P38 MAPK (p38-mitogen-activated protein kinase) directement ou indirectement puisqu'elle active par phosphorylation CKII après dommage à l'ADN par une voie encore peu étudiée. De plus, la surexpression de la protéine P14ARF dans les cellules induit la phosphorylation de P53 uniquement sur la sérine 392. La P38 MAPK (dont 4 isoformes ont été identifiées) est l'orthologue chez les mammifères de la kinase HOG de la levure et est activée suite à de nombreux stress environnementaux incluant les ultraviolets, la chaleur, les chocs osmotiques et les cytokines inflammatoires. La P38 MAPK est activée par phosphorylation de la thréonine 180 et de la tyrosine 182 par les kinases MKK3 et SEK, et ainsi modifiée phosphoryle à son tour et active la MAPKAP-kinase 2 et le facteur de transcription ATF-2 (Kumar *et al.*, 2003). P38 MAP kinase serait un candidat potentiel pour la phosphorylation de P53 sur la sérine 392.

6. Etude de la phosphorylation de P38 MAPK après traitement des cellules A549 par 10 μ M de 12459.

De nombreux stress cellulaires induisent l'arrêt du cycle cellulaire par une forte activation de P38MAPK. P38MAPK régule aussi les kinases de contrôle du cycle cellulaire en réponse à des dommages à l'ADN incluant la transition G1/S et G2/M induits par les UV. Toutefois, selon différentes études, il semble que ATM et ATR participent à l'activation de P38MAP kinase par l'intermédiaire des kinases TAO (thousand and one amino acid) après induction de dommages à l'ADN induit par UV ou infra-rouge (Raman *et al.*, 2007). Afin de vérifier la présence d'une éventuelle activation de P38 MAPK , nous avons analysé les phosphorylations de P38 MAPK au niveau de la thréonine 180 et de la tyrosine 182.



Figure III-14 : Etude par western blot de l'activation par phosphorylation de la P38 MAPK sur des extraits protéiques de cellules A549 traitées par 10 µM de 12459.

Comme le montre le western blot de la figure III-14, la phosphorylation de la P38 MAPK n'est pas modifiée suite au traitement par 10 μ M de 12459. En revanche, P38 MAPK est phosphorylée après traitement par la doxorubicine et après exposition aux UVC, résultats en accord avec la littérature. Ainsi, la voie impliquant P38 MAPK n'est pas responsable de la phosphorylation de P53 sur la sérine 392. Par déduction, la protéine CKII, associée aux facteur hSpt16 et SSRP1 n'est pas responsable de cette phosphorylation puisqu'elle est activée par P38 MAPK (Sayed *et al.*, 2000) lors du déclenchement de la reconnaissance de dommages à l'ADN. L'étude de l'expression des autres protéines candidates restent à analyser afin d'identifier la ou les protéines responsables de l'activation de P53 par phosphorylation de la sérine 392, notemment celle de PKR.

D. Le traitement par 10 μ M de 12459 permet l'induction de la protéine PPM1D

Dans les conditions déclenchant l'apoptose, le traitement par le 12459 ne permet pas l'induction des voies classiques de type dommages à l'ADN, comme le démontre l'absence de phosphorylation des substrats P53, CHK1 et CHK2 des kinases ATM et ATR. Toutefois, nous avons observé dans les temps de traitements précoces de traitement par 10 μ M de 12459 la déphosphorylation de la kinase de contrôle du cycle cellulaire CHK1. Nous avons recherché dans la littérature s'il existait des phosphatases capables d'exercer leur activité dans un contexte dommage à l'ADN. La phosphatase PPM1D (Protein phosphatase 1D magnesium dependent delta isoforme) aussi appelée Wip1 (wild-type P53-induced phosphatase) est décrite comme étant capable de déphosphoryler P53 et CHK1 lors de l'activation des voies de dommage à l'ADN médiée par ATM et ATR. Afin de vérifier si cette protéine est responsable de la déphosphorylation précoce de CHK1 suite au traitement par le 12459, un western blot a été réalisé avec un anticorps spécifique dirigé contre PPM1D. Les expositions aux UV et les traitements par l'H₂O₂, connus pour induire l'expression de cette protéine ont été utilisés comme témoins positifs pour l'expérience.



Figure III-15 : Etude de l'expression de P53, PPM1D, CHK1 S317 par western blot sur des extraits protéiques de cellules A549 traitées par 10 µM de 12459.

Les témoins positifs utilisés correspondent à des traitements par 1 μ M de doxorubicine pendant 14 heures et par 0,5 mM d' H₂O₂ pendant 14 heures ou à une exposition à 0,005 J/cm^2 d'UVC. Les incubations avec les différents anticorps ont été réalisées sur la même membrane.

Sur le western blot de la figure III-15, on observe une induction de P53 à 14 heures de traitement et la déphosphorylation transitoire de CHK1 sur la sérine 317 à 2 et 4 heures de traitement comme précédemment. La protéine PPM1D est induite dès 2 heures de traitement par le ligand et son expression diminue dans le temps (FigIII-15). La déphosphorylation de

CHK1 coïncidant avec l'induction de PPM1D, il semble ainsi possible que PPM1D soit responsable de la déphosphorylation de CHK1 pendant les temps précoces de traitement par le ligand de l'ADN G-quadruplexe. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons choisi d'inhiber l'expression de PPM1D dans les cellules A549 par introduction de siRNA PPM1D.

1. Inhibition de l'expression de la protéine PPM1D par siRNA dans la lignée A549.

Les siRNA contrôles ou un siRNA spécifique de l'ARNm de PPM1D ont été introduits dans la lignée A549 par transfection par la lipofectamine. Les traitements par l' H_2O_2 permettant une forte expression de la phosphatase PPM1D, les cellules transfectées ou non ont été traitées par 0,5mM d'H₂O₂ afin de déterminer l'efficacité des siRNA PPM1D (FigIII-16).



Figure III-16 : Expression par western blot de PPM1D des cellules A549, contrôles siRNA et siRNA PPM1D (4j) traitées par 0,5 mM de H_2O pendant 4 heures.

Le traitement par 0,5 mM d'H₂O₂ induit l'expression de la protéine PPM1D dans les cellules témoins et cellules contrôle siRNA, en revanche, son expression est inhibée dans les cellules où ont été introduits les siRNA PPM1D. Ce résultat confirme les données de la littérature et permet de valider l'efficacité d'inhibition de la protéine PPM1D dans les cellules transfectées par les siRNA PPM1D (FigIII-16).



Figure III-17 : Etude de l'expression de PPM1D par western blot des cellules A549, siRNA contrôles et siRNA PPM1D (4j) traitées par 15 μ M de 12459 pendant 4 heures. Un traitement par 0,5 mM H_2O_2 est utilisé comme témoin positif pour l'expression de PPM1D.

Dans les échantillons contrôles, le traitement par le 12459 permet l'augmentation de l'expression de PPM1D associée à une déphosphorylation de la sérine 317 de CHK1. L'introduction du siRNA PPM1D dans les cellules A549 permet une réduction de 3 fois de l'expression de la protéine PPM1D par rapport au contrôle et l'expression de PPM1D ne varie pas après traitement par le 12459. L'inhibition de l'expression de PPM1D permet la restauration, après traitement par le 12459, de la phosphorylation de CHK1 sur la sérine 317. En revanche, l'expression de P53 ne varie pas après traitement dans les 2 lignées. Ces résultats permettent ainsi de conclure que la protéine PPM1D est responsable de la déphosphorylation de CHK1 suite au traitement par 10 μ M de 12459 (FigIII-17).

2. Effets des siRNA PPM1D sur la formation de foci γ H2AX après traitement par 15 μ M de 12459.

L'inhibition de l'expression de PPM1D étant capable de restaurer la phosphorylation de CHK1 après traitement par le 12459, il n'est pas exclu que les voies de détections de dommages à l'ADN en amont soient activées. C'est pourquoi, dans les conditions où le 12459 induit l'apoptose des cellules A549, nous nous sommes focalisé sur la formation de foci

 γ H2AX au niveau de l'ADN des cellules dans lesquelles les siRNA PPM1D ont été introduits, préalablement au traitement par le 12459. Les cellules ont été traitées par 15 μ M de 12459, concentration induisant l'apoptose pour laquelle aucune détection préalable de γ H2AX n'a été mise en évidence.



Figure III-18 : Détection de TRF1 et des foyers yH2AX par immunofluorescence sur les cellules A549, contrôles siRNA et siRNA PPM1D (4j) traitées par 15 µM de 12459 pendant 4 heures puis fixées au paraformaldéhyde. La barre blanche correspond à 20 µm.

Le traitement par le 12459 sur les cellules témoins et contrôle siRNA ne provoque pas de formation de foci γ H2AX. En revanche, l'introduction du siRNA PPM1D permet, après traitement par le ligand de l'ADN G-quadruplexe, la formation de foci γ H2AX qui colocalisent avec la protéine télomérique TRF1, de plus ces colocalisations sont retrouvées en périphérie du noyau (FigIII-18).

Ainsi l'introduction de siRNA PPM1D restaure, après traitement par le ligand, la reconnaissance et le déclenchement des voies de dommages à l'ADN impliquant la reconnaissance des cassures double brin de l'ADN au niveau télomérique par γ H2AX et l'activation de la kinase de contrôle du cycle cellulaire CHK1. Ces résultats confirment que, dans les conditions d'apoptose, l'expression de PPM1D est responsable de l'inhibition de la voie de dommage à l'ADN médiée par ATR, voie activée lors de problèmes survenant au cours de la réplication.

E. Espèces réactives de l'oxygène et dommage de l'ADN.

1. Effet d'un traitement par l'H2O2 sur le télomère.

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est une espèce réactive de l'oxygène qui provoque au sein de la cellule des dommages oxydatifs créant des cassures simple brin au niveau de l'ADN. Les télomères sont particulièrement sensibles au stress oxydatif tout comme l'ADN mitochondrial. En effet, des travaux réalisés par l'équipe de Sitte ont montré que le traitement par H₂O₂ de fibroblastes humains induisait préférentiellement des cassures simple brin au niveau des télomères, et leur raccourcissement (von Zglinicki *et al.*, 2000). Afin de déterminer si le traitement par l' H₂O₂ permet le recrutement de γ H2AX au niveau des télomères, les cellules A549 ont été traitées par 0,5 mM d'H₂O₂ pendant 4 heures puis un immunomarquage a été réalisée avec un anticorps anti γ H2AX et anti TRF1.



Figure III-19 : Détection de TRF1 et des foyers γ H2AX par immunofluorescence sur les cellules A549 siRNA contrôle et siRNA PPM1D (4j) traitées par 0,5 mM de H₂O₂ pendant 4 heures puis fixées au paraformaldéhyde. La barrre blanche correspond à 20 µm.

Le traitement par l' H_2O_2 permet la formation de foci γ H2AX qui colocalisent en très grande majorité avec la protéine TRF1 dans les cellules A549, et dans les cellules transfectées par les siRNA contrôle et siRNA PPM1D (FigIII-19). Ce résultat confirme les données de la littérature affirmant que les télomères sont la cible la cible préférentielle de l' H_2O_2

2. Inhibition des espèces réactives de l'oxygène et expression de PPM1D

Etant donné que le ligand 12459 et l'H₂O₂ permettent chacun la formation des espèces réactives de l'oxygène et l'expression de la protéine PPM1D, il nous paraissait intéressant de

montrer l'implication des espèces réactives de l'oxygène produites par le 12459 dans l'induction de l'expression de PPM1D. Les espèces réactives de l'oxygène libérées lors des traitements par le 12459 et l'H₂O₂ ont été inhibées par un prétraitement au N-acétyl cystéine, antioxydant inhibiteur des espèces réactives de l'oxygène, puis l'expression de PPM1D a été analysée par western blot (FigIII-20).



Figure III-20 : Etude par western blot de l'expression de la protéine PPM1D après incubation des cellules A549 avec $0,5 \text{ mM} d'H_2O_2 \text{ ou } 10 \mu M$ de 12459 pendant 4 heures. Un prétraitement au N-acetyl cystéine à 10 mM a été effectué pendant une heure.

Comme nous l'avons vu précédemment (FigIII-19), l'expression de la protéine PPM1D est induite par le traitement au 12459 et à l' H_2O_2 (FigIII-20). Avec un prétraitement au N-acétyl cystéine, l'expression de PPM1D induite par l' H_2O_2 est réduite de 75 % et celle induite par le 12459 est inhibée de 75% (FigIII-20). Ainsi, les espèces réactives de l'oxygène induisent l'expression de la phosphatase PPM1D responsable de la réversion des voies de dommages de l'ADN.

3. Inhibition des espèces réactives de l'oxygène et formation de foci $\gamma H2AX$

Pour comprendre l'implication des espèces réactives de l'oxygène sur la formation des foci γ H2AX au niveau de l'ADN après traitement par le 12459 des cellules transfectées par les siRNA PPM1D, nous avons recherché la présence de foci γ H2AX par immunofluorescence dans les cellules A549, siRNA contrôles et siRNA PPM1D traitées par le 12459 ou l'H₂O₂ avec ou sans prétraitement par le N-acétyl cystéine (FigIII-21).



Figure III-21 : Détection des foyers γ H2AX par immunofluorescence sur les cellules A549, siRNA contrôles et siRNA PPM1D (4j) traitées par 15 μ M de 12459 ou 0,25 mM d'H₂O₂ pendant 4 heures préincubées en présence de 10 mM de N-acétyl cystéine, puis fixées au paraformaldéhyde.

La barre blanche correspond à 20 $\mu m.$

Ce résultat préliminaire (FigIII-21) montre que, dans les 3 lignées cellulaires, le prétraitement au N-acétyl cystéine permet d'obtenir une inhibition du marquage nucléaire de γ H2AX après incubation avec l'H₂O₂. Après incubation avec le 12459, la formation des foci γ H2AX n'est visible que dans les cellules transfectées par les siRNA PPM1D, et ces foyers persistent avec un prétraitement par l'inhibiteur des espèces réactives de l'oxygène N-acétyl cystéine. Ainsi, les espèces réactives de l'oxygène libérées suite au traitement par le 12459 ne participeraient pas ou peu à la formation des dommages au niveau de l'ADN. Toutefois cette expérience reste à reconfirmer.

Discussion et: Conclusion

Au cours de cette étude nous avons montré que le 12459 induit deux types de réponses « dommage à l'ADN » selon que le traitement induise la sénescence ou l'apoptose associée dans les deux cas une dégradation du simple brin télomérique. Des travaux de l'équipe de Lenhard Rudolh avaient démontré chez la souris que le niveau cellulaire de dysfonctionnement télomérique déterminait l'induction de la sénescence où de l'apoptose *in vivo* (Lechel *et al.*, 2005).

A faible concentration le 12459 déclenche une sénescence réplicative associée à l'expression des protéines P53 et P21. C'est aussi le cas du ligand Braco19 qui provoque une induction accélérée de la sénescence avec augmentation de P21 et P16. (Incles et al., 2004). Le traitement par le 12459 permet le recrutement des foci yH2AX au niveau du télomère, l'activation par phosphorylation de CHK1 sur la sérine 317 et la phosphorylation de P53 sur la sérine 15 puis sur la sérine 20. Ces résultats sont en accord avec une induction des voies de dommage à l'ADN impliquant la voie ATR, puisque CHK1 est activé, et non CHK2. Toutefois, les données de la littérature précisent que les protéines de reconnaissance des cassures doubles brins comme yH2AX, s'accumulent sur les télomères courts de cellules rentrant en sénescence réplicative (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Dans ces conditions, il s'opère un arrêt du cycle cellulaire déclenché par une cascade de signalisation incluant ATM, P53 et P21. (Herbig et al., 2004). En effet, ATM activée est retrouvée au niveau des TIFs télomériques dans les fibroblastes sénescents et dans les cellules surexprimant un dominant négatif de TRF2 (Takai et al., 2003). Toutefois, la déprotection du télomère induit la sénescence dans les fibroblastes ATM^{-/-} et une colocalisation d'ATR et d'ATRIP est retrouvée au niveau du télomère dans des cellules ATM^{-/-} (Herbig *et al.*, 2004), suggérant l'implication des protéines ATR et DNA-PK en absence de fonctionnalité de la protéine ATM. Cependant l'implication de la protéine ATR reste mineure dans les cellules normales en sénescence puisque cette protéine est rarement retrouvée dans les TIF (telomere-induced foci). En effet, des analyses par ChIP à partir de télomères de cellules sénescentes montrent une fixation de la protéine ATM au niveau du télomère 37 fois plus importante et une augmentation de la fixation de la protéine ATR de seulement 6 fois, par rapport au cellules normales (Herbig et al., 2004). De plus, l'inhibition de l'expression d'ATM par siRNA dans les cellules en sénescence est suffisante pour provoquer leur retour dans le cycle cellulaire (Herbig et al., 2004). Ces différentes données confirment le rôle prédominant de la protéine ATM dans le

déclenchement de la réponse aux dommages de l'ADN dans les cellules en sénescence. Or, cette voie n'est pas activée au cours de l'induction de la sénescence générée par de faibles doses de 12459. En effet, au cours de la sénescence induite par le 12459, l'activation de CHK1 par phosphorylation de la sérine 317, la phosphorylation de P53 au niveau des sérines 15 et 20, sont en accord avec l'implication de la voie ATR plutôt qu'ATM en réponse aux dommages à l'ADN induits par le 12459.

Ainsi, le 12459 induirait en condition de sénescence la voie de dommage de l'ADN médiée par ATR. Ce résultat est en contradiction avec la littérature puisque les traitements par la télomestatine ou la déprotection du télomère induit la voie de dommage de l'ADN médiée par ATM. Le 12459 occasionnerait ainsi des problèmes au niveau de la réplication notamment aux télomères. Ainsi, il serait intéressant de mettre en évidence la formation de foci γ H2AX au niveau de la fourche de réplication après incorporation de Brdu.

Cependant des données très récentes de la littérature obtenues par l'équipe de T. De Lange (Denchi et al., 2007) ont montré l'existence d'un contrôle de la protéine ATR par le télomère. Comme cette équipe avait déjà vu, la délétion de TRF2 induit la formation de TIFs et la phosphorylation de CHK2. En revanche, la délétion de TRF2 dans les cellules ATM-/induit une large abrogation de la formation de ces TIFs et de la phosphorylation de CHK2 et le simple brin télomérique n'est pas dégradé. Dans aucune de ces deux situations la phosphorylation de CHK1 n'a été retrouvée. Ces résultats indiquent ainsi que la kinase ATR n'est pas impliquée dans la voie de dommage à l'ADN déclenchée par un dysfonctionnement télomérique initié par une délétion de TRF2. De plus, l'inhibition d'ATR n'a pas d'effet sur la formation des TIFs et sur l'activation de CHK2 induites par l'inhibition de TRF2 dans les cellules ATM^{+/+}. Cependant, dans la lignée cellulaire humaine de carcinome du colon HCT116 et de même que dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), la délétion de hPOT1 par shRNA (ou dePOT1a et b chez la souris par KO) réduit significativement la formation de TIFs quand ATR est inhibée. Cettte délétion de POT1 induit la phosphorylation de CHK1 et de CHK2, et l'activation des substrats de la kinase ATR. De plus, l'expression d'ATM ne modifie pas la réponse occasionnée par la délétion de POT1 (Denchi et al., 2007). Les résultats de ces travaux concluent que la réponse aux dommages à l'ADN initiée par un dysfonctionnement télomérique occasioné par l'inhibition de hPOT1 (ou de TPP1) est dépendante de la kinase ATR. La voie de dommage à l'ADN médiée par ATR est inhibée au niveau du télomère par la fixation de la protéine hPOT1.

Ces travaux pourraient suggérer que le 12459, en condition de sénescence induise une délocalisation de hPOT1 au niveau du télomère, ou bien que le raccourcissement télomérique
observé ne permet pas un recrutement suffisant de hPOT1 au niveau du télomère pour inhiber la kinase ATR. Cependant, en condition de sénescence réplicative, l'activation d'ATR est rarement retrouvée (Herbig *et al.*, 2004). Il serait intéressant dans notre cas d'étudier l'effet du 12459 sur la localisation des protéines TRF2 et hPOT1.

L'inhibition de la réplication de l'ADN par l'hydroxyurée ou par irradiation aux UV induit la formation de foyers γ H2AX au niveau du point d'arrêt de la fourche de réplication (Ward *et al.*, 2001). Il est admis que l'activation d'ATR, et par conséquent de CHK1 est restreinte à la transition de phase S/G2 (Jazayeri *et al.*, 2006). En effet, ATR est activée en réponse aux stress survenus lors de la réplication (Zhou *et al.*, 2000; Abraham, 2001), et, par conséquent, la phosphorylation de CHK1 par ATR en réponse aux UV est elle aussi restreinte aux cellules en réplication (Ward *et al.*, 2004). Il apparaît que les lésions occasionnées par les UV n'activent pas directement ATR *in vivo*. En effet, les cassures simple brin créées par l'exposition aux UV sont reconnues par γ H2AX seulement au niveau des fourches de réplication, cette réponse étant exclusivement dépendante d'ATR (Ward *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2004). La surexpression d'une forme mutée inactive d'ATR inhibe la phosphorylation et la formation de foci γ H2AX après traitement par l'hydroxyurée ou exposition aux UV (Ward *et al.*, 2001). Ces résultats suggéreraient un mécanisme commun d'induction de la voie de dommage de l'ADN via ATR/P53/CHK1 par le 12459 à faible concentration, mécanisme identique à celui décrit pour les expositions aux UV ou à l'hydroxyurée.

En condition d'apoptose, le 12459 ne déclenche pas de réponse de type dommage de l'ADN, comme le révèle l'absence de formation de foci γ H2AX, et de phosphorylation des kinases de contrôle du cycle cellulaire CHK1 et CHK2. De plus, P53 est uniquement phosphorylée sur la sérine 392. La phosphorylation de P53 sur la sérine 392 favorise la stabilité du tétramère et par conséquent son activité transcriptionnelle (Kim *et al.*, 2004). Cette phosphorylation est généralement retrouvée après traitement par certains agents anticancéreux tels que la doxorubicine ou l'étoposide, ainsi qu'après exposition de la cellule aux radiations UV mais pas après aux radiations γ (Kapoor *et al.*, 2000). Les données de la littérature nous précisent que plusieurs protéines peuvent être responsables de cette phosphorylation : la protéine CAK (CDK2 activating kinase), la protéine CKII (casein kinase II) associée aux facteurs hSpt16 et SSRP1 (Keller *et al.*, 2001), la protéine PKR (double stranded RNA activated protein kinase) (Cuddihy *et al.*, 1999; Cuddihy *et al.*, 1999), la protéine CDK 9 (Radhakrishnan *et al.*, 2006), et la protéine P38 MAP kinase directement ou

indirectement puisqu'elle active par phosphorylation CKII après dommage à l'ADN par une voie encore peu étudiée. De plus le fait d'augmenter P14ARF dans les cellules permet la phosphorylation de P53 uniquement sur la sérine 392 (Jackson et al., 2004). Dans ce travail, nous avons montré par western blot que la voie impliquant P38 MAPK n'est pas responsable de la phosphorylation de P53 sur la sérine 392. En effet, le 12459 ne permet pas une augmentation des phosphorylations activatrices au niveau de la thréonine 180 et de la tyrosine 182 de P38 MAPK. Par déduction, la protéine CKII, associée aux facteur hSpt16 et SSRP1 n'est pas responsable de cette phosphorylation puisqu'elle n'est pas activée par P38 MAPK (Sayed et al., 2000) lors du déclenchement de la reconnaissance de dommages de l'ADN. L'étude de l'expression des autres protéines candidates reste à effectuer afin d'identifier la ou les protéines responsables de l'activation de P53 par phosphorylation de la sérine 392. Cependant l'implication de la protéine PKR devrait être intéressante à analyser. En effet, cette protéine est une sérine/thréonine kinase qui inhibe la synthèse protéique par phosphorylation du facteur de traduction eIf- 2α et a été décrite comme inducteur de l'apoptose (Cuddihy *et al.*, 1999). Cette protéine appartient à la famille des protéines inductibles par l'interféron. PKR est activée par les cytokines, les facteurs de croissance et par certains stress tels que les chocs thermique et les infections. (Williams, 1999) PKR est capable de s'associer avec P53 in vivo et in vitro et induire la phosphorylation de la sérine 392 in vitro (Cuddihy et al., 1999). En présence d'ARN double brin, PKR latent s'autophosphoryle et devient ainsi active (Clemens et al., 1997). Le cisplatine permet une accumulation préférentielle de P53 dans le nucléole, la phosphorylation de P53 sur la sérine 392 comme nous l'avons observé pour le 12459, et l'activation de la protéine PKR. (Bergeron et al., 2000). En effet, le cisplatine inhibe la synthèse des ARN ribosomiques in vivo (Jordan et al., 1998) et, des expériences préliminaires réalisées au sein du laboratoire ont montré que la télomestatine entraîne des altérations au niveau de l'amplification par PCR de l'ADN ribosomique (Della Gaspera, communication personnelle). Ainsi, les ligands de l'ADN G-quadruplexe pourraient reconnaître des séquences G-quadruplexe au niveau de l'ADN ribosomique et perturber la réplication et /ou la transcription de l'ADN ribosomique. De plus le cisplatine déclenche des mécanismes d'actions intra-cellulaires similaires à ceux du 12459. En effet, comme le 12459, le cisplatine, à faible concentration induit des dommages à l'ADN conduisant à la sénescence de la lignée de carcinome de colon HCT116 et, à plus forte concentration (> IC50), induit une apoptose liée à la formation de ROS, dans des cellules énuclées (Berndtsson et al., 2007). Outre ces effets nucléaires, le cisplatine déclenche un stress au niveau du réticulum endoplasmique capable de déclencher l'apoptose dans des cellules énuclées (Mandic et al., 2003). De plus, le cisplatine se lie à l'ADN mitochondrial (Murata *et al.*, 1990). Il n'est pas exclu que le 12459 de part sa structure chargée positivement, puisse provoquer un stress au niveau de la mitochondrie ou du réticulum endoplasmique comme le cisplatine.

Le cisplatine, comme la doxorubicine, l'H₂O₂, l'hypoxie ou les UV induisent une **phosphorylation de P53 sur la sérine 392**. Les protéines ATR et ATM semblent être également impliquées dans cette phosphorylation puisque la phosphorylation de P53 sur la sérine 392 induite par la doxorubicine est inhibée en absence d'ATM fonctionnelle (Kurz *et al.*, 2004). De même, l'hypoxie permet cette phosphorylation dépendante d'ATR mais indépendante d'ATM (Kurz *et al.*, 2004). L'H₂O₂ permet l'induction des voies de dommages à l'ADN médiées par ATM (Chen *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006). Néanmoins dans le cadre de notre étude il serait intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition des ROS sur la phosphorylation de P53 sur la sérine 392, et de regarder par immunofluorescence une éventuelle localisation nucléolaire de P53 phosphorylé sur la sérine 392.

Aux conditions déclenchant l'apoptose, nous avons observé une déphosphorylation transitoire de CHK1 sur la sérine 317 aux temps précoces de traitement qui coïncide avec une induction de la protéine PPM1D. Les données de la littérature précisent que cette protéine phosphatase PPM1D (Protein phosphatase 1D magnesium dependent delta isoforme) aussi appelée Wip1 (wild-type P53-induced phosphatase) déphosphoryle P53 et CHK1 lors de l'activation des voies de dommage à l'ADN médiée par ATM et ATR. Son expression est activée par les UV et par les stress oxydatifs tels que l'H2O2. Or, au cours de nôtre étude, nous avons montré que la déplétion de PPM1D par siRNA permet l'induction par le 12459 de la formation de foyers γ H2AX principalement localisés au niveau des télomères, ainsi que la phosphorylation de CHK1 sur la sérine 317. L'expression de cette protéine est ainsi responsable de l'inhibition de l'induction des dommages de l'ADN occasionné par le 12459 aux conditions induisant l'apoptose. Ces résultats suggèrent que la voie de dommage de l'ADN inhibée par la protéine PPM1D implique la kinase ATR. Toutefois, il serait intéressant d'étudier si l'inhibition de l'expression de PPM1D induit la phosphorylation de CHK2. De même, il serait intéressant d'étudier l'effet de la déplétion de PPM1D par siRNA sur le signal simple brin télomérique. Est-ce que cette phosphatase module la signalisation des dommages ou le niveau des dommages aux télomères ?

Au cours de cette étude, nous avons montré également que l'inhibition des espèces réactives de l'oxygène par un prétraitement au N-acétyl cystéine permet une inhibition de l'expression de la protéine PPM1D induite par le 12459 ou l'H₂O₂, suggérant l'implication

des espèces réactives de l'oxygène dans l'induction de l'expression de PPM1D. Nous avons vérifié dans notre étude que l' H₂O₂ déclenchait la formation de foyers γH2AX en très grande majorité au niveau des télomères et que la formation de ces foyers est très majoritairement inhibée par un traitement préalable au N-acétyl-cystéine. Ces résultats confirment donc l'implication des espèces réactives de l'oxygène sur la formation de TIF_S. En effet les télomères sont des structures particulièrement sensibles aux stress oxydatifs qui y favorisent la création de cassures simple brin et le raccourcissement télomérique (von Zglinicki et al., 2000). Or nous avons vu que, dans des expériences préliminaires dans les conditions ou PPM1D est déplété par siRNA, que les ROS ne participent pas ou peu à la formation de foyers yH2AX dans les cellules A549. Cependant il serait intéressant de reconfirmer ce résultat en mesurant la quantité de foyers yH2AX par cytométrie en flux pour vérifier l'implication des ROS dans les conditions induisant la sénescence. En effet, les fibroblastes rentrant en sénescence montrent un taux élevé de ces ROS, un dysfonctionnement mitochondrial, des télomères raccourcis et la présence de TIF_S. De plus, la réduction de la production des superoxydes par les mitochondries limite le raccourcissement des télomères et la formation des TIF_S (Passos *et al.*, 2007).

Les travaux de Kurz ont montré que la Doxorubicine active la voie de dommages de l'ADN médiée par ATM, en partie par la formation des espèces réactives de l'oxygène (Kurz *et al.*, 2004) En effet, alors qu'un prétraitement au NAC atténue partiellement mais de façon significative la phosphorylation de l'histone γ H2AX par la doxorubicine, l'inhibition des superoxydes par l'acide ascorbique n'a aucun effet sur l'activation de la voie de dommage de l'ADN médiée par ATM. Ainsi, dans ce cas, les ROS, et spécifiquement les radicaux hydroxyles, participent à l'activation de la voie ATM par la doxorubicine.

Dans la littérature il a été décrit que l' H_2O_2 (Xie *et al.*, 2001) et d'autres peroxydes (Shackelford *et al.*, 2001) déclenchent la voie de dommage de l'ADN médiée par ATM. De plus, ATM serait sensible au stress oxydatif (Rotman *et al.*, 1997). En revanche, l'hyperoxie (95% $O_2 + 5\%$ CO₂), permettant la production des espèces réactives de l'oxygène dans la cellule (Freeman *et al.*, 1981; Zweier *et al.*, 1989), déclenche une réponse aux dommages de l'ADN indépendamment de ATM. En effet ; l'hyperoxie, active la voie de dommage de l'ADN ATR/CHK1, permet la phosphorylation de sérines de P53 de manière ATM indépendante et la phosphorylation de CHK1 sur la sérine 345 par ATR (Das *et al.*, 2004). Ainsi, les différentes formes d'espèces réactives de l'oxygène ne déclenchent pas les mêmes voies de réponses aux dommages de l'ADN. Dans notre cas il serait intéressant de mettre en évidence une éventuelle phosphorylation de CHK1 sur la sérine 345.

Le 12459 ne permet pas l'activation de la phosphorylation de P38MAPK en condition d'apoptose. Cependant il a été décrit dans la littérature que les ROS participent à l'activation de cette voie (Dolado *et al.*, 2007) et que la protéine PPM1D déclenche une régulation négative de la voie P38MAPK/P53 (Takekawa *et al.*, 2000).

Ainsi, le 12459 favoriserait le déclenchement des voies de dommages à l'ADN par activation de la kinase ATR induisant une reconnaissance de cassure simple brin pendant la phase S. ATM ne semble pas être impliquée dans cette réponse aux dommages de l'ADN occasionnés par le 12459 puisque CHK2 n'est pas activée, ce qui est en contradiction avec les données de la littérature où la déprotection du télomère induite par l'utilisation de dominant négatif où de siRNA des protéines télomériques déclenchent préférentiellement la voie ATM. Cependant des données très récentes de la littérature ont montré que l'exclusion de la protéine hPOT1 du télomère active la voie ATR (Denchi *et al.*, 2007). Il serait ainsi intéressant de montrer l'effet du 12459 en condition apoptotique sur l'exclusion de hPOT1 du télomère.

Peu d'études ont été réalisées pour les ligands de l'ADN G-quadruplexe au niveau du déclenchement des voies de dommages de l'ADN. La télomestatine induit dans la lignée OM9 :22, lignée leucémique BCR-ABL positive, la voie ATM et CHK2 (Tauchi *et al.*, 2003). Bien que la lignée cellulaire OM9 :22 ne possède pas de P53 fonctionnelle, la télomestatine permet une augmentation significative de cellules arrêtées en G1 associées à une expression de P21 et P27. (Tauchi *et al.*, 2003). La télomestatine provoque aussi une réponse de type dommage de l'ADN dans la lignée HT1080, mise en évidence par la formation de foyers γ H2AX qui colocalisent partiellement au télomère, ceci suggérant que ce ligand provoque un dysfonctionnement télomérique (Gomez *et al.*, 2006). De même, le ligand RHPS4 induit une réponse γ H2AX dans le noyau de cellules de carcinome utérin UXF1138L (Phatak *et al.*, 2007).

Cependant, il serait intéressant d'approfondir les mécanismes à l'origine du raccourcissement du simple brin télomérique en condition d'apoptose. En effet, dans les conditions où l'apoptose est inhibée par surexpression de Bcl-2 dans la lignée A549, le profil de dégradation du simple brin télomérique n'est pas modifié en comparaison avec la lignée parentale. De plus, la campthotécine, puissant inducteur d'apoptose et libérateur de ROS

n'induit pas la dégradation du simple brin télomérique. Ces résultats excluraient l'implication des espèces réactives de l'oxygène sur la dégradation du simple brin télomérique. Or le traitement par l' H_2O_2 induit la formation de TIF_S. Il serait intéressant de regarder l'effet d'un traitement par cette espèce réactive de l'oxygène sur la taille du simple brin. Dans la même optique, dans les conditions où le 12459 induit l'apoptose, quelles conséquences sur la dégradation du simple brin télomérique auraient un inhibiteur de ROS ou l'ajout de radicaux libres ?

Afin d'approfondir la question il serait intéressant de regarder si des produits actifs au niveau de la mitochondrie permettent la libération des ROS, l'induction de PPM1D et la formation de TIF_{S.}

Aussi, nous ne savons pas si d'autres ligands de l'ADN G-quadruplexe tels que la télomestatine, le Braco-19 déclenchent la formation de ces ROS et si la formation des G-quadruplexes télomériques modifie la sensibilité de l'ADN aux actions radicalaires dont les guanines sont les principales cibles (DeFedericis *et al.*, 2006).

PARTIE 3

Effet de la télomestaine sur le simple brin télomérique et sur la localisation de protéines télomériques

Introduction

La modification de la structure du simple brin télomérique par des ligands de Gquadruplexe tels que le 12459 pourrait provoquer une déstabilisation de l'association des protéines protectrices (TRF2, TIN2, POT1, ...) du télomère qui pourrait induire la dégradation du télomère et l'activation des signaux de détection des lésions de l'ADN.

En effet, les travaux de Tauchi (Tahara *et al.*, 2006) montrent que le traitement par la télomestatine, un ligand de l'ADN G-quadruplexe parmi les plus actifs, induit la délocalisation de la protéine télomérique TRF2, associée a un phénotype $\text{TRF2}^{\Delta B\Delta M}$ Toutefois, il n'existe aucune donnée indiquant si la télomestatine ou d'autres ligands spécifiques des G-quadruplexes induisent une réponse de type «dommages de l'ADN» localisée dans le noyau ou aux niveaux des télomères (TIFs), telle que celle observée lors de l'inactivation de certaines protéines télomériques (POT1, TRF2).

Le traitement par 10 μ M de 12459 induit un raccourcissement du simple brin télomérique et l'apoptose, aussi, il n'est pas exclu que le traitement par le 12459 puisse permettre la délocalisation de protéines de protection du télomère, notamment de hPOT1, protéine de fixation de la région simple brin télomérique, et déclencher une réponse de type dommage à l'ADN au niveau du télomère.

Pour répondre à cette question, les cellules A549 ont été transfectées par la construction GFP-POT1. Or l'expression de clones stables surexprimant GFP-POT1 s'est révèlée impossible, puisque les clones sélectionnés perdent très rapidement le transgène. De même nous n'avonspas pu utilisé une autre lignée, la HT1080 transfectée et surexprimant de façon stable GFP-POT1 car cette lignée ne répond pas au 12459. Ainsi, pour déterminer si des ligands de l'ADN G-quadruplexe permettent la délocalisation de la protéine hPOT 1 du télomère, nous avons choisi la lignée transfectée HT1080 ::GFP-POT1 comme modèle avec un traitement par le ligand télomestatine. Les résultats ont fait l'objet d'une publication en collaboration avec les membres de l'équipe dans la revue *Journal of Biological Chemistry* (2006).

PUBLICATION 2

Telomestatin-induced Telomere Uncapping Is Modulated by POT1 through G-overhang Extension in HT1080 Human Tumor Cells^{*}

Received for publication, June 19, 2006, and in revised form, October 16, 2006 Published, JBC Papers in Press, October 17, 2006, DOI 10.1074/jbc.M605828200

Dennis Gomez^{‡1}, Thomas Wenner^{‡1,2}, Bertrand Brassart^{‡1}, Céline Douarre^{‡1,3}, Marie-Françoise O'Donohue[§], Victoria El Khoury[§], Kazuo Shin-ya[¶], Hamid Morjani[‡], Chantal Trentesaux[‡], and Jean-François Riou^{‡4}

From the [‡]Laboratoire d'Onco-Pharmacologie, JE 2428, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 Rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France, [§]UMR CNRS 6142, Reims, France, and [¶]Institute of Molecular and Cellular Biosciences, the University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan

 $\dot{b}c$

t-loop maintenance and whose interaction with telomeres is modulated by telomestatin. We show here that the treatment of HT1080 human tumor cells by telomestatin induces a rapid decrease of the telomeric G-overhang and of the doublestranded telomeric repeats. Telomestatin treatment also provokes a strong decrease of POT1 and TRF2 from their telomere sites, suggesting that the ligand triggers the uncapping of the telomere ends. The effect of the ligand is associated with an increase of the γ -H2AX foci, one part of them colocalizing at telomeres, thus indicating the occurrence of a DNA damage response at the telomere, but also the presence of additional DNA targets for telomestatin. Interestingly, the expression of GFP-POT1 in HT1080 cells increases both telomere and G-overhang length. As compared with HT1080 cells, HT1080GFP-POT1 cells presented a resistance to telomestatin treatment characterized by a protection to the telomestatin-induced growth inhibition and the G-overhang shortening. This protection is related to the initial G-overhang length rather than to its degradation rate and is overcome by increased telomestatin concentration. Altogether these results suggest that telomestatin induced a telomere

Telomestatin is a potent G-quadruplex ligand that interacts

with the 3' telomeric overhang, leading to its degradation,

and induces a delayed senescence and apoptosis of cancer

cells. POT1 and TRF2 were recently identified as specific

telomere-binding proteins involved in telomere capping and

dysfunction in which G-overhang length and POT1 level are important factors but also suggest the presence of additional DNA sites of action for the ligand. Telomeres play an important role in structural chromosome integrity. They cap and protect their extremities from illegitimate recombination, degradation, and end-to-end fusion (1). Telomere replication is sustained in proliferative somatic cells and in most cancer cells by telomerase, a ribonucleoprotein complex that elongates the chromosome ends to compensate losses occurring at each cell division, because of the inability of polymerase to fully replicate telomeric extremities (2). In somatic cells, the absence of telomerase provokes a progressive shortening of telomeric DNA that ultimately leads to replicative senescence, once a critical telomere length has been reached (3). Numerous observations, notably that inhibition of telomerase activity limits tumor cell growth (4), have led to the proposal that telomere and telomerase are potential targets for cancer chemotherapy (3, 5).

In human, telomeres consist of the repetition of the G-rich duplex sequence 5'-TTAGGG-3'. A G-rich 3'-strand extends beyond the duplex to form a 130–210-base overhang (G-overhang) (6, 7). Telomeres may be structurally organized in different conformations together with several telomere-associated proteins, such as TRF1, TRF2, and POT1 (8). The G-overhang is either accessible for telomerase extension in an open state or inaccessible in a capped (or closed) conformation that involves the formation of a putative t-loop structure (8). Although the t-loop structure has not been defined in detail, it may be created by the invasion of the G-overhang into the duplex part of the telomere (9). The t-loop structure is induced *in vitro* by the binding of TRF2 in the vicinity of the telomeric G-overhang (10).

Telomeric proteins stabilize the telomere by protecting the single-stranded G-overhang from degradation (8). Uncapping of the telomere ends leads to telomeric dysfunction characterized by end-to-end fusion, inappropriate recombination, anaphase bridges, and G-overhang degradation that either lead to apoptosis or senescence (11–13).

A dominant negative mutant of TRF2, TRF2^{$\Delta B\Delta M$}, displaces TRF2 and its interacting factors off the telomeres and causes a loss of telomeric overhangs, apoptosis, senescence, and chromosome abnormalities (8). POT1 (protection <u>of t</u>elomere 1) binds specifically to the single-stranded G-overhang (14) and has been described as a regulator of telomere length (15, 16). POT1 has been found associated with the double-stranded telomeric DNA protein TRF1 and TRF2 through the bridging proteins PTOP/ TINT1/PIP1 and TIN2 (17). Suppression of POT1 function by RNA interference in human cells leads to the loss of the telo-

^{*} This work was supported in part by the "Association pour la Recherche Contre le Cancer" Grant 3644 and by the "Ligue Nationale Contre le Cancer, Equipe Labelisée 2006 (to 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.

S The on-line version of this article (available at http://www.jbc.org) contains supplemental Figs. S1–S8.

¹ These authors contributed equally to this work.

² Supported by a postdoctoral fellowship granted by the "Région Champagne-Ardenne."

³ Supported by a doctoral fellowship granted by the "Association pour la Recherche Contre le Cancer."

⁴ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 33-3-26-91-80-13; Fax: 33-3-26-91-89-26; E-mail: jean-francois.riou@univ-reims.fr.

meric single-stranded overhang, induced apoptosis, senescence, and chromosomal instability in human cells (18, 19).

Because of the repetition of guanines, the G-overhang is prone to form a four-stranded G-quadruplex structure that has been shown to inhibit telomerase activity in vitro (20). Small molecules that stabilize the G-quadruplex are effective as telomerase inhibitors (21-24), and several series have been reported to date to induce replicative senescence after long term exposure to tumor cell cultures (25–29). Among them, the natural product telomestatin is one of the most active and selective telomeric G-quadruplex ligands (30-32). We have shown recently that telomestatin impairs the conformation and the length of the telomeric G-overhang, an effect that is thought to be more relevant than double-stranded telomere erosion as a marker for its cellular activity (33). Telomestatin also inhibits POT1 to the telomeric G-overhang in vitro and induces GFP-POT1 dissociation from telomeres in EcR293 cells (34). In tumor cells, telomestatin was shown to completely dissociate TRF2 from telomeres, a result thought to be the consequence of the t-loop disruption (35).

In this study we have investigated the effect of telomestatin treatment in the tumor cell line HT1080. Our results indicate that G-quadruplex stabilization provokes the rapid degradation of both G-overhang and telomere together with the delocalization of GFP-POT1 and TRF2 from telomeres. DNA damage response is induced by telomestatin, which is partially localized at telomeres. The expression of GFP-POT1 in HT1080 induces the lengthening of the G-overhang and partially protects cells from telomestatin-induced G-overhang degradation and senescence induction. These data confirm the importance of POT1 and G-overhang in the action of telomestatin but suggest the presence of additional DNA sites of action.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Oligonucleotides and Compounds—All oligonucleotides were synthesized and purified by Eurogentec (Seraing, Belgium). Telomestatin was purified according to Ref. 31. Other compounds were commercially available (Sigma). Telomestatin was prepared at 5 mM in MeOH/Me₂SO (50:50). Further dilutions were made in water.

Plasmids—Full-length hPOT1 was cloned into the pET22b expression vector by PCR using the Marathon testis cDNA library (Clontech). The cDNA was completely sequenced and corresponded to the sequence previously released (14). This construct contained an N-terminal T7 sequence allowing its coupled transcription/transcription. The GFP-POT1 plasmid was constructed by insertion of the POT1 cDNA after PCR amplification from pET22bPOT1 vector at BamHI-XbaI of the pEGFP-C1 plasmid (Clontech). The Δ OB-POT1 and TRF2 sequences were cloned by PCR from POT1 and TRF2 cDNAs (a gift from E. Gilson, ENS, Lyon, France), using *pfu* polymerase and inserted in the cloning sites of a pCDNA3 vector.

Cell Culture and Transfection—HT1080 was obtained from the ATCC. Cells were grown in DMEM⁵ with 100 units of penicillin and 0.1 mg of streptomycin per ml and 10% fetal bovine serum (Invitrogen). 70–80% confluence cells were transfected with 5 μ g of plasmid in Lipofectamine 2000 complex in fetal bovine serum and antibiotic-free DMEM according to the manufacturer (Invitrogen). The media were replaced after 24 h, and the cells were grown in DMEM with 100 units of penicillin and 0.1 mg of streptomycin/ml containing 400 μ g/ml of geneticin. After 15 days of geneticin selection, GFP-positive cells were sorted by fluorescence-activated cell sorter.

For long term cell growth studies, transfected cells were seeded at 15×10^3 cells/ml into a 25-cm² tissue culture flask, in the presence or the absence of telomestatin (2 μ M), cultured for 4 days, then trypsinized, and counted. At each passage, 15×10^3 cells/ml were replated into a new culture flask with fresh medium containing drug solution. Results were expressed as the cumulated population doubling as a function of the time of culture as described previously (36).

Immunofluorescence—For immunofluorescence microscopy, HT1080-GFP-POT1 cells plated on glass coverslips were permeabilized in 0.5% Triton X-100/PBS and fixed with 3% paraformaldehyde. Cells were then washed twice in PBS and treated with permeabilization buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 300 mM sucrose, and 0.5% Triton X-100), washed twice with PBS followed by antibody staining with 1 ng/µl TRF2 4A794 mouse monoclonal antibody (Upstate Biotechnology, Inc.) or TRF2 H-300(sc-9142) rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology), and/or 2 ng/µl antiphospho- γ H2AX (Ser-139) (Upstate Biotechnology) in 0.5% Triton X-100/PBS. The nuclear DNA was stained with 1 µM Hoechst. Secondary antibodies raised against mouse were labeled with Alexa 568 (Molecular Probes), and those raised against rabbit were labeled with Alexa 488 (Molecular Probes).

We obtained images of fixed cells using a $100 \times (NA \ 1.4)$ plan apochromat objective mounted on a piezo translator (Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany) and imaged with a Coolsnap HQ camera controlled by Metamorph software (Roper Scientific, Duluth, GA). Appropriate excitation and emission filters placed in two filter wheels driven by a Lambda 10-2 controller (Sutter Instruments, Novato, CA) were combined to specific double or triple band dichroic filters (Chroma Technology, Rockingham, VT). Stacks of 60–100 images (12-bit grayscale) were acquired with a *z*-step of 0.12 μ m with a low illumination intensity to avoid photo-bleaching. For data processing, experimental point spread functions were obtained from infra-resolution fluorescent microspheres emitting at specific wavelengths (Molecular Probes), whose stacks were acquired in the same sampling conditions as those used for the volumes to be analyzed. Deconvolution was performed with Metamorph software on a 2.4-GHz Dell computer equipped with a GeForce4 Ti 4800 Se Winfast A280 video card (Leadtek Research Inc., Almere, The Netherlands).

G-overhang Assays—The nondenaturing hybridization assay to detect the 3' telomere G-overhang was performed as described previously on 2.5- μ g aliquots of undigested genomic DNA using a labeled 5'-CCCTAACCCTAACCCTAACCC-3' oligonucleotide (21C) (33). The procedure allows detection of the amount of single strand overhang available for hybridization. Experiments were performed either on genomic DNA

⁵ The abbreviations used are: DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; GFP, green fluorescent protein; PBS, phosphate-buffered saline; ChIP, chromatin immunoprecipitation.

from treated cells or on purified genomic DNA treated *in vitro* with telomestatin, as indicated in the text.

TRF Analysis—Aliquots of 5 µg of undigested genomic DNA were hybridized at 37 °C overnight with 0.5 pmol of $[\gamma^{-32}P]$ ATP-labeled (5'-(CCCTAA)₃CCC-3') oligonucleotide in hybridization buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol) in the presence of RsaI and HinfI restriction enzymes in a volume of 20 μ l. Reaction was stopped with 2 µl of 1%SDS, 1 mg/ml proteinase K and incubated for 30 min at 50 °C. Hybridized samples were size-fractionated on 0.8% agarose gels in $1 \times$ TBE buffer. The gels were stained with ethidium bromide, washed, and dried on Whatman filter paper. Ethidium fluorescence and radioactivity were scanned in a PhosphorImager (Typhoon 9210, Amersham Biosciences). Telomeric smears were revealed by exposure in a PhosphorImager (Typhoon 9210, Amersham Biosciences), and the mean length of the TRF corresponds to the peak of the integration curve from three separate experiments.

Chromatin Immunoprecipitations (ChIP)—ChIP was performed according to the manufacturer's procedure (Upstate Biotechnology) using TRF2 antibody (H-300; Santa Cruz Biotechnology). Telomeric sequences in immunoprecipitates were evidenced by PCR amplification according to a method described previously (37). The final telomere primer concentrations were 270 nM (tel1) and 900 nM (tel2), and PCR amplification was subjected to 35 cycles of 95 °C for 15 s, 54 °C for 2 min. The primer sequences were as follows: tel1 5'-GGTTTT-TGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3' and tel2

5'-TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-

RESULTS

Telomestatin Induces a Decrease of the Telomeric G-overhang in HT1080 Cells—Recent studies have indicated that the telomeric G-overhang represents one of the direct targets of quadruplex ligands (33, 38). We analyzed the effect of telomestatin on the telomeric G-overhangs from HT1080 cells. As shown before, hybridization of a telomeric C-rich probe (21C) under nondenaturing conditions allowed the measurement of the relative single-stranded G-overhang signal in undigested genomic DNA samples (33).

Treatment of HT1080 cells with 1, 2, and 5 μ M telomestatin for 48 h induces a dose-dependent decrease of the G-overhang signal, which represents 32, 15, and 10% of the untreated control, respectively (Fig. 1, *A* and *C*).

Previous results with telomestatin in A549 cells (33) indicate that the apparent decrease in *G*-overhang signal may result from the stabilization of the quadruplex, making it less prone to hybridization to its complementary *C*-rich probe. To exclude this possibility, we performed the following experiment: telomestatin (1–5 μ M) was added to purified DNA just prior to the hybridization reaction. This results in a nearly complete inhibition of the *G*-overhang signal (Fig. 1, *B* and *C*). The inhibition is almost completely reversed in the presence of another *G*-quadruplex competitor (Pu22myc) that traps the ligands, leaving the overhang free for hybridization with 21*C* probe (Fig. 1, *B* and *C*).



FIGURE 1. Effect of telomestatin on the telomeric G-overhang in HT1080 cells and in vitro on purified genomic DNA, evaluated by nondenaturing solution hybridization with 21C telomeric probe (CCC(TAACCC)₃). A, telomestatin (1–5 μ M) induced a strong decrease of the 3' G-overhang signal in HT1080 cells treated with the ligand for 48 h, as compared with control untreated cells. A competition with Pu22myc (10 µM) barely reverses the hybridization inhibition, indicating a degradation of the G-overhang in HT1080-treated cells. G-overhang, signal of the gel with the CCC(TAACCC)₃ probe; *Et-Br*, ethidium bromide staining of the gel. *B*, telomestatin $(1-5 \mu M)$ inhibits in vitro the hybridization reaction to the G-overhang from purified HT1080 DNA. A competition with Pu22myc (10 μ M) reverses the hybridization inhibition. G-overhang, signal of the gel with the CCC(TAACCC)₃ probe; Et-Br, ethidium bromide staining of the gel. C, quantification of the telomestatin effect against purified HT1080 DNA and in HT1080-treated cells, with or without competition with Pu22myc. G-overhang hybridization signal is normalized relative to the EtBr signal. The results are expressed relative to untreated DNA (defined as 100%) and corresponded to the mean \pm S.D. of three independent experiments, including those presented in B and C.

To determine the real degradation of the G-overhang induced by telomestatin in HT1080 cells, in this study we used the competition with Pu22myc on DNA samples from telomestatin-treated HT1080 cells. Results indicated a limited reversion (\sim 15%) of the G-overhang signal decrease (Fig. 1, *A* and *C*, compare with reactions in the absence of Pu22myc). Therefore, we concluded that the G-overhang signal loss in HT1080-

The Journal of Biological Chemistry

ibc

DECEMBER 15, 2006 • VOLUME 281 • NUMBER 50





FIGURE 2. Telomestatin alters the GFP-POT1 and TRF2 localization at telomeres in HT1080 cells. Effect of telomestatin (2 μ M) on GFP-POT1 in HT1080 cells treated for 48 h. Fluorescence for GFP-POT1 (green), TRF2 (red), and Hoechst (blue) was determined on fixed cells. GFP-POT1 and TRF2 signals colocalize in control untreated cells. Telomestatin treatment induces a strong decrease of the telomeric sites of GFP-POT1 fluorescence and also induces a decrease of the TRF2 fluorescence.

treated cells mainly corresponds to an effective degradation of the telomeric G-overhang in vivo.

Treatment with Telomestatin Delocalizes Telomeric POT1 in Human Cell Lines-To examine the effects of telomestatin treatment on the binding of POT1 to telomeres in cultured cells, we have designed a GFP-POT1 vector that was transfected in HT1080 cells. As reported previously (15, 34), GFP-POT1 overexpression in telomerase-positive cells results in telomere length elongation (supplemental Fig. S1), suggesting that the N-terminal fusion with GFP does not alter the functional property of the fusion protein to transduce telomere extension.

To localize GFP-POT1 in HT1080 cells, a co-localization experiment has been performed on fixed cells by confocal microscopy using a TRF2 antibody. As shown in Fig. 2, GFP-POT1 colocalizes with almost all the TRF2 dots, suggesting that GFP-POT1 protein is present at telomeres in HT1080 cells. Thus, cells expressing GFP-POT1 fusion protein may be used as a model to investigate the effect of telomestatin on POT1 localization. HT1080 cells expressing GFP-POT1 have been treated for 48 h with 2 μ M telomestatin (Fig. 2), a concentration and time exposure with the ligand at which most of the cells are still viable, because the IC_{50} values for 2 and 4 days of treatment were equal to 5 and 1.5 μ M, respectively. Microscopic examination of treated cells indicated a dramatic change in the nuclear organization of GFP-POT1. Telomestatin strongly reduced the GFP-POT1 punctated signal associated with telomeres to nearly undetectable levels, as compared with untreated controls (Fig. 2).

The dose-dependent effect of telomestatin was also studied in HT1080GFP-POT1 cells after 48 h of treatment (supplemental Fig. S2). At 0.5 µM telomestatin, no obvious decrease or modification of the GFP-POT signal was detectable in >90% of the cells. At 1 µM, a decrease of telomeric GFP-POT1 fluorescence was observed in 20-30% of the cells. The main effect of the ligand, i.e. a decrease of the telomeric GFP-POT1 fluorescence, was detectable at 2 μ M in about 50–60% of the cells. In addition, a significant fraction of the cells (25-30%) presented a nucleolar localization of GFP-POT1. At 5 μ M, a telomestatin concentration that significantly impaired the growth of the cells and induced apoptosis (supplemental Fig. S3), nearly all surviving cells presented a complete loss of the GFP-POT1 telomeric signal and a strong nucleolar accumulation, as well as a marked cytoplasmic GFP-POT1 accumulation (supplemental Fig. S2).

Telomestatin Impairs TRF2 Binding at Telomeres and Decreases Telomere Length in HT1080 Cells-To examine whether the delocalization of POT1 is a consequence of a general effect on the telomere structure, we have determined the effect of telomestatin on TRF2 localization. Telomestatin treatment of HT1080 cells (2 µM, 48 h) induced a noticeable decrease of the TRF2 signal at telomeres (Fig. 2) that paralleled the effect of telomestatin on GFP-POT1.

The telomestatin effect was also evaluated by ChIP experiments using TRF2 antibodies. In these experiments, the immunoprecipitated telomere sequences were evaluated by specific PCR amplification, as described previously (37). ChIP experiments indicate that telomestatin (2 μ M, 48 h) provokes the removal of an important fraction of TRF2 from telomeric sequences, in agreement with the immunofluorescence results (supplemental Fig. S4).

The effect of the ligand on TRF2 suggests that either the double-stranded telomeric repeats or the t-loop conformations have been altered. We have thus determined the effect of telomestatin to decrease the length of the double-stranded telomere. Interestingly, the exposure of HT1080 cells to telomestatin (2 μ M) induces a rapid telomere shortening detectable after short term treatment (supplemental Fig. S5A). The TRF decrease corresponds to 300 and 600 bases after 4 and 8 days, respectively (supplemental Fig. S5B). These results indicate that telomestatin also induces a dramatic and rapid alteration of the doublestranded telomere repeats and TRF2 binding to telomeres in addition to the G-overhang degradation and the GFP-POT1 delocalization.

Telomestatin Induces an Early DNA Damage Response at Telomeres-Telomere-initiated senescence or dysfunctional telomeres have been shown to be associated with a DNA damage response involving factors such as 53BP1 and γ H2AX (17, 39). The rapid effect of telomestatin to trigger telomere degradation together with POT1 and TRF2 removal may suggest the induction of a DNA damage response at telomeres. To study such DNA damage, we used yH2AX immunofluorescence after short term treatment with the ligand. As shown in Fig. 3A, telomestatin treatment induces a marked DNA damage response evidenced by a strong increase in the γ H2AX foci. The effect started at 0.5 μ M telomestatin and reaches nearly all cells in the presence of 2 µM telomestatin (Fig. 3, A and B). We have also determined the colocalization of γ H2AX foci in HT1080GFP-POT1 with telomeric GFP-POT1 under telomestatin treatment. As shown in Fig. 3B, treatment with telomestatin 0.5 μ M mainly triggers a DNA damage response outside from the telomeric foci. Only a fraction of the

The Journal of Biological Chemistry



FIGURE 3. DNA damage response at telomere after telomestatin treatment in HT1080 cells. A, telomestatin induces a DNA damage response in HT1080 cells. Immunofluorescence for yH2AX (red) and Hoechst fluorescence (blue) in untreated (control) or cells treated for 48 h with 2 μ M telomestatin (+ Telo). B, merge fluorescence for γH2AX (red), GFP-POT1 (green), and Hoechst (blue) in untreated (control) or cells treated for 48 h with 0.5 µM telomestatin (+ Telo). Telomestatin induced a partial colocalization of γ H2AX and GFP-POT1 foci, as compared with untreated cells. Co-localized sites of DNA damage at telomere are indicated by arrowheads. C, number of yH2AX-GFPPOT1 colocalizing foci in HT1080 cells treated by telomestatin (0.5–2 μ M). Telomestatin significantly induced a 2.5-fold increase of colocalizing foci, as compared with untreated control cells by the statistical Wilcoxon test. Number of counted nuclei is 13, 23, 21, and 27 for 0, 0.5, 1, and 2 μM telomestatin, respectively. D, immunofluorescence for yH2AX (red) and Hoechst fluorescence (blue) of an HT1080 cell in metaphase after 48 h of treatment with telomestatin (2 μ M). Enlarged image on the *right* shows the sites of DNA damage at the extremity of a mitotic chromosome.

total γ H2AX foci colocalizes with GFP-POT1 in treated cells (indicated by *arrowheads* in Fig. 3*B*). The γ H2AX and GFP-POT1 colocalization is significantly increased by 2.5-fold (p < 0.01), as compared with controls, in cells treated with 0.5, 1, or 2 μ M telomestatin, where the GFP-POT1 telomeric signal is still detectable (Fig. 3*C*). However, in cells treated with 5 μ M telomestatin, the analysis was not possible, because of the complete delocalization of the GFP-POT1 protein (see supplemental Fig. S2). These results have been confirmed by Telo-fluorescence *in situ* hybridization experiments using a telomeric fluorescein isothiocyanate-peptidic nucleic acid probe to determine the localization of γ H2AX foci in telomestatin-treated HT1080 cells (supplemental Fig. S6). Analysis of HT1080 cells treated with telomestatin also showed that in some metaphases the γ H2AX response is observed at the extremities of chromosomes, in agreement with a response at telomeres (Fig. 3*D*).

These results suggest that telomestatin is able to induce an early and massive DNA damage response. Interestingly, only a fraction of this response was observed at telomeres, suggesting other sites of action for the ligand throughout the genome.

Overexpression of GFP-POT1 Increases G-overhang and Partially Protects Cells from Telomestatin Effects-POT1 was shown to be essential for telomere capping and allowed us to regulate potential G-quadruplex structures formed at the telomeric G-overhang in vitro (19, 40). Overexpression of POT1 may protect or modulate the telomere dysfunction induced by G-quadruplex ligands. We have therefore examined whether the overexpression of GFP-POT1 modulates the cellular effects of telomestatin. Treatment of HT1080GFP cells with telomestatin (0.5 μ M) induced a delayed cell growth arrest after four population doublings, followed by cell death at day 8 (Fig. 4A). Interestingly, HT1080GFP-POT1 cells presented a noticeable resistance to the effect of telomestatin because the growth arrest is not observed after 16 days corresponding to six additional populations doublings (Fig. 4A). In contrast, treatment of HT1080GFP and HT1080GFP-POT1 cells with higher telomestatin concentrations (2, 5, and 10 μ M) did not induce noticeable differences in the cytotoxic response after 4 days (result not shown). These results suggest that GFP-POT1 expression partially protects HT1080 cells from the antiproliferative effects of the ligand. As a control, doxorubicin treatment of the cell lines does not indicate significant resistance in HT1080GFP-POT1 cells, as compared with HT1080GFP (supplemental Fig. S7). In contrast, HT1080GFP-POT1 cells displayed resistance to the effect of another G-quadruplex ligand, steroid FG,⁶ indicating selectivity to this class of agents as compared with other DNA-damaging agents (supplemental Fig. S8).

To determine whether this partial protection corresponds to a difference in the effect of telomestatin at telomeres, we then analyzed the G-overhang degradation in these two cell lines. We first noticed that the G-overhang signal measured in HT1080GFP-POT1 was found increased by 270%, as compared with HT1080GFP cells, indicating that the overexpression of POT1 has a positive regulatory effect on the G-overhang length (Fig. 4, B and C). Treatment of HT1080GFP-POT1 and HT1080GFP cells with telomestatin for 48 h induces a dose-dependent 2-fold reduction of the G-overhang signal (Fig. 4C). Interestingly, the remaining G-overhang signal in HT1080GFP-POT1-treated cells is 2.1-2.4-fold higher than in treated HT1080GFP cells. Therefore, although the degradation rate induced by telomestatin is nearly equivalent in these two cell lines, the residual value of the G-overhang signal after telomestatin

ibc



⁶ The characterization of this new G-quadruplex ligand will be described elsewhere.



FIGURE 4. Expression of GFP-POT1 in HT1080 cells induced a protection to senescence induction and G-overhang degradation by telomestatin. *A*, proliferation curves of HT1080 cells transfected with GFP or GFP-POT1 in the absence (*open* and *closed circle*, respectively) or presence of telomestatin (0.5μ M) (*open* and *closed triangle*, respectively). A growth arrest of the culture of HT1080-GFP cells appears at day 8, and HT1080-GFPPOT cells continue growth up to 16 days, indicating a protection to the antiproliferative effects of telomestatin. *B*, increased G-overhang signal of HT1080 cells transfected with GFP-POT1, as compared with HT1080-GFP cells, evaluated by nondenaturing solution hybridization with 21C telomeric probe (CCC(TAACCC)₃). *C*, G-overhang signal of HT1080 cells transfected with GFP-OT1 in the absence or treated with telomestatin (0.1 and 0.2μ M) for 48 h. G-overhang signal is normalized relative to the EtBr signal for each loading. Results are expressed relative to untreated DNA samples from HT1080-GFP cells (defined as 100%) and correspond to mean \pm S.D. of three independent experiments.

treatment is higher in GFP-POT1-transfected cells, because of its higher initial value. These data suggest a direct relationship between the G-overhang length and the biological activity of G-quadruplex ligands rather than protection induced by GFP-POT1 to explain the partial resistance to telomestatin.

Overexpression of ΔOB -POT1 Increases G-overhang and Partially Protects Cells from Telomestatin *Effects*—The overexpression of $\Delta OB-POT1$ was also shown to increase telomere lengthening, and this mutant has been considered to function as a dominant negative for POT1 that deregulated the control of TRF1 to inhibit telomerase activity (16). EcR293 cells transfected by $\Delta OB-POT1$ present a telomere lengthening and an increased G-overhang signal (Fig. 5). A noticeable resistance to the long term proliferation inhibition by telomestatin was also observed, as compared with EcR293GFP control cells. Interestingly, EcR293 cells transfected by TRF2 do not present resistance to the telomestatin effect nor an increased G-overhang length. Treatment of transfected cells by telomestatin (48 h) also rapidly reduced the G-overhang signal by 2-fold. However, the remaining G-overhang signal was about 3-fold higher in treated ΔOB -POT1 cells than in GFP- and TRF2-tranfected cells. These data confirm that telomestatin resistance is related to a modification of the G-overhang length rather than to a direct effect of POT1.

DISCUSSION

Our results show that telomestatin induces a rapid degradation of the telomeric G-overhang and the double-stranded telomeric repeats. As a consequence, the telomeric localization of POT1 and TRF2 in HT1080 cells is also dramatically modified by telomestatin treatment. The alteration of the telomeric G-overhang conformation leading to its degradation has been reported recently in different cell lines for several G-quadruplex ligands, including telomestatin (33, 35, 38, 41). Such rapid degradation of the telomeric ends contrasts with the initial concept of action of these

ligands, designed to inhibit telomerase activity and to induce a progressive shortening of the double-stranded telomere repeats (42). The growing number of reports of their particular behavior rather suggests that they represent a new class of telomere targeting agents that provokes a telomere dysfunc-

The Journal of Biological Chemistry

ibc





FIGURE 5. Expression of Δ OB-POT1 but not TRF2 in EcR293 cells induced a protection to senescence induction and G-overhang degradation by telomestatin. *A*, proliferation curves of EcR293 cells transfected with GFP (control, *open circle*), TRF2 (*open triangle*), or DOB-POT1 (*open square*) in the absence or presence of telomestatin (0.5 μ M) (*open* and *closed symbols*, respectively). A growth arrest of the culture of EcR293-GFP and EcR293-TRF2 cells appears between days 14 and 17, whereas EcR293-DOB-POT1 cells continue growth up to 32 days, indicating a protection to the antiproliferative effects of telomestatin. *B*, G-overhang signal of EcR293 cells transfected with GFP, TRF2, or DOB-POT1 in the absence or treated with telomestatin (1 μ M) for 48 h. G-overhang signal is normalized relative to the EtBr signal for each loading. Results are expressed relative to untreated DNA samples from HT1080-GFP cells (defined as 100%) and correspond to mean \pm S.D. of three independent experiments.

tion. They mimic the effect of the inactivation of key components of the shelterin complex, including POT1 and TRF2.

Interestingly, the extent of the telomere dysfunction varies between cell lines. Telomestatin was recently shown to completely dissociate TRF2 from telomere in cancer cells but not in normal or immortalized cells (35). We also showed that telomestatin provokes the delocalization of GFP-POT1, but not of TRF2, from telomeres in an immortalized cell line (34). The effect of telomestatin in this cell line was related to the G-overhang degradation and to the property of the ligand to inhibit POT1 binding to the telomeric G-overhang. Indeed, the G-overhang degradation induced by telomestatin in HT1080 cells is sufficient to explain GFP-POT1 delocalization. However, because TRF2 is a double-stranded telomere-binding protein, its removal from telomeres observed in HT1080 cells not only results in the disruption of the t-loop, where the G-overhang is engaged with a fraction of TRF2, but also in the elimination of double-stranded telomeric sequences, in agreement with the telomere shortening observed with the TRF experiments. Several additional mechanisms other than the G-overhang erosion or the t-loop destruction are possibly involved in order to explain this dramatic telomere and TRF2 loss.

Double-stranded telomere shortening may result from a stalling of the lagging-strand replication fork by the stabilization of G-quadruplexes. In that case, a failure to solve the stalled replication forks will induce DNA double strand breaks and the loss of telomeric sequences. The inactivation of WRN helicase, a RecQ DNA helicase, in WS cells was reported to induce a preferential loss of the lagging strand of telomeres (43). Because WRN activity on telomeric sequence was also found sensitive to the effect of G-quadruplex ligands, the inhibition of this helicase may induce the telomere loss during replication (44).

We have also found that telomestatin provokes a DNA damage response in HT1080-treated cells. The DNA damage response is induced at telomestatin concentrations where an important fraction (40-50%) of the telomeric G-overhang is degraded. A fraction of the yH2AX foci is localized at telomere in HT1080GFP-POT1 cells, indicating that a telomeric dysfunction is induced by the ligand. However, because telomestatin provokes the delocalization of GFP-POT1 and TRF2 and because an important fraction of telomeres remains with a significant GFP-POT1 signal, it is difficult to establish a direct relationship between telomere degradation and DNA damage. Our results indicate that an important fraction of the γ H2AX response is not colocalized at telomeres. It is possible that one part of these DNA damage foci corresponds to GFP-POT1 uncapped telomeres. On the other hand, recent analysis of the genome composition has identified many G-quadruplex-forming sequences outside telomeres (45, 46). Because telomestatin does not discriminate between telomeric and other species of G-quadruplex, such as c-myc (47), it is possible that these foci correspond to DNA damage during replication of these G-quadruplex-forming loci. In agreement, preliminary experiments indicate that PCR amplification of the rDNA locus is highly sensitive to the effect of telomestatin.⁷

Because telomestatin causes cellular effects analogous to those due to dysfunctional telomeric proteins and because POT1 regulates *in vitro* the G-quadruplex conformation at telomeric sequences (40), we have speculated that telomestatin effects may be modulated by GFP-POT1 expression in HT1080 cells. Our results indicate that this is partially true at a low telomestatin concentration (0.5 μ M), where the growth arrest is delayed after several population doublings. Interestingly, this partial resistance is because of an increased initial G-overhang length in HT1080GFP-POT1 cells rather than to a difference in the rate of the G-overhang degradation induced by telomestatin.

The use of a dominant negative POT1 lacking the two OBfold domains that interact with the G-overhang also provokes a

 \dot{b}_{c}



⁷ P. Della-Gaspera and C. Trentesaux, unpublished results.

G-overhang signal increase in EcR293 cells, as well as telomere lengthening (Ref. 16 and results not shown). Interestingly, a resistance phenotype to telomestatin is also observed in this transfected cell line, confirming that G-overhang length rather that a direct effect of POT1 is responsible for the long term resistance to the ligand.

The up-regulation of the G-overhang was also observed in a cellular clone (JFD9) selected for resistance to 12429, a G-quadruplex ligand from the triazine series (38, 48). In this cell line, the G-overhang signal corresponds to 150% of that measured in parental A549 cells,⁸ thus emphasizing the relationship between the G-overhang length and the biological activity of the ligand. The overexpression of POT1 or Δ OBPOT1 also increases the double-stranded telomere length of the transfected cells. It is possible that the increased TRF may contribute to the resistance to the senescence induced by the ligand, as already observed in the JFA2 cell line selected for resistance to 12459 that presents cross-resistance to telomestatin (36).

Our data also indicate that the G-overhang length is not the unique factor that controls the cytotoxic effect of telomestatin, because increased concentrations of the ligand are able to overcome the resistance at short term and because DNA damage foci are also observed outside of the telomeres.

In conclusion, our results show that the G-quadruplex ligand telomestatin induces a telomere dysfunction associated with telomere erosion that dissociates POT1 and TRF2 from their telomeric sites. The G-overhang length is also modulated by GFP-POT1 expression and represents one of the factors that modulate the cellular effects of the ligand. However, the important DNA damage response outside the telomeres indicates that telomestatin also presents additional DNA targets that require further attention.

Acknowledgments—We thank Dr. A. Londono-Vallejo for helpful discussions; Dr. J. M. Millot for help in statistical analysis; P. Koebel for technical help in cell sorting; H. Kaplan for video microscopy facilities; and J. Macadré for technical help in cell culture.

REFERENCES

The Journal of Biological Chemistry

- 1. Blackburn, E. H. (2001) Cell 106, 661-673
- 2. McEachern, M. J., Krauskopf, A., and Blackburn, E. H. (2000) *Annu. Rev. Genet.* **34**, 331–358
- 3. Shay, J. W., and Wright, W. E. (2002) Cancer Cell 2, 257-265
- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., and Weinberg, R. A. (1999) *Nature* 400, 464–468
- 5. Neidle, S., and Parkinson, G. (2002) Nat. Rev. Drug Discov. 1, 383–393
- 6. Makarov, V. L., Hirose, Y., and Langmore, J. P. (1997) Cell 88, 657-666
- Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D., and Shay, J. W. (1997) *Genes Dev.* 11, 2801–2809
- Smogorzewska, A., and De Lange, T. (2004) Annu. Rev. Biochem. 73, 177–208
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999) *Cell* 97, 503–514
- 10. Stansel, R. M., de Lange, T., and Griffith, J. D. (2001) *EMBO J.* **20**, 5532–5540
- Blackburn, E. H., Chan, S., Chang, J., Fulton, T. B., Krauskopf, A., McEachern, M., Prescott, J., Roy, J., Smith, C., and Wang, H. (2000) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 65, 253–263

⁸ C. Douarre, unpublished results.

- 12. Li, G. Z., Eller, M. S., Firoozabadi, R., and Gilchrest, B. A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 527–531
- 13. Karlseder, J., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002) *Science* **295**, 2446-2449
- 14. Baumann, P., and Cech, T. R. (2001) Science 292, 1171–1175
- 15. Colgin, L. M., Baran, K., Baumann, P., Cech, T. R., and Reddel, R. R. (2003) *Curr. Biol.* **13**, 942–946
- 16. Loayza, D., and de Lange, T. (2003) Nature 25, 1013-1018
- 17. de Lange, T. (2005) Genes Dev. 19, 2100-2110
- Veldman, T., Etheridge, K. T., and Counter, C. M. (2004) Curr. Biol. 14, 2264–2270
- Yang, Q., Zheng, Y. L., and Harris, C. C. (2005) Mol. Cell. Biol. 25, 1070-1080
- Zahler, A. M., Williamson, J. R., Cech, T. R., and Prescott, D. M. (1991) *Nature* 350, 718–720
- Sun, D., Thompson, B., Cathers, B. E., Salazar, M., Kerwin, S. M., Trent, J. O., Jenkins, T. C., Neidle, S., and Hurley, L. H. (1997) *J. Med. Chem.* 40, 2113–2116
- Perry, P. J., Read, M. A., Davies, R. T., Gowan, S. M., Reszka, A. P., Wood, A. A., Kelland, L. R., and Neidle, S. (1999) *J. Med. Chem.* 42, 2679–2684
- Mergny, J. L., Lacroix, L., Teulade-Fichou, M. P., Hounsou, C., Guittat, L., Hoarau, M., Arimondo, P. B., Vigneron, J. P., Lehn, J. M., Riou, J. F., Garestier, T., and Helene, C. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3062–3067
- Koeppel, F., Riou, J. F., Laoui, A., Mailliet, P., Arimondo, P. B., Labit, D., Petitgenet, O., Helene, C., and Mergny, J. L. (2001) *Nucleic Acids Res.* 29, 1087–1096
- Duan, W., Rangan, A., Vankayalapati, H., Kim, M. Y., Zeng, Q., Sun, D., Han, H., Fedoroff, O. Y., Nishioka, D., Rha, S. Y., Izbicka, E., Von Hoff, D. D., and Hurley, L. H. (2001) *Mol. Cancer Ther.* **1**, 103–120
- 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
- Riou, J. F., Guittat, L., Mailliet, P., Laoui, A., Renou, E., Petitgenet, O., Megnin-Chanet, F., Helene, C., and Mergny, J. L. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 2672–2677
- Kim, M. Y., Gleason-Guzman, M., Izbicka, E., Nishioka, D., and Hurley, L. H. (2003) *Cancer Res.* 63, 3247–3256
- Tauchi, T., Shin-Ya, K., Sashida, G., Sumi, M., Nakajima, A., Shimamoto, T., Ohyashiki, J. H., and Ohyashiki, K. (2003) Oncogene 22, 5338–5347
- 30. Rosu, F., Gabelica, V., Shin-ya, K., and De Pauw, E. (2003) *Chem. Commun.* (*Camb.*) **21**, 2702–2703
- 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
- 32. Kim, M. Y., Vankayalapati, H., Shin-Ya, K., Wierzba, K., and Hurley, L. H. (2002) *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 2098–2099
- Gomez, D., Paterski, R., Lemarteleur, T., Shin-Ya, K., Mergny, J. L., and Riou, J. F. (2004) J. Biol. Chem. 279, 41487–41494
- Gomez, D., O'Donohue, M.-F., Wenner, T., Douarre, C., Macadré, J., Koebel, P., Giraud-Panis, M. J., Kaplan, H., Kolkes, A., Shin-Ya, K., and Riou, J. F. (2006) *Cancer Res.* 66, 6908–6912
- Tahara, H., Shin-Ya, K., Seimiya, H., Yamada, H., Tsuruo, T., and Ide, T. (2006) Oncogene 25, 1955–1966
- 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
- 37. Cawthon, R. M. (2002) Nucleic Acids Res. 30, e47
- Douarre, C., Gomez, D., Morjani, H., Zahm, J. M., O'Donohue, M. F., Eddabra, L., Mailliet, P., Riou, J. F., and Trentesaux, C. (2005) *Nucleic Acids Res.* 33, 2192–2203
- 39. Celli, G. B., and de Lange, T. (2005) Nat. Cell Biol. 7, 712-718
- Zaug, A. J., Podell, E. R., and Cech, T. R. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 10864–10869
- Pennarun, G., Granotier, C., Gauthier, L. R., Gomez, D., Hoffschir, F., Mandine, E., Riou, J. F., Mergny, J. L., Mailliet, P., and Boussin, F. D. (2005) Oncogene 24, 2917–2928
- Mergny, J. L., Riou, J. F., Mailliet, P., Teulade-Fichou, M. P., and Gilson, E. (2002) Nucleic Acids Res. 30, 839–865

- 43. Crabbe, L., Verdun, R. E., Haggblom, C. I., and Karlseder, J. (2004) *Science* **306**, 1951–1953
- 44. Li, J. L., Harrison, R. J., Reszka, A. P., Brosh, R. M., Jr., Bohr, V. A., Neidle, S., and Hickson, I. D. (2001) *Biochemistry* 40, 15194–15202
- 45. Todd, A. K., Johnston, M., and Neidle, S. (2005) Nucleic Acids Res. 33, 2901–2907
- 46. Huppert, J. L., and Balasubramanian, S. (2005) Nucleic Acids Res. 33,

2908-2916

- 47. Lemarteleur, T., Gomez, D., Paterski, R., Mandine, E., Mailliet, P., and Riou, J. F. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 802–808
- 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



Downloaded from www.jbc.org by on July 2, 2007

Résultats

Le traitement par la télomestatine induit un raccourcissement du simple brin télomérique dans les cellules HT1080.

L'effet de traitements par la télomestatine a été étudié sur le brin G télomérique dans la lignée HT1080 en mesurant comme précédemment la longueur du simple brin télomérique par la technique d'hybridation en condition non dénaturante avec une séquence complémentaire au motif TTAGGG. Le traitement de la lignée HT1080 par les concentrations de télomestatine de 1, 2 (< IC₅₀) et 5 μ M (>IC₅₀) induit à 48 heures une diminution du signal d'hybridation au simple brin télomérique de façon dose dépendante de 68, 85 et 90% respectivement par rapport à la lignée non traitée. Or, des expériences précédentes ont montrées que la télomestatine se fixe avec une forte affinité à l'ADN télomérique empêchant ainsi l'hybridation de la sonde télomérique sur le simple brin télomèrique dans la lignée A549 (Gomez et al., 2004). Pour vérifier cette hypothèse de l'ADN génomique extrait de la lignée HT1080, est incubée in vitro, en présence de télomestatine (1-5 µM). La fixation de la télomestatine permet une inhibition presque totale de l'hybridation de la sonde et cette inhibition est presque levée en présence du compétiteur des G-quadruplexes Pu22myc. Afin d'estimer la réelle dégradation du simple télomérique in vivo, dans la lignée hT1080, des expériences de compétition avec le Pu22myc ont été réalisées sur de l'ADN génomique de cellules HT1080 incubées en présence de 1, 2 et 5 µM de télomestatine avec ou sans compétiteur Pu22myc. Les résultats montrent une réversion du signal d'hybridation d'environ 15% en présence de Pu22myc. Ainsi, la diminution du signal d'hybridation obtenu dans les lignées HT1080 correspond à une dégradation du simple brin télomérique in vivo.

La surexpression de GFP-POT1 permet l'augmentation de la taille du simple brin télomérique et protège partiellement de l'effet de la télomestatine.

Pour vérifier si le traitement par la télomestatine déclenche la délocalisation de la protéine hPOT1 du télomère, les cellules HT1080 ont été transfectées par un vecteur GFP-POT1. La surexpression de hPOT1 permet un allongement du simple brin télomérique d'un facteur 3. Afin d'examiner si la surexpression de hPOT1 a une influence sur les effets intracellulaires de la télomestatine, les cellules HT1080 GFP et HT1080GFP-POT1 ont été traitées par 0,1 et 0,2 μ M de télomestatine, concentrations pour lesquelles la dégradation du simple brin télomérique n'est pas massive. Le traitement de ces cellules induit à 48 heures une réduction dose dépendante d'hybridation au simple brin télomérique d'un facteur 2 du signal à la concentration 0,2 μ M. Toutefois en présence de télomestatine le signal d'hybridation dans

la lignée surexprimant hPOT1 est 2,1 à 2,4 fois plus importante que dans la lignée non traitée. Ces résultats suggèrent ainsi un lien direct entre la taille du simple brin télomérique et l'activité biologique de ligands de l'ADN G-quadruplexe plutôt qu'une résistance à la dégradation télomérique due à la protection du télomère par la surexpression de hPOT1.

La télomestatine induit la délocalisation de la protéine hPOT1 du télomère et induit une réponse précoce de type dommage de l'ADN au niveau du télomère.

Afin de déterminer une éventuelle délocalisation de hPOT1 par la télomestatine notre groupe a réalisé des expériences de colocalisation sur les cellules HT1080GFP-POT1 fixées, par microscopie confocale a l'aide d'un anticorps anti-TRF2. Après traitement à la concentration de 2 μ M pendant 48 heure (<IC50) pour laquelle la majorité des cellules sont viables, on observe une réduction du signal GFP au niveau du télomère associé a une diminution du marquage TRF2. A plus forte concentration en télomestatine induisant un arrêt de croissance des cellules et l'apoptose (5 μ M 48 heures) hPOT1 est presque totalement délocalisé et s'accumule dans les nucléoles et dans le cytoplasme. Le traitement par 0,5 μ M de télomestatine à 48 heures induit la formation de foci γ H2AX qui colocalisent avec hPOT1, mais la grande majoritée des foci H2AX sont localisé hors du télomère, ceci indiquant que ce ligand a d'autres cibles dans le génome. Le traitement par 2 μ M de télomestatine à 48 heures induit la formation de foci γ H2AX.dans presque toutes les cellules.

Discussion et Conclusion

La stabilisation des structures G-quadruplexe au niveau du télomère permettrait une déprotection du télomère caractérisée par la formation de fusion des extrémités télomériques, la formation de ponts anaphasiques. Ces figures sont observées après traitement par certains ligands des G-quadruplexes (Incles *et al.*, 2004; Leonetti *et al.*, 2004; Pennarun *et al.*, 2005) ou après exclusion de protéines télomériques. Par exemple, un traitement à court terme par le ligand RHPS4 de cellules de mélanome télomérase positive, possédant de longs télomères, provoque une inhibition très précoce de la prolifération cellulaire qui s'explique par un dysfonctionnement télomérique, c'est à dire une augmentation significative de fusions télomériques. Cependant, à aucun moment, à court ou long terme et quelque soit la dose, une différence de taille des télomères a pu être détectée pour le RHPS4, ce qui suggère un

découplage entre la protection des télomères et la régulation de la longueur (Leonetti et al., 2004). Quant aux protéines télomériques, l'exclusion de TRF2 du télomère par introduction d'un dominant négatif de TRF2^{$\Delta B\Delta M$}, déclenche un raccourcissement du simple brin télomérique, avec comme conséquence la formation de jonctions télomèriques, observables sur des étalements mitotiques sous forme de ponts anaphasiques ou de chromosomes fusionnés (van Steensel et al., 1998). De même, la réduction de POT1 par ARN interférence induit l'apoptose et conduit à une perte du simple brin télomérique, une instabilité chromosomique et la sénescence (Yang et al., 2005). Ainsi, le traitement par le 12459 pourrait induire l'exclusion de protéines télomèriques indispensables à son intégrité, telles que hPOT1et/ou TPP1, protéines fixant le télomère simple brin. Puisque l'obtention d'une lignée A549 stable surexprimant hPOT1 s'est avérée impossible, l'étude de la délocalisation de hPOT1 a été réalisée sur la lignée HT1080 transfectée par GFP-hPOT1. De plus, comme les cellules HT1080 ne répondent pas au traitement par le 12459, nous avons étudié l'effet de la télomestatine dans ce modèle cellulaire. Dans les cellules HT1080, nous avons montré que le traitement à court terme par la télomestatine induit un raccourcissement rapide du simple brin télomérique et l'induction de l'apoptose (Gomez et al., 2006). Dans cette lignée, la surexpression de GFP-hPOT1 permet l'augmentation de la taille du simple brin télomérique et protège partiellement de l'effet de la télomestatine sur la dégradation du simple brin télomérique. Ces résultats suggèrent un lien direct entre la taille du simple brin télomérique et l'activité biologique de ligands de l'ADN G-quadruplexe plutôt qu'une résistance à la dégradation télomérique due à la protection du télomère par la surexpression de hPOT1. L'équipe de Reddel avait précédemment montré que la surexpression de la forme entière de hPOT1 permettait l'augmentation de la taille du double brin télomérique par activation de la télomérase dans la lignée HT1080 (Colgin et al., 2003) et dans la lignée 293 (cellules HEK transfectées par la region E1 de Ad5)(Armbruster et al., 2004). En revanche, l'équipe de T. De Lange en 2003 (Loayza et al., 2003) avait montré que la surexpression de la forme entière de hPOT1 n'avait pas d'effet sur la longueur du télomère dans la lignée HTC75. Ces différences de résultats pourraientt s'expliquer par le type cellulaire utilisé.

L'utilisation d'un dominant négatif de hPOT1 muté dans ses domaines OB de fixation à l'ADN induit également une augmentation de la taille du télomère et du signal simple brin dans la lignée EcR293 (Loayza *et al.*, 2003) (communication personnelle). Une résistance à la télomestatine est aussi observée dans ces cellules, confirmant que la taille du simple brin télomérique plutôt que l'effet direct de hPOT1 est responsable de la résistance à ce ligand. De même, le clone JFD9 sélectionné pour sa résistance induite par le 12459 présente une augmentation de 50% de la taille du simple brin télomérique par rapport à la lignée parentale A549. (Douarre, résultats non publiés).

Le traitement par la **télomestatine** des cellules HT1080 GFP-hPOT1 induit la **délocalisation de la protéine hPOT1** du télomère et une diminution de la fixation de la protéine TRF2 (vérifiée par immunofluorescence et par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine). Ce traitement déclenche une réponse précoce de type dommage de l'ADN vérifiée par la **formation de foyers** γ **H2AX** localisés partiellement au niveau du télomère. Des études du laboratoire avaient montré que la télomestatine inhibait *in vitro* la fixation de hPOT1 sur le simple brin télomérique (Gomez *et al.*, 2006). De même, dans la lignée immortalisée EcR293, le traitement par la télomestatine induit une rapide et massive délocalisation de hPOT1 du télomère mais la fixation de TRF2 au niveau du double brin télomérique n'est pas altérée (Gomez *et al.*, 2006). L'équipe de Ide a montré la même année que la télomestatine induit la dissociation de TRF2 du télomère dans les cellules cancéreuses, la perte du simple brin télomérique et la formation de TRF2 du télomère dans les cellules cancéreuses, la perte du simple brin télomérique et la formation de ponts anaphasiques (Tahara *et al.*, 2006)

Ainsi, la stabilisation des structures G-quadruplexe, comme cela a été décrit pour la télomestatine, permet la délocalisation des protéines essentielles à la stabilité et la protection du télomère. Le traitement par la télomestatine des lignées HT1080 induit le recrutement des foyers yH2AX au niveau du télomère, ce qui indique que le télomère est reconnu par la machinerie de reconnaissance et de déclenchement des dommages de l'ADN. En effet, l'érosion des télomères ou une altération de leur protection par les protéines télomériques génèrerait un signal équivalent à une cassure double brin de l'ADN et donc, serait reconnu comme un dommage à l'ADN (de Lange, 2002). Par exemple, l'inactivation de la fonction de TRF2 provoque l'apparition de TIF₈ (Telomere Dysfonction-Induced Foci), localisés en grande majorité au niveau des extrémités chromosomiques qui comprennent des facteurs associés à la réponse aux dommages à l'ADN (53BP, yH2AX, Rad 17, ATM, Mre11) (Takai et al., 2003). De même, l'équipe de J. Karlseder (Verdun et al., 2005) a décrit que les télomères de fibroblastes humains primaires sont déprotégés pendant la phase G2 du cycle cellulaire et sont recrutés par des protéines de réponse aux dommages à l'ADN telles que ATM Ser 1981 et NBS1 Ser 343. Ce recrutement coïncide avec une délocalisation partielle de hPOT1 du télomère. Cependant, cette reconnaissance par les protéines de dommage de l'ADN ne déclenche pas d'arrêt du cycle cellulaire. En Effet, l'activation d'ATM et de NBS1 ne permet pas la phosphorylation de P53 sur la sérine 15 ni la phosphorylation de CHK2 sur la thréonine 68. Cette réponse de type « dommages à l'ADN » au niveau des télomères en fin de réplication serait nécessaire pour favoriser la formation du complexe de protection des télomères (Verdun *et al.*, 2005).

L'introduction d'une séquence d'ADN homologue au simple brin télomérique oligo-T (pGTTAGGGTTAG) dans les fibroblastes humains normaux induit les voies de signalisation P53/P21/pRB et P16/pRb conduisant à la sénescence (Li et al., 2003). La sénescence induite par les oligo-T emprunte les mêmes voies de signalisation que celles induites lors de la désorganisation de la T-loop par l'expression d'un dominant négatif de TRF2 ou du raccourcissement des télomères. (Li et al., 2003). Ces oligo-T sont capables d'induire la sénescence, l'apoptose et/ ou la différenciation de plusieurs types de cellules malignes in vivo et in vitro, au contraire des cellules normales où leur effet est minime (Ohashi et al., 2007). Ces oligo-T rentrent dans le novau et miment ainsi la réponse aux dommages à l'ADN occasionnés par la désorganisation de la T-loop et l'exposition du simple brin télomérique déprotégé de son complexe shelterin. Cette réponse aux dommages de l'ADN mène à l'activation d'ATM (Eller et al., 2003), de DNA-PK (Eller et al., 2006), et à l'induction ou l'activation de certaines protéines en aval telles que P53, P53 Ser 15, P73, P95/NBS1, E2F1, P16 et yH2AX (Eller et al., 2002; Eller et al., 2003; Li et al., 2003; Puri et al., 2004). L'introduction de séquences d'ADN duplexe linéaire mimant le télomère induit une activation des voie de dommage à l'ADN dans des extraits nucléaires dépourvu d'ADN endogène. Ces voies de dommages de l'ADN incluent la phosphorylation de P53 sur la sérine 15, de CHK2 sur les sérines 33 et 35, de CHK1 sur la sérine 317, de c-Abl sur la sérine 375, et, de plus semblerait impliquer la DNA-PK. Cependant, un duplexe d'ADN linéaire comprenant une extrémité 3'capable de former un G-quadruplexe ne permet pas l'activation de cette voie de dommage à l'ADN, suggérant que la présence de G-quadruplexes télomériques protégerait de l'activation de cette voie (Qi et al., 2006). Or ces résultats ne correspondraient pas à ce qui se passe in vivo puisque nous avons vu que la stabilisation des structures G-quadruplexes permettait la délocalisation des protéines indispensables à l'intégrité du télomère

IV. CONCLUSION GENERALE

Ainsi, le ligand de l'ADN G-quadruplexe 12459 induit la sénescence (à faible concentration et à long terme) ou l'apoptose (à forte concentration et à court terme) notamment par ses effets sur le télomère dans la lignée d'adénocarcinome pulmonaire humain A549. L'apoptose induite par le 12459 est médiée par la voie mitochondriale, s'accompagne précocément d'un effondrement du potentiel membranaire mitochondriale, d'une libération des espèces réactives de l'oxygène, et plus tardivement du clivage de la pro caspase 3 et de PARP. Deux clones résistants au traitement par ce ligand surexpriment la protéine antiapoptotique Bcl-2 et montrent une résistance à l'induction de l'apoptose. La surexpression de cette protéine dans la lignée parentale A549 induit une résistance à l'apoptose induite par ce ligand, confirmant que la surexpression de cette protéine est suffisante pour conférer une résistance au 12459. En revanche, la surexpression de Bcl-2 n'est pas suffisante pour conférer une résistance à la sénescence induite à long terme par le 12459. Il s'opère une dégradation rapide du simple brin télomérique qui est concomitante à l'induction de l'apoptose. Cette dégradation n'est pas la conséquence du processus apoptotique puisque qu'un traitement par la camptothécine, un agent anticancéreux connu pour induire une apoptose massive avec libération des espèces réactives de l'oxygène ne permet pas la dégradation du simple brin télomérique. De même qu'un traitement par le 12459 de la lignée A549 où l'apoptose est inhibée ne montre aucune différence de profil de dégradation du simple brin télomérique.

Puisque le traitement par le 12459 occasionne un raccourcissement du simple brin télomérique, ce traitement pourrait ainsi induire l'exclusion de protéines télomériques indispensable à leur intégrité comme c'est le cas pour la télomestatine, qui dans la lignée HT1080 induit une dégradation du simple brin télomérique et la délocalisation de la protéine fixatrice du simple brin télomérique hPOT1 vérifiée par immunofluorescence dans la lignée transfectée par une construction GFP-hPOT1. De même la télomestatine permet le recrutement de la protéine de reconnaissance de dommage à l'ADN γ H2AX notamment au niveau du télomère. La surexpression de hPOT1 permet dans cette lignée une augmentation de la longueur du télomère qui permet de la protéger partiellement de l'effet de la télomestatine. Ce résultat suggère ainsi un lien direct entre la taille du simple brin télomérique et l'activité biologique de ligands de l'ADN G-quadruplexe plutôt qu'une résistance à la dégradation télomérique due à la protection du télomère par la surexpression de hPOT1.

Aux concentrations induisant la sénescence, le 12459 induit le recutement de γ H2AX notamment au niveau du télomère, l'expression de P53 et de P21, ainsi que la phosphorylation de P53 sur la sérine 15 et 20, et la phosphorylation de CHK1 sur la sérine 317, mais, il ne

permet pas la phosphorylation de CHK2. Ces résultats sont en accord avec le déclenchement de la voie de dommage à l'ADN médiée par la kinase ATR et non d'ATM. En revanche, en condition d'apoptose, le 12459 ne déclenche pas de réponse de type dommage à l'ADN, vérifiée par l'absence de formation de foci γ H2AX, et de phosphorylation des kinases de contrôle du cycle cellulaire CHK1 et CHK2. De plus, les phosphorylations de P53 sur les sérines généralement activées par ATM et ATR ne sont pas détectées. P53 est uniquement phosphorylé sur la sérine 392.

Cependant, une déphosphorylation transitoire de CHK1 s'opère aux temps précoces de traitement par le 12459 en condition apoptotique, et coïncide avec l'induction de la phosphatase responsable de l'arrêt des voies de dommages à l'ADN, PPM1D (Protein Phosphatase 1D magnesium dependent delta isoform). L'inhibition de l'expression de cette protéine par siRNA induit la restauration de la formation de foci γ H2AX notamment au niveau des télomères et la phosphorylation de CHK1 sur la sérine 317.

De même, nous avons vu que les espèces réactives de l'oxygène permettaient l'induction de cette protéine PPM1D, puisque son expression après traitement par le 12459 et l'H₂O₂ est inhibée en présence de N-acétyl cystéine. Nous avons vu que les espèces réactives de l'oxygène sont impliquées dans l'induction des dommages à l'ADN puisque un traitement par H₂O₂ induit la formation de foci H2AX au niveau du télomère, et la formation de ces foci est diminuée en présence d'un inhibiteur de ces espèces. Néanmoins des expériences préliminaires ont montrés que ces espèces réactives de l'oxygène ne participeraient pas ou peu à la formation des foci γ H2AX au niveau de l'ADN. Il serait intéressant de regarder l'effet d'un traitement par cette espèce réactive de l'oxygène sur la taille du simple brin.et, dans la même optique, dans les conditions où le 12459 induit l'apoptose, quelles conséquences auraient un inhibiteur de ROS ou l'ajout de radicaux libres sur la dégradation du simple brin télomérique.

Ainsi, le 12459 induirait en condition de sénescence la voie de dommage de l'ADN médiée par ATR. Ce résultat est en contradiction avec la littérature puisque les traitements par la télomestatine ou la déprotection du télomère par TRF2 induit la voie de dommage de l'ADN médiée par ATM. Cependant des résultats très récents ont montré que la protéine hPOT1 inhibe l'activation de la voie de dommage à l'ADN médiée par ATR (Denchi *et al.*, 2007). Dans notre cas on peut se demander ainsi quel serait l'effet du 12459 sur la localisation télomérique de cette protéine.

Puisque que le 12459 induirait la voie de dommage à l'ADN médiée par ATR, il pourrait occasionner des problèmes au niveau de la réplication notamment aux télomères. Ainsi, il serait intéressant de mettre en évidence la formation de, foci γ H2AX au niveau de la fourche de réplication après incorporation de Brdu.

Cependant, il serait intéressant d'approfondir la question sur l'origine du déclenchement du raccourcissement du simple brin télomérique en condition d'apoptose. En effet, nous n'avons vu aucune différence de profil de dégradation du simple brin télomérique dans la lignée A549 surexprimant Bcl-2, où l'apoptose est inhibée. De plus, un traitement par la campthotécine, puissant inducteur d'apoptose et libérateur de ROS n'induit pas la dégradation du simple brin télomérique. Ces résultats excluraient l'implication des espèces réactives de l'oxygène sur la dégradation du simple brin télomérique. Or le traitement par l'H₂O₂ induit la formation de TIF_S, il serait intéressant de regarder l'effet d'un traitement par cette espèce réactive de l'oxygène sur la taille du simple brin. Dans la même optique, quel serait l'effet en conditon d'apoptose induite par le 12459 de l'inhibition des ROS sur la dégradation télomérique. Afin d'approfondir la question il serait intéressant de regarder si des produits actifs au niveau de la mitochondrie permettent la libération des ROS, l'induction de PPM1D et la formation de TIF_S.

Aussi, nous ne savons pas si d'autres ligands de l'ADN G-quadruplexe tels que la télomestatine, le Braco-19 déclenchent la formation de ces ROS et si la formation des G-quadruplexes la déclenche aussi. Le 12459, en interagissant avec l'ADN pourait induire la libération des ROS.

Pour conclure, nous pouvons dire qu'il existe une différence d'induction des voies de dommage à l'ADN par les ligands de l'ADN G-quadruplexe télomestatine et 12459 qui sont récapitulés sur la figure IV-1. En effet, la télomestatine active la voie de dommage à l'ADN médiée par ATM. Cependant aucune donnée de la littérature ne montre une éventuelle activation de la kinase ATR induite par la télomestatine. Nous avons vu que la telomestatine induit la délocalisation de hPOT1 et de TRF2. Puisque la délétion de la protéine hPOT1 active ATR (Denchi *et al.*, 2007), on peut se demander si ce ligand induit l'activation de cette kinase. De même, afin de déterminer si le 12459 induit la délocalisation de hPOT1, il serait nécessaire d'obtenir une lignée A549 n'exprimant pas hPOT1.



Figure IV-1 : Différence d'induction des voies de dommage à l'ADN par les ligands de l'ADN G-quadruplexe télomestatine et 12459.

Enfin, les perspectives immédiates de ce travail sont principalement la validation de nos résultats en montrant l'implication de la kinase ATR et non celle d'ATM en réponse au 12459, ainsi que la ou les protéines responsable(s) de la phosphorylation de P53 sur la sérine 392. De même il est nécessaire de vérifier l'effet des ROS au niveau télomérique dans la lignée A549 en étudiant l'effet d'un traitement à $1'H_2O_2$ sur la taille du simple brin télomérique avec ou sans les inhibiteurs de ROS. Il serait également intéressant de savoir pourquoi le 12459 ne donne aucune réponse dans la lignée HT1080, et s'il franchit la barrière lipidique de la membrane plasmique.

D'autres perspectives à plus long terme seraient de valider nos résultats sur d'autres modèles cellulaires et l'utilisation d'autres ligands des G-quadruplexes.

L'approfondissement des connaissances des mécanismes d'action des ligands de l'ADN G-quadruplexe télomérique pourra permettre l'identification d'une nouvelle classe de médicaments à thérapeutique plus ciblée dans le domaine de la cancérologie. En effet, des expériences réalisées *in vivo* chez l'animal avec l'un de ces ligands, le Braco 19 sont encourageantes puisqu'il y a spécificité tumorale sans toxicité secondaire. Des études en phase d'essais pré-cliniques se poursuivent sur ce type de molécules. L'identification d'un marqueur biologique de la réponse à ces ligands (protéine télomérique) permettrait de mettre en œuvre plus facilement les études cliniques.

V. BIBLIOGRAPHIE

ABRAHAM RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. Genes Dev 2001; 15 (17): 2177-2196.

ADAMS KE, MEDHURST AL, DART DA, LAKIN ND. Recruitment of ATR to sites of ionising radiation-induced DNA damage requires ATM and components of the MRN protein complex. Oncogene 2006; 25 (28): 3894-3904.

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

AKIYAMA M, HIDESHIMA T, HAYASHI T, TAI YT, MITSIADES CS, MITSIADES N, *et al.* Nuclear factor-kappaB p65 mediates tumor necrosis factor alpha-induced nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein. Cancer Res 2003; 63 (1): 18-21.

ALARCON-VARGAS D, RONAI Z. p53-Mdm2--the affair that never ends. Carcinogenesis 2002; 23 (4): 541-547.

ANCELIN K, BRUNORI M, BAUWENS S, KOERING CE, 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.

ANURADHA S, MUNIYAPPA K. Meiosis-specific yeast Hop1 protein promotes synapsis of double-stranded DNA helices via the formation of guanine quartets. Nucleic Acids Res 2004; 32 (8): 2378-2385.

APPELLA E, ANDERSON CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. Eur J Biochem 2001; 268 (10): 2764-2772.

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 (24): 4832-4838.

ARMBRUSTER BN, LINARDIC CM, VELDMAN T, BANSAL NP, DOWNIE DL, COUNTER CM. Rescue of an hTERT mutant defective in telomere elongation by fusion with hPot1. Mol Cell Biol 2004; 24 (8): 3552-3561.

ASHLEY CT, JR., WARREN ST. Trinucleotide repeat expansion and human disease. Annu Rev Genet 1995; 29: 703-728.

ASHLEY T, WARD DC. A "hot spot" of recombination coincides with an interstitial telomeric sequence in the Armenian hamster. Cytogenet Cell Genet 1993; 62 (2-3): 169-171.

ATKINSON SP, HOARE SF, GLASSPOOL RM, KEITH WN. Lack of telomerase gene expression in alternative lengthening of telomere cells is associated with chromatin remodeling of the hTR and hTERT gene promoters. Cancer Res 2005; 65 (17): 7585-7590.

ATTARDI LD, DONEHOWER LA. Probing p53 biological functions through the use of genetically engineered mouse models. Mutat Res 2005; 576 (1-2): 4-21. AUTEXIER C, LUE NF. The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase. Annu Rev Biochem 2006:

BAKKENIST CJ, KASTAN MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature 2003; 421 (6922): 499-506.

BARTEK J, LUKAS J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. Cancer Cell 2003; 3 (5): 421-429.

BARTEK J, LUKAS C, LUKAS J. Checking on DNA damage in S phase. Nat Rev Mol Cell Biol 2004; 5 (10): 792-804.

BARTKOVA J, BAKKENIST CJ, RAJPERT-DE MEYTS E, SKAKKEBAEK NE, SEHESTED M, LUKAS J, *et al.* ATM activation in normal human tissues and testicular cancer. Cell Cycle 2005; 4 (6): 838-845.

BATTINO M, FERRI E, GATTAVECCHIA E, BRECCIA A, GENOVA ML, LITTARRU GP, *et al.* Mitochondrial respiratory chain features after gamma-irradiation. Free Radic Res 1997; 26 (5): 431-438.

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

BECHTER OE, EISTERER W, DLASKA M, KUHR T, THALER J. CpG island methylation of the hTERT promoter is associated with lower telomerase activity in B-cell lymphocytic leukemia. Exp Hematol 2002; 30 (1): 26-33.

BEKKER-JENSEN S, LUKAS C, KITAGAWA R, MELANDER F, KASTAN MB, BARTEK J, *et al.* Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. J Cell Biol 2006; 173 (2): 195-206.

BELLORINI M, LEE DK, DANTONEL JC, ZEMZOUMI K, ROEDER RG, TORA L, *et al.* CCAAT binding NF-Y-TBP interactions: NF-YB and NF-YC require short domains adjacent to their histone fold motifs for association with TBP basic residues. Nucleic Acids Res 1997; 25 (11): 2174-2181.

BEN-PORATH I, WEINBERG RA. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. J Clin Invest 2004; 113 (1): 8-13.

BEN-PORATH I, WEINBERG RA. The signals and pathways activating cellular senescence. Int J Biochem Cell Biol 2005; 37 (5): 961-976.

BERGERON J, BENLIMAME N, ZENG-RONG N, XIAO D, SCRIVENS PJ, KOROMILAS AE, *et al.* Identification of the interferon-inducible double-stranded RNA-dependent protein kinase as a regulator of cellular response to bulky adducts. Cancer Res 2000; 60 (24): 6800-6804. BERNDTSSON M, HAGG M, PANARETAKIS T, HAVELKA AM, SHOSHAN MC, LINDER S. Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. Int J Cancer 2007; 120 (1): 175-180.

BILAUD T, BRUN C, ANCELIN K, KOERING CE, LAROCHE T, GILSON E. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. Nat Genet 1997; 17 (2): 236-239.

BLACKBURN EH, GALL JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. J Mol Biol 1978; 120 (1): 33-53.

BLACKBURN EH. Switching and signaling at the telomere. Cell 2001; 106 (6): 661-673.

BLADIER C, WOLVETANG EJ, HUTCHINSON P, DE HAAN JB, KOLA I. Response of a primary human fibroblast cell line to H2O2: senescence-like growth arrest or apoptosis? Cell Growth Differ 1997; 8 (5): 589-598.

BODNAR AG, OUELLETTE M, FROLKIS M, HOLT SE, CHIU CP, MORIN GB, *et al.* Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science 1998; 279 (5349): 349-352.

BONNAL S, SCHAEFFER C, CREANCIER L, CLAMENS S, MOINE H, PRATS AC, *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.

BOYLE JM, MITCHELL EL, GREAVES MJ, ROBERTS SA, TRICKER K, BURT E, *et al.* Chromosome instability is a predominant trait of fibroblasts from Li-Fraumeni families. Br J Cancer 1998; 77 (12): 2181-2192.

BRADSHAW PS, STAVROPOULOS DJ, MEYN MS. Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. Nat Genet 2005; 37 (2): 193-197.

BROCCOLI D, SMOGORZEWSKA A, CHONG L, DE LANGE T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. Nat Genet 1997; 17 (2): 231-235.

BROOKS CL, GU W. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. Mol Cell 2006; 21 (3): 307-315.

BROWN JP, WEI W, SEDIVY JM. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. Science 1997; 277 (5327): 831-834.

BRYAN TM, ENGLEZOU A, GUPTA J, BACCHETTI S, REDDEL RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. Embo J 1995; 14 (17): 4240-4248.

BRYAN TM, REDDEL RR. Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells. Eur J Cancer 1997; 33 (5): 767-773. BULAVIN DV, SAITO S, HOLLANDER MC, SAKAGUCHI K, ANDERSON CW, APPELLA E, *et al.* Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. Embo J 1999; 18 (23): 6845-6854.

BULAVIN DV, AMUNDSON SA, FORNACE AJ. p38 and Chk1 kinases: different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony. Curr Opin Genet Dev 2002; 12 (1): 92-97.

BULAVIN DV, DEMIDOV ON, SAITO S, KAURANIEMI P, PHILLIPS C, AMUNDSON SA, *et al.* Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. Nat Genet 2002; 31 (2): 210-215.

BURGER AM, DAI F, SCHULTES CM, RESZKA AP, MOORE MJ, DOUBLE JA, *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.

BURMA S, CHEN DJ. Role of DNA-PK in the cellular response to DNA double-strand breaks. DNA Repair (Amst) 2004; 3 (8-9): 909-918.

CAMPISI J. Cancer, aging and cellular senescence. In Vivo 2000; 14 (1): 183-188.

CANDE C, COHEN I, DAUGAS E, RAVAGNAN L, LAROCHETTE N, ZAMZAMI N, *et al.* Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. Biochimie 2002; 84 (2-3): 215-222.

CATALANO A, ROMANO M, ROBUFFO I, STRIZZI L, PROCOPIO A. Methionine aminopeptidase-2 regulates human mesothelioma cell survival: role of Bcl-2 expression and telomerase activity. Am J Pathol 2001; 159 (2): 721-731.

CATASTI P, CHEN X, MOYZIS RK, BRADBURY EM, GUPTA G. Structure-function correlations of the insulin-linked polymorphic region. J Mol Biol 1996; 264 (3): 534-545.

CHAI W, FORD LP, LENERTZ L, WRIGHT WE, SHAY JW. Human Ku70/80 associates physically with telomerase through interaction with hTERT. J Biol Chem 2002; 277 (49): 47242-47247.

CHAI W, SFEIR AJ, HOSHIYAMA H, SHAY JW, WRIGHT WE. The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres. EMBO Rep 2006; 7 (2): 225-230.

CHAKRABORTI T, DAS S, MONDAL M, ROYCHOUDHURY S, CHAKRABORTI S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. Cell Signal 1999; 11 (2): 77-85.

CHEHAB NH, MALIKZAY A, STAVRIDI ES, HALAZONETIS TD. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96 (24): 13777-13782.

CHEN CR, KANG Y, SIEGEL PM, MASSAGUE J. E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. Cell 2002; 110 (1): 19-32.

CHEN D, KON N, LI M, ZHANG W, QIN J, GU W. ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. Cell 2005; 121 (7): 1071-1083.

CHEN JL, BLASCO MA, GREIDER CW. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. Cell 2000; 100 (5): 503-514.

CHEN K, ALBANO A, HO A, KEANEY JF, JR. Activation of p53 by oxidative stress involves platelet-derived growth factor-beta receptor-mediated ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase activation. J Biol Chem 2003; 278 (41): 39527-39533.

CHEN QM, LIU J, MERRETT JB. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H2O2 response of normal human fibroblasts. Biochem J 2000; 347 (Pt 2): 543-551.

CHENG EH, WEI MC, WEILER S, FLAVELL RA, MAK TW, LINDSTEN T, *et al.* BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. Mol Cell 2001; 8 (3): 705-711.

CHOI SH, KANG HK, IM EO, KIM YJ, BAE YT, CHOI YH, *et al.* Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by retinoic acids. Int J Oncol 2000; 17 (5): 971-976.

CHOMCZYNSKI P, SACCHI N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162 (1): 156-159.

CHONG L, VAN STEENSEL B, BROCCOLI D, ERDJUMENT-BROMAGE H, HANISH J, TEMPST P, *et al.* A human telomeric protein. Science 1995; 270 (5242): 1663-1667.

CHOWDHURY D, KEOGH MC, ISHII H, PETERSON CL, BURATOWSKI S, LIEBERMAN J. gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. Mol Cell 2005; 20 (5): 801-809.

CLEMENS MJ, ELIA A. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. J Interferon Cytokine Res 1997; 17 (9): 503-524.

COLGIN LM, BARAN K, BAUMANN P, CECH TR, REDDEL RR. Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. Curr Biol 2003; 13 (11): 942-946.

COLLINS K, MITCHELL JR. Telomerase in the human organism. Oncogene 2002; 21 (4): 564-579.

COMPTON SA, ELMORE LW, HAYDU K, JACKSON-COOK CK, HOLT SE. Induction of nitric oxide synthase-dependent telomere shortening after functional inhibition of Hsp90 in human tumor cells. Mol Cell Biol 2006; 26 (4): 1452-1462.

CONG YS, WRIGHT WE, SHAY JW. Human telomerase and its regulation. Microbiol Mol Biol Rev 2002; 66 (3): 407-425, table of contents. 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 U S A 1998; 95 (25): 14723-14728.

COUNTER CM, MEYERSON M, EATON EN, ELLISEN LW, CADDLE SD, HABER DA, et al. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase.

Oncogene 1998; 16 (9): 1217-1222.

COUSTRY F, SINHA S, MAITY SN, CROMBRUGGHE B. The two activation domains of the CCAAT-binding factor CBF interact with the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex. Biochem J 1998; 331 (Pt 1): 291-297.

CRABBE L, VERDUN RE, HAGGBLOM CI, KARLSEDER J. Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. Science 2004; 306 (5703): 1951-1953.

CRABBE L, JAUCH A, NAEGER CM, HOLTGREVE-GREZ H, KARLSEDER J. Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104 (7): 2205-2210.

CRESCENZI E, PALUMBO G, BRADY HJ. Bcl-2 activates a programme of premature senescence in human carcinoma cells. Biochem J 2003; 375 (Pt 2): 263-274.

CRISTOFALO VJ, LORENZINI A, ALLEN RG, TORRES C, TRESINI M. Replicative senescence: a critical review. Mech Ageing Dev 2004; 125 (10-11): 827-848.

CROWE DL, NGUYEN DC, TSANG KJ, KYO S. E2F-1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. Nucleic Acids Res 2001; 29 (13): 2789-2794.

CUADRADO M, MARTINEZ-PASTOR B, MURGA M, TOLEDO LI, GUTIERREZ-MARTINEZ P, LOPEZ E. et al. ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks.

J Exp Med 2006; 203 (2): 297-303.

CUDDIHY AR, LI S, TAM NW, WONG AH, TAYA Y, ABRAHAM N, et al. Double-stranded-RNA-activated protein kinase PKR enhances transcriptional activation by tumor suppressor p53. Mol Cell Biol 1999; 19 (4): 2475-2484.

CUDDIHY AR, WONG AH, TAM NW, LI S, KOROMILAS AE. The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. Oncogene 1999; 18 (17): 2690-2702.

D'ADDA DI FAGAGNA F, REAPER PM, 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.

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 (24): 6958-6968.
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 (4): 489-499.

DARNELL JC, WARREN ST, DARNELL RB. The fragile X mental retardation protein, FMRP, recognizes G-quartets. Ment Retard Dev Disabil Res Rev 2004; 10 (1): 49-52.

DAS KC, DASHNAMOORTHY R.

Hyperoxia activates the ATR-Chk1 pathway and phosphorylates p53 at multiple sites. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2004; 286 (1): L87-97.

DAVIS JT.

G-quartets 40 years later: from 5'-GMP to molecular biology and supramolecular chemistry. Angew Chem Int Ed Engl 2004; 43 (6): 668-698.

DE LANGE T. Protection of mammalian telomeres. Oncogene 2002; 21 (4): 532-540.

DE LANGE T. T-loops and the origin of telomeres. Nat Rev Mol Cell Biol 2004; 5 (4): 323-329.

DE LANGE T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. Genes Dev 2005; 19 (18): 2100-2110.

DE SOUZA NASCIMENTO P, ALVES G, FIEDLER W. Telomerase inhibition by an siRNA directed against hTERT leads to telomere attrition in HT29 cells. Oncol Rep 2006; 16 (2): 423-428.

DEBATIN KM, PONCET D, KROEMER G. Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. Oncogene 2002; 21 (57): 8786-8803.

DEFEDERICIS HC, PATRZYC HB, RAJECKI MJ, BUDZINSKI EE, IIJIMA H, DAWIDZIK JB, *et al.* Singlet oxygen-induced DNA damage. Radiat Res 2006; 165 (4): 445-451.

DENCHI EL, DE LANGE T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. Nature 2007: DESSAIN SK, YU H, REDDEL RR, BEIJERSBERGEN RL, WEINBERG RA. Methylation of the human telomerase gene CpG island. Cancer Res 2000; 60 (3): 537-541.

DEVEREUX TR, HORIKAWA I, ANNA CH, ANNAB LA, AFSHARI CA, BARRETT JC. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. Cancer Res 1999; 59 (24): 6087-6090.

DIEDE SJ, GOTTSCHLING DE. Telomerase-mediated telomere addition in vivo requires DNA primase and DNA polymerases alpha and delta. Cell 1999; 99 (7): 723-733.

DIMRI GP, 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.

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.

DOLADO I, SWAT A, AJENJO N, DE VITA G, CUADRADO A, NEBREDA AR. p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. Cancer Cell 2007; 11 (2): 191-205.

DOUARRE C, GOMEZ D, MORJANI H, ZAHM JM, 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.

DU C, FANG M, LI Y, LI L, WANG X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell 2000; 102 (1): 33-42.

DUAN J, DUAN J, ZHANG Z, TONG T. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H2O2 involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. Int J Biochem Cell Biol 2005; 37 (7): 1407-1420.

DUQUETTE ML, HANDA P, VINCENT JA, TAYLOR AF, MAIZELS N. Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. Genes Dev 2004; 18 (13): 1618-1629.

ELKAK AE, KIRKPATRICK K, MEARS L, WELLS C, GHILCHIK M, NEWBOLD R, *et al.* Telomerase activity and Bcl-2 expression in human breast cancer. Eur J Surg Oncol 2002; 28 (1): 14-18.

ELLER MS, PURI N, HADSHIEW IM, VENNA SS, GILCHREST BA. Induction of apoptosis by telomere 3' overhang-specific DNA. Exp Cell Res 2002; 276 (2): 185-193.

ELLER MS, LI GZ, FIROOZABADI R, PURI N, GILCHREST BA. Induction of a p95/Nbs1-mediated S phase checkpoint by telomere 3' overhang specific DNA. Faseb J 2003; 17 (2): 152-162.

ELLER MS, LIAO X, LIU S, HANNA K, BACKVALL H, OPRESKO PL, *et al.* A role for WRN in telomere-based DNA damage responses. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103 (41): 15073-15078.

ELMORE LW, REHDER CW, DI X, MCCHESNEY PA, JACKSON-COOK CK, GEWIRTZ DA, *et al.* Adriamycin-induced senescence in breast tumor cells involves functional p53 and telomere dysfunction. J Biol Chem 2002; 277 (38): 35509-35515.

ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, OKAWA K, IWAMATSU A, NAGATA S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. Nature 1998; 391 (6662): 43-50.

ENOKIZONO Y, KONISHI Y, NAGATA K, OUHASHI K, UESUGI S, ISHIKAWA F, *et al.* Structure of hnRNP D complexed with single-stranded telomere DNA and unfolding of the quadruplex by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D. J Biol Chem 2005; 280 (19): 18862-18870.

ESKES R, DESAGHER S, ANTONSSON B, MARTINOU JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. Mol Cell Biol 2000; 20 (3): 929-935. FADOK VA, BRATTON DL, ROSE DM, PEARSON A, EZEKEWITZ RA, HENSON PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. Nature 2000; 405 (6782): 85-90.

FAHLMAN RP, SEN D. Cation-regulated self-association of "synapsable" DNA duplexes. J Mol Biol 1998; 280 (2): 237-244.

FALCK J, COATES J, JACKSON SP. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. Nature 2005; 434 (7033): 605-611.

FELDMANN G, HAOUZI D, MOREAU A, DURAND-SCHNEIDER AM, BRINGUIER A, BERSON A, *et al.* Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. Hepatology 2000; 31 (3): 674-683.

FENG J, FUNK WD, WANG SS, WEINRICH SL, AVILION AA, CHIU CP, *et al.* The RNA component of human telomerase. Science 1995; 269 (5228): 1236-1241.

FISCELLA M, ZHANG H, FAN S, SAKAGUCHI K, SHEN S, MERCER WE, *et al.* Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner.

Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94 (12): 6048-6053.

FLETCHER TM, CATHERS BE, RAVIKUMAR KS, MAMIYA BM, KERWIN SM. Inhibition of human telomerase by 7-deaza-2'-deoxyguanosine nucleoside triphosphate analogs: potent inhibition by 6-thio-7-deaza-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate. Bioorg Chem 2001; 29 (1): 36-55.

FLEURY C, MIGNOTTE B, VAYSSIERE JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. Biochimie 2002; 84 (2-3): 131-141.

FOLINI M, COLELLA G, VILLA R, LUALDI S, DAIDONE MG, 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.

FOLINI M, BERG K, MILLO E, VILLA R, PRASMICKAITE L, DAIDONE MG, *et al.* Photochemical internalization of a peptide nucleic acid targeting the catalytic subunit of human telomerase. Cancer Res 2003; 63 (13): 3490-3494.

FRAMSON P, 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.

FREEMAN BA, CRAPO JD. Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lungs and lung mitochondria. J Biol Chem 1981; 256 (21): 10986-10992.

FRONTINI M, IMBRIANO C, DISILVIO A, BELL B, BOGNI A, ROMIER C, *et al.* NF-Y recruitment of TFIID, multiple interactions with histone fold TAF(II)s. J Biol Chem 2002; 277 (8): 5841-5848.

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.

GARCIA-CAO I, GARCIA-CAO M, MARTIN-CABALLERO J, CRIADO LM, KLATT P, FLORES JM, et al. "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. Embo J 2002; 21 (22): 6225-6235.

GEHRING K, LEROY JL, GUERON M. A tetrameric DNA structure with protonated cytosine.cytosine base pairs. Nature 1993; 363 (6429): 561-565.

GELLERT M, LIPSETT MN, DAVIES DR. Helix formation by guanylic acid. Proc Natl Acad Sci U S A 1962; 48: 2013-2018.

GHOSAL G, MUNIYAPPA K.

Saccharomyces cerevisiae Mre11 is a high-affinity G4 DNA-binding protein and a G-rich DNA-specific endonuclease: implications for replication of telomeric DNA. Nucleic Acids Res 2005; 33 (15): 4692-4703.

GILLEY D, BLACKBURN EH.

The telomerase RNA pseudoknot is critical for the stable assembly of a catalytically active ribonucleoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96 (12): 6621-6625.

GIRALDO R, RHODES D.

The yeast telomere-binding protein RAP1 binds to and promotes the formation of DNA quadruplexes in telomeric DNA.

Embo J 1994; 13 (10): 2411-2420.

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 U S A 1994; 91 (16): 7658-7662.

GIRE V, ROUX P, WYNFORD-THOMAS D, BRONDELLO JM, DULIC V. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. Embo J 2004; 23 (13): 2554-2563.

GLASSPOOL RM, BURNS S, HOARE SF, SVENSSON C, KEITH NW. The hTERT and hTERC telomerase gene promoters are activated by the second exon of the adenoviral protein, E1A, identifying the transcriptional corepressor CtBP as a potential repressor of both genes. Neoplasia 2005; 7 (6): 614-622.

GOMEZ D, MERGNY JL, RIOU JF. Detection of telomerase inhibitors based on g-quadruplex ligands by a modified telomeric repeat amplification protocol assay. Cancer Res 2002; 62 (12): 3365-3368.

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 2003; 278 (50): 50554-50562.

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 2003; 63 (19): 6149-6153.

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.

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.

GOMEZ D, O'DONOHUE MF, WENNER T, DOUARRE C, MACADRE J, KOEBEL P, *et al.* The G-quadruplex ligand telomestatin inhibits POT1 binding to telomeric sequences in vitro and induces GFP-POT1 dissociation from telomeres in human cells. Cancer Res 2006; 66 (14): 6908-6912.

GOMEZ D, WENNER T, BRASSART B, DOUARRE C, O'DONOHUE MF, EL KHOURY V, *et al.* Telomestatin-induced telomere uncapping is modulated by POT1 through G-overhang extension in HT1080 human tumor cells. J Biol Chem 2006; 281 (50): 38721-38729.

GOPING IS, GROSS A, LAVOIE JN, NGUYEN M, JEMMERSON R, ROTH K, *et al.* Regulated targeting of BAX to mitochondria. J Cell Biol 1998; 143 (1): 207-215.

GOTTLIEB E, VANDER HEIDEN MG, THOMPSON CB. Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. Mol Cell Biol 2000; 20 (15): 5680-5689.

GOUELI BS, JANKNECHT R. Regulation of telomerase reverse transcriptase gene activity by upstream stimulatory factor. Oncogene 2003; 22 (39): 8042-8047.

GOWAN SM, HEALD R, STEVENS MF, KELLAND LR. Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with Gquadruplexes. Mol Pharmacol 2001; 60 (5): 981-988.

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 (5): 1154-1162.

GRAND CL, HAN H, MUNOZ RM, WEITMAN S, VON HOFF DD, HURLEY LH, *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.

GRANOTIER C, PENNARUN G, RIOU L, HOFFSCHIR F, GAUTHIER LR, DE CIAN A, *et al.* Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends. Nucleic Acids Res 2005; 33 (13): 4182-4190.

GREENBERG RA, O'HAGAN RC, DENG H, XIAO Q, HANN SR, ADAMS RR, *et al.* Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. Oncogene 1999; 18 (5): 1219-1226.

GREIDER CW, BLACKBURN EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. Cell 1985; 43 (2 Pt 1): 405-413. GREIDER CW, BLACKBURN EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. Nature 1989; 337 (6205): 331-337.

GREIDER CW. Telomere length regulation. Annu Rev Biochem 1996; 65: 337-365.

GREIDER CW. Telomeres do D-loop-T-loop. Cell 1999; 97 (4): 419-422.

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 (4): 503-514.

GUILLERET I, YAN P, GRANGE F, BRAUNSCHWEIG R, BOSMAN FT, BENHATTAR J. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. Int J Cancer 2002; 101 (4): 335-341.

GUITTAT L., LACROIX L., GOMEZ D., ARIMONDO P.B., DE CIAN A., PENNARUM G., *et al.* Quadruplex structures and quadruplex ligands. Dynamical Genetics (2004) 199-236.

GUO QL, LIN SS, YOU QD, GU HY, YU J, ZHAO L, *et al.* Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expression by gambogic acid in human hepatoma SMMC-7721 cells. Life Sci 2006; 78 (11): 1238-1245.

GUPTA S, YEL L, KIM D, KIM C, CHIPLUNKAR S, GOLLAPUDI S. Arsenic trioxide induces apoptosis in peripheral blood T lymphocyte subsets by inducing oxidative stress: a role of Bcl-2. Mol Cancer Ther 2003; 2 (8): 711-719.

HAENDELER J, HOFFMANN J, BRANDES RP, ZEIHER AM, DIMMELER S. Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphorylation of tyrosine 707. Mol Cell Biol 2003; 23 (13): 4598-4610.

HAHN WC, STEWART SA, BROOKS MW, YORK SG, EATON E, KURACHI A, *et al.* Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. Nat Med 1999; 5 (10): 1164-1170.

HAIDER S, PARKINSON GN, NEIDLE S. Crystal structure of the potassium form of an Oxytricha nova G-quadruplex. J Mol Biol 2002; 320 (2): 189-200.

HAN H, HURLEY LH. G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. Trends Pharmacol Sci 2000; 21 (4): 136-142.

HAN H, LANGLEY DR, RANGAN A, HURLEY LH. Selective interactions of cationic porphyrins with G-quadruplex structures. J Am Chem Soc 2001; 123 (37): 8902-8913.

HANAKAHI LA, SUN H, MAIZELS N. High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA. J Biol Chem 1999; 274 (22): 15908-15912. HARLEY CB, FUTCHER AB, GREIDER CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature 1990; 345 (6274): 458-460.

HARLEY CB, SHERWOOD SW. Telomerase, checkpoints and cancer. Cancer Surv 1997; 29: 263-284.

HARRINGTON L. Those dam-aged telomeres! Curr Opin Genet Dev 2004; 14 (1): 22-28.

HARRISON RJ, GOWAN SM, KELLAND LR, NEIDLE S. Human telomerase inhibition by substituted acridine derivatives. Bioorg Med Chem Lett 1999; 9 (17): 2463-2468.

HAYFLICK L, MOORHEAD PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 1961; 25: 585-621.

HAYFLICK L. The illusion of cell immortality. Br J Cancer 2000; 83 (7): 841-846.

HAZEL P, HUPPERT J, BALASUBRAMANIAN S, NEIDLE S. Loop-length-dependent folding of G-quadruplexes. J Am Chem Soc 2004; 126 (50): 16405-16415.

HENDERSON ER, BLACKBURN EH. An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. Mol Cell Biol 1989; 9 (1): 345-348.

HERBERT B, PITTS AE, BAKER SI, HAMILTON SE, WRIGHT WE, SHAY JW, *et al.* Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96 (25): 14276-14281.

HERBIG U, JOBLING WA, CHEN BP, CHEN DJ, SEDIVY JM. 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.

HERBIG U, SEDIVY JM. Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. Mech Ageing Dev 2006; 127 (1): 16-24.

HILL MM, ADRAIN C, MARTIN SJ. Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. Mol Interv 2003; 3 (1): 19-26.

HISATOMI H, OHYASHIKI K, OHYASHIKI JH, 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.

HO CC, SIU WY, CHOW JP, LAU A, AROOZ T, TONG HY, *et al.* The relative contribution of CHK1 and CHK2 to Adriamycin-induced checkpoint. Exp Cell Res 2005; 304 (1): 1-15. HORIKAWA I, CABLE PL, AFSHARI C, BARRETT JC. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. Cancer Res 1999; 59 (4): 826-830.

HORVATH MP, SCHWEIKER VL, BEVILACQUA JM, RUGGLES JA, SCHULTZ SC. Crystal structure of the Oxytricha nova telomere end binding protein complexed with single strand DNA. Cell 1998; 95 (7): 963-974.

HOUGHTALING BR, CUTTONARO L, CHANG W, 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.

HOWARD S, BOTTINO C, BROOKE S, CHENG E, GIFFARD RG, SAPOLSKY R. Neuroprotective effects of bcl-2 overexpression in hippocampal cultures: interactions with pathways of oxidative damage. J Neurochem 2002; 83 (4): 914-923.

HUPP TR, SPARKS A, LANE DP. Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. Cell 1995; 83 (2): 237-245.

HUPPERT JL, BALASUBRAMANIAN S. Prevalence of quadruplexes in the human genome. Nucleic Acids Res 2005; 33 (9): 2908-2916.

HURLEY LH. Secondary DNA structures as molecular targets for cancer therapeutics. Biochem Soc Trans 2001; 29 (Pt 6): 692-696.

HWANG PM, BUNZ F, YU J, RAGO C, CHAN TA, MURPHY MP, *et al.* Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. Nat Med 2001; 7 (10): 1111-1117.

ICHAS F, MAZAT JP. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. Biochim Biophys Acta 1998; 1366 (1-2): 33-50.

INCLES CM, SCHULTES CM, KEMPSKI H, KOEHLER H, KELLAND LR, 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.

ITAHANA K, DIMRI G, CAMPISI J. Regulation of cellular senescence by p53. Eur J Biochem 2001; 268 (10): 2784-2791.

ITAHANA K, DIMRI GP, HARA E, ITAHANA Y, ZOU Y, DESPREZ PY, *et al.* A role for p53 in maintaining and establishing the quiescence growth arrest in human cells. J Biol Chem 2002; 277 (20): 18206-18214.

ITAHANA K, CAMPISI J, DIMRI GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. Biogerontology 2004; 5 (1): 1-10.

IZBICKA E, WHEELHOUSE RT, RAYMOND E, DAVIDSON KK, LAWRENCE RA, SUN D, *et al.* Effects of cationic porphyrins as G-quadruplex interactive agents in human tumor cells. Cancer Res 1999; 59 (3): 639-644.

JACKSON MW, AGARWAL MK, AGARWAL ML, AGARWAL A, STANHOPE-BAKER P, WILLIAMS BR, *et al.* Limited role of N-terminal phosphoserine residues in the activation of transcription by p53. Oncogene 2004; 23 (25): 4477-4487.

JACKSON SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. Carcinogenesis 2002; 23 (5): 687-696.

JACOBS JJ, DE LANGE T. Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. Curr Biol 2004; 14 (24): 2302-2308.

JACOBS JJ, DE LANGE T. p16INK4a as a second effector of the telomere damage pathway. Cell Cycle 2005; 4 (10): 1364-1368.

JAGADEESH S, KYO S, BANERJEE PP. Genistein represses telomerase activity via both transcriptional and posttranslational mechanisms in human prostate cancer cells. Cancer Res 2006; 66 (4): 2107-2115.

JAZAYERI A, FALCK J, LUKAS C, BARTEK J, SMITH GC, LUKAS J, *et al.* ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. Nat Cell Biol 2006; 8 (1): 37-45.

JIANG XR, JIMENEZ G, CHANG E, FROLKIS M, KUSLER B, SAGE M, *et al.* Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. Nat Genet 1999; 21 (1): 111-114.

JIN Z, EL-DEIRY WS. Overview of cell death signaling pathways. Cancer Biol Ther 2005; 4 (2): 139-163.

JORDAN P, CARMO-FONSECA M. Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA in vivo. Nucleic Acids Res 1998; 26 (12): 2831-2836.

KAMIJO T, WEBER JD, ZAMBETTI G, ZINDY F, ROUSSEL MF, SHERR CJ. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95 (14): 8292-8297.

KAMINKER PG, KIM SH, TAYLOR RD, ZEBARJADIAN Y, FUNK WD, MORIN GB, *et al.* TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. J Biol Chem 2001; 276 (38): 35891-35899.

KANE DJ, SARAFIAN TA, ANTON R, HAHN H, GRALLA EB, VALENTINE JS, *et al.* Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. Science 1993; 262 (5137): 1274-1277.

KANG SS, KWON T, KWON DY, DO SI. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. J Biol Chem 1999; 274 (19): 13085-13090. KAPOOR M, LOZANO G.

Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95 (6): 2834-2837.

KAPOOR M, HAMM R, YAN W, TAYA Y, LOZANO G.

Cooperative phosphorylation at multiple sites is required to activate p53 in response to UV radiation. Oncogene 2000; 19 (3): 358-364.

KARLSEDER J, BROCCOLI D, DAI Y, HARDY S, DE LANGE T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. Science 1999; 283 (5406): 1321-1325.

KARLSEDER J, SMOGORZEWSKA A, DE LANGE T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. Science 2002; 295 (5564): 2446-2449.

KARLSEDER J, HOKE K, MIRZOEVA OK, BAKKENIST C, KASTAN MB, PETRINI JH, *et al.* The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. PLoS Biol 2004; 2 (8): E240.

KATAKURA Y, NAKATA E, MIURA T, SHIRAHATA S. Transforming growth factor beta triggers two independent-senescence programs in cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 1999; 255 (1): 110-115.

KATAKURA Y, YOSHIZAKI K, YASUDA T, TSUNEMATSU T, UEHARA N, MIURA T, *et al.* Functional impairment of telomerase in sublines derived from human lung adenocarcinoma exposed to mild oxidative stress. Biochem Biophys Res Commun 2005; 334 (2): 450-459.

KATINKA MD, BOURGAIN FM.

Interstitial telomeres are hotspots for illegitimate recombination with DNA molecules injected into the macronucleus of Paramecium primaurelia. Embo J 1992; 11 (2): 725-732.

KELLER DM, ZENG X, WANG Y, ZHANG QH, KAPOOR M, SHU H, *et al.* A DNA damage-induced p53 serine 392 kinase complex contains CK2, hSpt16, and SSRP1. Mol Cell 2001; 7 (2): 283-292.

KERR JF, WINTERFORD CM, HARMON BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 1994; 73 (8): 2013-2026.

KEYS B, SERRA V, SARETZKI G, VON ZGLINICKI T. Telomere shortening in human fibroblasts is not dependent on the size of the telomeric-3'-overhang. Aging Cell 2004; 3 (3): 103-109.

KIM MY, VANKAYALAPATI H, SHIN-YA K, WIERZBA K, HURLEY LH. 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.

KIM MY, GLEASON-GUZMAN M, IZBICKA E, NISHIOKA D, HURLEY LH. 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.

KIM SH, KAMINKER P, CAMPISI J. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. Nat Genet 1999; 23 (4): 405-412. KIM SH, BEAUSEJOUR C, DAVALOS AR, KAMINKER P, HEO SJ, CAMPISI J. TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. J Biol Chem 2004; 279 (42): 43799-43804.

KIM SJ, LEE HD, ROBBINS PD, BUSAM K, SPORN MB, ROBERTS AB. Regulation of transforming growth factor beta 1 gene expression by the product of the retinoblastomasusceptibility gene. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88 (8): 3052-3056.

KIM TH, ZHAO Y, BARBER MJ, KUHARSKY DK, YIN XM. Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax. J Biol Chem 2000; 275 (50): 39474-39481.

KIM YW, HUR SY, KIM TE, LEE JM, NAMKOONG SE, KI IK, *et al.* Protein kinase C modulates telomerase activity in human cervical cancer cells. Exp Mol Med 2001; 33 (3): 156-163.

KIM YY, PARK BJ, KIM DJ, KIM WH, KIM S, OH KS, *et al.* Modification of serine 392 is a critical event in the regulation of p53 nuclear export and stability. FEBS Lett 2004; 572 (1-3): 92-98.

KIRK KE, HARMON BP, REICHARDT IK, SEDAT JW, BLACKBURN EH. Block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation. Science 1997; 275 (5305): 1478-1481.

KLENER P, JR., ANDERA L, KLENER P, NECAS E, ZIVNY J. Cell death signalling pathways in the pathogenesis and therapy of haematologic malignancies: overview of therapeutic approaches. Folia Biol (Praha) 2006; 52 (4): 119-136.

KOMATA T, KONDO Y, KANZAWA T, HIROHATA S, KOGA S, SUMIYOSHI H, *et al.* Treatment of malignant glioma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit (human telomerase reverse transcriptase) gene promoter. Cancer Res 2001; 61 (15): 5796-5802.

KONDO S, TANAKA Y, KONDO Y, HITOMI M, BARNETT GH, ISHIZAKA Y, *et al.* Antisense telomerase treatment: induction of two distinct pathways, apoptosis and differentiation. Faseb J 1998; 12 (10): 801-811.

KONDO Y, KONDO S, TANAKA Y, HAQQI T, BARNA BP, COWELL JK. Inhibition of telomerase increases the susceptibility of human malignant glioblastoma cells to cisplatin-induced apoptosis. Oncogene 1998; 16 (17): 2243-2248.

KORSMEYER SJ. Regulators of cell death. Trends Genet 1995; 11 (3): 101-105.

KORSMEYER SJ, WEI MC, SAITO M, WEILER S, OH KJ, SCHLESINGER PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. Cell Death Differ 2000; 7 (12): 1166-1173.

KOZLOV SV, GRAHAM ME, PENG C, CHEN P, ROBINSON PJ, LAVIN MF. Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. Embo J 2006; 25 (15): 3504-3514. KRAEMER K, FUESSEL S, SCHMIDT U, KOTZSCH M, SCHWENZER B, WIRTH MP, *et al.* Antisense-mediated hTERT inhibition specifically reduces the growth of human bladder cancer cells. Clin Cancer Res 2003; 9 (10 Pt 1): 3794-3800.

KRAVEKA JM, LI L, BIELAWSKI J, OBEID LM, OGRETMEN B. Involvement of endogenous ceramide in the inhibition of telomerase activity and induction of morphologic differentiation in response to all-trans-retinoic acid in human neuroblastoma cells. Arch Biochem Biophys 2003; 419 (2): 110-119.

KROEMER G, REED JC. Mitochondrial control of cell death. Nat Med 2000; 6 (5): 513-519.

KU WC, CHENG AJ, WANG TC. Inhibition of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture. Biochem Biophys Res Commun 1997; 241 (3): 730-736.

KUMAGAI A, DUNPHY WG. Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in Xenopus egg extracts. Mol Cell 2000; 6 (4): 839-849.

KUMAGAI A, LEE J, YOO HY, DUNPHY WG. TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. Cell 2006; 124 (5): 943-955.

KUMAR S, BOEHM J, LEE JC. p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. Nat Rev Drug Discov 2003; 2 (9): 717-726.

KURVINEN K, SYRJANEN S, JOHANSSON B. Long-term suppression of telomerase expression in HeLa cell clones, transfected with an expression vector carrying siRNA targeting hTERT mRNA. Int J Oncol 2006; 29 (1): 279-288.

KURZ EU, DOUGLAS P, LEES-MILLER SP. Doxorubicin activates ATM-dependent phosphorylation of multiple downstream targets in part through the generation of reactive oxygen species. J Biol Chem 2004; 279 (51): 53272-53281.

KYO S, TAKAKURA M, KANAYA T, ZHUO W, FUJIMOTO K, NISHIO Y, *et al.* Estrogen activates telomerase. Cancer Res 1999; 59 (23): 5917-5921.

KYO S, TAKAKURA M, TAIRA T, KANAYA T, ITOH H, YUTSUDO M, *et al.* Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). Nucleic Acids Res 2000; 28 (3): 669-677.

KYRIAKIS JM, AVRUCH J. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. Bioessays 1996; 18 (7): 567-577.

LAVRIK IN, GOLKS A, KRAMMER PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. J Clin Invest 2005; 115 (10): 2665-2672.

LAZEBNIK YA, KAUFMANN SH, DESNOYERS S, POIRIER GG, EARNSHAW WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. Nature 1994; 371 (6495): 346-347.

LEBEL C, WELLINGER RJ. Structure terminale des chromosomes: le "capuchon télomérique" Médecine/Sciences 2004; (20) 207-212

LECHEL A, SATYANARAYANA A, JU Z, PLENTZ RR, SCHAETZLEIN S, RUDOLPH C, et al. The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis in vivo. EMBO Rep 2005; 6 (3): 275-281.

LEE JH, KIM KH, MORIO T, KIM H. Ataxia-telangiectasia-mutated-dependent activation of Ku in human fibroblasts exposed to hydrogen peroxide. Ann N Y Acad Sci 2006; 1091: 76-82.

LEE JW, HARRIGAN J, OPRESKO PL, BOHR VA. Pathways and functions of the Werner syndrome protein. Mech Ageing Dev 2005; 126 (1): 79-86.

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.

LENDVAY TS, MORRIS DK, SAH J, BALASUBRAMANIAN B, LUNDBLAD V. Senescence mutants of Saccharomyces cerevisiae with a defect in telomere replication identify three additional EST genes.

Genetics 1996; 144 (4): 1399-1412.

LEONETTI C, AMODEI S, D'ANGELO C, RIZZO A, BENASSI B, ANTONELLI A, et al. Biological activity of the G-quadruplex ligand RHPS4 (3,11-difluoro-6,8,13-trimethyl-8H-quino[4,3,2kl]acridinium methosulfate) is associated with telomere capping alteration. Mol Pharmacol 2004; 66 (5): 1138-1146.

LETAI A, BASSIK MC, WALENSKY LD, SORCINELLI MD, WEILER S, KORSMEYER SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics.

Cancer Cell 2002; 2 (3): 183-192.

LI B, OESTREICH S, DE LANGE T. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. Cell 2000; 101 (5): 471-483.

LIB, DE LANGE T. Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. Mol Biol Cell 2003; 14 (12): 5060-5068.

LI CP, HUANG JH, CHANG AC, HUNG YM, LIN CH, CHAO Y, et al. A G-quadruplex ligand 3,3'-diethyloxadicarbocyanine iodide induces mitochondrion-mediated apoptosis but not decrease of telomerase activity in nasopharyngeal carcinoma NPC-TW01 cells. Pharm Res 2004; 21 (1): 93-100.

LI DW, LIU JP, SCHMID PC, SCHLOSSER R, FENG H, LIU WB, et al. Protein serine/threonine phosphatase-1 dephosphorylates p53 at Ser-15 and Ser-37 to modulate its transcriptional and apoptotic activities. Oncogene 2006; 25 (21): 3006-3022.

LI GZ, ELLER MS, FIROOZABADI R, GILCHREST BA. Evidence that exposure of the telomere 3' overhang sequence induces senescence. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100 (2): 527-531.

LI H, ZHAO L, YANG Z, FUNDER JW, LIU JP.

Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cells. J Biol Chem 1998; 273 (50): 33436-33442.

LI LY, LUO X, WANG X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. Nature 2001; 412 (6842): 95-99.

LIN SY, ELLEDGE SJ. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. Cell 2003; 113 (7): 881-889.

LINGNER J, CECH TR, HUGHES TR, LUNDBLAD V. Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94 (21): 11190-11195.

LIU D, O'CONNOR MS, QIN J, SONGYANG Z. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. J Biol Chem 2004; 279 (49): 51338-51342.

LIU D, SAFARI A, O'CONNOR MS, CHAN DW, LAEGELER A, QIN J, *et al.* PTOP interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. Nat Cell Biol 2004; 6 (7): 673-680.

LIU K, HODES RJ, WENG N.

Cutting edge: telomerase activation in human T lymphocytes does not require increase in telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein but is associated with hTERT phosphorylation and nuclear translocation. J Immunol 2001; 166 (8): 4826-4830.

LIU S, BEKKER-JENSEN S, MAILAND N, LUKAS C, BARTEK J, LUKAS J. Claspin operates downstream of TopBP1 to direct ATR signaling towards Chk1 activation. Mol Cell Biol 2006; 26 (16): 6056-6064.

LIU X, ZOU H, SLAUGHTER C, WANG X. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. Cell 1997; 89 (2): 175-184.

LIU Y, SNOW BE, HANDE MP, BAERLOCHER G, KICKHOEFER VA, YEUNG D, *et al.* Telomerase-associated protein TEP1 is not essential for telomerase activity or telomere length maintenance in vivo.

Mol Cell Biol 2000; 20 (21): 8178-8184.

LIU Z, FRANTZ JD, GILBERT W, TYE BK. Identification and characterization of a nuclease activity specific for G4 tetrastranded DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90 (8): 3157-3161.

LIU Z, GILBERT W. The yeast KEM1 gene encodes a nuclease specific for G4 tetraplex DNA: implication of in vivo functions for this novel DNA structure. Cell 1994; 77 (7): 1083-1092.

LOAYZA D, DE LANGE T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. Nature 2003; 423 (6943): 1013-1018.

LOAYZA D, PARSONS H, DONIGIAN J, HOKE K, DE LANGE T. DNA binding features of human POT1: a nonamer 5'-TAGGGTTAG-3' minimal binding site, sequence specificity, and internal binding to multimeric sites. J Biol Chem 2004; 279 (13): 13241-13248. LOPATINA NG, POOLE JC, SALDANHA SN, HANSEN NJ, KEY JS, PITA MA, *et al.* Control mechanisms in the regulation of telomerase reverse transcriptase expression in differentiating human teratocarcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun 2003; 306 (3): 650-659.

LU Q, HENDERSON E. Two Tetrahymena G-DNA-binding proteins, TGP1 and TGP3, share novel motifs and may play a role in micronuclear division. Nucleic Acids Res 2000; 28 (15): 2993-3001.

LU X, BOCANGEL D, NANNENGA B, YAMAGUCHI H, APPELLA E, DONEHOWER LA. The p53-induced oncogenic phosphatase PPM1D interacts with uracil DNA glycosylase and suppresses base excision repair. Mol Cell 2004; 15 (4): 621-634.

LU X, NANNENGA B, DONEHOWER LA. PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. Genes Dev 2005; 19 (10): 1162-1174.

LU X, NGUYEN TA, DONEHOWER LA. Reversal of the ATM/ATR-mediated DNA damage response by the oncogenic phosphatase PPM1D. Cell Cycle 2005; 4 (8): 1060-1064.

LUDWIG A, SARETZKI G, HOLM PS, TIEMANN F, LORENZ M, EMRICH T, *et al.* Ribozyme cleavage of telomerase mRNA sensitizes breast epithelial cells to inhibitors of topoisomerase. Cancer Res 2001; 61 (7): 3053-3061.

LY JD, GRUBB DR, LAWEN A. The mitochondrial membrane potential (deltapsi(m)) in apoptosis; an update. Apoptosis 2003; 8 (2): 115-128.

LYONNAIS S, HOUNSOU C, TEULADE-FICHOU MP, JEUSSET J, LE CAM E, MIRAMBEAU G. G-quartets assembly within a G-rich DNA flap. A possible event at the center of the HIV-1 genome. Nucleic Acids Res 2002; 30 (23): 5276-5283.

MACFARLANE M, WILLIAMS AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. EMBO Rep 2004; 5 (7): 674-678.

MACHWE A, XIAO L, ORREN DK. TRF2 recruits the Werner syndrome (WRN) exonuclease for processing of telomeric DNA. Oncogene 2004; 23 (1): 149-156.

MAIDA Y, KYO S, KANAYA T, WANG Z, YATABE N, TANAKA M, *et al.* Direct activation of telomerase by EGF through Ets-mediated transactivation of TERT via MAP kinase signaling pathway. Oncogene 2002; 21 (26): 4071-4079.

MAITI S, CHAUDHURY NK, 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.

MANDAL M, KUMAR R. Bcl-2 modulates telomerase activity. J Biol Chem 1997; 272 (22): 14183-14187.

MANDIC A, HANSSON J, LINDER S, SHOSHAN MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. J Biol Chem 2003; 278 (11): 9100-9106. MARCAND S, BREVET V, MANN C, GILSON E. Cell cycle restriction of telomere elongation. Curr Biol 2000; 10 (8): 487-490.

MARCHAND C, POURQUIER P, LACO GS, 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 2002; 277 (11): 8906-8911.

MARQUET R, BAUDIN F, GABUS C, DARLIX JL, 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.

MARZO I, BRENNER C, ZAMZAMI N, SUSIN SA, BEUTNER G, BRDICZKA D, *et al.* The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. J Exp Med 1998; 187 (8): 1261-1271.

MASSARD C, ZERMATI Y, PAULEAU AL, LAROCHETTE N, METIVIER D, SABATIER L, *et al.* hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. Oncogene 2006; 25 (33): 4505-4514.

MASUTOMI K, KANEKO S, HAYASHI N, YAMASHITA T, SHIROTA Y, KOBAYASHI K, *et al.* Telomerase activity reconstituted in vitro with purified human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA component. J Biol Chem 2000; 275 (29): 22568-22573.

MCCLINTOCK B. The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. Proc Natl Acad Sci U S A 1939; 25 (8): 405-416.

MCILROY D, TANAKA M, SAKAHIRA H, FUKUYAMA H, SUZUKI M, YAMAMURA K, *et al.* An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. Genes Dev 2000; 14 (5): 549-558.

MERGNY JL, HELENE C. G-quadruplex DNA: a target for drug design. Nat Med 1998; 4 (12): 1366-1367.

MERGNY JL, LACROIX L, TEULADE-FICHOU MP, HOUNSOU C, GUITTAT L, HOARAU M, *et al.* Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98 (6): 3062-3067.

MERGNY JL, RIOU JF, MAILLIET P, TEULADE-FICHOU MP, GILSON E. Natural and pharmacological regulation of telomerase. Nucleic Acids Res 2002; 30 (4): 839-865.

MIKHAILOV V, MIKHAILOVA M, DEGENHARDT K, VENKATACHALAM MA, WHITE E, SAIKUMAR P.

Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release.

J Biol Chem 2003; 278 (7): 5367-5376.

MITCHELL JR, WOOD E, COLLINS K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. Nature 1999; 402 (6761): 551-555. MIURA M, ZHU H, ROTELLO R, HARTWIEG EA, YUAN J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C. elegans cell death gene ced-3. Cell 1993; 75 (4): 653-660.

MORALES CP, HOLT SE, OUELLETTE M, KAUR KJ, YAN Y, WILSON KS, *et al.* Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. Nat Genet 1999; 21 (1): 115-118.

MORIN GB.

The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. Cell 1989; 59 (3): 521-529.

MOTTA MC, CARETTI G, BADARACCO GF, MANTOVANI R. Interactions of the CCAAT-binding trimer NF-Y with nucleosomes. J Biol Chem 1999; 274 (3): 1326-1333.

MUMBY MC, WALTER G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. Physiol Rev 1993; 73 (4): 673-699.

MURATA T, HIBASAMI H, MAEKAWA S, TAGAWA T, NAKASHIMA K. Preferential binding of cisplatin to mitochondrial DNA and suppression of ATP generation in human malignant melanoma cells. Biochem Int 1990; 20 (5): 949-955.

MURCHIE AI, LILLEY DM. Retinoblastoma susceptibility genes contain 5' sequences with a high propensity to form guanine-tetrad structures. Nucleic Acids Res 1992; 20 (1): 49-53.

MYERS JS, CORTEZ D. Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. J Biol Chem 2006; 281 (14): 9346-9350.

NAGATA S. Apoptosis by death factor. Cell 1997; 88 (3): 355-365.

NANNENGA B, LU X, DUMBLE M, VAN MAANEN M, NGUYEN TA, SUTTON R, *et al.* Augmented cancer resistance and DNA damage response phenotypes in PPM1D null mice. Mol Carcinog 2006; 45 (8): 594-604.

NEWBOLD RF. The significance of telomerase activation and cellular immortalization in human cancer. Mutagenesis 2002; 17 (6): 539-550.

NGUYEN DC, CROWE DL. Intact functional domains of the retinoblastoma gene product (pRb) are required for downregulation of telomerase activity. Biochim Biophys Acta 1999; 1445 (2): 207-215.

NIIDA H, SHINKAI Y, HANDE MP, MATSUMOTO T, TAKEHARA S, TACHIBANA M, *et al.* Telomere maintenance in telomerase-deficient mouse embryonic stem cells: characterization of an amplified telomeric DNA. Mol Cell Biol 2000; 20 (11): 4115-4127. NIIDA H, NAKANISHI M. DNA damage checkpoints in mammals. Mutagenesis 2006; 21 (1): 3-9.

NODA A, NING Y, VENABLE SF, PEREIRA-SMITH OM, SMITH JR. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. Exp Cell Res 1994; 211 (1): 90-98.

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 (2): 491-506.

NORTH S, HAINAUT P. p53 and cell-cycle control: a finger in every pie. Pathol Biol (Paris) 2000; 48 (3): 255-270.

O'CONNOR MS, SAFARI A, LIU D, QIN J, SONGYANG Z. The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. J Biol Chem 2004; 279 (27): 28585-28591.

OGANESIAN L, MOON IK, BRYAN TM, JARSTFER MB. Extension of G-quadruplex DNA by ciliate telomerase. Embo J 2006; 25 (5): 1148-1159.

OGANESIAN L, BRYAN TM. Physiological relevance of telomeric G-quadruplex formation: a potential drug target. Bioessays 2007; 29 (2): 155-165.

OH S, SONG Y, YIM J, KIM TK. The Wilms' tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. J Biol Chem 1999; 274 (52): 37473-37478.

OHASHI N, YAAR M, ELLER MS, TRUZZI F, GILCHREST BA. Features that determine telomere homolog oligonucleotide-induced therapeutic DNA damage-like responses in cancer cells. J Cell Physiol 2007; 210 (3): 582-595.

OHMURA Y, AOE M, ANDOU A, SHIMIZU N. Telomerase activity and Bcl-2 expression in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2000; 6 (8): 2980-2987.

OIKAWA S, KAWANISHI S. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. FEBS Lett 1999; 453 (3): 365-368.

OIKONOMOU P, MESSINIS I, TSEZOU A. DNA methylation is not likely to be responsible for hTERT expression in premalignant cervical lesions. Exp Biol Med (Maywood) 2007; 232 (7): 881-886.

OLIVA-TRASTOY M, BERTHONAUD V, CHEVALIER A, DUCROT C, MARSOLIER-KERGOAT MC, MANN C, *et al.* The Wip1 phosphatase (PPM1D) antagonizes activation of the Chk2 tumour suppressor kinase. Oncogene 2007; 26 (10): 1449-1458.

OLIVER FJ, DE LA RUBIA G, ROLLI V, RUIZ-RUIZ MC, DE MURCIA G, MURCIA JM. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. J Biol Chem 1998; 273 (50): 33533-33539. OLOVNIKOV AM [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. Dokl Akad Nauk SSSR 1971; 201 (6): 1496-1499.

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; 277 (43): 41110-41119.

PAESCHKE K, SIMONSSON T, POSTBERG J, RHODES D, LIPPS HJ. Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo. Nat Struct Mol Biol 2005; 12 (10): 847-854.

PAN B, XIONG Y, SHI K, DENG J, SUNDARALINGAM M. Crystal structure of an RNA purine-rich tetraplex containing adenine tetrads: implications for specific binding in RNA tetraplexes. Structure 2003; 11 (7): 815-823.

PAN B, XIONG Y, SHI K, SUNDARALINGAM M. An eight-stranded helical fragment in RNA crystal structure: implications for tetraplex interaction. Structure 2003; 11 (7): 825-831.

PANTIC M, ZIMMERMANN S, WALLER CF, MARTENS UM. The level of telomere dysfunction determines the efficacy of telomerase-based therapeutics in a lung cancer cell line.

Int J Oncol 2005; 26 (5): 1227-1232.

PANTIC M, ZIMMERMANN S, EL DALY H, OPITZ OG, POPP S, BOUKAMP P, et al. Telomere dysfunction and loss of p53 cooperate in defective mitotic segregation of chromosomes in cancer cells. Oncogene 2006; 25 (32): 4413-4420.

PARK MJ, JANG YK, CHOI ES, KIM HS, PARK SD. Fission yeast Rap1 homolog is a telomere-specific silencing factor and interacts with Taz1p. Mol Cells 2002; 13 (2): 327-333.

PARKINSON GN, LEE MP, NEIDLE S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. Nature 2002; 417 (6891): 876-880.

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.

PASSOS JF, SARETZKI G, AHMED S, NELSON G, RICHTER T, PETERS H, et al. Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. PLoS Biol 2007; 5 (5): e110.

PATEL PK, KOTI AS, HOSUR RV. NMR studies on truncated sequences of human telomeric DNA: observation of a novel A-tetrad. Nucleic Acids Res 1999; 27 (19): 3836-3843.

PENDINO F, FLEXOR M, DELHOMMEAU F, BUET D, LANOTTE M, SEGAL-BENDIRDJIAN E. Retinoids down-regulate telomerase and telomere length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98 (12): 6662-6667.

PENDINO F, TARKANYI I, DUDOGNON C, HILLION J, LANOTTE M, ARADI J, et al. Telomeres and telomerase: Pharmacological targets for new anticancer strategies? Curr Cancer Drug Targets 2006; 6 (2): 147-180.

PENNARUN G, GRANOTIER C, GAUTHIER LR, 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.

PENNOCK E, BUCKLEY K, LUNDBLAD V. Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. Cell 2001; 104 (3): 387-396.

PETRINI JH, STRACKER TH. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. Trends Cell Biol 2003; 13 (9): 458-462.

PHAM NA, HEDLEY DW. Respiratory chain-generated oxidative stress following treatment of leukemic blasts with DNA-damaging agents. Exp Cell Res 2001; 264 (2): 345-352.

PHATAK P, COOKSON JC, DAI F, SMITH V, GARTENHAUS RB, STEVENS MF, *et al.* Telomere uncapping by the G-quadruplex ligand RHPS4 inhibits clonogenic tumour cell growth in vitro and in vivo consistent with a cancer stem cell targeting mechanism. Br J Cancer 2007; 96 (8): 1223-1233.

POGACIC V, DRAGON F, FILIPOWICZ W. Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. Mol Cell Biol 2000; 20 (23): 9028-9040.

POMERANTZ J, SCHREIBER-AGUS N, LIEGEOIS NJ, SILVERMAN A, ALLAND L, CHIN L, *et al.* The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53.

Cell 1998; 92 (6): 713-723.

PROIA DA, NANNENGA BW, DONEHOWER LA, WEIGEL NL. Dual roles for the phosphatase PPM1D in regulating progesterone receptor function. J Biol Chem 2006; 281 (11): 7089-7101.

PURI N, ELLER MS, BYERS HR, DYKSTRA S, KUBERA J, GILCHREST BA. Telomere-based DNA damage responses: a new approach to melanoma. Faseb J 2004; 18 (12): 1373-1381.

QI H, LIN CP, FU X, WOOD LM, LIU AA, TSAI YC, *et al.* G-quadruplexes induce apoptosis in tumor cells. Cancer Res 2006; 66 (24): 11808-11816.

RADHAKRISHNAN SK, GARTEL AL. CDK9 phosphorylates p53 on serine residues 33, 315 and 392. Cell Cycle 2006; 5 (5): 519-521.

RAMAN M, EARNEST S, ZHANG K, ZHAO Y, COBB MH. TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage. Embo J 2007; 26 (8): 2005-2014.

REDDEL RR. The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. Carcinogenesis 2000; 21 (3): 477-484.

REERS M, SMITH TW, CHEN LB. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. Biochemistry 1991; 30 (18): 4480-4486. REICHENBACH P, HOSS M, AZZALIN CM, NABHOLZ M, BUCHER P, LINGNER J. A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed. Curr Biol 2003; 13 (7): 568-574.

REN JG, XIA HL, TIAN YM, JUST T, CAI GP, DAI YR. Expression of telomerase inhibits hydroxyl radical-induced apoptosis in normal telomerase negative human lung fibroblasts.

FEBS Lett 2001; 488 (3): 133-138.

REZLER EM, BEARSS DJ, HURLEY LH. Telomeres and telomerases as drug targets. Curr Opin Pharmacol 2002; 2 (4): 415-423.

REZLER EM, BEARSS DJ, HURLEY LH. Telomere inhibition and telomere disruption as processes for drug targeting. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2003; 43: 359-379.

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 U S A 2002; 99 (5): 2672-2677.

RIOU JF, GOMEZ D, LEMARTELEUR T, TRENTESAUX C. [G-quadruplex DNA: myth or reality?]. Bull Cancer 2003; 90 (4): 305-313.

RIOU JF.

G-quadruplex interacting agents targeting the telomeric G-overhang are more than simple telomerase inhibitors. Curr Med Chem Anticancer Agents 2004; 4 (5): 439-443.

RIOU JF, GOMEZ D, MERGNY JL, GUITTAT L, PATERSKI R, CHENAIS B, et al. [Regulation of telomeres length: making the telomeres accessible?]. Bull Cancer 2005; 92 (1): 13-22.

ROGAKOU EP, PILCH DR, ORR AH, IVANOVA VS, BONNER WM. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J Biol Chem 1998; 273 (10): 5858-5868.

ROGAN EM, BRYAN TM, HUKKU B, MACLEAN K, CHANG AC, MOY EL, et al. Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. Mol Cell Biol 1995; 15 (9): 4745-4753.

RONINSON IB, BROUDE EV, CHANG BD. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. Drug Resist Updat 2001; 4 (5): 303-313.

ROSTOVTSEVA TK, ANTONSSON B, SUZUKI M, YOULE RJ, COLOMBINI M, BEZRUKOV SM. Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. J Biol Chem 2004; 279 (14): 13575-13583.

ROSU F, GABELICA V, SHIN-YA K, DE PAUW E. Telomestatin-induced stabilization of the human telomeric DNA quadruplex monitored by electrospray mass spectrometry. Chem Commun (Camb) 2003; (21): 2702-2703.

ROTMAN G, SHILOH Y. Ataxia-telangiectasia: is ATM a sensor of oxidative damage and stress? Bioessays 1997; 19 (10): 911-917.

ROUCOU X, MONTESSUIT S, ANTONSSON B, MARTINOU JC. Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein.

Biochem J 2002; 368 (Pt 3): 915-921.

RUBIO MA, KIM SH, CAMPISI J. Reversible manipulation of telomerase expression and telomere length. Implications for the ionizing radiation response and replicative senescence of human cells. J Biol Chem 2002; 277 (32): 28609-28617.

RUFFOLO SC, BRECKENRIDGE DG, NGUYEN M, GOPING IS, GROSS A, KORSMEYER SJ, *et al.* BID-dependent and BID-independent pathways for BAX insertion into mitochondria. Cell Death Differ 2000; 7 (11): 1101-1108.

SAITO S, YAMAGUCHI H, HIGASHIMOTO Y, CHAO C, XU Y, FORNACE AJ, JR., *et al.* Phosphorylation site interdependence of human p53 post-translational modifications in response to stress. J Biol Chem 2003; 278 (39): 37536-37544.

SAKAGUCHI K, SAITO S, HIGASHIMOTO Y, ROY S, ANDERSON CW, APPELLA E. Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. J Biol Chem 2000; 275 (13): 9278-9283.

SAKAHIRA H, ENARI M, NAGATA S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature 1998; 391 (6662): 96-99.

SANCAR A, LINDSEY-BOLTZ LA, UNSAL-KACMAZ K, LINN S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. Annu Rev Biochem 2004; 73: 39-85.

SANDELL LL, ZAKIAN VA. Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. Cell 1993; 75 (4): 729-739.

SAYED M, KIM SO, SALH BS, ISSINGER OG, PELECH SL. Stress-induced activation of protein kinase CK2 by direct interaction with p38 mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem 2000; 275 (22): 16569-16573.

SCHAEFFER C, BARDONI B, MANDEL JL, EHRESMANN B, EHRESMANN C, 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.

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 U S A 2001; 98 (15): 8572-8577.

SCHMITZ I, KIRCHHOFF S, KRAMMER PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. Int J Biochem Cell Biol 2000; 32 (11-12): 1123-1136.

SEIMIYA H, MURAMATSU Y, OHISHI T, TSURUO T. Tankyrase 1 as a target for telomere-directed molecular cancer therapeutics. Cancer Cell 2005; 7 (1): 25-37.

SEN D, 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. SENGUPTA S, HARRIS CC. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. Nat Rev Mol Cell Biol 2005; 6 (1): 44-55.

SETO AG, LIVENGOOD AJ, TZFATI Y, BLACKBURN EH, CECH TR. A bulged stem tethers Est1p to telomerase RNA in budding yeast. Genes Dev 2002; 16 (21): 2800-2812.

SHACKELFORD RE, INNES CL, SIEBER SO, HEINLOTH AN, LEADON SA, PAULES RS. The Ataxia telangiectasia gene product is required for oxidative stress-induced G1 and G2 checkpoint function in human fibroblasts. J Biol Chem 2001; 276 (24): 21951-21959.

SHAMMAS MA, SIMMONS CG, COREY DR, SHMOOKLER REIS RJ. Telomerase inhibition by peptide nucleic acids reverses 'immortality' of transformed human cells. Oncogene 1999; 18 (46): 6191-6200.

SHAMMAS MA, SHMOOKLER REIS RJ, LI C, KOLEY H, HURLEY LH, ANDERSON KC, *et al.* Telomerase inhibition and cell growth arrest after telomestatin treatment in multiple myeloma. Clin Cancer Res 2004; 10 (2): 770-776.

SHARPLESS NE, DEPINHO RA. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. J Clin Invest 2004; 113 (2): 160-168.

SHAY JW. At the end of the millennium, a view of the end. Nat Genet 1999; 23 (4): 382-383.

SHEN ZX, SHI ZZ, FANG J, GU BW, LI JM, ZHU YM, *et al.* All-trans retinoic acid/As2O3 combination yields a high quality remission and survival in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101 (15): 5328-5335.

SHERR CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2 (10): 731-737.

SHIEH SY, IKEDA M, TAYA Y, PRIVES C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. Cell 1997; 91 (3): 325-334.

SHILOH Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. Nat Rev Cancer 2003; 3 (3): 155-168.

SHIMIZU S, IDE T, YANAGIDA T, TSUJIMOTO Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. J Biol Chem 2000; 275 (16): 12321-12325.

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.

SHIPPEN-LENTZ D, BLACKBURN EH. Functional evidence for an RNA template in telomerase. Science 1990; 247 (4942): 546-552. SHORE D. Aging. Silence is golden. Curr Biol 1995; 5 (8): 822-825.

SHREERAM S, DEMIDOV ON, HEE WK, YAMAGUCHI H, ONISHI N, KEK C, *et al.* Wip1 phosphatase modulates ATM-dependent signaling pathways. Mol Cell 2006; 23 (5): 757-764.

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 U S A 2002; 99 (18): 11593-11598.

SILICIANO JD, CANMAN CE, TAYA Y, SAKAGUCHI K, APPELLA E, KASTAN MB. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. Genes Dev 1997; 11 (24): 3471-3481.

SMILEY ST, REERS M, MOTTOLA-HARTSHORN C, LIN M, CHEN A, SMITH TW, *et al.* Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88 (9): 3671-3675.

SMITH S, DE LANGE T. TRF1, a mammalian telomeric protein. Trends Genet 1997; 13 (1): 21-26.

SMITH S, GIRIAT I, SCHMITT A, DE LANGE T. Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. Science 1998; 282 (5393): 1484-1487.

SMITH S, DE LANGE T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. Curr Biol 2000; 10 (20): 1299-1302.

SMOGORZEWSKA A, VAN STEENSEL B, BIANCHI A, OELMANN S, SCHAEFER MR, SCHNAPP G, *et al.* Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. Mol Cell Biol 2000; 20 (5): 1659-1668.

SMOGORZEWSKA A, DE LANGE T. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. Embo J 2002; 21 (16): 4338-4348.

SMOGORZEWSKA A, DE LANGE T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. Annu Rev Biochem 2004; 73: 177-208.

SNOW BE, ERDMANN N, CRUICKSHANK J, GOLDMAN H, GILL RM, ROBINSON MO, *et al.* Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. Curr Biol 2003; 13 (8): 698-704.

SONG K, JUNG D, JUNG Y, LEE SG, LEE I. Interaction of human Ku70 with TRF2. FEBS Lett 2000; 481 (1): 81-85.

STANSEL RM, DE LANGE T, GRIFFITH JD. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. Embo J 2001; 20 (19): 5532-5540. STANSEL RM, SUBRAMANIAN D, GRIFFITH JD. p53 binds telomeric single strand overhangs and t-loop junctions in vitro. J Biol Chem 2002; 277 (14): 11625-11628.

STARK GR, TAYLOR WR. Control of the G2/M transition. Mol Biotechnol 2006; 32 (3): 227-248.

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 (25): 3135-3144.

STELLWAGEN AE, HAIMBERGER ZW, VEATCH JR, GOTTSCHLING DE. Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. Genes Dev 2003; 17 (19): 2384-2395.

STENNICKE HR, SALVESEN GS. Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. Biochim Biophys Acta 2000; 1477 (1-2): 299-306.

STEWART SA, BEN-PORATH I, CAREY VJ, O'CONNOR BF, HAHN WC, WEINBERG RA. Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. Nat Genet 2003; 33 (4): 492-496.

STRAHL C, BLACKBURN EH. The effects of nucleoside analogs on telomerase and telomeres in Tetrahymena. Nucleic Acids Res 1994; 22 (6): 893-900.

STRAHL C, BLACKBURN EH. Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. Mol Cell Biol 1996; 16 (1): 53-65.

STUCKI M, JACKSON SP. gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. DNA Repair (Amst) 2006; 5 (5): 534-543.

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.

SUN D, THOMPSON B, CATHERS BE, SALAZAR M, KERWIN SM, TRENT JO, *et al.* Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. J Med Chem 1997; 40 (14): 2113-2116.

SUN H, KAROW JK, HICKSON ID, MAIZELS N. The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA. J Biol Chem 1998; 273 (42): 27587-27592.

SUN H, BENNETT RJ, MAIZELS N. The Saccharomyces cerevisiae Sgs1 helicase efficiently unwinds G-G paired DNAs. Nucleic Acids Res 1999; 27 (9): 1978-1984.

SUN H, YABUKI A, MAIZELS N. A human nuclease specific for G4 DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98 (22): 12444-12449. SUNDQUIST WI, 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.

SUSIN SA, LORENZO HK, ZAMZAMI N, MARZO I, SNOW BE, BROTHERS GM, *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature 1999; 397 (6718): 441-446.

SUSIN SA, DAUGAS E, RAVAGNAN L, SAMEJIMA K, ZAMZAMI N, LOEFFLER M, *et al.* Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. J Exp Med 2000; 192 (4): 571-580.

TAETZ S, BALDES C, MURDTER TE, KLEIDEITER E, PIOTROWSKA K, BOCK U, *et al.*Biopharmaceutical Characterization of the Telomerase Inhibitor BRACO19.
Pharm Res 2006:
TAHARA H, SHIN-YA K, SEIMIYA H, YAMADA H, TSURUO T, IDE T.
G-Quadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells.
Oncogene 2006; 25 (13): 1955-1966.

TAKAI H, SMOGORZEWSKA A, DE LANGE T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. Curr Biol 2003; 13 (17): 1549-1556.

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.

TAKEKAWA M, MAEDA T, SAITO H. Protein phosphatase 2Calpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. Embo J 1998; 17 (16): 4744-4752.

TAKEKAWA M, ADACHI M, NAKAHATA A, NAKAYAMA I, ITOH F, TSUKUDA H, *et al.* p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. Embo J 2000; 19 (23): 6517-6526.

TANAKA H, MENDONCA MS, BRADSHAW PS, HOELZ DJ, MALKAS LH, MEYN MS, *et al.* DNA damage-induced phosphorylation of the human telomere-associated protein TRF2. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102 (43): 15539-15544.

TANG D, KIDD VJ. Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. J Biol Chem 1998; 273 (44): 28549-28552.

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.

TAUCHI T, SHIN-YA K, SASHIDA G, SUMI M, OKABE S, OHYASHIKI JH, *et al.* Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: in vitro and in vivo studies in acute leukemia. Oncogene 2006; 25 (42): 5719-5725.

TESTA U.

Apoptotic mechanisms in the control of erythropoiesis. Leukemia 2004; 18 (7): 1176-1199.

TIBBETTS RS, BRUMBAUGH KM, WILLIAMS JM, SARKARIA JN, CLIBY WA, SHIEH SY, et al. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. Genes Dev 1999; 13 (2): 152-157.

TISHKOFF DX, JOHNSON AW, KOLODNER RD. Molecular and genetic analysis of the gene encoding the Saccharomyces cerevisiae strand exchange protein Sep1. Mol Cell Biol 1991; 11 (5): 2593-2608.

TODD AK, JOHNSTON M, NEIDLE S. Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA. Nucleic Acids Res 2005; 33 (9): 2901-2907.

TOMBOR B, RUNDELL K, OLTVAI ZN. Bcl-2 promotes premature senescence induced by oncogenic Ras. Biochem Biophys Res Commun 2003; 303 (3): 800-807.

ULLRICH SJ. SAKAGUCHI K. LEES-MILLER SP. FISCELLA M. MERCER WE. ANDERSON CW. et al. Phosphorylation at Ser-15 and Ser-392 in mutant p53 molecules from human tumors is altered compared to wildtype p53.

Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90 (13): 5954-5958.

UNGER T, JUVEN-GERSHON T, MOALLEM E, BERGER M, VOGT SIONOV R, LOZANO G, et al. Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. Embo J 1999; 18 (7): 1805-1814.

VAN LOO G, SCHOTTE P, VAN GURP M, DEMOL H, HOORELBEKE B, GEVAERT K, et al. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. Cell Death Differ 2001; 8 (12): 1136-1142.

VAN STEENSEL B, DE LANGE T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. Nature 1997; 385 (6618): 740-743.

VAN STEENSEL B, SMOGORZEWSKA A, DE LANGE T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. Cell 1998; 92 (3): 401-413.

VANDER HEIDEN MG, CHANDEL NS, LI XX, SCHUMACKER PT, COLOMBINI M, THOMPSON CB. Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97 (9): 4666-4671.

VAZIRI H, WEST MD, ALLSOPP RC, DAVISON TS, WU YS, ARROWSMITH CH, et al. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. Embo J 1997; 16 (19): 6018-6033.

VERDUN RE, CRABBE L, HAGGBLOM C, KARLSEDER J. Functional human telomeres are recognized as DNA damage in G2 of the cell cycle. Mol Cell 2005; 20 (4): 551-561.

VON ZGLINICKI T, PILGER R, SITTE N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. Free Radic Biol Med 2000; 28 (1): 64-74.

VON ZGLINICKI T. Oxidative stress shortens telomeres. Trends Biochem Sci 2002; 27 (7): 339-344. VULLIAMY T, MARRONE A, GOLDMAN F, DEARLOVE A, BESSLER M, MASON PJ, *et al.* The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. Nature 2001; 413 (6854): 432-435.

WANG E.

Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. Cancer Res 1995; 55 (11): 2284-2292.

WANG F, PODELL ER, ZAUG AJ, YANG Y, BACIU P, CECH TR, *et al.* The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. Nature 2007; 445 (7127): 506-510.

WANG RC, SMOGORZEWSKA A, DE LANGE T. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. Cell 2004; 119 (3): 355-368.

WANG X, ZOU L, LU T, BAO S, HUROV KE, HITTELMAN WN, *et al.* Rad17 phosphorylation is required for claspin recruitment and Chk1 activation in response to replication stress. Mol Cell 2006; 23 (3): 331-341.

WANG Y, PATEL DJ.

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.

WANG Y, PATEL DJ. Solution structure of a parallel-stranded G-quadruplex DNA. J Mol Biol 1993; 234 (4): 1171-1183.

WANG Y, PRIVES C. Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. Nature 1995; 376 (6535): 88-91.

WANG YF, GUO KJ, HUANG BT, LIU Y, TANG XY, ZHANG JJ, *et al.* Inhibitory effects of antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides on pancreatic cancer cell Bxpc-3 telomerase activity and cell growth in vitro. World J Gastroenterol 2006; 12 (25): 4004-4008.

WARD IM, CHEN J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. J Biol Chem 2001; 276 (51): 47759-47762.

WARD IM, MINN K, CHEN J. UV-induced ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) activation requires replication stress. J Biol Chem 2004; 279 (11): 9677-9680.

WATSON JD. Origin of concatemeric T7 DNA. Nat New Biol 1972; 239 (94): 197-201.

WEBLEY K, BOND JA, JONES CJ, BLAYDES JP, CRAIG A, HUPP T, *et al.* Posttranslational modifications of p53 in replicative senescence overlapping but distinct from those induced by DNA damage. Mol Cell Biol 2000; 20 (8): 2803-2808.

WEI MC, ZONG WX, CHENG EH, LINDSTEN T, PANOUTSAKOPOULOU V, ROSS AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. Science 2001; 292 (5517): 727-730.

WEINRICH SL, PRUZAN R, MA L, OUELLETTE M, TESMER VM, HOLT SE, et al. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT.

Nat Genet 1997; 17 (4): 498-502.

WEISZ L, OREN M, ROTTER V. Transcription regulation by mutant p53. Oncogene 2007; 26 (15): 2202-2211.

WELLINGER RJ, ETHIER K, LABRECQUE P, ZAKIAN VA. Evidence for a new step in telomere maintenance. Cell 1996; 85 (3): 423-433.

WILLIAMS BR. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. Oncogene 1999; 18 (45): 6112-6120.

WILLIAMS ES, STAP J, ESSERS J, PONNAIYA B, LUIJSTERBURG MS, KRAWCZYK PM, et al. DNA double-strand breaks are not sufficient to initiate recruitment of TRF2. Nat Genet 2007; 39 (6): 696-698.

WON J, YIM J, KIM TK.

Sp1 and Sp3 recruit histone deacetylase to repress transcription of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter in normal human somatic cells. J Biol Chem 2002; 277 (41): 38230-38238.

WOOTEN LG, OGRETMEN B. Sp1/Sp3-dependent regulation of human telomerase reverse transcriptase promoter activity by the bioactive sphingolipid ceramide. J Biol Chem 2005; 280 (32): 28867-28876.

WU KJ, 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.

WU L, DAVIES SL, HICKSON ID. Roles of RecQ family helicases in the maintenance of genome stability. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2000; 65: 573-581.

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 (13): 9636-9644.

WU L, HICKSON ID. The Bloom's syndrome helicase stimulates the activity of human topoisomerase IIIalpha. Nucleic Acids Res 2002; 30 (22): 4823-4829.

XIE S, WANG Q, WU H, COGSWELL J, LU L, JHANWAR-UNIYAL M, et al. Reactive oxygen species-induced phosphorylation of p53 on serine 20 is mediated in part by polo-like kinase-3. J Biol Chem 2001; 276 (39): 36194-36199.

XIN H, LIU D, WAN M, SAFARI A, KIM H, SUN W, et al. TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. Nature 2007; 445 (7127): 559-562.

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.

YAGI K, FURUHASHI M, AOKI H, GOTO D, KUWANO H, SUGAMURA K, *et al.* c-myc is a downstream target of the Smad pathway. J Biol Chem 2002; 277 (1): 854-861.

YAGO M, OHKI R, HATAKEYAMA S, FUJITA T, ISHIKAWA F. Variant forms of upstream stimulatory factors (USFs) control the promoter activity of hTERT, the human gene encoding the catalytic subunit of telomerase. FEBS Lett 2002; 520 (1-3): 40-46.

YAMAGUCHI T, YAMADA R, TOMIKAWA A, SHUDO K, SAITO M, ISHIKAWA F, *et al.* Recognition of 2'-deoxy-l-ribonucleoside 5'-triphosphates by human telomerase. Biochem Biophys Res Commun 2000; 279 (2): 475-481.

YANG Q, ZHENG YL, HARRIS CC. POT1 and TRF2 cooperate to maintain telomeric integrity. Mol Cell Biol 2005; 25 (3): 1070-1080.

YARDEN Y, SLIWKOWSKI MX. Untangling the ErbB signalling network. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2 (2): 127-137.

YE JZ, DONIGIAN JR, VAN OVERBEEK M, LOAYZA D, LUO Y, KRUTCHINSKY AN, *et al.* TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. J Biol Chem 2004; 279 (45): 47264-47271.

YE JZ, HOCKEMEYER D, KRUTCHINSKY AN, LOAYZA D, HOOPER SM, CHAIT BT, *et al.* POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. Genes Dev 2004; 18 (14): 1649-1654.

YEO M, RHA SY, JEUNG HC, HU SX, YANG SH, KIM YS, *et al.* Attenuation of telomerase activity by hammerhead ribozyme targeting human telomerase RNA induces growth retardation and apoptosis in human breast tumor cells. Int J Cancer 2005; 114 (3): 484-489.

YI X, TESMER VM, SAVRE-TRAIN I, SHAY JW, WRIGHT WE. Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. Mol Cell Biol 1999; 19 (6): 3989-3997.

YI X, SHAY JW, WRIGHT WE.

Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells. Nucleic Acids Res 2001; 29 (23): 4818-4825.

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.

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.

YOU Y, PU P, HUANG Q, XIA Z, WANG C, WANG G, *et al.* Antisense telomerase RNA inhibits the growth of human glioma cells in vitro and in vivo. Int J Oncol 2006; 28 (5): 1225-1232.

YOU Z, CHAHWAN C, BAILIS J, HUNTER T, RUSSELL P. ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. Mol Cell Biol 2005; 25 (13): 5363-5379. YU CC, LO SC, WANG TC. Telomerase is regulated by protein kinase C-zeta in human nasopharyngeal cancer cells. Biochem J 2001; 355 (Pt 2): 459-464.

YU GL, BRADLEY JD, ATTARDI LD, BLACKBURN EH. In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. Nature 1990; 344 (6262): 126-132.

YUAN J, SHAHAM S, LEDOUX S, ELLIS HM, HORVITZ HR. The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. Cell 1993; 75 (4): 641-652.

ZAHLER AM, WILLIAMSON JR, CECH TR, PRESCOTT DM. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. Nature 1991; 350 (6320): 718-720.

ZAMZAMI N, KROEMER G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. Nat Rev Mol Cell Biol 2001; 2 (1): 67-71.

ZAUG AJ, PODELL ER, CECH TR. Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102 (31): 10864-10869.

ZHANG H, PAN KH, COHEN SN. Senescence-specific gene expression fingerprints reveal cell-type-dependent physical clustering of up-regulated chromosomal loci. Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100 (6): 3251-3256.

ZHANG H, COHEN SN. Smurf2 up-regulation activates telomere-dependent senescence. Genes Dev 2004; 18 (24): 3028-3040.

ZHANG H, HERBERT BS, PAN KH, SHAY JW, COHEN SN. Disparate effects of telomere attrition on gene expression during replicative senescence of human mammary epithelial cells cultured under different conditions. Oncogene 2004; 23 (37): 6193-6198.

ZHANG QS, MANCHE L, XU RM, KRAINER AR. hnRNP A1 associates with telomere ends and stimulates telomerase activity. Rna 2006; 12 (6): 1116-1128.

ZHANG X, MAR V, ZHOU W, HARRINGTON L, ROBINSON MO. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. Genes Dev 1999; 13 (18): 2388-2399.

ZHANG X, CHEN Z, CHEN Y, TONG T. Delivering antisense telomerase RNA by a hybrid adenovirus/ adeno-associated virus significantly suppresses the malignant phenotype and enhances cell apoptosis of human breast cancer cells. Oncogene 2003; 22 (16): 2405-2416.

ZHANG Y, XIONG Y, YARBROUGH WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. Cell 1998; 92 (6): 725-734.

ZHAO J, BILSLAND A, HOARE SF, KEITH WN. 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. ZHAO J, BILSLAND A, JACKSON K, KEITH WN.

MDM2 negatively regulates the human telomerase RNA gene promoter. BMC Cancer 2005; 5: 6.

ZHENG JN, SUN YF, PEI DS, LIU JJ, CHEN JC, LI W, *et al.* Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human renal carcinoma cells by anti-telomerase small interfering RNAs. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2006; 38 (7): 500-506.

ZHIVOTOVSKY B, ORRENIUS S, BRUSTUGUN OT, DOSKELAND SO. Injected cytochrome c induces apoptosis. Nature 1998; 391 (6666): 449-450.

ZHONG Z, SHIUE L, KAPLAN S, DE LANGE T. A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. Mol Cell Biol 1992; 12 (11): 4834-4843.

ZHOU BB, ELLEDGE SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature 2000; 408 (6811): 433-439.

ZHOU JM, ZHU XF, LU YJ, DENG R, HUANG ZS, MEI YP, *et al.* Senescence and telomere shortening induced by novel potent G-quadruplex interactive agents, quindoline derivatives, in human cancer cell lines. Oncogene 2006; 25 (4): 503-511.

ZHOU XZ, LU KP. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. Cell 2001; 107 (3): 347-359.

ZHU X, KUMAR R, MANDAL M, SHARMA N, SHARMA HW, DHINGRA U, *et al.* Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93 (12): 6091-6095.

ZHU XD, KUSTER B, MANN M, PETRINI JH, DE LANGE T. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. Nat Genet 2000; 25 (3): 347-352.

ZHU XD, NIEDERNHOFER L, KUSTER B, MANN M, HOEIJMAKERS JH, DE LANGE T. ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNAcontaining double minute chromosomes. Mol Cell 2003; 12 (6): 1489-1498.

ZIEGLER U, GROSCURTH P. Morphological features of cell death. News Physiol Sci 2004; 19: 124-128.

ZIMMERMANN S, MARTENS UM. Telomeres and telomerase as targets for cancer therapy. Cell Mol Life Sci 2007; 64 (7-8): 906-921.

ZOU L, ELLEDGE SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. Science 2003; 300 (5625): 1542-1548.

ZOU L, ZHANG P, LUO C, TU Z. shRNA-targeted hTERT suppress cell proliferation of bladder cancer by inhibiting telomerase activity. Cancer Chemother Pharmacol 2006; 57 (3): 328-334. ZOU Y, SFEIR A, GRYAZNOV SM, SHAY JW, WRIGHT WE. Does a sentinel or a subset of short telomeres determine replicative senescence? Mol Biol Cell 2004; 15 (8): 3709-3718.

ZWEIER JL, DUKE SS, KUPPUSAMY P, SYLVESTER JT, GABRIELSON EW. Electron paramagnetic resonance evidence that cellular oxygen toxicity is caused by the generation of superoxide and hydroxyl free radicals. FEBS Lett 1989; 252 (1-2): 12-16.

ZWICKER J, GROSS C, LUCIBELLO FC, TRUSS M, EHLERT F, ENGELAND K, *et al.* Cell cycle regulation of cdc25C transcription is mediated by the periodic repression of the glutamine-rich activators NF-Y and Sp1. Nucleic Acids Res 1995; 23 (19): 3822-3830.

VI. ANNEXES

Articles insérés dans ce manuscrit :

DOUARRE, C., GOMEZ, D., MORJANI, H., ZAHM, J-M, O'DONOHUE, MF, EDDABRA, L, MAILLIET, P., RIOU, J.F. AND TRENTESAUX, C.

Overexpression of Bcl-2 is associated with apoptotic resistance to the G-quadruplex ligand 12459 but is not sufficient to confer resistance to senescence. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33, 2192-2203.

<u>GOMEZ, D*., WENNER, T.*, BRASSART, B*., **DOUARRE, C***., MACADRÉ, J., <u>O'DONOHUE, M.F., EL KHOURY, V., SHIN-YA, K., MORJANI, H., TRENTESAUX, C</u>. AND RIOU, J.F.</u>

Telomestatin-induced telomere uncapping is modulated by POT1 through G-overhang extension in HT1080 human tumor cells. *J Biol Chem.* 2006; 281, 38721-29(*these authors contributed equally to this work).

Articles publiés dans le cadre de la thèse insérés en annexes :

GOMEZ, D., AOUALI, N., RENAUD, A., **DOUARRE, C.**, SHIN-YA, K., TAZI, J., MARTINEZ, S., TRENTESAUX, C., MORJANI, H. AND RIOU, J.F.

Resistance to senescence induction and telomere shortening by a G-quadruplex ligand inhibitor of telomerase. *Cancer Res.* 2003; 63, 6149-53.

<u>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.</u>

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, 50554-62

<u>GOMEZ D.; O'DONOHUE M.F., WENNER T., **DOUARRE C.**, MACADRÉ J., KOEBEL P., GIRAUD-PANIS M.J., KAPLAN H., KOLKES A., SHIN-YA K.AND RIOU J.F.</u>

The G-quadruplexe ligand telomestatin inhibits POT1 binding to the telomeric sequence *in vitro* and induces GFP-POT1 dissociation from telomeres in human cells. *Cancer research.* 2006; 66, 6908-6912.

Articles publiés dans le cadre de la thèse :

WENNER, T*; TEMIME-SMAALI, N*; GIRAUD-PANIS, MJ; C; DOUARRE, C, MORJANI, H; GOMEZ, D; LONDONO-VALLEJO, A; GUERET, GILSON, E. AND RIOU, JF..

Human topoisomerase III interacts with TRF2 at telomere and is required for normal growth and telomere stability of ALT cells (in preparation) (*these authors contributed equally to this work).

DE CIAN, A ; LACROIX, L; **DOUARRE, C**; TEMIME-SMAALI, N; TRENTESAUX, C; RIOU, JF; MERGNY, JL.

Targeting Telomeres and Telomerase, Biochimie, 2007, In press.

RIOU, J.F. DE CIAN, A., GUITTAT, L., GOMEZ, D., DOUARRE, C., LACROIX, L., TRENTESAUX, C. AND MERGNY, J.L.

Telomerase and telomere intercating agents. In: Targeted therapies in oncology, clinical achievements. Giacccone, G. and Soria, J.C. eds. Taylor & Francis Publishers, NY. 2007, In press.
Resistance to Senescence Induction and Telomere Shortening by a G-Quadruplex Ligand Inhibitor of Telomerase¹

Dennis Gomez, Nassera Aouali, Alexandra Renaud, Céline Douarre, Kazuo Shin-ya, Jamal Tazi, Sophie Martinez, Chantal Trentesaux, Hamid Morjani, and Jean-François Riou²

Onco-Pharmacologie [D. G., C. D., C. T., J-F. R.], Unité Mixte de Recherche (UMR) 6142 Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) [N. A., A. R., C. D., C. T., H. M.], and Equipe d'Accueil 2070 [S. M.], Institut Fédératif de Recherche 53, Unité de Formation et de Recherche de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51096 Reims Cedex, France; Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-0032, Japan [K. S.]; and Institut de Génétique Moléculaire, UMR 5535 CNRS, IFR 122, 34293 Montpellier cedex, France [J. T.]

Abstract

The molecular mechanisms induced by G-quadruplex ligands to trigger senescence in mammalian cells are still unknown, although the critical role of telomerase is highly suspected. JFA2 cells selected for resistance to senescence induced by the G-quadruplex ligand 12459 presented an overexpression of hTERT transcript that correlated to a functional increase in telomerase activity and telomere length. Consistently, treatment with 12459 failed to trigger senescence and telomere shortening in JFA2 cells. Resistant cells also presented cross-resistance for senescence induction to telomestatin, another G-quadruplex ligand from a different series, but not to other anticancer agents, indicating the selectivity of the resistance mechanism. We, thus, provide evidence that telomerase activity and telomere length are key cellular determinants of the resistance to G-quadruplex ligands.

Introduction

Telomeres are essential to maintain the stability of chromosome ends, and telomeric overhang has been implicated as a critical component of telomere structure that is required for proper telomere function (1, 2). Telomeric overhang may be involved in different DNA conformations such as T-loops (2) or G-quadruplexes (3). The presence of telomeric quadruplexes has been recently demonstrated in the macronucleus of a ciliate, *Stylonychia lemnane* (4). G-quadruplexes were also present in other parts of the genome such as gene promoters (5), and it was proposed that their formation must be strictly controlled during replication to avoid genetic instability (6).

Telomere replication is sustained 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 expressed in most somatic cells (7). Such differential expression provided the initial rationale for the evaluation of telomerase inhibitors as potential anticancer agents. Folding of the telomeric G-rich overhang into a quadruplex DNA has been found to inhibit telomerase activity. Therefore, stabilization of the telomeric overhang into a G-quadruplex structure by specific ligands can then be an original strategy to achieve antitumour activity (8–10). The G-quadruplex, which is very different from classical double-stranded B DNA, provides a good structural basis for selective recognition, and several

classes of small molecules that selectively bind to G-quadruplex DNA and inhibit telomerase activity have been described (8-10).

The 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine derivatives are potent telomerase inhibitors that bind to telomeric G-quadruplex (11). In this series, 12459 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 TRAP³-G4 assay (12). In addition, 12459 is able to induce both telomere shortening and senescence in the human lung adenocarcinoma A549 cell line, as a function of its concentration and time exposure (11). The molecular mechanism induced by G-quadruplex ligands to trigger senescence in mammalian cells is still unknown, although the critical role of telomerase is highly suspected.

In the present study, we used the strategy to render tumor cells resistant to the senescence induced by a G-quadruplex ligand to analyze cellular determinants of the resistance. We show that resistant cells presented a functional alteration of telomerase activity and telomere length that lead to a specific resistance to senescence and telomere shortening triggered by G-quadruplex ligands.

Materials and Methods

Oligonucleotides and Compounds. All oligonucleotides were synthesized and purified by Eurogentec (Seraing, Belgium). The triazine derivative 12459 was synthesized according to patent WO-0140218. Telomestatin was purified as described previously (13). Other compounds were commercially available (Sigma Chemical Co.). Solutions of compounds were prepared in 10 mM DMSO, except telomestatin, which was prepared in 5 mM methanol/DMSO (50:50). Additional dilutions were made in water.

Telomerase Assay. Telomerase extracts were prepared from A549 and JFA2 cells as described previously (11). The TRAP assay was performed in the presence of an internal control (internal telomerase assay standard) corresponding to the 36-mer (5'-ATCCGTCGAGCAGAGTTAAAAGGC-CGAGAAGCGAT-3') as described previously (14).

Cell Culture Conditions and Selection of Resistant Cell Lines. The A549 human lung carcinoma cell line was from American Type Culture Collection. These cells were grown in DMEM with Glutamax (Invitrogen), supplemented with 10% FCS and antibiotics.

For long-term growth of A549 cells, treated or untreated cells were seeded at 6×10^4 cells into 25-cm² tissue culture flask for 4 days, then trypsinized and counted. Each time, 6×10^4 cells were replated onto a new culture flask with fresh drug solution. The JFA-resistant cell line was established by progressive adaptation to long-term treatment with 12459. The starting concentration was 0.05 μ M and was progressively increased to 0.1, 0.15, 0.2, and 0.3 μ M. Fresh drug solution was added at each passage. The JFA2 cell line is derived from JFA 0.2 that was further grown in the absence of 12459.

The 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 manu-

Received 5/14/03; revised 7/10/03; accepted 8/5/03.

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.

¹ Supported by an Action Concertée Incitative "Molécules et Cibles Thérapeutiques" grant from the French Ministry of Research and a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer (Grant 4691).

² To whom requests for reprints should be addressed, at Unité de Formation et de Recherche de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France. Phone: 33-3-26-91-80-13; Fax: 33-3-26-91-37-30; E-mail: jf.riou@univ-reims.fr.

³ The abbreviations used are: TRAP, telomeric repeat amplification protocol; TBE, Tris-borate EDTA; PD, population doubling; TRF, telomere restriction fragment.

facturer (Sigma Chemical Co.). The resistance index was the ratio of the drug IC_{50} for JFA2 over A549 and corresponded to the mean value (+/-SD) of three independent experiments.

RNA Preparation and RT-PCR Assays. Total RNA was isolated from 1×10^{6} cells using Tri-Reagent (Sigma Chemical Co.) as recommended by the manufacturer. One microgram 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 μ l with diethyl pyrocarbonate-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') as described previously (15), 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'-ACCCCACTGAAAAAGATGA-3') and primer reverse (5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'). Amplified products were resolved on 6% nondenaturing polyacrylamide gels in 1× TBE and stained with SYBR Green I (Roche). Quantification was performed by a charge-coupled device 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.

Telomeric Restriction Size Fragment Determination. Genomic DNA was digested with *Hinfl/RsaI* restriction enzymes and electrophoresed in 0.8% agarose gels in 1× TBE buffer. DNA were transferred onto hybond N+ membrane (Amersham) and then prehybridized for 2 h at 65°C in 7% SDS, 1% BSA, and 0.5 M NaPO4 (pH 8.0). A 0.7-kb telomere DNA probe (pUCTelo; a gift from Prof. E. Gilson, École Normale Supérieure, Lyon, France) was labeled 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 and 0.1% SDS at 65°C for 15 min, then twice with 2× SSC and 0.1% SDS at room temperature. Telomeric smears were revealed by exposure in a phosphorimager (Typhoon 9210; Amersham).

Solution Hybridization Experiments. The nondenaturing hybridization assay to detect 3' telomere overhang was performed with a modification of the procedure described previously (16). Aliquots of 5 μ g of undigested genomic DNA were hybridized at 37°C overnight with 0.5 pmol of [γ^{32} P]ATP-labeled (CCCTAA)₄ oligonucleotide in hybridization buffer [10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl2, and 1 mM DTT] in the presence or absence of *Rsa*I and *Hin*fI restriction enzymes in a volume of 20 μ l. Reaction was stopped with 2 μ l of 1% SDS and 1 mg/ml Proteinase K and incubated for 30 min at 50°C. Hybridized samples were size-fractionated on 0.8% agarose gels in 1× TBE buffer. The gels were stained with ethidium bromide, washed, and dried on Whatman filter paper. Ethidium fluorescence and radioactivity were scanned in a phosphorimager (Typhoon 9210; Amersham). The procedure allows detecting the amount of single-strand overhang available for hybridization (undigested sample), and migration sizes represent overall telomere length (*Rsa*I and *Hin*fI digested sample).

Results and Discussion

We have investigated the cellular consequences of the induction of resistance to the triazine derivative 12459, using the appearance of senescence as a selection criterion. Derivative 12459 was chosen inside the triazine series because of its high selectivity profile (12). A549 cells were treated with a 12459 starting concentration equal to 0.05 μ M that was progressively increased to 0.1, 0.15, 0.2, and 0.3 μ M. Parallel treatment of A549 cells with a fixed 12459 concentration equal to 0.04 μ M induced a plateau after 40 days on growth curves, followed rapidly by an arrest in cell growth at day 60 with typical figures of senescent cells (Fig. 1A). Cells treated with the progressive increase of 12459 concentrations up to 0.3 µM (Fig. 1B, JFA 0.3) entered a plateau at day 85, followed by an arrest of cell growth at day 95 (approximately PD 70). In contrast, cells treated up to 0.2 μ M (JFA 0.2) were able to continue growth up to 225 days (Fig. 1B and data not shown) and, therefore, became resistant to the drug treatment. The growth curve of JFA 0.2 presented a slight decrease in proliferation



Fig. 1. Induction of resistance to senescence in A549 cells. *A*, long-term culture of A549 cells in the absence (A549) or presence of 12459 (0.04 μ M). A cell growth plateau appears at day 45, and cells enter senescence at day 60. *B*, long-term culture of A549 cells in the absence (A549) or presence of increasing concentrations of 12459 (JFA, 0.05–0.2 μ M and 0.3 μ M). *Numbers* indicated the time points at which 12459 concentration was increased. JFA 0.3 enters senescence at day 85. JFA 0.2 was able to continue growth up to 225 days (shown to 120 days) and presents resistance to 12459-induced senescence. *C*, cross-resistance profile to anticancer agents. The resistance index represents, for each compound, the ratio of IC₅₀ on JFA2:IC₅₀ on A549 measured for 96-h drug exposure. Data correspond to the mean values (+/-SD) of three independent determinations.

between days 80 and 90 (approximately PD 80) that disappeared later. We suspected that cells passed through an event(s) that may modify their sensitivity to additional drug treatment. To elucidate that point, 12459 concentration was increased to 0.3 μ M on JFA 0.2 at PD 90 (day 110) and was pursued up to PD 180 without any evidence of senescence (data not shown). Altogether, these results indicated that JFA 0.2 cells have became 5- to 7.5-fold resistant to 12459 after PD 80, as compared with A549 parental cells. Although JFA 0.2 cells never entered senescence, an apparent delay on cell growth was observed corresponding to an increase in doubling time to 27.5 h, as compared with untreated A549 (20-h doubling time). The doublingtime modification is mainly dependent on the 12459 treatment because its removal at day 110 (PD 90) restored a growth nearly similar to that of untreated A549 cells with a doubling time equal to 22 h. Additional evaluations were performed on untreated JFA 0.2, renamed JFA2.

JFA2 was evaluated for its cross-resistance pattern to other cytotoxic agents with various mechanisms of action. As shown in Fig. 1*C*, JFA2 has no cross-resistance to the topoisomerase inhibitors doxorubicin, etoposide, and camptothecin; to the DNA-interactive agent mitomycin C; or to the tubulin poison vinblastin. Interestingly, a 3- to 4-fold collateral sensitivity was found for etoposide and vinblastin. This sensitivity may be related to vinblastin for an increased amount of mitotic alteration (anaphase bridges) observed in JFA2 that could enhance the effect of this mitotic poison (data not shown). Etoposide was also shown to block topoisomerase II at specific sites of the telomere repeat *in vivo* (17). Therefore, an increase in JFA2 telomere length (see later in text) may explain its collateral sensitivity. No variation in MRP1 and BCRP transcripts was found and the MDR1 transcript remained undetectable in JFA2 cells (result not shown). These data indicated that JFA2 does not have the characteristics of a multidrug resistance phenotype and suggested G-quadruplex selectivity for the resistance profile.

The level of hTERT transcript was investigated in JFA2 cells by RT-PCR analysis. hTERT presented a complex splicing pattern that includes an active $(+\alpha, +\beta)$ transcript and several inactive species including, the major $-\beta$ transcript (Fig. 2A; Refs. 15 and 18). Results indicated that JFA2 presented a reproducible 2-fold overexpression of the active $(+\alpha, +\beta)$ transcript, as compared with A549 (Fig. 2, A and B). To determine whether the increased hTERT transcript is related to a functional increase in telomerase activity, TRAP activity was measured on serial amounts of protein extracts prepared from A549 and JFA2 cells. In agreement with the hTERT mRNA increase, telomerase



Fig. 2. hTERT mRNA expression and telomerase activity in sensitive and resistant cells. A, RT-PCR of hTERT in parental A549 and resistant JFA2 cells that allowed detection of active $(+\alpha, +\beta)$ and inactive $(-\beta)$ hTERT transcripts. B2-microglobulin is used as a control for mRNA expression. As indicated, cell lines were treated with 10 μ M 12459 for 48 h before RNA extraction and RT-PCR analysis (representative of three experiments). *B*, quantifications of three independent RT-PCR experiments (from independent RNA extractions) for the active and the inactive hTERT transcripts on A549 and JFA2, untreated or treated, as indicated. Data were normalized relative to the β 2-microglobulin transcript. *C*, telomerase activity was measured by the TRAP assay with extracts (10, 100, and 200 ng) from A549 and JFA2 cells. As indicated, cells were treated with 10 μ M 12459 for 48 h before the extract preparation. *D*, telomerase activity was measured by the TRAP assay with extracts (3, 10, 30, and 100 ng) from untreated A549 treated with 0.2 μ M 12459 (A549 0.2 μ M) for 100 days and JFA2 untreated for four passages (JFA2).

activity was found augmented in JFA2 cells, as compared with parental cells (Fig. 2C). Interestingly, treatment of A549 with 12459 (10 μ M, 48 h) had no effect on the global transcription level of hTERT but markedly altered its splicing pattern, leading to a strong decrease of the active transcript $(+\alpha, +\beta)$ and to an increase of the inactive one. In sharp contrast, treatment of resistant JFA2 cells with 12459 did not alter the splicing pattern. The active $(+\alpha, +\beta)$ transcript was reproducibly maintained at a level comparable with that of untreated cells, and the inactive $-\beta$ transcript was poorly modified. In agreement with these observations, telomerase activity measured by TRAP in A549-treated cells was down-regulated but remained detectable in JFA2-treated cells (with a level comparable with that of untreated A549 cells; Fig. 2C). Because short-term treatment with 12459 is able to down-regulate telomerase activity, we have also determined whether long-term treatment with a lower 12459 concentration might also modulate telomerase activity. A549 cells treated with 0.2 μ M 12459 during the resistance acquisition at day 100 presented a strong decrease of telomerase activity measured by TRAP (Fig. 2D). In JFA2 cells, the arrest of 12459 treatment progressively restore telomerase activity that became up-regulated after four passages without 12459, as compared with parental A549 cells (Fig. 2D and data not shown). These data suggested that the relaxation of the 12459 pressure might be at the origin of the hTERT and telomerase activity overexpression in JFA2. The in vitro inhibitory effect of 12459 was also measured by the TRAP assay on extracts from sensitive and resistant cells. Derivative 12459 was found to inhibit TRAP with equal IC50 for sensitive and resistant extracts. This result excludes a qualitative alteration of telomerase that modify the sensitivity of the enzyme to the inhibition by 12459 (data not shown). These data suggested that overexpression of telomerase activity and a failure of 12459 to reduce the expression levels of hTERT, through alternative splicing, in JFA2 cells are the characteristics of the resistance. Furthermore, we have obtained in the laboratory clones of another 12459-resistant cell line selected by mutagenesis. These resistant clones presented a 2- to 5-fold hTERT overexpression, increased telomerase activity, and telomere length.⁴ Therefore, up-regulation of telomerase expression seems to represent a frequent mechanism to escape from the cellular effects of 12459.

Telomestatin is another G-quadruplex ligand described as a potent and selective inhibitor of telomerase (13). To determine whether JFA2 cells are cross-resistant to the senescence induced by telomestatin, we have treated long-term cultures of A549 and JFA2 with different concentrations of this compound (0.5, 1, and 2 μ M). Telomestatin at $0.5 \ \mu M$ does not induce senescence on both A549 and JFA2 cells after 60 days (Fig. 3, A and B). An increase of telomestatin to 1 μM induced a plateau at day 16 on A549 cells, followed by senescence at day 20 (Fig. 3A), in contrast to JFA2 cells that were still able to grow after 60 days of treatment (Fig. 3B). In the presence of 2 μ M telomestatin, plateau and senescence of A549 cells were also achieved in A549 after 8 and 20 days, respectively (Fig. 3C). Telomestatin treatment was able to lower the growth of JFA2 cells up to 20 days, but then after, the cell line recovers a normal growth and does not enter senescence up to 30 days (Fig. 3D). As a control, A549 and JFA2 cell lines were also treated with 0.2 μ M 12459. In that case, the senescence was obtained after 20 days of treatment on A549 cells but not on JFA2 cells (Fig. 3, C and D).

Altogether, these data indicated that JFA2 cells presented a resistance to senescence induction toward telomestatin. Resistance of JFA2 cells to 12459 was also achieved by using a single concentration of the

⁴ D. Gomez, N. Aouali, A. Londono-Vallejo, L. Lacroix, F. Mégnin-Chanet, T. Lemarteleur, C. Douare, K. Shin-ya, P. Mailliet, C. Trentesaux, *et al.* Resistance to the short-term anti-proliferative activity of the G-quadruplex ligand 12459 is associated with telomerase overexpression and telomere capping alteration. J. Biol. Chem., accepted for publication.

compound on a cell line grown without 12459, which indicated that the phenotype acquired during resistance selection is stable.

The latter observation prompted us to analyze the telomere length in A549 and JFA2 cells during treatment with telomestatin and 12459. JFA2 have larger TRF length (\sim 12 kb) than the parental A549 cells (\sim 7 kb; Fig. 4A, compare Lanes 1 and 3). We have also determined by nondenaturing solution hybridization analysis and native agarose gel electrophoresis the signal hybridizing at 3' telomere overhang. Comparison between hybridization signals and ethidium bromide staining for undigested A549 and JFA2 DNA samples do not indicate significant change in the 3' telomere overhang (Fig. 4B, compare Lanes 1 and 3). In agreement with the TRF experiment, RsaI- and HinfI-digested DNA samples also revealed that the size of the overall telomere length hybridizing with the telomeric probe is increased in JFA2 as compared with A549 cells (Fig. 4B, compare Lanes 2 and 4). The homogenous long size of JFA2 telomeres are in favor of a functional overexpression of telomerase in resistant cells. Because the JFA2 cell line was grown without 12459 for 120 days to obtain a 5-kb net gain of telomeres, it corresponded to a 40-base increase per PD. In normal cells without telomerase, telomeres erode from 50 to 200 bases at each round of division (7). Therefore, our results are consistent with the 2-fold activation of the



Fig. 3. Resistance to senescence induction by 12459 and telomestatin on JFA2 cells. *A*, long-term culture of A549 cells in the absence (A549) or presence of telomestatin (Telo 0.5 and 1 μ M). *B*, long-term culture of JFA2 cells in the absence (JFA2) or presence of telomestatin (Telo 0.5 and 1 μ M). *C*, long-term culture of A549 cells in the absence (A549) or presence of 12459 (0.2 μ M) or telomestatin (Telo 2 μ M). *D*, long-term culture of JFA2 cells in the absence (JFA2) or presence of 12459 (0.2 μ M) or telomestatin (Telo 2 μ M). *Arrows* indicate the time points at which cells were harvested and DNA samples were prepared for TRF analysis (see Fig. 4).



Fig. 4. Increased telomere length and resistance to telomere shortening induced by telomestatin in JFA2 cells. A, TRF analysis of A549 and JFA2 resistant cells untreated or treated with telomestatin, as indicated. A549 DNA was harvested at day 20 from untreated culture (*Lane 1*) or from culture treated with 1 μ M telomestatin (*Lane 2*). JFA2 DNA was harvested at day 60 from untreated culture (*Lane 3*) or from culture treated with 1 μ M telomestatin (*Lane 2*). JFA2 DNA was harvested at day 60 from untreated culture (*Lane 3*) or from culture treated with 1 μ M telomestatin (*Lane 4*). Molecular DNA size markers are indicated on the *right. B*, nondenaturing solution hybridization analysis of 3' telomere overhang for A549 (*Lanes 1* and 1) and JFA2 (*Lanes 3* and 4). *Lanes 1* and 3 show reactions with undigested DNA; *Lanes 2* and 4 show reactions with DNA digested with *Rsal/Hint*II. *Et Br*, ethidium bromide staining of the gel; (*CCCTAA*)₄, hybridization signal of the gel. Molecular DNA

hTERT transcript, although it could not be excluded that resistance contributed to the selection of cells containing long telomeres through an unknown mechanism mediated by 12459.

Long-term treatment of A549 cells with 12459 induced a telomere shortening as reported previously (11). Similarly, telomestatin at 0.1 μ M triggered significant telomere shortening against A549 cells (Fig. 4A, *Lane 2*). In contrast, DNA samples from JFA2 cells treated with 0.1 μ M telomestatin did not show significant change in TRF length, as compared with untreated JFA2 (Fig. 4A, compare *Lanes 3* and 4). Similar results were obtained with JFA2 cells treated with 0.5 or 2 μ M telomestatin or 0.2 μ M 12459 (results not shown).

These results indicate that JFA2 cells are also resistant to telomere shortening induced with either 12459 or telomestatin, thus suggesting that resistance to senescence induction is linked with resistance to telomere shortening, in good agreement with its increased telomerase activity.

Interestingly, long-term treatment of both sensitive and resistant cells with 12459 and telomestatin are able to induce a growth inhibition, without affecting cell viability, which is uncoupled from the senescence induction and the telomere shortening in the resistant cells. It may be proposed that despite the important selectivity of these G-quadruplex-interacting agents, additional mechanisms unrelated to telomere shortening and telomerase inhibition may be involved in this growth inhibition process (9, 10). It is noteworthy that other potential quadruplexes are located throughout the genome (19, 20) and a quadruplex in the *c-myc* gene was recently highlighted to modulate *c-myc* expression and cell growth (5).

Interestingly, the senescence and telomere shortening induced by 12459 and telomestatin against the parental cells arise earlier than expected for a catalytic inhibition of telomerase but too late to be the consequence of an unrelated cytotoxic event. In agreement, the expression of a hTERT dominant negative cDNA in A549 cells, inhibiting catalytic activity of telomerase, induced a progressive telomere

shortening.⁵ Extensive and irreversible degradation of telomeres was recently observed during the late phase of apoptosis (21) but may not correspond to the present situation, because 12459 was not found to induce significant apoptosis at the concentrations used in these experiments and that telomere attrition induced by 12459 was found reversible (11). Furthermore, the G-quadruplex ligand concentrations used to trigger senescence are largely below those necessary to induce short-term (96 h) antiproliferative activity in A549 (IC₅₀ 12459, 1.8 μ M; IC₅₀ telomestatin, 9.6 μ M). These concentrations are rather compatible with a mechanism related to telomerase inhibition (ranging from 0.15 to 0.6 μ M) than to an unrelated cytotoxic event, because TRAP inhibition was found between 0.1 and 0.6 μ M for these ligands (11, 12). It should also be noted that the molecular target of these ligands is DNA itself (i.e., the 3' overhang of telomere). Therefore, telomerase that catalyzes the overhang extension has to be considered as an indirect target of these ligands. Because telomerase displays both catalytic and telomere capping functions (22), it is possible that telomere shortening and subsequent senescence induced by G-quadruplex ligands might also result from telomere uncapping that trigger more dramatic and rapid consequences on cell viability than a mechanism of telomere attrition. Therefore, the mechanisms related to the senescence induced by G-quadruplex ligands might be a subtle balance between telomerase inhibition and telomere uncapping, as a function of the ligand concentration.

Interestingly, our results indicated that JFA2 cells presented resistance to all putative mechanisms by which G-quadruplex ligands might induce telomere shortening.

It could be also speculated that telomere lengthening in resistant cells may be caused by a telomerase-independent mechanism selected during the resistance acquisition. In that case, the expression of a DN-hTERT would not be expected to induce telomere shortening in the resistant cells. Such an experiment was done on a 12459-resistant clone (JFD18) that presented a similar resistance-associated phenotype (hTERT overexpression and increased telomere length; cell line to be described elsewhere). After 80 days of culture, the DN-hTERT JFD18 cells presented a significant decrease of telomere length, suggesting that telomerase activity was necessary to maintain telomere length,⁵ a situation that would worthy correspondence to the JFA2 cells.

In conclusion, our results are the first evidence that cellular resistance to a G-quadruplex ligand is related to phenotypic alterations that are selective to G-quadruplex ligands and not to other anticancer agents. Previous studies have suggested a link between senescence induction and telomere shortening induced by these inhibitors. We believe that up-regulation of telomerase activity, lack of telomere shortening, and cross-resistance with telomestatin for senescence induction in JFA2-resistant cells reflect a situation in which telomere and telomerase are important targets for the molecular action of these ligands in cancer cells.

Acknowledgments

We thank J. L. Mergny, P. Mailliet, E. Mandine, L. Lacroix, and A. Londono-Vallejo for helpful discussions and constant support and D. Pisani for technical help.

References

- 1. Blackburn, E. H. Switching and signaling at the telomere. Cell, 106: 661-673, 2001.
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. Cell, 97: 503–514, 1999.
- Parkinson, G. N., Lee, M. P., and Neidle, S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. Nature (Lond.), 417: 876–880, 2002.
- 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. USA, 98: 8572–8577, 2001.
- 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. USA, 99: 11593–11598, 2002.
- 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., 31: 405–409, 2002.
- McEachern, M. J., Krauskopf, A., and Blackburn, E. H. Telomeres and their control. Annu. Rev. Genet., 34: 331–358, 2000.
- Mergny, J. L., Riou, J. F., Mailliet, P., Teulade-Fichou, M. P., and Gilson, E. Natural and pharmacological regulation of telomerase. Nucleic Acids Res., 30: 839–865, 2002.
- Neidle, S., and Parkinson, G. Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. Nat. Rev. Drug Discov., 1: 383–393, 2002.
- Rezler, E. M., Bearss, D. J., and Hurley, L. H. Telomeres and telomerases as drug targets. Curr. Opin. Pharmacol., 2: 415–423, 2002.
- Riou, J. F., Guittat, L., Mailliet, P., Laoui, A., Renou, E., Petitgenet, O., Megnin-Chanet, F., Helene, C., and Mergny, J. L. Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 2672–2677, 2002.
- 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., 62: 3365–3368, 2002.
- 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., 124: 2098–2099, 2002.
- Krupp, G., Kuhne, K., Tamm, S., Klapper, W., Heidorn, K., Rott, A., and Parwaresch, R. Molecular basis of artifacts in the detection of telomerase activity and a modified primer for a more robust 'TRAP' assay. Nucleic Acids Res., 25: 919–921, 1997.
- 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., 29: 4818–4825, 2001.
- Makarov, V. L., Hirose, Y., and Langmore, J. P. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. Cell, 88: 657–666, 1997.
- Yoon, H. J., Choi, I. Y., Kang, M. R., Kim, S. S., Muller, M. T., Spitzner, J. R., and Chung, I. K. DNA topoisomerase II cleavage of telomeres *in vitro* and *in vivo*. Biochim. Biophys. Acta, 1395: 110–120, 1998.
- Wick, M., Zubov, D., and Hagen, G. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). Gene, 232: 97–106, 1999.
- Riou, J. F., Gomez, D., Lemarteleur, T., and Trentesaux, C. G-quadruplex DNA: myth or reality? Bull. Cancer, 90: 305–313, 2003.
- 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, *107*: 489–499, 2001.
- Ramirez, R., Carracedo, J., Jimenez, R., Canela, A., Herrera, E., Aljama, P., and Blasco, M. A. Massive telomere loss is an early event of DNA damage-induced apoptosis. J. Biol. Chem., 278: 836–842, 2003.
- Chan, S. W., and Blackburn, E. H. New ways not to make ends meet: telomerase. DNA damage proteins and heterochromatin. Oncogene, 21: 553–563, 2002.

⁵ D. Gomez, unpublished observations.

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 singlestranded 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.

The Journal of Biological Chemistry

ibc

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 TRAP¹-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).

III 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-2phenylindole; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid; hTERT, human TERT; hTR, human TR; hnRNPA1, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1; Gy, grays.

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

The Journal of Biological Chemistry

ibc

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 Me₂SO, except telomestatin, which was prepared at 5 mM in MeOH/Me₂SO (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'-AATCCGTCGAGCA-GAGTTAAAAGGCCGAGAAGCGAT-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 \times 10^6 cells were seeded into 10 tissue culture flasks and were treated for 48 h with 300 μ g/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 $12459\ (10\ \mu\text{M}).$ 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 phosphatebuffered saline and stained with Hoechst 33342 at 1 μ g/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 \pm 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 (¹³⁷Cs) 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-cm² 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 \times 10³ cells from A549- or JFD18-transfected cell lines according to the previously published procedure (22) in the presence or absence of 5 μ M **12459**. Results represent the mean value \pm S.D. of triplicate determinations.

RNA Preparation and RT¹-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 $200 \ \mu$ l 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'-GCCTGAGCT-GTACTTTGTCAA-3') and the reverse TERT2531R primer (5-AGGCT-GCAGAGCAGCGTGGAGAGG-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'-TCTAACCCTAACTGAGA-AGGGCGTAG-3') and reverse primer (5'-GTTTGCTCTAGAATGAAC-GGTGGAAG-3'); TRF1, forward primer (5'-AGCAGAAGAGCCACTG-AAAGCA-3') and reverse primer (5'-CTTCGCTGTCTGAGGAAATCA-G-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'-CTTCCA-CCAACTCTCTGTTTG-3') and reverse primer (5'-CTGTGATAATTGC-AGGTCCAG-3'); NCL, forward primer (5'-AATGAGGGCAGAGCAAT-CAGG-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 $1 \times$ 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 Hinfl/RsaI restriction enzymes and electrophoresed in 0.8% agarose gels in $1 \times$ 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 NaPO₄, 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.



JFD clones

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.

with $[\alpha^{-32}P]dCTP$ 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 μ g/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



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 μ M. 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.

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 μ M **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

The Journal of Biological Chemistry

JFD15



TRF1 NCL β2m TRF2 β2m WRN BLM β2m hPot1 ß2m JFD18 FD10 JFD10 A549 JFD18 A549

The Journal of Biological Chemistry

ibc

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 ($\beta 2m$) and to the values of parental A549 cells defined as 1.

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. 3c). 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 tran-

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 ($\beta 2m$) transcript is used as a control for mRNA expression. Duplicate lanes represent independent **RT-PCR** experiments.

script 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. 6a). 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. 6b, 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.

50558

The Journal of Biological Chemistry

ibc

Resistance to a G-quadruplex Ligand



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 ($\beta 2m$) transcript is used as a control for mRNA expression. *Triplicate or duplicate lanes* represented independent RT-PCR experiments from separate RNA extractions.

An expected consequence for the clones that presented increased $(+\alpha, +\beta)$ 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. 7a). 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. 7d).

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 μ M after a 48-h treatment with the drug in both sensitive and resistant cells (not shown). In contrast, untreated JFD10- and JFD18-



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 μ M **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 μ M **12459** for 48 h or untreated before the extract preparation. **12459** tor 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.

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. 8a. In the JFD18 clone, FISH analyses also revealed occasional telophase bridges, in the middle of which telomere signals are detected (Fig. 8b). 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. 2a) 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. 9a, 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. 5b). Similar results were found for the JFD10 clone that displayed a 5-fold resistance to 12459 (Fig. 5b). It should be noticed that nontriazine 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 μ M for telomestatin and BRACO19, respectively. Furthermore, JFD18 cells did not present significant resistance against the effect of ionizing radiation, as compared with A549 (Fig. 9b).

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 DNhTERT 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 The Journal of Biological Chemistry

ibc



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*).

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 μ M), 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 μ M **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

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 \pm S.D. of three independent determinations. *b*, radiation survival curves for A549 (\bullet) and JFD18 (\Box) cells. The curves were drawn for best fit to a linear quadratic equation (see "Experimental Procedures"). Found: $\alpha = 0.100 \pm 0.012 \text{ Gy}^{-1}$, $\beta = 0.017 \pm 0.003 \text{ Gy}^{-2}$ for A549 cells; $\alpha = 0.092 \pm 0.010 \text{ Gy}^{-1}$, $\beta = 0.014 \pm 0.002 \text{ Gy}^{-2}$ for JFD18 cells. Bars, S.D.

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 μ M **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*.

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 telo-



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 \pm S.D. of quadruplicate measurements. Significant differences were observed for 10 and 30 μ M 12459. b, effect of 12459 (5 μ M) 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 \pm S.D. of triplicate measurements.

merase-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

ibc

(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

- McEachern, M. J., Krauskopf, A., and Blackburn, E. H. (2000) Annu. Rev. Genet. 34, 331–358
 Masutomi, K., Yu, E. Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J., Metz, G. B.,
- 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
 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
- Parkinson, G. N., Lee, M. P., and Neidle, S. (2002) Nature 417, 876–880
 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
- Rezler, E. M., Bearss, D. J., and Hurley, L. H. (2002) Curr. Opin. Pharmacol. 2, 415–423
- 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
- Kim, M. Y., Gleason-Guzman, M., Izbicka, E., Nishioka, D., and Hurley, L. H. (2003) *Cancer Res.* 63, 3247–3256
- Siddiqui-Jain, A., Grand, C. L., Bearss, D. J., and Hurley, L. H. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 11593–11598
- 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
- Gomez, D., Mergny, J. L., and Riou, J. F. (2002) Cancer Res. 62, 3365–3368
 Zhang, X., Mar, V., Zhou, W., Harrington, L., and Robinson, M. O. (1999) Genes
- Dev. 13, 2388–2399
- Guidaci, C., Cerone, M. A., and Bacchetti, S. (2001) Oncogene 20, 714–725
 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
- 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
- Fu, W., Begley, J. G., Killen, M. W., and Mattson, M. P. (1999) J. Biol. Chem. 274, 7264–7271
- Krupp, G., Kuhne, K., Tamm, S., Klapper, W., Heidorn, K., Rott, A., and Parwaresch, R. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 919–921
- 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
- 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
- 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
- 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
- Wick, M., Zubov, D., and Hagen, G. (1999) Gene (Amst.) 232, 97–106
 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- Stansel, R. M., de Lange, T., and Griffith, J. D. (2001) *EMBO J.* 20, 5532–5540
 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
- Colgin, L. M., Baran, K., Baumann, P., Cech, T. R., and Reddel, R. R. (2003) Curr. Biol. 13, 942–946
- 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
- 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
- Holt, S. E., Glinsky, V. V., Ivanova, A. B., and Glinsky, G. V. (1999) Mol. Carcinog. 25, 241–248
- Mailliet, P., Riou, J. F., Mergny, J. L., Laoui, A., Lavelle, F., and Petitgenet, O. (2001) Patent WO 0140218

NGSD-

The Journal of Biological Chemistry

ibc

The G-quadruplex Ligand Telomestatin Inhibits POT1 Binding to Telomeric Sequences *In vitro* and Induces GFP-POT1 Dissociation from Telomeres in Human Cells

Dennis Gomez,¹ Marie-Françoise O'Donohue,² Thomas Wenner,¹ Céline Douarre,¹ Jérome Macadré,¹ Pascale Koebel,³ Marie-Josèphe Giraud-Panis,⁵ Hervé Kaplan,³ Alain Kolkes,⁴ Kazuo Shin-ya,⁶ and Jean-François Riou¹

¹Laboratoire d'Onco-Pharmacologie, JE 2428; ²Centre National de la Recherche Scientifique UMR 6142; ³Institut Fédératif de Recherche 53, Université de Reims Champagne-Ardenne; ⁴Institut Jean-Godinot, Reims, France; ⁵Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5161, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France; and ⁶Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Abstract

Telomestatin is a potent G-quadruplex ligand that specifically interacts with the 3' telomeric overhang, leading to its degradation and that induces a delayed senescence and apoptosis of cancer cells. Protection of Telomere 1 (POT1) was recently identified as a specific single-stranded telomerebinding protein involved in telomere capping and T-loop maintenance. We showed here that a telomestatin treatment inhibits POT1 binding to the telomeric overhang in vitro. The treatment of human EcR293 cells by telomestatin induces a dramatic and rapid delocalization of POT1 from its normal telomere sites but does not affect the telomere localization of the double-stranded telomere-binding protein TRF2. Thus, we propose that G-quadruplex stabilization at telomeric Goverhang inactivates POT1 telomeric function, generating a telomere dysfunction in which chromosome ends are no longer properly protected. (Cancer Res 2006; 66(14): 6908-12)

Introduction

In human, telomeres consist of the repetition of the G-rich duplex sequence 5'-TTAGGG-3'. A G-rich 3' strand extends beyond the duplex to form a 130- to 210-base overhang (G-overhang; ref. 1). Telomeres may be structurally organized in different conformations together with several telomere-associated proteins, such as TRF1, TRF2, and POT1 (2). The G-overhang is either accessible for telomerase extension in an open state or inaccessible in a capped (or closed) conformation that involves the formation of a putative t-loop structure (2).

Telomeric proteins stabilize the telomere by protecting the single-stranded G-overhang from degradation (2). Protection of Telomere 1 (POT1) binds specifically to the single-stranded G-overhang (3) and has been described as a regulator of telomere length (4, 5). POT1 has been found associated with the double-stranded telomeric DNA proteins TRF1 and TRF2 through the bridging proteins PTOP/TINT1/PIP1 and TIN2 (6). Suppression of POT1 function by RNA interference in human cells leads to the loss

of the telomeric single-stranded overhang, induced apoptosis, senescence, and chromosomal instability in human cells (7, 8).

Because of the repetition of guanines, the G-overhang is prone to form a four-stranded G-quadruplex structure that has been shown to inhibit telomerase activity *in vitro* (9). Small molecules that stabilize the G-quadruplex are effective as telomerase inhibitors, and several series have been reported to date to induce replicative senescence after long-term exposure to tumor cell cultures (9). Among them, the natural product telomestatin is one of the most active and selective telomeric G-quadruplex ligand (10). It has been recently shown that telomestatin impairs the conformation and the length of the telomeric G-overhang, an effect that is thought to be more relevant than double-stranded telomere erosion as a marker for its cellular activity (11, 12).

Because telomestatin causes cellular effects analogous to those due to dysfunctional telomeric proteins, and because POT1 regulates *in vitro* the G-quadruplex conformation at telomeres (13), we have investigated the effect of a telomestatin treatment on POT1 binding *in vitro* and in human cells using a green fluorescent protein (GFP) fusion protein. Our results indicate that Gquadruplex stabilization impairs POT1 binding to telomere sequences and provokes the rapid delocalization of GFP-POT1 from telomeres in human cells.

Materials and Methods

Plasmids. Full-length hPOT1 was cloned into the pET22b expression vector by PCR using the Marathon testis cDNA library (Clontech, Palo Alto, CA). The cDNA was completely sequenced and corresponded to the sequence previously released (3). This construct contained an NH₂-terminal T7 sequence, allowing its coupled transcription/transcription. The GFP-POT1 plasmid was constructed by insertion of the POT1 cDNA after PCR amplification from pET22bPOT1 vector at *Bam*HI-*Xba*I of the pEGFP-C1 plasmid (Clontech).

Electrophoretic mobility gel shift assay. POT1 protein was prepared with the TNT Coupled Transcription/Translation system (Promega, Charbonnières, France) using the pET22bPOT1 vector. Purified TRF2 protein was obtained from an *Escherichia coli* strain expressing TRF2 fused to a NH₂-terminal Tag containing six histidines. Purification of the protein was done by affinity chromatography through a nickel-containing resin (Ni-NTA agarose from Qiagen, Courtaboeuf, France; details on cloning and purification will be published elsewhere). Oligonucleotides were labeled at the 5' end with T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs, Beverly, MA) and [γ -³²P]ATP (3,000 Ci/mmol, Amersham Bioscience Europe, Orsay, France) and gel purified.

The binding reactions were done in 20 μ L of the following buffer: 50 mmol/L Tris HCl (pH 8), 100 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl₂, 10% glycerol, 0.1% NP40, 20 nmol/L labeled TEL1 probe in the presence of POT1 (2 μ g) or

Note: D. Gomez is currently at the Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France.

Requests for reprints: Jean-François Riou, Laboratoire d'Onco-Pharmacologie, JE 2428, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France. Phone: 33-3-26-91-80-13; Fax: 33-3-26-91-89-26; E-mail: firoiu@univ-reims.fr.

^{©2006} American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1581

TRF2 (50 ng). For POT1 reactions, the SACC1 oligonucleotide (250 nmol/L) and salmon sperm DNA (50 μ g/mL) were also added as competitors. For TRF2 reactions, the CXext oligonucleotide (250 nmol/L) that hybridized to the TEL1 overhang was also added. Telomestatin was added at room temperature 15 minutes before the protein. Then, the protein was added, and binding was done for 15 minutes at room temperature. Reaction products were separated by electrophoresis in 6% nondenaturing polyacrylamide gels in 0.25× Tris borate EDTA buffer. The gels were run at 180 V for 1.5 hours, dried on Whatman DE81 paper at 80°C, and visualized by a Phosphorimager (Typhoon 9210, Amersham).

Oligonucleotides used were as follows: TEL1, 5'-TAACCCTAACCCTAAGC-GAATTCGTCATGCGAATTCGCTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGT TAGGGTTAGGGTTAGGG-3'; CXext, 5'-GTGCCTTACCCTCTACCCTTAC-CCTAA-3'; SACC1, 5'-ACTGTCGTACTTGATATGTGGGTGTGTGTGGGG-3'; TR2, 5'-TTAGGGTTAGGG-3'.

Cell culture and transfection. EcR293 telomerase-positive cells (14) were grown in DMEM with 100 units of penicillin and 0.1 mg of streptomycin per milliliter and 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, Cergy Pontoise, France); 70% to 80% confluence cells were transfected with 5 μ g of plasmid in LipofectAMINE 2000 complex in FBS and antibiotic-free DMEM according to the manufacturer (Invitrogen). The medium was replaced after 24 hours, and the cells were grown in DMEM with 100 units of penicillin and 0.1 mg of streptomycin per milliliter containing 400 μ g/mL of geneticin. After 15 days of geneticin selection, GFP-positive cells were sorted by fluorescence-activated cell sorting.

Immunofluorescence. For immunofluorescence microscopy, EcR293-GFPPOT1 cells plated on glass coverslips were permeabilized in 0.5% Triton X-100/PBS and fixed with 3% paraformaldehyde. Cells were then washed twice in PBS and treated with permeabilization buffer [20 mmol/L Tris-HCl (pH 8), 50 mmol/L NaCl, 3 mmol/L MgCl₂, 300 mmol/L sucrose, and 0.5% Triton X-100] and washed twice with PBS followed by antibody staining with 1 ng/ μ L for TRF2 4A794 mouse monoclonal (Chemicon-Upstate, Hampshire, United Kingdom) in 0.5% Triton X-100/PBS. The nuclear DNA was stained with 1 μ mol/L Hoechst. Secondary antibodies raised against mouse were labeled with Alexa 568 (Molecular Probes, Eugene, OR).

For experiments on living cells, EcR293GFP-POT1 cells were plated on glass coverlips in complete media supplemented with 0.1 μ mol/L Hoechst 33342. GFP and Hoechst fluorescence were recorded on a heated stage (37°C) and CO₂ chamber of a Axiovert 200 M inverted microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Chromatin immunoprecipitations. Chromatin immunoprecipitation was done according to manufacturer procedure (Upstate Biotechnology) using, either TRF2 antibody (H-300, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) or with a telomere antibody that recognizes the single- and double-stranded telomere repeats *in vitro* (19C7, a generous gift from Dr E. Mandine, Sanofi-Aventis, Vitry sur Seine, France). Telomeric sequences in immunoprecipitates were evidenced by PCR amplification according to a previously described method (15). The final telomere primer concentrations were 270 nmol/L (tel1) and 900 nmol/L (tel2), and PCR amplification was subjected to 35 cycles of 95°C for 15 seconds and 54°C for 2 minutes.

Results and Discussion

G-quadruplex formation inhibits POT1 binding to telomeric sequences *in vitro*. To study the effect of telomestatin on POT1 binding *in vitro*, a short hairpin oligonucleotide (i.e., TEL1), which reconstitutes the double-stranded telomere with a short 3'overhang, has been used. In the presence of translated POT1, two specific POT1-TEL1 complexes are evidenced by electrophoretic mobility shift assay (EMSA; Fig. 1*A*, see * and ** bands). These two complexes



Figure 1. Telomestatin inhibits POT1 but not TRF2 binding to telomeric sequences. *A*, EMSA assay of *in vitro* translated hPOT1 protein (2 μg) on TEL1 oligonucleotide. POT1 forms two specific complexes (* and **) with TEL1 compared with control vector (pET22b). Competitions with CXext or TR2 oligonucleotides (250 nmol/L) abolish the formation of the complexes, indicating that POT1 binds the TEL1 overhang. The addition of telomestatin (2 or 5 μmol/L) decreases the formation of the POT1/TEL1 complexes. *Bottom*, underexposed and allowed to follow the migration of the TEL1 probe. Telomestatin also binds the TEL1 3' overhang, as evidenced by a faster electrophoretic mobility (see TEL1⁺ arrow). *B*, quantification of the telomestatin effect on POT1-TEL1 upper (*) and lower (**) complexes. Results are relative to untreated control. *Points*, mean of three independent experiments; *bars*, SD. *C*, direct treatment of TEL1 oligonucleotide by telomestatin (2-10 μmol/L) results in the formation of the faster mobility oligonucleotide TEL1⁺. *Bottom*, relative percentage of TEL1⁺ compared with total TEL1. *D*, EMSA assay of purified TRF2 protein (50 ng) on TEL1 oligonucleotide in the presence of CXext oligonucleotide hybridized to the TEL1 overhang. TRF2 forms a specific complex with TEL1 (*), which is not affected by telomestatin (1.25-10 μmol/L).

correspond to the binding of POT1 at the single-stranded extension, as the addition of oligonucleotides (a) CXext that hybridizes to the single-stranded extension and (b) TR2 that titrates POT1 (16) inhibit the formation of these complexes.

In the presence of 2 to 5 μ mol/L telomestatin, a strong reduction of the intensity of the signal corresponding to these two complexes is observed, suggesting that telomestatin inhibits the binding of POT1 onto TEL1 (Fig. 1*A*). Furthermore, the telomestatin treatment induces a dose-dependent inhibitory effect on the formation of the TEL1-POT1 complexes, with an IC₅₀ of 3 μ mol/L for the upper complex (*) and an IC₅₀ of 8 μ mol/L for the lower complex (**; Fig. 1*B*). These data suggest that the formation of the complex with the lower mobility is preferentially inhibited by the presence of telomestatin.

The telomestatin treatment also induces in a dose-dependent manner a faster electrophoretic mobility for TEL1 oligonucleotide (Fig. 1*A*, see TEL1⁺ at *bottom*), with a maximal mobility at 10 μ mol/L telomestatin, where TEL1⁺ represents 87% of the total TEL1 oligonucleotide (Fig. 1*C*).

Interestingly, this effect on TEL1⁺ correlates with the binding inhibition of POT1 and may result from the interaction of telomestatin with the TEL1 overhang fold in a G-quadruplex structure, in agreement with previous findings (11, 17).

To further establish the selectivity of the telomestatin interaction with telomeric DNA, we also examined its effect on the binding of purified TRF2 to the TEL1 oligonucleotide by EMSA. In the absence of telomestatin, we observe the formation of a specific TRF2-TEL1 complex, as already described (18). In the presence of telomestatin (1.25-10 μ mol/L), we did not observe any significant effect of telomestatin (up to 10 μ mol/L) on the TRF2-TEL1 complex (Fig. 1*D*).

These results suggest that telomestatin is able to inhibit *in vitro* the binding of POT1 to a short telomeric G-overhang but is not able to inhibit the interaction of telomeric proteins, such as TRF2, with the double-stranded telomeric DNA.

GFP-POT1 is localized at telomeres in EcR293 cells. To examine the effects of telomestatin treatment on the binding of POT1 to telomeres in cultured cells, we have designed a GFP-POT1 vector that was transfected in EcR293 cells. Western blot analysis using a GFP antibody indicated that EcR293-GFPPOT1 cells stably express the fusion protein (Fig. 2*A*). As previously reported, POT1 overexpression in telomerase-positive cells results in telomere length elongation (4). Similar findings are observed in EcR293 cells transfected with either GFP-POT1 or POT1 (Fig. 2*B*), suggesting that the NH₂-terminal fusion with GFP does not alter the functional property of the fusion protein to transduce telomere extension.

POT1 colocalizes at telomeric ends with different telomerebinding proteins (19). To localize GFP-POT1 in EcR293 cells, colocalization experiments have been done on fixed cells by confocal microscopy using a TRF2 antibody. As shown in Fig. 3*A*, GFP-POT1 colocalizes with almost all the TRF2 dots, suggesting that GFP-POT1 protein is present at telomeres in EcR293 cells. Thus, cells expressing GFP-POT1 fusion protein may be used as models to investigate the cellular effect of telomestatin on POT1 localization.

Treatment with telomestatin delocalizes telomeric GFP-POT1 in EcR293 cells. To investigate the effect of telomestatin on POT1 binding, EcR293 cells expressing GFP-POT1 have been treated for 48 hours with 2 μ mol/L telomestatin (Fig. 3*A*), a concentration and time exposure with the ligand at which most of



Figure 2. Transfection of GFP-POT1 induces a telomere lengthening and colocalizes with TRF2 in human cell lines. *A*, immunoblot analysis to detect GFP in EcR293 cells stably transfected by GFP-POT1 or by control GFP vector. *B*, overexpression of POT1 and GFP-POT1 induced a telomere lengthening in EcR293 cells. TRF analysis of EcR293 control cells and cells transfected with POT1 or GFP-POT1, as indicated. The TRF analysis was done 2 months after the selection of transfected cells.

the cells are still viable, because the IC₅₀ for 2 and 4 days treatment were equal to 7 and 1.8 µmol/L, respectively. Microscopic examination of treated cells indicated a dramatic change in the nuclear organization of GFP-POT1. Telomestatin strongly reduced the GFP-POT1–punctuated signal associated with telomeres compared with untreated controls (compare with TRF2). We also observe the formation of large and diffuse GFP-POT1 aggregates inside the nucleoli (Fig. 3*A*, see also *B*). These aggregates are not due to preparation artifacts, as they are also observed in living cells (Fig. 3*B*). These modifications of the GFP-POT1 localization were detectable within 24 hours and with 1 µmol/L telomestatin, and when the treatment is prolonged for 72 to 96 hours, the GFP-POT1 telomeric foci almost disappeared from nuclei (results not shown, see also living cell experiments in Fig. 3*B*).

Microscopic examination of living cells confirms these results obtained with fixed cells (Fig. 3B) but also shows that the telomestatin treatment provokes the formation of additional cytoplasmic GFP-POT1 foci that were not or poorly observed in fixed cells. These foci may correspond to proteasome-dependent degradation of GFP-POT1.

All together, our results indicate that telomestatin induces a reduction of the GFP-POT1 telomeric foci in EcR293 cells at noncytotoxic concentrations and in the range to those used to inhibit POT1 binding at telomeric overhang *in vitro*.

To further establish that POT1 delocalization is specifically due to telomestatin treatment, we also used several anticancer agents (doxorubicin, etoposide, and vinblastin) whose mechanisms of action are not related to G-quadruplex stabilization. At drug concentrations corresponding to the IC₅₀ on EcR293GFP-POT1 cells, we did not observe any effect on the telomere localization

of POT1 in viable cells for doxorubicin (10 nmol/L) and etoposide (10 nmol/L; Fig. 3C) and for vinblastin (data not shown). In contrast, cells undergoing apoptosis present a strong decrease of telomeric POT1 staining (data not shown), in agreement with the degradation of telomeric sequences observed during the late stages of apoptosis (20). Therefore, we conclude that POT1 delocalization by telomestatin is an early event occurring before any evidence for apoptosis or cell growth arrest.

Telomestatin does not impair TRF2 binding at telomeres in EcR293 cells. To examine whether the delocalization of POT1 is a consequence of a general effect on the telomere structure, we have determined whether the telomeric localization of TRF2 is also modified by telomestatin. As shown in Fig. 4A (see also Fig. 3A), the telomere localization of TRF2 is not or barely altered by telomestatin treatment in conditions that provokes the GFP-POT1 delocalization in EcR293 cells. The selectivity of the telomestatin effect was also evaluated by chromatin immunoprecipitation experiments using TRF2. In these experiments, the immunoprecipitated telomere sequences were evaluated by specific PCR amplification, as described previously (15). As shown in Fig. 4B, telomestatin treatment of EcR293GFP-POT1 cells to 48 hours and up to 96 hours does not modify the telomere immunoprecipitation by TRF2, in agreement with the immunofluorescence results. Chromatin immunoprecipitation with telomere antibodies were used as internal controls and did not present variation under telomestatin treatment (Fig. 4B).

These results suggest that telomestatin induces a differential effect between POT1 and TRF2 in EcR293 cells and selectively alters POT1 localization, whereas TRF2 is not or poorly affected.

Telomestatin was recently shown to completely dissociate TRF2 from telomere in cancer cells but not in normal or immortalized cells (12), a result in agreement with our data on the immortalized EcR293 cell line. Because *in vitro* experiments using purified TRF2 indicates that telomestatin is inactive to remove TRF2 from double-stranded telomere repeats (Fig. 1*D*), it is not clear whether the TRF2 dissociation from telomere in cancer cells directly results from a structural alteration induced by telomestatin or is a latter consequence of the telomere destabilization, such as t-loop disruption. Because TRF2 binds to double-stranded telomere and participate to t-loop, a limited effect of telomestatin to telomeric ends would be difficult to detect by microscopy or chromatin immunoprecipitation and is not excluded.

Telomestatin was also reported to induce alterations of the telomeric G-overhang conformation in different tumor cell lines that leads to a degradation of the G-overhang (11, 12). Indeed, telomestatin also provokes a decrease of the G-overhang signal, in EcR293 cells treated for 48 hours at 2 μ mol/L (results not shown). This may indicate that the G-overhang alteration preferentially impairs the telomere localization of POT1 in EcR293 cells compared with TRF2.

Experiments were also done on the HT1080 tumor cell line. Preliminary results indicated that both GFP-POT1 and TRF2 binding to telomere were sensitive to telomestatin treatment (12).⁷ The kinetic of their dissociation, compared with the G-overhang erosion, is currently under investigation and will give interesting





Figure 3. Telomestatin alters the GFP-POT1 localization at telomeres in EcR293 cells. *A*, effect of telomestatin (2 µmol/L) on GFP-POT1 in EcR293 cells treated for 48 hours. Fluorescence for GFP-POT1 (green), TRF2 (red), and Hoechst (blue) were determined on fixed cells. GFP-POT1 colocalizes with TRF2 signal in control EcR293 cells. Telomestatin treatment induced a marked decrease of the normal telomeric sites of GFP-POT1 fluorescence and induced a nucleolar accumulation of GFP-POT1 (*arrowheads*) in EcR293 cells but does not modify the TRF2 localization at telomeres. *B*, effect of telomestatin (2 µmol/L) in living EcR293 cells for 24 to 72 hours (as indicated). Fluorescence for GFP-POT1 (green) and Hoechst (blue) were merged. Cytoplasmic foci of GFP-POT1 are indicated by arrows. Diffuse GFP-POT1 aggregates inside the nucleus or the nucleoli are indicated by arrowheads. *C*, doxorubicin (*DOX*) and etoposide (*VP16*) do not affect the GFP-POT1 localization in living EcR293 cells treated for 48 hours. The drug concentration used was 10 nmol/L, corresponding to the IC₅₀ at 96 hours, as determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. Fluorescence for GFP-POT1 (green) and Hoechst (blue) were merged.



Figure 4. Telomestatin does not alter TRF2 binding to telomere in EcR293 cells. A, effect of telomestatin (2 µmol/L) on GFP-POT1 in EcR293 cells treated for 48 hours. Fluorescence for GFP-POT1 (green), TRF2 (red), and Hoechst (blue) were determined on fixed cells. Telomestatin treatment induced a marked decrease of the normal telomeric sites of GFP-POT1 fluorescence but does not modify the TRF2 localization at telomeres. B, chromatin immunoprecipitation of EcR293 treated by telomestatin (2 µmol/L) for 48 or 96 hours with TRF2 antibodies or telomere antibodies as internal standard. Immunoprecipitated telomere sequences were evidenced by PCR amplification (see Materials and Methods). PCR telomere fragments migrated as a smear indicated by bracket. Primer dimers forming in the blank PCR migrated as a distinct single band.

clues for the importance of these proteins in the mechanism of action of telomestatin.

In conclusion, our results show that the G-quadruplex ligand telomestatin impairs the binding of POT1 to single-stranded telomeric sequences *in vitro* and alters the nuclear localization of GFP-POT1, suggesting that major modifications of the telomeric end structure are induced by this ligand for which POT1 is a highly sensitive nuclear marker.

Acknowledgments

Received 5/1/2006; revised 5/30/2006; accepted 6/2/2006.

Grant support: Association pour la Recherche contre le Cancer grant 3644 and Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe labellisée 2006).

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 thank Drs. E. Gilson, J.L. Mergny, A. Londono-Vallejo, C. Trentesaux, and H. Morjani for helpful discussions.

References

- 1. Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP. Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. Cell 1997;88:657–66.
- Smogorzewska A, De Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. Annu Rev Biochem 2004;73: 177–208.
- **3.** Baumann P, Cech TR. Pot1, the putative telomere endbinding protein in fission yeast and humans. Science 2001;292:1171–5.
- Colgin LM, Baran K, Baumann P, Cech TR, Reddel RR. Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. Curr Biol 2003;13:942–6.
- Loayza D, De Lange T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. Nature 2003;423:1013–8.
- de Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. Genes Dev 2005;19: 2100–10.
- Veldman T, Etheridge KT, Counter CM. Loss of hPot1 function leads to telomere instability and a cut-like phenotype. Curr Biol 2004;14:2264–70.

- Yang Q, Zheng YL, Harris CC. POT1 and TRF2 cooperate to maintain telomeric integrity. Mol Cell Biol 2005;25:1070–80.
- Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, Teulade-Fichou MP, Gilson E. Natural and pharmacological regulation of telomerase. Nucleic Acids Res 2002;30:839–65.
- Shin-ya K, Wierzba K, Matsuo K, et al. Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from *Streptomyces anulatus*. J Am Chem Soc 2001;123:1262–3.
- **11.** 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: 41487–94.
- **12.** Tahara H, Shin-Ya K, Seimiya H, Yamada H, Tsuruo T, Ide T. G-Quadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells. Oncogene 2006;25:1955–66.
- Zaug AJ, Podell ER, Cech TR. Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension *in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:10864-9.
 Ancelin K, Brunori M, Bauwens S, 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;22:3474–87.

- 15. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. Nucleic Acids Res 2002;30:e47.
- **16.** Lei M, Podell ER, Cech TR. Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. Nat Struct Mol Biol 2004;11:1223–9.
- 17. Kim MY, Gleason-Guzman M, Izbicka E, Nishioka D, Hurley LH. 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;63:3247–56.
- **18.** Bilaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E. Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. Nat Genet 1997;17:236–9.
- **19.** 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.
- **20.** Ramirez R, Carracedo J, Jimenez R, et al. Massive telomere loss is an early event of DNA damage-induced apoptosis. J Biol Chem 2003;278:836–42.

Les ligands qui stabilisent les structures G-quadruplexe formées par le simple brin télomérique bloquent l'activité télomérase et la réplication des télomères et sont considérés comme de potentiels agents antitumoraux. Nous avons étudié le mode d'action d'un de ces ligands, le dérivé triazine 12459, sur l'intégrité télomérique et sur l'apoptose induite par ce ligand dans la lignée d'adénocarcinome pulmonaire humain A549.

Le ligand 12459 induit une rapide dégradation du simple brin télomérique entraînant l'induction d'une apoptose médiée par la voie mitochondriale.

La dégradation du simple brin télomérique induite par le 12459 représente une réponse spécifique du 12459 au niveau du télomère. Cette dégradation pourrait refléter une déprotection du télomère et réprésenter une altération de la fixation de facteurs télomériques spécifiques. En effet, nos résultats montrent que la télomestatine (un autre ligand) induit dans les cellules HT1080 la formation de TIFs et la délocalisation de hPOT1 induisant la déprotection du télomère. Nous avons également montré que la surexpresion de GFP-POT1 dans la lignée HT1080 induit une extension du simple brin télomérique qui les protègent partiellement de l'effet de la télomestatine.

De plus, le traitement cellulaire par le 12459 induit deux réponses cellulaires distinctes : la sénescence où l'apoptose (en fonction de la concentration utilisée et du temps de traitement) dans les cellules A549. En condition de sénescence ($<5 \mu$ M) le 12459 déclenche la voie de dommage à l'ADN médiée par ATR, caractéristique des problèmes de réplication. En revanche, dans les conditions apoptotiques ($>5 \mu$ M) aucune activation des voies de dommage à l'ADN n'a été mise en évidence, ceci dû à une surexppression de la proteine PPM1D induite par le 12459. En effet; la délétion de PPM1D restaure la formation de TIFs après traitement par le 12459.

Enfin, les mécanismes de résistance au 12459 ont été étudiés. Des clones cellulaires sélectionnés pour leur résistance au 12459 présentent une surexpression de Bcl-2. La transfection del'ADNc de Bcl-2 dans les cellules A549 induit une résistance à l'apoptose induit par le 12459; ceci suggérant que Bcl-2 est un facteur déterminant pour l'activité du 12459.

<u>Mots clés</u> : télomère, télomérase, G-quadruplexes, ligand des G-quadruplexes, apoptose, sénescence, dommages à l'ADN.

Ligands that stabilize the telomeric G-overhang into G-quadruplex structures can be considered as potential antitumor agents that block telomerase activity and telomere replication in tumor cells. We have studied the mode of action of the triazine derivative 12459 G-quadruplexe ligand on telomere integrity and apoptosis induction in A549 human pulmonary carcinoma cell line.

We have shown that 12459 ligand provokes a rapid degradation of the telomeric G-overhang resulting in a mitochondrial apoptosis in A549 cell line.

The G-overhang degradation induced by 12459 treatment represents a specific telomeric response. This degradation might reflect the uncapping of the telomeric ends and represent the alteration of the binding of specific telomeric factor. Indeed, our results show that telomestatin treatment in HT1080 cell line induces TIFs formation and telomere uncapping by hPOT1 delocalization. We have also shown that GFP-POT1 surexpression in HT1080 induces a G-overhang extension which partially protects from telomestatin effect.

Moreover, 12459 ligand treatment induces two distinct signalling pathway: senescence or apoptosis (depending on its concentration and time exposure) In senescence conditions (<5 μ M), 12459 induces a ATR-dependent DNA damage response characteristic of the replicative damage pathway. In apoptotic conditions (>5 μ M), no DNA damage signalling pathway activation has been detected due to a 12459-induced PPM1D overexpression. Indeed, PPM1D deletion restores TIFs formation after 12459 treatment.

Finally we have studied the 12459 resistance mechanism. Cellular clones selected for 12459 resistance show Bcl-2 overexpression. Transfection of the cDNA of Bcl-2 into A549 cells induces a resistance to the short term apoptotic effect triggered by 12459, suggesting that Bcl-2 is an important factor in 12459 resistance.

Key words: telomere, telomerase, G-overhang, G-quadruplex, G-quadruplex ligand, apoptosis, senescence, DNA damage