Université de Reims Champagne Ardenne UFR Pharmacie

2009

N°

THESE

Présentée pour l'obtention du

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

Spécialité : Biologie Moléculaire et Physiologie

Par

TEMIME Nassima Epouse SMAALI

Rôle de la Topoisomérase IIIα dans la structure des télomères des lignées ALT et modulation par un ligand de l'ADN G-quadruplexe : la télomestatine

Présentée publiquement le 1^{er} Juillet 2009

Membres du Jury

Directeur de thèse :	Monsieur le Professeur Jean François Riou (Paris)
Président	Monsieur le Docteur Manuel Dauchez (Reims)
Rapporteurs	Madame le Docteur Sophie Bombard (DR2 CNRS) (Paris)
	Monsieur le Docteur Phillipe Pourquier (CR1CNRS) (Bordeaux)
Examinateurs	Monsieur le Docteur Patrick Mailliet (Vitry sur Seine)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement le professeur Jean-François Riou pour son accueil et son encadrement, pour son enthousiasme scientifique communicatif. Je lui suis très reconnaissante de la confiance, de l'autonomie et du soutien qu'il m'a toujours accordé. Nos discussions et sa grande culture scientifique m'ont beaucoup appris, merci !

Je tiens à remercier vivement les Docteurs Sophie Bombard et Philippe Pourquier d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Professeur Manuel Dauchez de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse, ainsi que le professeur Patrick Mailliet d'avoir accepté d'être membres du jury et d'évaluer ce travail.

J'exprime ma reconnaissance à Madame Trentesaux Chantal pour son aide et surtout pour sa qualité humaine.

Mes remerciements vont également à monsieur le Docteur Thomas Wenner pour son encadrement pendant la première année de thèse.

Je voudrais adresser un remerciement à tous les membres de mon équipe JE2428. Céline, Pamela, Lahcen, Bertrand.....

A toi Loubna, cette aventure n'aurait pas été la même si je ne t'avais pas rencontrée. Merci pour ton amitié, pour ton humour, ton soutien permanent et «les pauses cappuccino».

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

Des personnes plus intimes méritent des remerciements plus profonds, à eux je dédie ce travail.....

Je remercie ceux qui ont fait de moi ce que je suis, ceux grâce à qui tant d'années d'études ont été possibles, ceux envers qui j'ai une dette imprescriptible, ma mère et mon père. C'est à vous que je dois cette réussite, et je suis fière de vous l'offrir. Je remercie mes frères et sœurs, plus particulièrement ma grande sœur Amel qui m'a toujours soutenue et encouragée, gros bisous à tes deux petits loups Sara et Yacine.

Je voudrais remercier celui qui a cru en moi et qui a toujours été là pour m'écouter, me conseiller et supporter ma mauvaise humeur surtout pendant la rédaction de cette thèse. Merci à toi, Kacem, merci de m'avoir remis les pieds sur terre quand c'était nécessaire, merci pour ton amour !

Enfin, ma petite éclat de vie, source de mes joies, secret de ma force et de mon inspiration. Ma fille Nada. Voilà enfin la raison de poursuivre mon histoire.

¹

Liste des abréviations

А	:	Adénine
ADN	:	Acide DésoxyRibonucléique
ADNr	:	ADN Ribosomique
Akt	:	Acutely transforming retrovirus
ALT	:	Alternative Lengthening of Telomeres
APB	:	ALT associated PML bodies
AP-1	:	Activating protein 1
ARN	:	Acide RiboNucléique
ATM	:	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	:	ATM and Rad3 related
b	:	Base
Bcl-2	:	B-cell lymphoma 2
BLAP75	:	BLM Associated Protein 75
BLM	:	Bloom
BSA	:	Bovine serum Albumin
BTB	:	BLM/TopoIII/BLAP75
С	:	Cytosine
Caspase	:	Cystéinyl ASPartic acid-ProteASE
CFP	:	Cyan Fluorescent Protein
CHAPS	:	3-[3-(Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
CHK1	:	CHeckpoint Kinase 1
CHK2	:	CHeckpoint Kinase 2
ChiP	:	Chromatin Immunoprecipitation
CI50	:	Concentration Inhibitrice de 50% de l'activité
c-myc	:	Myelocytomastosis
CO-FISH	:	Chromosome orientation-Fish
CSB	:	Cassures Simple-Brin de l'ADN
DJH	:	Double-Jonctions de Holliday
DC	:	Dyskératose Congénitale
D-loop	:	Displacement loop

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO : DiMéthylSulfOxyde
DNA-PK : Protéine Kinase Dépendante de l'ADN
DR4, DR5: Death Receptor 4, Death Receptor 5 : (DR4=TRAILR1, DR5=TRAILR2)
ECTR : Extrachromosomal Telomeric Repeat
EDTA : Ethylène Diamine Tetra-Acetate de sodium
EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay
ETS : E26 Transformation-specific oncogen
FACS : Fluorescence Activated Cell Sorter
Fish : Fluorescence Hibridization In Situ
FMRP : Fragile Mental Retardation Protein
G : Guanine
GAR : Glycine Arginine Rich
GFP : Green fluorescent protein
GQN1 : G quartet nuclease 1
HIF1 : Facteur 1 α de l'hypoxie
HRR : Homologous Recombination Repair
hTERT : Human Telomerase Reverse Transcriptase
hTR : Human Telomerase RNA
IP : Iodure de Propidium
IRES : Internal Ribosome EntrySite
kb : Kilobase
kDa : Kilo-Dalton
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase MAPK
MDM2 : Mouse Double Minute 2
MMR : MisMatch Repair
NF-κB : Nuclear Factor κB NF-Y : Facteur Nucléaire Y
NHEJ : Non Homologous End-Joining
NLS : Nuclear Localisation Sequence
NTE : Acid N-Terminal Extension
OB fold : Open binding fold
PAR1 : Repressor Activator Protein1
PARP : Poly (ADP-Ribose) Polymérase

pb	:	Paire de bases
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PD	:	Doublement de Population
PIP1	:	POT1 Interacting Protein 1
PIKK	:	Phosphoinositide 3-Kinase related Kinase
PKB	:	Protein Kinase B
РКС	:	Protein Kinase C
PML	:	ProMyelocytic Leukemia
PML-N	B	s: ProMyelocytic Leukemia nuclear bodies
POT1	:	Protection Of Telomere 1
PP2A	:	Protéine phosphatase 2A
PS	:	PhosphatidylSérine
PVDF	:	Polyvinylidin DiFluoride
RARα	:	Récepteur de l'Acide Rétinoïque α
Rb	:	Protéine du Rétinoblastome
RE	:	Reticulum Endoplasmique
RISC	:	RNA-Induced Silencing Complex
RMN	:	Résonance Magnétique Nucléaire ROS: Reactive Oxygen Species
RPA	:	Replication Protein A
rpm	:	Rotation Par Minute
RT	:	Reverse Transcriptase
Ser	:	Sérine
siRNA	:	Small interfering RNA
SMC	:	Structure Maintenance of chromosoms
Sp1	:	Stimulating Protein 1
SV40	:	Simian Virus 40
SVF	:	Sérum de Veau Foetal
Т	:	Thymine
TANK	:	Tankyrase
TBE	:	Tris/Borate/EDTA
Tbf1	:	Telomeric repeat binding factor 1
TEBP	:	Telomere end-binding protein
TERRA	١:	TElomeric Repeat containing RNA

- TGF- β : Transforming growth factor β
- TIF : Telomere-Induced Foci
- TIMP : Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
- TIN2 : TRF1 interacting facteur 2
- t-loop : Telomeric loop
- TNF : Tumor Necrosis Factor
- TopoIII α : Topoisomérase III α
- TPP1 : Tint1-Pip1-Ptop.
- 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
- TRFH : TRF Homology
- Tris-HCl : Hydrochlorure de Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
- UV : UltraViolet
- WRN : Werner
- WT1 : Wilms Tumor 1
- XIAP : X-chromosome linked IAP
- YFP : Yellow fluorescent protein
- Z.VAD-fmk: Benzoloxy-valine-alanine-aspartate-O-methyl-fluoromethylketone

Sommaire

Int	Introduction			
I.]	I. Les télomères			
1	Historique			
2	Description et structure des télomères	15		
	2.1 L'ADN télomérique			
	2.2 La t-loop	18		
	2.3 Les G-quartets et les G-quadruplexes	19		
3	Problème de la réplication terminale des télomères			
4	Les protéines associées aux télomères humains	21		
	4.1 TRF1			
	4.2 TRF2	23		
	4.3 POT1	24		
	4.4 TPP1	25		
	4.5 TIN2	26		
	4.6 RAP1	27		
5	Facteurs accessoires du complexe shelterin	28		
6	Transcription des télomères	29		
7	La sénescence cellulaire	29		
II.	Elongation des télomères par la télomérase	34		
1	Généralités			
2	Structure			
	2.1 TERT	35		
	2.2 TR	36		
3	Partenaire de la télomérase			
	3.1 La dyskérine	38		

2	Fonction de la télomérase	39
	2.1 Elongation des télomères	
	2.2 La protection des télomères	
	2.3 Fonction tumorigène	40
	2.4 Rôle anti-apoptotique	
	2.5 Réparation de l'ADN	41
3	Régulation de la télomérase	
	3.1 Mécanisme de régulation de hTERT	42
	5.1.1 Régulation de la transcription du gène hTERT	
	5.1.2 L'épissage alternatif de hTERT	43
	5.1.3 Régulation post traductionnelle	
	5.2 Mécanisme de régulation de hTR	
III. I	Maintien des télomères par le mécanisme ALT	45
1	Généralités	
2	Les télomères des lignées ALT	48
3	Facteurs protéiques liés au phénotype ALT	49
	3.1 Les corps nucléaires de PML	
	3.2 Les APBs	50
	3.3 RAD51	52
	3.4 Le complexe MRN	
	3.5 Le complexe SMC5/6	53
	3.6 BLM et WRN	54
	3.7 Autres protéines	55
4	Répresseurs du mécanisme ALT	56
5	Recombinaison des télomères par le mécanisme ALT	57
	5.1 Recombinaison inter chromosomique	
	5.2 Recombinaison, t-loop, cercle télomérique et ECTR	58
	5.3 Les échanges entre chromatides sœurs	59
6	Coexistence de la télomérase et ALT	60

VI. G-quartets et G-quadruplexes

1	Définition et structure	
2	Formation des G-quadruplexes	62
3	Mise en évidence de l'existence <i>in vivo</i> des G-4 biologiques	et rôles 63
4	G-quadruplexes et télomères	66
5	Les autres G-quadruplexes potentiels du génome	69
	5.1 Les régions de commutation des gènes d'immunoglobuline	es IgH
	5.2 ADN ribosomique	
	5.3 Les promoteurs de gènes	
	5.4 Les minisatelites	71
6	Les quadruplexes d'ARN	
7	Protéines reconnaissant les G-quadruplexes	72
	7.1 La nucléoline et hnRNP	
	7.2 Les hélicases et les topoisomérases	73
	7.3 Autres protéines fixant les G-quadruplexes	74
8	Ligand des G-quadruplexes	76
	La télomestatine	78
V.]	Les topoisomérases	81
1	Généralités	
2	Définition et historique	82
3	Classification des topoisomérases	84
	3.1 Topoisomérases de type I	
	3.2 Topoisomérases de type II	86
4	L'inhibition des topoisomérases comme stratégie anticat	ncéreuse 87
5	La topoisomérase III	88
	5.1 Généralités	
	5.2 Structure	89

5.3 Fonctions cellulaires	90
5.4 Partenaires de la TopoIII	92
5.4.1 Les hélicases de la famille RecQ	
5.4.2 BLAP75/RMI1	95
1.2.3 BLAP18/RMI2	96
5.5 Interaction RMI1-RMI2-TopoIII-BLM	
5.6 TopoIIIα, hélicases, ALT, télomère et cancer	99
Présentation des objectifs de la thèse	100
Matériels et méthodes	101
I. Culture cellulaire	102
1 Lignées cellulaires	
2 Entretien des cellules	
3 Détermination de la viabilité cellulaire	
3.1 Etude de la viabilité cellulaire en présence de la télomestatine	103
4 Conservation des cellules	
II. Plasmides	
III. Agents pharmacologiques utilisés	104
1 La télomestatine	
2 La camptothécine	
3 La doxorubicine	
IV. Techniques de biochimie	105
1 Analyse de l'expression des protéines par western blot	
1.1 Principe	
3.2 Matériels	
1.3 Protocole	106
1.3.1 Extraction des protéines totales	

			1.3.2	Dosage du lysat protéique	
			1.3.3	Migration et électro-transfert	107
			1.3.4	Hybridation	
			1.3.5	Immunodétection	108
	2]	L'im	munopr	récipitation	109
		2.1	Principe	2	
		2.2	Matérie	ls	
	3]	[mm	ınofluo	rescence	
		3.1	Prépara	tion des lames	
		3.2	Imageri	e	110
V.	Т	ech	niques	de biologie moléculaire	111
]	1]	Le ge	el retard	l	
		1.1	Principe	2	
		3.2	Protoco	le	
			1.3.1	Marquages radioactifs des oligonucléotides	
			1.3.2	Choix d'oligonucléotides	
			1.3.3	Incubation et transfert	113
			1.3.4	Les super shifts	
			1.3.5 TopoIII	Les expériences de compétition pour la fixation de la Iα	protéine
	2 7	Tran	sfection	des cellules par le siRNA TopoIIIa et BLM	114
		2.1	Principe	9	
		2.2	Protoco	le	115
	3]	Expé	rience c	l'hybridation en solution	116
		3.1	Principe	2	
		3.2	Protoco	le	
Z	1]	[mm	ınopréc	cipitation de la chromatine	117
		4.1	Principe	2	
		4.2	Protoco	le	
			4.2.1	Cross-link et sonication	
			4.2.2	Le pré-clearing	
			4.2.3	Immunoprécipitation	

4.2.4	Lavages	118
4.2.5	Elution des complexes ADN/protéines	
100		

- 4.2.6 Reverse cross-link
- 4.2.7 Purification de l'ADN (IP + INPUT)

Résultats

119

I. Rôle de la topoisomérase IIIα dans la prolifération cellulaire et le maintien de l'élongation des télomères par le mécanisme ALT 120

1	Intro	duction	121
2	But c	lu travail	123
3	Publi	cation	124
	3.1	Résumé en français	
	3.2	Publication	
4	Résu	ltats complémentaires	137
	4.1	Colocalisation de la TopoIIIa avec PML et TRF2 dans les ALT et télomérase positives	lignées
	4.2	Les cellules en mitose n'expriment pas la TopoIII α	139
	4.3	Interaction physique entre TopoIIIa et TRF2	140
	4.5	Mise en évidence de l'interaction de la TopoIIIa avec TRF2 au niveau des séquences télomériques	<i>in vitro</i> 141
	4.6	Effet de la déplétion de la TopoIIIα sur la croissance des ALT et télomérase positives	lignées 143
	4.7	Etude de l'induction de l'apoptose par le siRNA TopoIII α	145
	4.8	Immunoprécipitation de la TopoIIIα avec la protéine télor TRF1	nérique 147
	4.9	Rôle de la TopoIII α dans la stimulation de l'invasion	
5	Conc	clusion et discussion	149

II: La télomestatine (ligand des G-quadruplexes) inhibe la fixation de la Topoisomérase IIIα aux oligonucléotides formant des G-quadruplexes et déprotège les télomères des cellules ALT 153

1	Introduction	154
2	But du travail	155
3	Résultats	
	3.1 La TopoIII α se lie aux G-quadruplexes mais préfère les simple-brins	s structures
	3.2 Le traitement par la télomestatine inhibe la liaison de l avec le brin G télomérique	a TopoIIIα 162
	3.3 Le traitement par la télomestatine induit la dim niveau protéique des protéines TopoIIIα, TRF2, et BLM et déso APBs dans les cellules ALT MRC5-V1	inution du organise les 164
	3.4 Induction d'une réponse aux dommages à l'ADN des télomères des cellules ALT	au niveau 172
	3.5 La télomestatine induit une dégradation du s télomérique	simple-brin 174
4	Discussion	176
Co	onclusion et perspectives	180
Bi	bliographie	184
Ar	nexes	221

Introduction

I. Les télomères

II. Elongation des télomères par la télomérase

III. Maintien des télomères par le mécanisme ALT

IV. G-quartets et G-quadruplexes

V. Les topoisomérases

I. Les télomères :

1 <u>Historique :</u>

La découverte des télomères remonte aux années 1930, lorsque les généticiens Hermann J.Müller et Barbara Mc Clintock démontrèrent que les extrémités des chromosomes présentent des propriétés différentes par rapport aux autres régions du génome. Tout d'abord, en 1938, les travaux de Müller ont donné naissance au concept de télomère. Il montra grâce aux expériences d'irradiation aux rayons X, réalisées chez *Drosophila melanogaster*, que les régions terminales des chromosomes ne subissent pas les phénomènes de réarrangements chromosomiques que le reste du génome présentait (Muller., 1938). Müller nomma ces structures particulières « *télomères* » qui signifient en grec *telos* (fin) et *mere* (segment). Un an plus tard, les mêmes résultats ont été obtenus grâce aux travaux de Mc Clintock sur les chromosomes de maïs ayant subi des cassures double-brins; les extrémités chromosomiques restent stables contrairement au reste des chromosomes capables de fusionner (Mcclintock., 1939). Suite à ces résultats, les auteurs définissent le télomère comme une structure particulière succeptible de protéger les chromosomes d'éventuelles fusions de leurs extrémités.

Après une vingtaine d'années, une vision biologique du vieillissement a été proposée par Leonard Hayflick qui montra que les cellules humaines diploïdes présentent, en culture, un potentiel de réplication limité (Hayflick et al., 1961). Les cellules entrent ensuite dans un état appelé «*sénescence réplicative»* caractérisé par des changements morphologiques et biochimiques qui déclenchent l'arrêt de la prolifération. Dans les années 1970, le problème de la réplication terminale a été proposé par James D. Watson : le complexe enzymatique de l'ADN polymérase s'avère incapable de synthétiser l'extrémité de molécules d'ADN linéaires, l'ADN télomérique est alors sujet à un raccourcissement qui serait dû à une réplication incomplète des extrémités télomériques (Watson., 1972). La relation qui existe entre la longueur du télomère et le vieillissement est aussi mise en évidence par Alexander Olovnikov, il proposa une hypothèse reliant la sénescence cellulaire et le problème de réplication. Il expliqua la réplication limitée des cellules par l'érosion des télomères à chaque division cellulaire (Olovnikov, 1971). On sait maintenant que les télomères jouent des rôles essentiels dans la protection des chromosomes vis-à-vis des cassures double-brins et des phénomènes de recombinaisons.

En 1985, une nouvelle découverte a été ajoutée aux données précédentes, l'équipe d'E. Blackburn a pu identifier chez le cilié *Tetrahymena* une enzyme appelée « *la télomérase* » qui

assure la stabilité des télomères au cours des divisions cellulaires successives (Greider et al, 1985). C'est une réverse transcriptase ribonucléoprotéique, responsable de l'élongation d'un brin du télomère, évitant ainsi la perte progressive de séquences télomériques. L'enzyme est exprimée préférentiellement dans les cellules tumorales, qui ont des télomères courts (Morin., 1989), et est quasiment absente dans la plupart des cellules somatiques normales qui possèdent habituellement de longs télomères (Harley et al., 1990). Le télomère et la télomérase assurent alors une fonction qui se situe à la croisée de deux thèmes de recherche; le vieillissement et le cancer. Quelques années plus tard, Bryan et Rogan observèrent que des cellules de mammifères ne montrant aucune activité télomérase sont capables de maintenir la taille de leur télomères (Bryan et al., 1995). Cette découverte a mis en évidence l'existence d'un mécanisme capable de maintenir la longueur des télomères. En l'absence de la télomérase, Bryan et Reddel ont pu montrer que ce mécanisme est basé sur des recombinaisons entre les télomères (Bryan and Reddel., 1997), et ils l'ont nommé ALT (<u>A</u>lternative <u>L</u>engthening of <u>T</u>elomeres).

2 Description et structure des télomères :

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques particulières présentes aux extrémités des chromosomes eucaryotes dont l'intégrité est vitale pour la croissance de la cellule. Les structures télomériques, appelées aussi capuchons télomériques « *telomeric cap* », sont constituées par l'association de l'ADN télomérique et des protéines spécifiques. En effet, les télomères interviennent dans des fonctions essentielles pour la cellule. Ils coiffent les extrémités des chromosomes, ce processus empêche que ces extrémités soient reconnues comme des cassures double-brins d'ADN (Bertuch and Lundblad., 1998). Les télomères protègent aussi les extrémités des chromosomes contre les événements de fusion, de dégradation par les exonucléases et les enzymes de la recombinaison (Zakian et al., 1995). Leur raccourcissement, au fur et à mesure des divisions cellulaires, produit un signal d'arrêt de la prolifération par entrée en sénescence réplicative où ils joueraient le rôle d'horloge mitotique.

2.1 <u>L'ADN télomérique :</u>

Dans la majorité des cellules eucaryotes, l'ADN télomérique consiste en une séquence répétée, arrangée en tandem, non codante qui varie d'une espèce à une autre. Cette séquence est le plus souvent riche en guanines sur le brin orienté de 5' en 3' vers l'extrémité du chromosome. La séquence d(GGGTTA/TAACCC) est retrouvée à l'extrémité des

chromosomes des vertébrés, et d'autres séquences télomériques ont été identifiées chez les protozoaires, les levures et les végétaux supérieurs (**Tableau 1**). Le premier motif télomérique d(TTGGGG) a été caractérisé chez le cilié *Tetrahymena thermophila* par Elisabeth Blackburn (Blackburn, 1978). La taille moyenne des télomères varie d'une espèce à une autre. Chez l'homme, les télomères sont composés de 650 à 2500 répétitions ce qui représente une taille qui varie entre 10 et 15 kb, et une extension simple-brin d'environ 200 à 300 bases (Morin., 1989 ; Greider., 1996).

Organismes		Longueurs (pb)	Séquences brin C	Séquences brin G
Protozoaires	Tetrahymena Oxytricha, Euplotes Paramecium Plasmodium	< 100 < 100 < 100 ~1500	C4A2 C4A4 C3[C/A]A2 C3T[G/A]A2	T2G4 T4G4 T2[T/G] G3 T2[T/C] AG3
Champignons	Neurospora Cryptococcus Saccharomyces cerevisiae Schizosaccharomyces	<500	C3TA2 C3-5TA2 C2-3A(CA) 1-6 C1-6G0-1T0- 1GTA1-2	T2AG3 T2AG3-5 (TG) 1-6TG2-3 T1-2ACA0- 1C0-1G1-6
Plantes	Chlamydomonas Arabidopsis	< 500 3000	C3TA4 C3TA3	T4AG3 T3AG3
Invertébrés	Ascaris Bombyx mori	10000	GC2TA2 C2TA2	T2AG2C T2AG2
Vertébrés	Homme Mus musculus	> 10000 > 50000	C3TA2 C3TA2 C3TA2	T2AG3 T2AG3 T2AG3

Tableau (1)

Séquences télomériques de quelques organismes (D'après Wellinger and Sen., 1997).

L'ADN des spirotriches (*Oxytricha, Stylonychia, Euplotes*) convient bien particulièrement à l'analyse structurale des télomères car il est formé de petites molécules qui comportent en moyenne 2000 pb, soit une extrémité libre de 1000 pb. Dès 1981, le séquençage de l'ADN macromoléculaire d'*O. nova* révélait que chaque molécule se termine par plusieurs répétitions directes d'un motif de 8 pb : TTTTGGGGG. Le brin G 5'- 3' dépasse de 16 bases le brin C

(représenté en gris), formant ainsi une extrémité 3' saillante (**Figure I-1**). Cette extension simple-brin prolonge la région double-brin. L'ADN des autres ciliés comporte aussi des répétitions terminales. Les motifs télomériques des oligohyménophores ne comportent que 6 pb : TTGGGG/CCCCAA chez *Tetrahymena* et TTGGGG/CCCCAA ou TTTGGG/CCCCAAA chez *Paramecium*.



Figure (I-1)

ADN télomérique des ciliés.

L'ADN télomérique est organisé en double-brin, suivie d'une extension simple brin en 3' qui joue un rôle essentiel dans la structure du télomère. Le simple-brin télomérique peut adopter des structures en quadruplexe de guanine (G4) par des appariements de type Hoogsteen (Sen and Gilbert., 1988), mais aussi des boucles (t-loop) en envahissant le duplexe en amont de la partie simple-brin.



Figure (I-2)

ADN télomérique

- a- Séquences télomériques détectés par fluorescence (Kipling, 1995)
- b- Structure primaire de l'ADN télomérique humain.

2.2 <u>La t-loop :</u>

Une structure en boucle a été proposée pour expliquer le fait que l'extrémité des chromosomes ne soit pas reconnue par la cellule comme des dommages à l'ADN. L'insertion de l'extrémité télomérique simple-brin 3' dans la double hélice des séquences télomériques (D-loop) donne naissance à de grandes boucles à l'extrémité des chromosomes appelées t-loop pour *«telomeric loop»*. Ces structures ont été observées par microscopie électronique sur des préparations d'ADN génomique (Griffith., 1999). La même conformation a également été mise en évidence chez *Trypanosoma brucei* (Munoz-Jordan., 2001).



Figure (I-3) Représentation schématique de la t-loop en présence des protéines télomériques (D'après Blackburn and Neidel., 2006).

La formation de cette structure serait permise par une taille relativement longue du simplebrin télomérique, et par l'association avec certaines protéines spécifiques (**Figure I-3**). Il a été suggéré qu'au moins 100 nucléotides de l'extrémité simple-brin participent à la formation de cette structure (Griffith et al., 1999 ; Stansel et al., 2001). En effet, la formation de la t-loop serait médiée par la protéine télomérique TRF2 et l'altération de ses fonctions induit la dégradation du simple-brin télomérique (Stansel et al., 2001 ; Amiard et al., 2007). La séquestration du simple-brin dans cette conformation permettrait d'éviter la dégradation du télomère par les nucléases et les fusions télomériques (De Lange., 2004).

2.3 <u>Les G-quartets et les G-quadruplexes :</u>

Le G-quartet est une structure secondaire que peut adopter le simple-brin télomérique riche en guanines. Cette structure comprend quatre guanines associées par des liaisons de type Hoogsteen. Les G-quartets ont été caractérisés pour la première fois en 1962 par diffraction de rayon X (Gellert et al, 1962). L'empilement hydrophobe de trois quartets, intercalé par un cation monovalent stabilisant la structure, constitue les G-quadruplexes. La formation de ces derniers au niveau de l'extension simple-brin télomérique bloque l'activité de la télomérase et représente une stratégie originale pour rechercher de nouveaux agents anticancéreux (Zahler et al., 1991).



Figure (I-4)

Structures G-quadruplexes à 3 quartets.

3 Problème de la réplication terminale des télomères :

Au début des années 1970, Olovnikov proposait que les cellules perdaient une partie de leur ADN télomérique après chaque cycle de réplication jusqu'à atteindre une taille critique qui déclencherait un signal d'arrêt de la prolifération cellulaire en G₀ (Olovnikov., 1973). Ce phénomène, appelé «sénescence réplicative», dépend de l'activation de p53. En l'absence de cette protéine, les cellules continuent de se diviser, malgré l'absence de télomérase, et accumulent des réarrangements chromosomiques résultant de l'apparition de télomères instables. Cette instabilité finit par atteindre des niveaux intolérables et les cellules rencontrent une deuxième barrière de prolifération : la crise, qui correspond à leur mort massive. Le processus est dû à l'incapacité de la machinerie conventionnelle à répliquer les extrémités linéaires des chromosomes. La réplication de l'ADN se déroule dans le sens 3'- 5' sur la matrice de l'ADN. Au cours de la réplication, le mécanisme fait appel à la synthèse d'une courte séquence d'ARN qui sert d'amorce à l'ADN polymérase. Ultérieurement, ces amorces sont excisées et la brèche ainsi formé est comblée par la polymérase à l'exception de l'extrémité 5' du brin retardé des télomères (Figure I-5). La répétition de ce phénomène à chaque division conduit à une érosion importante des télomères. En l'absence de mécanisme compensateur, et à partir d'une longueur critique, ce phénomène aboutit à un arrêt de la

Origin

prolifération des cellules somatiques. Cependant, la cellule peut échapper à la sénescence et à la crise par deux mécanismes distincts :

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

Figure (I-5)

Problème de la réplication terminale.

La machinerie "classique" de réplication de l'ADN est incapable de répliquer l'extrémité des chromosomes. Par conséquent, après chaque cycle de réplication, les molécules d'ADN se raccourcissent un peu plus. Les brins parentaux sont représentés en noir, les brins nouvellement synthétisés en bleu et les amorces d'ARN en rose. Le brin tardif est représenté en bleu clair et le brin précoce en bleu foncé. Ainsi, chaque brin nouvellement synthétisé est un brin précoce à une extrémité et un brin tardif à l'autre extrémité. Une seule fourche de réplication est représentée (d'après Addison Wesley Longman, 1999).

 Par l'intermédiaire de la télomérase qui, grâce à sa propre matrice d'ARN, peut allonger de façon itérative l'extrémité simple-brin télomérique en synthétisant, en 5'- 3', à la manière d'une réverse transcriptase des répétitions télomériques (Blackburn, 1992; Lingner et al., 1995; Counter., 1996; Chiu and Harley., 1997; O'Reilly et al., 1999 pour revue).

 par un mécanisme de recombinaison spécifique des télomères appelé ALT (Alternative Lengthening of Telomeres) lorsque l'activité télomérase est absente. Ces deux mécanismes seront détaillés dans les prochains chapitres.

4 Les protéines associées aux télomères humains :

Les télomères sont organisés sous forme de complexe nucléoprotéique formé de protéines spécifiques associées aux répétitions télomériques, ce complexe a été nommé « shelterin » ou «télosome» (De Lange., 2005). Le shelterin est composé de six protéines, il reconnaît spécifiquement les répétitions télomériques TTAGGG grâce à trois protéines de ses composants : Telomeric Repeat binding Factor 1 et 2 (TRF1 et TRF2) qui se lient à la partie double-brin télomérique, tandis que la protéine Protection Of Telomeres 1 (POT1) peut lier les répétitions TTAGGG simple-brin de l'extrémité 3'. Trois autres protéines ; TRF2- and TRF1-Interacting Nuclear protein 2 (TIN2), Rap1 (Repressor Activator Protein 1), et TPP1 (appelé aussi TINT1, PTOP, ou PIP1) servent d'adaptateurs entre TRF1, TRF2 et POT1. Au cours du cycle cellulaire, les composants du shelterin sont localisés au niveau des télomères. En absence de l'ADN télomérique, le shelterin forme un complexe stable dans des extraits nucléaires de cellules (Liu et al., 2004 ; Ye., 2004). La formation dynamique de complexes entre ces protéines et l'ADN télomérique permet la protection et l'allongement des télomères. En effet, le shelterin permet aux cellules de faire la distinction entre les extrémités naturelles des chromosomes et les cassures d'ADN, ce qui évite les processus illégitimes de réparation induisant la fusion et la dégradation des extrémités chromosomiques. Le shelterin est impliqué également dans la régulation de la longueur des télomères en interagissant avec la télomérase ou en remodelant la chromatine. L'inhibition fonctionnelle de chacune de ces protéines par l'interférence ARN ou par la surexpression d'un dominant négatif affecte la protection ou la taille des télomères, ce qui démontre leurs rôles dans le maintien des télomères (De Lange T., 2005)

4.1 <u>TRF1 :</u>

TRF1 (*TTAGGG repeat factor 1*) est la première protéine télomérique des mammifères identifiée grâce à sa fixation spécifique des répétitions télomériques (Zhong et al., 1992). C'est une protéine de 60kD qui se lie spécifiquement à l'ADN double-brin ou circulaire par l'intermédiaire d'un domaine de type *myb* (Smith and De Lange, 1997). Elle forme un

homodimère grâce à son domaine de dimérisation TRFH (TRF Homology) (Bianchi et al, 1997). A son extrémité N-terminale se trouve un domaine acide, pouvant servir de site de reconnaissance pour des protéines de régulation. TRF1 est associée aux télomères humains et murins tout au long du cycle cellulaire (Broccoli et al., 1997; Chong et al., 1995; van Steensel and de Lange., 1997).



Figure (I-6) Représentation schématique de la structure primaire de TRF1.

La surexpression de TRF1 dans les cellules tumorales télomérase positives entraîne un raccourcissement progressif des télomères individuels, et inversement, l'élongation des télomères a été induite par l'expression d'un dominant négatif de TRF1 (dnTRF1), qui inhibe la fixation de TRF1 endogène aux télomères. Ces résultats ont permis l'identification de TRF1 comme un régulateur négatif de la longueur des télomères (van Steensel and de Lange., 1997; Smogorzewska et al., 2000). En outre, la délétion de l'exon 1, codant pour le gène de TRF1 murin, cause une létalité embryonnaire précoce, sans perte majeure de la longueur des télomères, ni altration de leur protection, ce qui suggère une fonction essentielle de TRF1 dans la croissance normale des cellules, indépendante de sa fonction de régulation de la longueur des télomères (Karlseder et al., 2003). TRF1 est capable de modifier, in vitro, la configuration de l'ADN télomérique en induisant l'appariement parallèle des répétitions TTAGGG, forme d'ADN inaccessible à la télomérase. Cette fonction de TRF1 pourrait contribuer à son rôle dans la régulation de la longueur des télomères (Jack Griffith and al, 1998). TRF1 est sujet à la phosphorylation, la SUMOylation, la PARsylation, l'ubiquitination, et la dégradation par la protéine Fbx4 (Kishi et al., 2001; Chang W et al., 2003; Lee et al., 2006 ; Potts and Yu., 2007). Chez la levure, des travaux récents suggèrent que le facteur de transcription *c-myc* devrait être impliqué dans la régulation de la longueur des télomères via son interaction directe avec TRF1/TIN2 (Kim and Chen., 2007). Il a été identifié un homologue de TRF1/TRF2 chez Schizosaccharomyces pombe, la protéine Tbf1 pour (telomeric repeat binding factor 1), qui présente une similarité de séquence, mais aussi de

structure et de fonction avec les protéines télomériques TRF1 et TRF2 (Christopher et al., 2008).

4.2 <u>TRF2 :</u>

La seconde protéine télomérique associée au télomère TRF2 (*TTAGGG repeat factor 2*) a été découverte en 1997 (Bilaud et al., 1997; Broccoli et al., 1997). TRF2 est directement liée avec l'ADN double brin à travers son domaine *myb* situé sur l'extrémité C-terminale, et fonctionne comme un homodimère grâce au domaine de dimérisation TRFH. Ce dernier est de structure différente de celui de TRF1, ce qui empêche l'homodimérisation des deux protéines. Le domaine TRFH possède un site polyvalent essentiel pour le recrutement d'autres protéines aux télomères (Chen et al., 2008). TRF2 possède, contrairement à TRF1, un domaine basique à son extrémité N-terminale, riche en acides aminés Glycine et Arginine appelé aussi domaine GAR; (Gly/Arg-rich). La différence de séquences des extrémités N-terminales de TRF1 et TRF2 explique leurs fonctions différentes, et leur interaction avec des protéines différentes. TRF2 a une assez forte homologie de séquence avec TRF1 ce qui explique la fixation des deux protéines sur la même séquence d'ADN. Les deux protéines sont extrêmement abondantes, soit des milliers de dimères couvrants chaque télomère (Palm and De Lange., 2008).



Figure (I-7)Représentation schématique de la structure de TRF2.

TRF2 a été plus particulièrement étudiée pour le rôle essentiel qu'elle semble jouer au niveau du complexe shelterin. En effet, TRF2 régule négativement la longueur des télomères dans des cellules exprimant ou non la télomérase (Smogorzewska et al., 2000). TRF2 joue un rôle majeur dans la protection des télomères en promouvant la formation de la structure en t-loop, une structure qui permet aux télomères d'être protégés contre les fusions (Griffith et al., 1999 ; Stansel RM et al., 2001), TRF2 réprime aussi la réparation des télomères notamment les mécanismes NHEJ (Non-homologous End Joining) et les recombinaisons homologues et évite que la t-loop soit reconnue comme une jonction de Holliday (Wright and Shay., 2005). Les travaux de Bea et al suggèrent que le complexe que TRF2/ RAP1 bloquerait la réparation des NHEJ (Bae et al., 2007). De plus, chez les souris TRF2 ^(-/-), l'abondance de RAP1 mais

pas celle de TRF1 est diminuée suggérant que TRF2 et RAP1 agissent ensemble (Celli et al., 2005). La déplétion de TRF2 ou la surexpression de son dominant négatif (TRF2 Δ B Δ M) induit des fusions chromosomiques et une perte de l'extrémité 3', sans perte majeure du duplexe télomérique. (Van Steensel et al., 1998). De même, l'expression d'un mutant du domaine basique de TRF2 dans des cellules télomérase positives provoque le raccourcissement des télomères (Wang et al., 2004). A l'inverse, la surexpression de TRF2 accélère le raccourcissement des télomères, dans les lignées télomérase positives et ALT (Zhu et al., 2003) mais protège aussi l'entrée des cellules en sénescence et de la formation de fusions télomériques (Karlseder et al., 2002). La présence de TRF2 est cruciale pour permettre l'invasion du brin G. Récemment, une étude transdisciplinaire a permis de découvrir de nouvelles propriétés de TRF2 permettant de comprendre le fonctionnement de cette protéine dans la structuration des télomères humains. Ces travaux montrent que TRF2 agirait sur la topologie de l'ADN pour permettre l'invasion du brin G (Amiard et al., 2007). Comme TRF1, TRF2 est aussi sujet à la phosphorylation, la SUMOylation et la PARsylation (Dantzer et al., 2004; Tanaka et al., 2005; Potts et al., 2007)

4.3 <u>POT1 :</u>

POT1, la protéine la plus conservée du shelterin, a été identifiée par homologie de séquence avec la sous-unité α de la protéine TEBP (telomere end-binding protein), capable de fixer l'ADN télomérique simple-brin chez le cilié Oxytrichia nova (Baumann and Cech., 2001). Comme TEBPa, POT1 possède deux domaines OB «Oligonucleotide Binding fold» situés sur l'extrémité N-terminale, grâce auquels elle reconnaît le brin G in vitro (Lei et al., 2004 ; Loayza et al., 2004 ; Kelleher et al., 2005). Le domaine OB1 interagit avec les 5 premiers nucléotides T1-G5 de la séquence TTAGGGTTAG alors que le domaine OB2 interagit avec les nucléotides T7-G10. Le domaine OB est un domaine commun de plusieurs protéines, identifié initialement, comme un domaine de fixation aux oligosaccharides et aux oligonucléotides simple-brin, y compris le simple brin télomérique (Murzin et al , 1993). Chez la levure, la protéine télomérique Cdc13 (cell division cycle 13) l'homologue fonctionnel de POT1, reconnaît l'extrémité 3' à travers le domaine OB (Nugent et al., 1996 ; Lin and al, 1996; Hughes and al, 2000; Theobald and al, 2003; Miyoshi and al, 2008). L'analyse de la séquence de POT1 suppose la présence d'un troisième domaine sur l'extrémité C-terminale (Figure I-8), suggérant une structure conservée du domaine OB de POT1 et celui de TEBP qui possède trois domaines OB (Theobald and Wuttke., 2004).

Le domaine OB est impliqué dans le fonctionnement des télomères des plantes et du nematode *C. elegans* (Shakirov et al., 2005 ; Surovtseva and al , 2007 ; Raices et al., 2008).



Figure (I-8) Représentation schématique de la structure primaire de POT1.

Les cellules humaines expriment deux formes de POT1, l'une code la protéine complète, l'autre code une forme tronquée POT1-55 dépourvue du domaine OB1, et incapable de fixer le simple-brin télomérique (Hockemeyer et al., 2005). La surexpression de POT1 chez l'Homme, induit l'allongement des télomères des cellules qui expriment la télomérase (Colgin et al., 2003). Chez les cellules humaines, la suppression des fonctions de POT1 par ARN interférant est caractérisée par des fusions chromosomiques, des ponts anaphasiques, l'entrée des cellules dans la sénescence, l'augmentation de la taille des télomères (Veldman and al , 2004), le recrutement des facteurs de réponses aux dommages de l'ADN et la perte du simplebrin télomérique (Hockemeyer et al., 2005). Chez la levure, la délétion du gène *Pot1*+ altère la stabilité des chromosomes, entraînant une perte rapide de l'ADN télomérique et la formation des chromosomes circulaires. (Baumann and Cech., 2001). En fonction de sa position sur le simple-brin télomérique qui le laisse accessible ou non, POT1 peut inhiber ou activer la télomérase (Lei et al., 2005). Le recrutement de POT1 constitue donc une étape importante dans la protection et le contrôle de la longueur des télomères.

4.4 <u>TPP1 :</u>

TPP1 (appelée précédemment TINT1, PTOP ou PIP1) interagit à la fois avec POT1 et TIN2 permettant la connexion entre les deux protéines. L'interaction avec POT1 s'effectue par le biais d'un domaine central d'interaction avec POT1, alors que l'interaction avec TIN2 nécessite les 22 acides aminés situés sur l'extrémité C-terminale de TPP1 (Houghtaling et al., 2004 ; Liu et al., 2004 ; Ye et al., 2004). Entre ces deux domaines, il existe un troisième domaine riche en sérine dont la fonction est inconnue. Sur son extrémité N-terminale, TPP1 contient un domaine de repliement OB de structure similaire à celui du cilié TEBP_β (Wang et al., 2007). Des travaux portés sur TPP1 montrent que le domaine OB co-immunoprécipite avec une activité télomérase (Ye et al., 2004 (b) ; Xin et al., 2007) et que le complexe TPP1/POT1 augmente l'activité et la processivité de la télomérase (Wang et al., 2007). Ces résultats suggèrent que TPP1 est impliquée, avec POT1, dans le recrutement et la régulation de la télomérase. La déplétion de TPP1 ou l'expression d'un mutant ne liant pas POT1 empêche le recrutement de POT1 aux télomères. En outre, la suppression de fonctions de TPP1 conduit à une déprotection du télomère, qui présente un phénotype compatible avec la perte de POT1 (Liu et al., 2004 ; Ye et al., 2004 ; Hockemeyer et al., 2007 ; Lazzerini and de Lange., 2007 ; Xin et al., 2007). L'interaction avec TPP1 est alors essentielle pour l'association de POT1 aux télomères.



Figure (I-9)

Interaction de POT avec TPP1.

TPP1 se lie au complexe POT1-ADN simple-brin et améliore leur interaction. Les complexes humains POT1-TPP1 (a) et de O.Nova (b) montrent une similarité d'organisation de leurs domaines. Les domaines N-terminaux de POT1 et TEBPa, liant l'ADN simple-brin sont coloriés en rouge, et sur l'extrémité C-terminale, les domaines liant TPP1/TEBP β sont coloriés en bleu ciel. Pour TPP1 et TEBP, le domaine OB situé sur la région N-terminale est en orange, la région centrale du domaine PBD pour TPP1 et aBD pour TEBP β sont en bleu, et les domaines C-terminaux sont en jaune.

4.5 <u>TIN2 :</u>

TIN2, (pour *TRF1 interacting facteur 2*) occupe une position centrale du shelterin, elle lie TRF1, TRF2 et TPP1 permettant de créer une jonction entre les protéines fixant le simplebrin télomérique et les protéines fixant le double-brin. (Houghtaling et al., 2004; Kim et al., 1999; Kim et al., 2004; Ye et al., 2004). L'interaction TRF1/TIN2 nécessite le domaine TRFH de TRF1, et le motif FxLxP situé sur l'extrémité C-terminale de TIN2, alors que TIN2 est associée au domaine localisé entre les domaines TRFH et *myb* de TRF2 à travers une région située sur son extrémité N-terminale (Chen et al., 2008). Ces interactions peuvent se produire simultanément, permettant de créer une jonction entre TRF1 et TRF2 (Ye et al., 2004 (a)). Par conséquent, la déplétion de TIN2 ou l'expression d'un dominant négatif altère profondément la stabilité du complexe shelterin (Kim et al., 2004 ; Ye., 2004 (a)). TIN2 recrute la protéine TPP1 au complexe TIN2/TRF1/TRF2 à travers un troisième site localisé sur son extrémité N-terminale, le recrutement de TPP1 renforce l'interaction de TIN2 avec TRF2 (O'Connor et al., 2006).



Figure (I-10) Représentation schématique de la structure primaire de TIN2.

4.6 <u>RAP1 :</u>

Identifié d'abord chez la levure, RAP1 (Repressor Activator Protein1) est un composant du complexe shelterin essentiel à la viabilité cellulaire mais très peu caractérisé. Chez l'Homme, RAP1 a été identifié comme étant un partenaire de TRF2 avec laquelle elle forme un complexe équimoléculaire (Li and De Lange., 2000 ; Zhu et al., 2000). RAP1 possède trois domaines; un domaine Myb qui devrait conférer une interaction protéine-protéine avec un partenaire inconnu (Hanaoka et al., 2001), un domaine de motif BRCT sur l'extrémité Nterminale susceptible de reconnaître les peptides phosphorylés et un domaine de liaison avec TRF2 situé sur l'extrémité C-terminale (Palm and De Lange., 2008). Chez la levure, RAP1 possède un deuxième domaine Myb qui fixe directement l'ADN télomérique. Cependant, chez les mammifères, RAP1 n'interagit pas directement avec l'ADN télomérique et dépend de TRF2 pour assurer sa stabilité et sa localisation aux niveau des télomères (Li et al., 2000; Li and De Lange T., 2003). RAP1 interagit également avec des éléments de la réparation de l'ADN tels que le complexe MRN et PARP1 (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 diminue l'hétérogénéité de leur taille (Li and de Lange, 2003).



Figure (I-11) Représentation schématique de la structure primaire de Rap1.



a- Représentation schématique du complexe Shelterin. (D'après Palm and De Lange., 2008).



b- Interconnexion entre les composants du shelterin : TRF1 et TRF2 fixent le duplexe télomérique sous forme d'un homodimère alors que POT1 se lie au simple-brin. TPP1 et TIN2 permettent de faire la jonction entre TRF1/TRF2 et POT1. RAP1 est liée à TRF2 (d'après Bianchi and Shore., 2008).



Figure (I-12)Le complexe shelterin humain.

5 Facteurs accessoires du complexe shelterin :

En dehors des composants du complexe de shelterin, les télomères des mammifères contiennent d'autres protéines pouvant contribuer au maintien et la protection des télomères. Ces facteurs sont moins abondants au niveau des télomères que les composants du shelterin et certains sont associés au télomère de façon transitoire. En outre, la plupart de ces protéines retrouvées au niveau des télomères ont des fonctions télomériques non exclusives, et sont plus abondantes dans d'autres sites nucléaires ou au niveau du cytoplasme. Plusieurs de ces facteurs sont impliqués dans des processus tels que la réparation de l'ADN [Ku70/80 (Hsu et al., 1999 ; Hsu et al., 2000), XPF/ERCC1 (Zhu et al., 2003), Apollo (Van Overbeek and de Lange., 2006 ; Lenain et al., 2006), le complexe Mre11 (Zhu et al., 2000), RAD51D (Tarsouna et al., 2004), PARP1 et -2], la signalisation des dommages à l'ADN [le complexe Mre11 (Zhu et al., 2000), le complexe 9-1-1 (Francia et al., 2006)] et la réplication de l'ADN [ORC (Deng et al., 2007), et les hélicases de la famille RecQ (Opresko et al., 2002)]. Un grand nombre de ces facteurs est recruté par le complexe shelterin (**Figure I-13**) et

TRF2/Rap1 ou TRF1 sont les médiateurs dominants de ces interactions. Il ne semble pas que TIN2, TPP1 et POT1 soient impliqués dans le recrutement des facteurs accessoires.



Le domaine TRFH de TRF1(a) et TRF2 (b) interagit avec les protéines contenant les motifs FxLxP et YxLxP, respectivement. Ces interactions avec ces sites ont été également vérifiées pour TIN2 et Apollo. (c) Autres interactions n'impliquant pas le motif F/YxLxP (D'après Palm and De Lange)..

6 Transcription des télomères :

Judqu'à récemment, les télomères étaient toujours considérés comme des régions génomiques non transcrites, toutefois, en 2007, Azzalin et al ont montré que les télomères des mammifères sont transcrite en des répétitions télomériques d'ARN nommées (*TERRA*) pour <u>TE</u>lomeric <u>Repeat containing RNA (Azzalin et al., 2007)</u>. La transcription est faite à partir de régions riches en Cytosine, en utilisant des promoteurs situés sur des régions subtélomériques. Les molécules TERRA présentent une hétérogénéité de taille de 0.1 à 9 kb. Ainsi, l'hybridation *in situ* montre la présence de TERRA au niveau des extrémités des chromosomes. Puisque ces molécules colocalisent avec la protéine télomérique Rap1, il a été suggéré que les molécules TERRA sont associées avec la chromatine télomérique. Les travaux de cette équipe ont montré également que la protéine chromatinienne SMG, *«Suppressors with Morphogenetic Defects in Genitalia»*, impliquée dans une voie de surveillance de l'ARN, abondantes aux télomères, régule négativement l'association des molécules TERRA à la chromatine et protège les extrémités chromosomiques d'éventuelle perte de séquences. La protéine SMG établit donc le lien entre la régulation des molécules TERRA et la maintenance de l'intégrité

des télomères. Le rôle exact des molécules TERRA n'est pas encore élucidé, cependant, il semble qu'elles interviennent lors de l'élongation et la réplication des télomères. Le niveau transcriptionnel de TERRA a été étudié par RNA slot-blot dans les cellules ALT et les cellules télomérase positives (Ng et al., 2009). Il a été démontré que la transcription est beaucoup plus importante dans les lignées ALT par rapport aux lignées télomérase positives ce qui est cohérent avec l'idée que les molécules TERRA devraient inhiber la télomérase.

7 La sénescence cellulaire :

Le terme de sénescence cellulaire a été introduit par Hayflick afin de décrire l'arrêt de la croissance permanent et viable des fibroblastes primaires suite à plusieurs cycles de division en culture. Des cellules en culture sont capables de se multiplier rapidement jusqu'à une limite dite limite de « Hayflick » à partir de laquelle les cellules se divisent de plus en plus lentement jusqu'à un arrêt du cycle cellulaire en G1, connu sous le nom de sénescence réplicative (Hayflick., 1979; Shay et al., 2000). Les cellules sénescentes acquièrent des caractéristiques morphologiques différentes des cellules normales telles que le noyau et le cytoplasme qui sont plus volumineux, la forme applatie, la richesse en lysosomes, en mitochondrie et les modifications des enzymes de la matrice telle que la diminution des inhibiteurs de la matrice métalloprotéinase (TIMP) (Cristofalo et al., 2004) et la production de facteurs paracrines qui affectent la survie et la croissance des cellules voisines. Cet état est également associé à de nombreux changements du métabolisme cellulaire, notamment une activité accrue de l'activité β galactosidase (SA- β -galactosidase) (Dimri et al., 1995). Le programme de sénescence est perdu ou réprimé dans les cellules tumorales qui échappent à l'entrée en sénescence et prolifèrent au délà de leur capacité réplicative normale. La persistance des divisions cellulaires est à l'origine d'une prolifération cellulaire excessive conduisant à la cancérogénèse. Selon Hayflick les cellules somatiques possèdent un mécanisme moléculaire appelé « horloge mitotique » qui compterait le nombre de divisions révolues, et lorsque le nombre maximal de division est atteint, déclencherait des signaux provoquant un arrêt de la prolifération (Figure I-14). 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 des télomères (Griffith et al., 1999). Les cellules en sénescence présentent également une érosion de l'extrémité simple brin télomérique (Stewart et al., 2003). La sénescence peut être alors induite par le raccourcissement des télomères lié à des modifications de la structure de la chromatine télomérique. Les cellules présentent également une augmentation de l'expression de l'anti-oncogène P53 qui déclencherait la désorganisation de la t-loop et les fusions chromosomiques (Griffith et al., 1999; De Lang., 2002). La sénescence, dans ce cas, est dite intrinsèque et elle correspond au processus de vieillissement normal des cellules somatiques. Le gène suppresseur de tumeur P53 joue un rôle crutial dans les situations où l'intégrité du génome est compromise en induisant l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire. Son inactivation entraîne l'augmentation de l'espérance de vie des fibroblastes humaines (Itahana et al., 2001) alors que les cellules sénescentes présentent une forte expression de P53 et entre autre de sa cible P21(Itahana et al., 2002; Noda et al., 1994).



Figure (I-14)

Hypothèse télomérique de la sénescence.

Dans les cellules germinales et les cellules immortelles (étape b), la télomérase est active et la taille des télomères est généralement maintenue à un niveau stable. L'absence de télomérase dans les cellules somatiques occasionne un raccourcissement progressif des télomères à chaque mitose cellulaire. Lorsque les télomères ont atteint une taille critique, il se produit un arrêt du cycle cellulaire (sénescence réplicative). La transfection des cellules somatiques avec des virus transformants permet d'échapper à la sénescence réplicative (étape a). Ces cellules préimmortelles continuent à se diviser jusqu'à un stade que l'on dénomme «crise». Dans 15 % des cas, l'émergence de cellules immortelles s'associe au rallongement des télomères en l'absence d'activité télomérase (ALT) (étape c) (Bryan et al., 1997). En transfectant certaines cellules primaires humaines avec un vecteur permettant l'expression d'hTERT, l'activité télomérase est restaurée, les télomères sont allongés et ces cellules échappent à la sénescence réplicative (étape d) (Bodnar et al., 1998 ; Vaziri et al., 1998; Morales et al., 1999; Jiang et al., 1999; Ouellette et al., 1999). Dans certains types de cellules préimmortelles, la surexpression de hTERT permet le maintien ou l'augmentation de la taille des télomères (étape e) (Counter et al., 1998; Halvorsen et al., 1999). La taille des télomères dans d'autres types de cellules préimmortelles et surexprimant hTERT est plus courte que celle des télomères des cellules ayant été transfectées par le vecteur seul, qui – elles – sont déjà en « crise » (étape f) (Zhu et al., 1999).



Figure (I-15)

Les deux types de sénescence chez les mammifères (d'après Itahana et al., 2004).

Les travaux de D'adda di Fagagna et de Gire montrent que les fibroblastes humains sénescents accumulent sous forme de foyers la forme phosphorylée de l'histone H2AX (yH2AX), un marqueur des sites de cassures de l'ADN (D'adda et al., 2003 ; Gire et al., 2004), ainsi que d'autres protéines intervenant dans la réparation de l'ADN, comme le complexe MRN, 53BP1 et BRCA1. Lorsque les télomères deviennent trop courts, p53 pourrait être phosphorylée par ATM (Ataxia Telangiectasia mutated), ce qui induit l'entrée en sénescence des cellules (Pandita., 2002). Une activité ATM élevée a été trouvée dans des cellules en sénescence (Herbig., et al., 2004). L'activation d'ATM par les lésions de l'ADN induit la dissociation des dimères inactifs d'ATM en monomères actifs et son autophosphorylation. L'ATM monomérique activé est alors recrutée au niveau des sites de cassures de l'ADN où elle phosphoryle de nombreux substrats comme Chk2 et p53 (Bakkenist et al., 2003). Bien que les mécanismes responsables de l'activation de p53 ne soient pas complètement élucidés, la voie ATM/Chk2 reconnaît très vraisemblablement le signal émis par les télomères érodés et active p53 par phosphorylation (Abraham et al., 2001). Ce processus de sénescence devrait permettre à priori de protéger l'organisme de l'apparition de cancer en empêchant les cellules de réaliser un trop grand nombre de divisions cellulaires (Campisi et al., 2001). Cependant des études montrent que l'état de sénescence s'accompagne d'une forte instabilité génétique. En effet, le raccourcissement des télomères induit une augmentation du nombre de recombinaisons non homologues avec fusions chromosomiques et fusions de chromatides soeurs (Hande et al., 1999), ce qui pourrait au contraire favoriser l'émergence de certains oncogènes. La sénescence peut être également induite par d'autres stimuli extrinsèques comprenant l'exposition des cellules au stress oxydatif, à des radiations ionisantes, aux UV, et par l'expression ectopique de certains oncogènes et de suppresseurs de tumeur tels que P53, Rb, P16 ou P21. L'ensemble de ces stimuli provoque une sénescence prématurée, appelée aussi sénescence accélérée, induite par le stress au bout de 12 à 15 divisions. La voie de signalisation de la sénescence extrinsèque dépendant de la protéine pRb est différente de la sénescence intrinsèque (Figure I-16). La sénescence peut être également provoquée après traitement par différents agents anticancéreux. En effet, à des doses non toxiques n'induisant pas l'apoptose, certaines molécules peuvent conduire des cellules traitées en sénescence après plusieurs divisions cellulaires (Roninson et al., 2001).





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 qui à son tour va activer la protéine P21. (Herbig and Sedivy, 2006).

II. Elongation des télomères par la télomérase :

1. <u>Généralités :</u>

Il faudra attendre 1985 pour que la notion de télomérase soit évoquée. En effet, Elisabeth Blackburn et sa collaboratrice Carol Greider ont découvert, chez le cilié Tetrahymena, l'activité réverse transcriptase de la télomérase, capable de prévenir la perte des éléments terminaux par addition de séquences aux extrémités 3'. Elles pressentent aussitôt qu'il ne s'agit pas d'une particularité de Tetrahymena thermophila, ou de Saccharomyces cerevisiae, mais d'un processus cellulaire général, d'une importance extrême (Greider and Blackburn., 1985). Il s'agit d'une enzyme très conservée, formée par un complexe ribonucléoprotéique avec une activité cellulaire de transcription inverse qui se sert d'un ARN matrice spécifique pour allonger le brin 3' dans le sens 5' 3' de l'extrémité distale des télomères. La télomérase ajoute des répétitions télomériques TTAGGG en complémentarité d'une molécule d'ARN constitutive incluse dans le complexe et utilisée comme matrice pour la synthèse de ces répétitions (Greider and Blackburn., 1989 ; Yu et al., 1990 ; Shippen-Lentz and Blackburn., 1990). Ce mécanisme a été mis en évidence dans de nombreux organismes, y compris les cellules humaines (Autexier and Lue., 2006). La télomérase est active dans les cellules germinales et embryonnaires indifférenciées, mais très faiblement exprimée dans les cellules somatiques. Une très forte activité télomérase a été détectée dans les cellules à prolifération rapide, hématopoïétiques et interstitielles (Broccoli et al., 1995; Yasui., 1999). Les cellules souches et les cellules germinales possèdent également une activité télomérase qui permet d'assurer leurs fonctions respectives dans le renouvellement de tissus et dans la reproduction. En revanche, une faible activité de la télomérase a été détectée dans les fibroblastes en phase S (Masutomi et al., 2003).

2. Structure

La télomérase humaine est une ADN polymérase ARN-dépendante qui comporte deux sousunités: la sous-unité catalytique TERT (<u>*Telomerase Reverse Transcriptase*</u>), et TERC (*telomerase RNA component*) ou TR, un ARN non traduit dont la séquence sert de matrice pour la synthèse *de novo* des séquences complémentaires (Greider and Blackburn, 1989; Feng et al., 1995).

2.1 <u>TERT :</u>

La sous unité catalytique de la télomérase TERT a initialement été purifiée chez la levure Saccharomyces cerevisiae et le cilié Euplotes aediculatus (Lendvay et al., 1996; Lingner et al., 1997). hTERT a été ensuite clonée sur la base de son homologie avec les protéines EST2p et P123 de ces deux espèces, respectivement (Harrington et al., 1997b; Kilian et al., 1997; Meyerson et al., 1997; Nakamura et al., 1997). Depuis, TERT a été identifiée chez de nombreux autres organismes : ciliés, nématodes, protozoaires et plantes. Chez l'homme, le gène de la sous-unité catalytique hTERT est situé en 5p15.33, et code pour une protéine de 1132 acides aminés de 127kDa (Cong et al., 1999). La protéine hTERT est une ADN polymérase, assurant l'activité catalytique de l'enzyme. Elle contient des motifs RT (Reverse Transcriptase) très conservés dans les différents organismes (Bachand and Autexier., 2001). Sur son extrémité N-terminale, TERT possède une large extension de 400 acides aminés nommée NTE (acid N-terminal extension) et une courte extension en C-terminal d'environ 150-200 acides aminés nommée CTE (C-terminal extension). Les domaines N-terminaux et NLS sont impliqués dans la localisation nucléolaire de la télomérase (Yang et al., 2002), alors que le domaine C-terminal est essentiel pour le fonctionnement de hTERT, et semble jouer un rôle dans l'activité processive de la télomérase (Huard et al., 2003).





Structure de la sous-unité catalytique de la télomérase humaine hTERT, et du virus HIV. (D'après Autexier and Lue 2006).
Les travaux de Wong et al ont montré, grâce à l'expression d'une protéine de fusion GFPhTERT, une localisation nucléolaire pendant la phase G1 et le début de la phase S, et une localisation nucléaire pendant la fin de la phase S et la phase G2 (Wong et al., 2002). Plusieurs organismes présentent une seule isoforme de TERT. Cependant, *E. crassus* possède trois gènes qui codent pour TERT et montrent une régulation différente corrélée avec des changements de l'activité de la télomérase.

2.2 <u>TR :</u>

A la suite de leur découverte de la télomérase chez le cilié *Tetrahymena*, l'équipe de Blackburn a montré que cette enzyme est dépendante d'un ARN pour son activité (Greider and Blackburn 1989; Yu and Blackburn 1991). Chez l'homme, la sous unité ribonucléique appelée hTR a été identifiée et clonée en 1995 (Feng et al., 1995). hTR est transcrite par l'ARN polymérase II et comporte 451 nucléotides dont 11 constituent la matrice pour la synthèse des répétitions télomériques. Elle est codée par un gène situé en 3q26, et contient une courte séquence nucléotidique 5'- CUAACCCUAAC- 3' complémentaire de celle des télomères qui sert de matrice lors de la synthèse de l'ADN télomérique. Le temps de demi-vie de hTR varie entre 4 et 32 jours (Yi et al., 1999). La taille de TR varie énormément selon les espèces. La séquence primaire de cet ARN est très peu conservée entre les différentes espèces. En revanche, sa structure secondaire, constituée de trois domaines conservés CR (pour conserved region) (figure II-2), est paradoxalement bien conservée (Chen et al., 2000 ; Bachand et al., 2001a) :

La région CR1, proche de l'extrémité 5', contient la séquence matrice, 5'-CUAAUCCU-3'. Le pseudo-nœud (CR2-3) qui est essentiel à son assemblage avec hTERT et à son activité (Gilley and Blackburn., 1999). Le domaine CR4-5 est impliqué dans la stabilisation de hTR, sa localisation cellulaire et son assemblage avec hTERT et d'autres composants. (Bachand and Autexier., 2001; Chen et al., 2002; Mitchell and Collins, 2000). Sur l'extrémité 3' se situe le domaine de type H/ACA (CR6-8), ce domaine a suscité beaucoup d'intérêt car il est à la fois important pour la stabilité de hTR et pour sa maturation en 3' (Mitchell JR et al., 1999). Enfin, le domaine CR7 spécifique des vertébrés. La mutation du domaine CR7 n'affecte pas l'interaction de hTR avec hTERT (Bachand and Autexier., 2001).



Figure (II-2) a) Structure de la sous-unité ribonucléique de la télomérase humaine, b) Proposition de structure tridimensionnelle du domaine pseudoknot.

Les trois motifs conservés sont encadrés en pointillés : le domaine pseudo-noeud, le domaine CR4-CR5 et le domaine H/ACA (Theimer, Blois et al. 2005).

3. Partenaire de la télomérase :

Compte tenu de la complexité des polymérases et des ribonucléoprotéines, il est probable que la télomérase humaine nécessite l'association de multiples protéines afin d'assurer son assemblage, sa régulation, et l'action enzymatique sur son substrat (Collins et al., 2006). Plusieurs observations suggèrent l'existence d'autres composants de la télomérase que hTERT et hTR. Les analyses biochimiques de la télomérase humaine par sédimentation en gradient de glycérol et la filtration sur gel montrent qu'elle consiste en un large complexe de 1-2 MD avec des composants connus ne représentant qu'une fraction de cette masse (Schnapp et al., 1998; Xin et al., 2007). L'association de hTERT et hTR est suffisante pour reconstituer *in vitro* l'activité catalytique de la télomérase (Beattie et al., 1998), cependant, la reconstitution de la télomérase est facilitée par la présence des lysats eucaryotes et d'ATP (Weinrich et al., 1997; Holt et al., 1999; Wenz et al., 2001).

- La dyskérine :

L'analyse structurale de la sous unité TR et la caractérisation de la maladie humaine de dyskératose congénitale (DC) ont permis l'identification d'un troisième composant de le télomérase, la protéine dyskérine (Mitchell et al., 1999a, 1999b). C'est une protéine de 514 acides aminés, hautement conservée chez les mammifères, les levures et les bactéries. Elle interagit avec les petits ARN nucléolaires (snoRNA) à travers le motif H/ACA, pour former des particules ribonucléoprotéiques (RNPs), et catalyse la pseudouridylation des ARN et la biogenèse du ribosome (Lafontaine et al., 1998). La dyskérine est codée par le gène DKC1 situé sur le chromosome X, siège de mutations chez des patients atteints par la forme de DC liée au chromosome X. La DC est une maladie héréditaire rare qui se caractérise notamment par des troubles de la pigmentation de la peau, une dystrophie des ongles et une leucoplasie des muqueuses. Chez les patients atteints d'une dyskératose, une mutation de la dyskérine provoque un défaut d'accumulation de hTR, ainsi qu'une baisse de l'activité de la télomérase corrélée à un raccourcissement accéléré de la taille des télomères. Les formes autosomales dominantes de la dyskératose sont liées avec les mutations de TERT et TR (Vulliamy et al., 2001; Armanios et al., 2005). Bien que le dyskérine soit associée avec une télomérase active (Cohen et al., 2007) et soit nécessaire pour l'accumulation de TERC, sa fonction précise au niveau du complexe de la télomérase reste à déterminer (Mitchell et al., 1999b).



Figure (II-3)

Modèles de mécanismes pouvant être responsables du syndrome de DC (D'après Chen et Greider, 2004).

Des travaux récents ont mis en évidence par chromatographie d'affinité et spectrométrie de masse des complexes protéiques associés à hTERT, l'existence d'autres composants du complexe de télomérase, les ATPases pontin et reptin. Ces composants interagissent avec TERT et la dyskérine et sont essentiels pour l'assemblage de l'holoenzyme télomérase.

4. Fonction de la télomérase :

4.1 Elongation des télomères :

L'activité catalytique de la télomérase contribue à l'immortalisation cellulaire par un mécanisme processif, en allongeant l'extrémité 3' terminale des télomères. Des études ont montré que l'élongation des télomères a lieu par hybridation d'un brin d'ADN d'un télomère sur le brin complémentaire d'un autre télomère (Dunham, Neumann et al. 2000; Reddel 2003). Le processus se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, la télomérase se positionne sur un site de reconnaissance de l'extrémité 3' par le biais de sa matrice hTR, qui consiste en une courte séquence au niveau du domaine CR1 (chez l'homme CAAUCCCAAUC) (Feng J., et al., 1995). L'extrémité 3' de l'ADN télomérique forme alors un hybride avec la matrice d'ARN. Une fois associée à l'ADN télomérique, la sous unité catalytique amorce l'ajout des nucléotides par l'intermédiaire de l'ARN matrice qui est rétro-transcrit. Enfin, le complexe est déplacé une fois la synthèse achevée, afin qu'un nouveau cycle d'élongation puisse avoir lieu. Cette étape implique une hélicase PIF1 qui permet la dissociation de l'hybride (Mateyak MK and Zakian., 2006). Les mécanismes de cette dernière étape n'ont été étudiés que chez la levure.

4.2 La protection des télomères :

Indépendamment de son activité d'élongation des télomères, la télomérase protège le télomères d'éventuelles fusions (Blackburn., 2001; Zhu et al., 1999). Les cellules immortelles exprimant de façon ectopique hTERT continuent de proliférer malgré la taille critique des télomères inférieure à celle des cellules sénescentes, ce qui suggère un rôle protecteur des télomères courts par hTERT (Zhu et al., 1999). Dans les fibroblastes humains immortalisés, bien que la télomérase soit active, les télomères les plus longs continuaient de raccourcir pendant que la taille des télomères les plus courts se stabilisait. Ces résultats soutiennent la théorie du rôle protecteur des télomères par la télomérase, et suggèrent aussi que la télomérase agirait préférentiellement sur les télomères les plus courts (Ducray et al., 1999). Plus tard, derSarkissian et al ont pu montrer que la télomérase allonge

préférentiellement les télomères les plus courts afin de limiter les signaux responsables de l'arrêt du cycle cellulaire (derSarkissian et al., 2004).

4.3 <u>Fontion tumorigène :</u>

La surexpression de la télomérase dans les cancers et l'incapacité pour des souris dépourvues de télomérase de développer certaines formes de tumeurs ont permis d'attribuer des propriétés oncogéniques au surdosage de la télomérase. La surexpression de la sous unité TERT, dépourvue d'une activité catalytique, induit la formation de tumeurs dans les lignées ALT. Ces résultats laissent penser que la télomérase contribue à la tumorigénèse indépendamment de sa fonction d'élongation des télomères (Stewart et al., 2002). Chez les souris KO pour la télomérase, en présence de hTR, la surexpression de hTERT provoque une augmentation de la durée de vie des animaux et favorise la croissance des tumeurs (González-Suárez et al., 2005). Cependant, en l'absence de hTR, la surexpression de hTERT rend les animaux plus résistants à la progression tumorale sans altération de la taille des télomères (Cayuela et al., 2005), cet effet est indépendant de l'activité d'élongation des télomères par la télomérase. De plus, la télomérase régule l'expression de gènes contrôlant la croissance et probablement la tumorigénèse (Smith et al., 2003). Il apparaît alors que la télomérase joue un rôle clef dans la tumorigénèse.

4.4 <u>Rôle anti-apoptotique :</u>

Les travaux de Stewart et collaborateurs montrent que la télomérase pourrait contribuer à l'installation d'un phénotype tumoral en inhibant l'apoptose. Il semble de plus que cette protection puisse se faire par un mécanisme indépendant du maintien de la longueur des télomères (Stewart et al., 2002). De même, Folini et collaborateurs ont pu montrer que l'inhibition de hTERT par l'expression d'oligonucléotides antisens induit l'inhibition de l'activité de la télomérase, la baisse de la croissance cellulaire et l'apoptose (Folini et al., 2005). En revanche, ces effets ne sont pas observés en inhibant la sous unité hTR. Cependant, les mécanismes par lesquels la télomérase agit contre l'induction de l'apoptose sont largement discutés. Il se peut que hTERT puisse intervenir en bloquant l'apoptose induite par p53 dans des cellules de lymphomes de Burkitt (Rahman et al., 2005) ou de cancer du sein (Cao et al., 2002). L'expression d'un mutant dominant négatif de hTERT catalytiquement inactif montre le même effet de protection que le hTERT sauvage. Il semblerait donc que ce rôle anti-apoptotique soit indépendant de l'activité catalytique de la télomérase. Toutefois, d'autres travaux montrent que l'activité catalytique de hTERT liée à la protéine 14-3-3 est

indispensable à sa fonction anti-apoptotique (Zhang et al., 2003). De plus, la surexpression de hTERT confère aux cellules leucémiques une forte résistance à l'apoptose induite par les facteurs TNF (tumor necrosis factor) et le ligand TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (Dudognon et al., 2004). Il a été démontré que l'expression de hTERT est suffisante et spécifique pour réduire l'apoptose des cellules épithéliales ovariennes (Bermudez Y et al., 2006). En effet, hTERT réduit l'activation des caspases 3, 8 et 9, ce qui diminue l'expression des protéines pro-apoptotiques mitochondriales t-BID, BAD, et BAX et augmente l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Plus récemment, Wong et collaborateurs ont pu montrer que l'inhibition de hTERT induit l'arrêt de la croissance des cellules tumorales de l'astrocytome pédiatrique, ce qui pourrait constituer une thérapie adjuvante pour ce type de tumeur.

4.5 <u>Réparation de l'ADN :</u>

Plusieurs études ont pu observer que la télomérase permettait de protéger les cellules contre les dommages à l'ADN induits par les rayonnements ionisants (Pirzio et al., 2004 ; Nakamura et al., 2005 ; Serakinci et al., 2007). La télomérase se localise au niveau du télomère et empêche la reconnaissance par les systèmes de réparation des cassures doubles brins (Chan and Blackburn 2002). En effet, il a été démontré que la suppression de la sous unité catalytique de la télomérase abroge l'expression de la réponse cellulaire aux cassures d'ADN double brin. La perte de hTERT n'altère pas à court terme l'intégrité des télomères mais affecte la formation de la chromatine. En effet, l'inhibition de hTERT est à l'origine d'une radiosensibilité accrue due à une diminution de la capacité des cellules à réparer les cassures doubles brins d'ADN, comme le montre la diminution de la phosphorylation de γ -H2AX (Masutomi K et al., 2005). Shin et collaborateurs ont montré aussi que hTERT est impliquée dans la réparation des dommages dus aux UV et dans la voie NHEJ (non homologous endjoining). Cependant, les mécanismes par lesquels hTERT agit sur les voies de réparation de l'ADN ne sont pas encore bien éclaircis.

5. <u>Régulation de la télomérase :</u>

L'activité de la télomérase est restreinte aux tissus embryonnaires et aux cellules à haute capacité proliférative. En revanche, elle est active dans la majorité des cellules cancéreuses. L'activité télomérase fait l'objet d'une régulation complexe à différents niveaux, notamment la transcription, l'épissage alternatif de l'ARNm, la maturation de hTERT et hTR.

5.1 <u>Mécanisme de régulation de hTERT :</u>

5.1.1 <u>Régulation de la transcription du gène hTERT :</u>

Le promoteur du gène hTERT (environ 1100 pb) est situé sur le bras court du chromosome 5 en 5p15.33 (Kilian et al., 1997). La transcription du gène hTERT est soumise au contrôle d'activateurs de transcription et des répresseurs, parmi lesquels on retrouve : c-Myc/Mad, Sp1, le récepteur aux estrogènes, Ets, NF-κB, E2F-1, MZF-2 et WT1. En association avec la protéine Max, l'oncogène c-Myc (myelocytomastosis) se fixe sur une séquence consensus du promoteur de gène de hTERT et exerce un effet d'activateur de la transcription du gène (Wang et al., 1998; Wu et al., 1999). Cependant, la fixation de Mad1 à la place de c-Myc inhibe la transcription de gène (Xu et al., 2001). Sp1 pour (Stimulating Protein 1), coopère avec c-Myc pour activer la transcription de hTERT. Il s'avère qu'une mutation sur le site de fixation de Sp1 rend la transcription de hTERT par c-Myc plus faible (Kyo et al., 2000). De plus, il a été démontré que la surexpression de p53 a un effet répresseur de la transcription du gène hTERT en empêchant la fixation de Sp1 sur le promoteur (Kanaya et al., 2000). Les œstrogènes activent également la télomérase dans les cellules de cancer du sein, soit directement par la fixation du récepteur aux estrogènes sur le promoteur, soit indirectement par l'activation d'autres voies de signalisation (Kyo et al., 1999 ; Wang, Kyo et al. 2002; Kimura, Ohmichi et al., 2004). Contrairement aux œstrogènes, la progestérone module négativement la transcription de hTERT (Wang Z et al., 2000). Par ailleurs, certaines molécules rétinoïdes impliquées dans la différenciation cellulaire sont capables de réprimer l'expression de hTERT (Pendino et al., 2001 ; Pendino et al., 2003). Chez la souris, NFkB se fixe sur un site consensus situé sur le promoteur de hTERT et régule positivement sa transcription (Yin, Hubbard et al. 2000). Chez l'homme, il a été montré que le virus HTLV-1 pouvait induire l'expression de hTERT via NFkB (Sinha-Datta, Horikawa et al. 2004). D'autres répresseurs ont été également identifiés: WT-1 (Wilms Tumor 1) (Oh et al., 1999), la fixation du facteur de transcription E2F-1 sur le promoteur de hTERT induit une réduction de l'activité du promoteur dans les cellules squameuses de carcinome humain (Crowe et al., 2001; Lacerte et al., 2007), AP-1 (Takakura et al., 2005) (même s'il peut aussi jouer un rôle activateur (Alfonso-De Matte et al., 2002) et MZF-2 (Myeloid Zinc Finger 2) qui interagit avec un cluster de quatre sites du promoteur de hTERT et régule négativement son activité (Fujimoto et al., 2000). Les protéines SIP1, un facteur de transcription de TGF-β, et Menin, un suppresseur de tumeur, ont été aussi identifiées comme répresseurs de hTERT (Lin and Elledge, 2003).

5.1.2 <u>L'épissage alternatif de hTERT :</u>

L'activité de la télomérase peut être modulée par l'épissage alternatif de son ARN messager (Ulaner et al., 1998). En effet, quatre insertions et deux délétions peuvent se produire (Wick et al., 1999; Yi et al., 2001). L'insertion 1 (38pb) et la délétion β (182pb) induisent un arrêt prématuré de la traduction donnant une protéine tronquée non fonctionnelle. La délétion α produit une protéine agissant comme un dominant négatif de la télomérase active (Colgin et al., 2000). Les autres insertions semblent aboutir à des protéines non fonctionnelles. Une troisième forme d'épissage alternatif $-\gamma$ a été identifiée dans laquelle un fragment de 189 pb est tronqué, ce variant altère également la région RT en inhibant l'activité catalytique de hTERT (Hisatomi et al., 2003).

5.1.3 <u>Régulation post traductionnelle :</u>

Une fois la traduction du transcrit actif de hTERT accomplie, la protéine obtenue doit subir des étapes de modifications post traductionnelles pour qu'elle soit active. Tout d'abord, hTERT doit être transloquée au noyau en s'associant avec la protéine 14-3-3, ce qui bloque l'export de hTERT vers le cytoplasme (Seimiya et al., 2000). Il semble que le stress oxydatif induit la relocalisation cytoplasmique de hTERT (Haendeler et al., 2003). Ensuite, une étape d'oligomérisation de hTERT sera indispensable pour qu'elle soit active. L'oligomérisation est contrôlée par des protéines chaperonnes Hsp70 qui jouent un rôle dans le repliement de hTERT, Hsp90 et p23 qui sont impliquées dans l'assemblage de hTERT et hTR (Forsythe et al., 2001). La télomérase peut être inhibée en empêchant l'oligomérisation de la protéine (Keppler et al., 2004). La phosphorylation de hTERT par des kinases et des phosphatases pourrait moduler l'activité de la télomérase. Plusieurs études ont montré que les sérine/thréonine kinases de la famille PKCs activent la télomérase (Ku et al., 1997 ; Li et al., 1998 ; Yu et al., 2001). De même, la protéine kinase B (Akt) impliquée dans la voie de la PI3kinase, phosphoryle hTERT et augmente son activité (Kang, Kwon et al. 1999). De façon inverse la protéine phosphatase 2A (PP2A) inhibe l'activité télomérase en déphosphorylant hTERT (Li et al., 1997). Enfin, la tyrosine kinase c-abl, en réponse à des dommages de l'ADN, peut phosphoryler hTERT induisant l'inhibition de la télomérase (Kharbanda et al., 2000).

5.2 Mécanisme de régulation de hTR :

De même que pour hTERT, il a été montré que l'expression de hTR est spécifiquement augmentée dans les tumeurs en comparaison avec les lignées cellulaires et les tissus normales (Feng et al., 1995 ; Soder et al., 1998 ; Atkinson et al., 2005). Le gène humain hTR, présent en une seule copie, est localisé sur le chromosome 3 à la position 3q26.3 (Soder et al., 1997). Cette région est souvent amplifiée dans certains types de tumeurs solides humaines, telles que les cancers du col de l'utérus, des poumons et de certains carcinomes épidermoïdes. Le promoteur de hTR contient une boîte CCAAT à proximité du site d'initiation de la transcription et une boîte TATA, compatible avec la transcription de ce gène par l'ARN polymérase II. La mutation ou la délétion de la boite CCAAT inhibe l'expression du promoteur de hTR, ce qui montre l'importance de cette séquence pour la transcription de hTR (Zhao et al., 2000). Le promoteur contient également 4 sites Sp1 de fonction différente (Zhao et al., 2003). Bien que les deux sites situés en amont de la boîte CCAAT régulent positivement hTR, les 2 sites en aval de la boîte CCAAT semble être répresseurs (**Figure II-4**).



Figure (II-4)Représentation schématique du promoteur du gène hTR
(d'après Zhao et al., 2003).

Le premier site, situé juste après la boîte CCAAT semble être le plus fonctionnel, alors qu'il a la plus faible affinité pour Sp1, et en coordination avec le facteur nucléaire Y (NF-Y), il active la transcription du gène hTR. 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). L'association physique avec MDM2 (mouse double minute 2) inhibe l'activité transcriptionnelle de Sp1 via pRb ou NF-Y (Zhao et al., 2005). L'analyse de la séquence du promoteur hTR montre l'existence d'îlots CpG, ce qui suggère un rôle de la méthylation dans la régulation de l'expression de gène. Cependant, il a été montré que le niveau de méthylation de l'ADN n'est pas corrélé avec le niveau de l'expression de hTR dans les cellules tumorales et normales (Hoare et al., 2001 ; Guilleret et al., 2002), même si une forte corrélation a été

établie entre l'hyperméthylation du promoteur de hTR et la répression de son expression dans 3 lignées ALT. Un certain nombre de protéines, parmi lesquelles nous retrouvons Cbf5p/dyskerin, Nhp2p, Nop10p et Gar1p, est capable de s'associer au motif H/ACA snoRNAs de la sous unité hTR et jouer un rôle dans sa stabilisation. Le raccourcissement progressif des télomères induit des changements épigénétiques des régions télomériques et subtélomériques (Benetti et al., 2007).

III. Maintien des télomères par le mécanisme ALT :

1. <u>Généralités :</u>

En 1993, le groupe de Blackburn a remarqué que certaines cellules de S. cerevisae, présentant une mutation de hTR ou ayant perdu le gène EST1, survivent grâce à leur capacité à restaurer les répétitions télomériques, alors que la plupart des autres cellules meurent après un raccourcissement progressif de leurs télomères (Lundblad et al., 1993). Plus tard, il a été montré que certaines cellules de mammifères peuvent maintenir la taille de leurs télomères après plusieurs divisions, malgré l'absence de l'activité télomérase (Bryan et al., 1995; Rogan et al., 1995). Le maintien de la taille des télomères serait permis par des évènements de recombinaisons homologues ou homeologues entre les télomères mais le mécanisme exact n'est pas encore connu (Dunham et al., 2000). Ce mécanisme, nommé ALT (Alternative Lengthening of Telomere), permet le maintien de la taille des télomères de façon indépendante de la télomérase, en utilisant des échanges homologues non réciproques entre les extrémités de chromosomes (Bryan et al., 1997), il nécessite la présence de protéines impliquées dans la recombinaison homologue ainsi que dans la réparation des cassures d'ADN double-brin (Lundblad et Blackburn, 1993; McEachern et Blackburn, 1996; Le et coll., 1999). Les cellules de phénotype ALT sont dépourvues d'activité télomérase et possèdent des télomères longs (jusqu'à 50kb) dont la distribution de taille est plus hétérogène que dans les cellules télomérase positives. Dans les cellules ALT, un certain niveau d'instabilité chromosomique persiste qui serait dû aux mécanismes intrinsèques mis en jeu (Henson et al., 2002). L'expression de la télomérase dans les cellules immortalisées par les mécanismes ALT n'interfère pas avec les événements de recombinaison et n'empêche pas l'évolution caryotypique (Perrem et al., 2001; Cerone et al., 2001), suggérant que les cassures doublebrins constituent une source de réarrangements génomiques. Il est évident que des protéines impliquées dans la recombinaison homologue et dans la réparation de l'ADN ont un rôle complexe dans la biologie des télomères. Cependant, le mécanisme ALT n'a été détecté que dans les lignées cellulaires tumorales humaines et murines, et dans les lignées humaines immortalisées *in vitro* (Bryan et al., 1995, 1997; Chang et al., 2003; Laud et al., 2005). Il semble que ce mécanisme se produit en réponse à un dysfonctionnement des mécanismes de régulation contrôlant la recombinaison des télomères. Ce type de maintenance est présent dans les 10 à 15 % des cellules cancéreuses humaines et dans certaines cellules immortalisées où la télomérase est absente (Bryan et al., 1995). Parmi eux nous retrouvons des ostéosarcomes, sarcomes des tissus mous, glioblastomes, carcinomes de cellules rénales, carcinomes adénocorticaux, carcinomes à larges cellules de poumon (carcinome épidermoïde) et des carcinomes ovariens. Reddel et collaborateurs ont montré que le phénotype ALT est le plus souvent présent dans les tissus d'origine mésenchymateuse plutôt que les tissus d'origine épithéliale (Reddel et al., 2003). Depuis son identification, le mécanisme ALT est mis en évidence dans plusieurs lignées cellulaires (**Tableau 2**).

Teng et collaborateurs ont décrit deux classes de cellules *Saccharomyces cerevisiae* qui survivent avec les mutations résultant de l'absence de l'activité télomérase. Les survivants de type I ont fait l'objet d'amplification de l'élément Y par un mécanisme qui dépend de gènes, y compris RAD51. En revanche, les télomères des survivants de type II contiennent des séquences télomériques et utilisent un mécanisme qui nécessite le gène de RAD50 (Teng et al., 1999). Bien qu'il existe des différences entre la biologie des télomères de la levure et des cellules humaines, la détection de ces deux classes de survivants chez la levure laisse penser qu'il existe plusieurs types de mécanismes ALT dans les cellules humaines télomérase négatives.

Lignée cellulaire	Type de cellules	Transformation	Références	
GM847	Fibroblast, skin	SV40	(Bryan et al., 1995)	
GM0637(NSV)	Fibroblast, skin	SV 40	(Xia et al., 1996)	
LM217, KB319	Fibroblast, skin	SV 40	(Murnane et al., 1994)	
HSF E-2B	Fibroblast, foreskin	SV40	(Montalto et al., 1999)	
JFCF-6/T.1R	Fibroblast, jejunal	SV40	(Yeager et al., 1999)	
WI38-VA13/2RA	Fibroblast, lung	SV40	(Bryan et al., 1995)	
SW26-I	Fibroblas:jt, lung	SV40	(Henderson et al., 1996)	
SV/HF-5/39	Fibroblast, bone marrow	SV40	(Small et al., 1996)	
KMST-6	Fibroblast, embryo	Gamma irradiation	(Nakabayashi et al., 1997)	
OUMS-24F	Fibroblast, embryo	Chemical	(Sugihara et al., 1996)	
SUSM-1	Fibroblast, liver	Chemical	(Bryan et al., 1995)	
AT1BR44 neo	Fibroblast, skin; ATa	SV40	(Sprung et al., 1997)	
AT13LA(SV)	Fibroblast, skin; AT	SV40	(Sprung et al., 1997)	
AT18LA(SV)	Fibroblast, skin; AT	SV40	(Sprung et al., 1997)	
IIICF/a2,/b4,/b5,/c, .2/A1	Fibroblast, breast; LFSb	Spontaneous	(Bryan et al., 1995)	
IIICF-T series	Fibroblast, breast; LFS	SV40	(Bryan et al., 1995)	
IIICF-E series	Fibroblast, breast; LFS	HPV E6 +/7 E7	(Bryan et al., 1995)	
HMS50-E7	Fibroblast, breast; LFS	HPV E7	(Shay et al., 1995)	
MDAH087 series	Fibroblast, skin; LFS	Spontaneous	(Gollahon et al., 1998)	
LCS-AF.1-2, .1-3, .3-1	Fibroblast, skin; LFS	Aflatoxin B1	(Gollahon et al., 1998)	
LCS-4X2	Fibroblast, skin; LFS	X-Irradiation	(Gollahon et al., 1998)	
MeT-4A	Mesothelial	SV40	(Bryan et al., 1995)	
Saos-2	Osteosarcoma	Tumor	(Bryan et al., 1997a)	
G-292	Osteosarcoma	Tumor	(Bryan et al., 1997a)	
U-2 OS	Osteosarcoma	Tumor	(Bryan et al., 1997a)	
ZK-58	Osteosarcoma	Tumor	(Scheel et al., 2001)	
SK-LU-1	Adenocarcinoma, lung	Tumor	(Bryan et al., 1997a)	
BET-3M	Epithelial, bronchial	SV40	(Bryan et al., 1995)	
HIO107, 117 and 118	Epithelial, ovarian surface	SV40	(Grobelny et al., 2000)	

Tableau (2)

Exemples de cellules ALT.

2. Les télomères des lignées ALT :

Le mécanisme ALT a été mis en évidence dans les cellules humaines lorsque Bryan a montré que certaines lignées cellulaires maintiennent la taille des télomères en l'absence d'activité télomérase (Bryan et al., 1995). Ce mécanisme est associé avec des caractéristiques phénotypiques permettant aux cellules d'être identifiées comme une lignée ALT positive, sans avoir à les cultiver pendant plusieurs cycles de divisions. Le premier marqueur du mécanisme ALT dans les cellules humaines est la présence d'un ADN télomérique très long et de taille très hétérogène au sein de la même cellule (**Figure III-1**) (Bryan et al., 1995; Henson et al., 2002). L'analyse des télomères des lignées ALT par la technique FISH montre que leur taille varie entre 2 kb et 50 kb, et plusieurs terminaisons chromosomiques sont dépourvues d'un signal détectable (Henson et al., 2002).



Figure (III-1)

Analyse par CO-FISH d'une lignée ALT qui révèle de multiples échanges au niveau télomérique (sonde G en vert, sonde C en rouge, signal jaune : colocalisation).

La dynamique de la longueur des télomères des lignées ALT est très complexe, fluctuant entre des évènements rapides d'élongation et de délétion (Murnane et al., 1994). Il semble que les événements de délétions génèrent de l'ADN télomérique extrachromosomique. En effet, il a été détecté, dans les cellules ALT, la présence d'une partie importante de l'ADN télomérique extrachromosomique linéaire (de 0,7 à 57 kb) (Tokutake et al., 1998; Ogino et al., 1998), mais aussi circulaire (de 0.5 à 70 kb), de la taille de la t-loop, appelé t-circles (cercles télomériques) et dont l'abondance est caractéristique des lignées ALT (Cesare and Griffith, Wang et al., 2004; 2004; Fasching et al., 2007). La formation de ces cercles

télomériques est dépendante des protéines impliquées dans la recombinaison homologues NBS1 et XRCC3, suggérant que ces cercles seraient générées par la recombinaison de la t-loop (Compton et al., 2007).



Figure (III-2)

Modèles alternatifs d'allongement des télomères.

a) Par recombinaison homologue inter-télomérique, b) par synthèse sur la t-loop, et c) par synthèse sur les cercles télomériques (d'après De lange., 2004).

3. Facteurs protéiques liés au phénotype ALT :

3.1 Les corps nucléaires de PML :

PML est une phosphoprotéine appartenant à la famille RBCC, localisée distinctement dans des structures subnucléaires nommées les corps nucléaires de PML (PML-NBs, pour PML-nuclear bodies) dont le gène *PML* est essentiel pour leur formation (Ishov et al., 1999; Salomoni et al., 2002). Le gène *PML* a été découvert dans la leucémie aiguë promyélocytaire associée à la translocation t (15;17), il est localisé sur le chromosome 15q22 et code pour une protéine nucléaire localisée soit de façon diffuse dans le nucléoplasme, soit sur les corps nucléaires (Negorev and Maul., 2001).

Les PML-NBs sont des foyers nucléaires discrets de 0.2–1 μ m de largeur, présents dans la plupart des noyaux des cellules mammifères, le nombre de foyers varie de 1 à 30 en fonction du type de cellule, de phase du cycle cellulaire et du stade de la différenciation (Dellaire et al., 2004). Des données récentes indiquent que, même si elles semblent être uniformes, les PML-NBS sont des structures dynamiques hétérogènes sur le plan structural et fonctionnel. Dans les cellules leucémiques promyélocytiques, PML, qui correspond à un coactivateur de p53, forme une protéine de fusion avec le récepteur de l'acide rétinoïque α (RAR α) et induit une résistance à l'apoptose en dérégulant les voies induites par PML (Son S. H., et al., 2005; Bernardi R., et al., 2003). La protéine PML régule les fonctions de p53 à deux niveaux: (i) elle induit l'accumulation de p53 dans la PML-NBS, causant ainsi son l'acétylation et son activation transcriptionnelle (Pearson et al., 2000), et (ii) elle séquestre MDM2 au nucléole,

par conséquent, elle inhibe indirectement l'ubiquitynation et la dégradation de p53 (Bernardi et al., 2004). La protéine PML est aussi une cible transcriptionnelle de p53, ajoutant un certain degré de complexité de l'ensemble de l'image (de Stanchina et al., 2004). Plusieurs études indiquent que p53 peut s'associer avec PML dans le PML-NB, mais on ne sait pas si la localisation de p53 dans les PML-NBs est nécessaire pour son activation.

De nombreuses protéines résident dans les PML-NBs, mais le plus souvent de façon transitoire. Sp100, une protéine de 100 kDa, est le principal composant des PML-NBs. Elle a été initialement identifiée comme un antigène qui réagit avec des auto-anticorps de patients atteints de cirrhose biliaire primitive, formant des taches nucléaires d'où son nom Sp100 (speckle protein of 100 kDa) (Szostecki et al., 1990). Comme les PMLs, Sp100 est un composant dynamique des PML-NBs (Wiesmeijer et al., 2002). Elle est retrouvée également dans les foyers nucléaires qui ne contiennent pas les PML. La région de Sp100 responsable de sa localisation dans les PML-NBs est située sur son extrémité N-terminale (Sternsdorf et al., 1999). Sp100 est suspectée d'avoir une activité modulatrice de la transcription via son association avec les facteurs HIPK2, HP1, et Ets-1 (Lehming et al., 1998; Sternsdorf et al., 1999; Wiesmeijer et al., 2002; Moller et al., 2003). Il a été montré que Sp100 est associée aussi avec la protéine de recombinaison et de réparation de l'ADN NBS1 (Grobelny et al., 2001). Les PML-NBS sont impliqués dans la régulation de diverses fonctions cellulaires, telles que l'induction de l'apoptose et la sénescence cellulaire, l'inhibition de la prolifération, le maintien de la stabilité génomique et la réponse antivirale. Bien que les rôles physiologiques des PML et des PML-NBS ne soient pas encore bien élucidés, il est admis qu'ils sont impliqués dans la suppression tumorale (Salomoni et al., 2004 ; Trotman et al., 2006; Bernardi et al., 2006). En effet, les PML-NBS et leurs fonctions sont souvent perdus dans les leucémies et les tumeurs solides.

Un lien étroit a été établi entre les PML-NBs et le compartiment chromatinien qui les entoure (Eskiw et al., 2004) et qui est nécessaire pour l'intégrité et la stabilité des PML-NBs dans le noyau. Les conditions perturbant la condensation de la chromatine, telles que le stress, la répression transcriptionnelle ou les évènements d'apoptose, induisent la perte de l'interaction entre PML-NBs et la chromatine, et l'instabilité des PML-NBs (Eskiw et al., 2004 ; Ching et al., 2005).

3.2 <u>Les APBs :</u>

Les cellules ALT possèdent des structures nucléaires uniques, appelées <u>A</u>LT-associated <u>Promyelocytic Leukemia (PML)</u> <u>B</u>odies (APBs). Ces structures sont définies par la présence de la protéine PML (promyelocytic leukemia protein) et de l'ADN télomérique associés aux protéines du shelterin TRF1, TRF2, TIN2 et Rap1 (Yeager et al., 1999). Les APBs contiennent également des protéines impliquées dans la recombinaison et la réparation incluant, BLM (Yankiwski et al., 2000), BRCA1, hRAP1 (Wu et al., 2003), MRE11, NBS1, RAD50 (Zhu et al., 2000; Wu et al., 2000), RAD51, RAD52, RPA (replication protein A) (Yeager et al., 1999), RAD51D (Tarsounas et al., 2004), WRN (Johnson et al., 2001), ERCC1, XPF (Zhu et al., 2003), hRAD1, hRAD9, hRAD17, et hHUS1 (Nabetani., 2004). Les protéines essentielles pour la formation des APBs ont été identifiées par interférence ARN (Jiang et al., 2007). Ces structures sont spécifiques des lignées ALT et n'ont jamais été détectées dans les lignées télomérase positives (Yeager et al., 1999). Elles sont présentes de façon inégale pendant le cycle cellulaire avec un taux relativement élevé en G2/M (Yeager et al., 1999; Grobelny et al., 2000; Grobelny et al., 2001), durant cette phase les recombinaisons homologues sont plus actives et l'activité ALT se produit vraisemblablement. En outre, les APBs ne sont présents que dans 5 à 10% des cellules ALT en division asynchrone (Yeager et al., 1999; Wu et al., 2003). Il semble que les APBs sont utilisés comme des compartiments de stockage des protéines et de l'ADN télomérique et jouent un rôle directe dans le mécanisme ALT (Yeager et al., 1999 ; Grobelny et al., 2000 ; Wu et al., 2003). Molenaar et al ont pu visualiser, par imagerie, le déplacement d'une sous-fraction des télomères dans et/ou en dehors des APBs, suggérant que la structure des télomères n'est pas stable dans les ALTs, mais dynamique (Molenaar et al., 2003). La quantification des APBs pat immunohistochimie permet la caractérisation du phénotype ALT dans les tumeurs. Cette analyse montre qu'une proportion importante des ostéosarcomes et des astrocytomes utilise le mécanisme ALT. De plus, le nombre d'APBs est fortement corrélé avec la survie des patients atteints d'astrocytome (Jeremy et al., 2005). Cependant, le mécanisme ALT n'est pas toujours associé à la présence d'APBs. En effet, des travaux utilisant une lignée de cellules atypiques (AG11395) montrent qu'elle est dépourvue d'APBs détectables alors qu'elle présente les caractéristiques typiques du mécanisme ALT, telles que la recombinaison des télomères et l'absence de l'activité télomérase (Fasching et al., 2005 ; Marciniak et al., 2005). Une autre étude montre qu'une lignée cellulaire humaine immortalisée dérivant d'une lignée ALT maintient la longueur de leurs télomères en l'absence de caractéristiques essentielles du mécanisme ALT et de la télomérase (Cerone et al., 2005). Toutes ces données suggèrent que le phénotype ALT peut réunir plus d'un mécanisme moléculaire coexistant avec l'activité télomérase. Les études mentionnées ci-dessus mettent en évidence la nécessité d'identifier de nouveaux marqueurs du mécanisme ALT pour réévaluer l'importance de ces mécanismes dans les tumeurs.

Comme nous l'avons précédemment décrit, les télomères contiennent un nombre de protéines spécifiques impliquées dans les fonctions des télomères, tels que TRF1, TRF2, TIN2, et RAP1, aussi bien que les protéines qui jouent un rôle dans la synthèse et la recombinaison de l'ADN. Une étude récente qui a utilisé l'ARN interférence en combinaison avec une restriction en méthionine a pu montrer que huit protéines sont nécessaires pour la formation des APBs (Wu et al., 2000). En effet, la délétion de PML, des protéines télomériques TRF1, TRF2, TIN2 et RAP1 et des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, MRE11, RAD50 et NBS1, bloque la formation des APBs. Ces résultats laissent penser sans le démontrer formellement qu'en raison de leur rôle dans la formation des APBs, ces protéines sont nécessaires pour le mécanisme ALT. Ces travaux ont établi pour la première fois un lien entre les protéines télomériques et le mécanisme ALT.

3.3 <u>RAD51 :</u>

D'autres protéines impliquées dans la recombinaison et la réplication sont également retrouvées au niveau des APBs. Parmi ces protéines nous citons la protéine eucaryote RAD51, équivalente de la protéine bactérienne RecA (Stavropoulos et al., 2002). RAD51 est nécessaire pour la recombinaison durant la mitose et la méiose et également pour la réparation des cassures double-brins par recombinaison homologue. RAD51 entoure l'ADN monocaténaire afin de former un filament nucléoprotéique qui envahit et s'apparie à sa région homologue dans le duplexe d'ADN, et qui active par la suite l'échange des brins afin de générer un crossing-over entre les brins juxtaposés. L'activité de RAD51 est augmentée en présence de la protéine de réplication A (RPA), de Rad52 et de l'hétérodimère RAD55/RAD57 (Yeager et al., 1999).

3.4 <u>Le complexe MIRN :</u>

RAD51 est également associée aux protéines RAD50 et MRE11 du complexe MRN qui joue un rôle central dans la réparation des cassures double-brins via les recombinaisons homologues. Le complexe MRN est formé de deux protéines très conservées Mre11 et RAD50 et une protéine moins conservée Nbs1/Xrs2 (D'Amours et al.,2002). Les trois protéines sont capables de fixer l'ADN télomérique (Zhu et al., 2000 ; Lombard et al., 2000 ; Nakamura et al., 2002 ; Takata et al., 2005). Deux molécules Mre11 et une molécule Nbs1 interagissent avec le dimère RAD51, formant un complexe capable de s'attacher aux extrémités chromosomiques. Il a été démontré, dans les cellules de mammifères, l'association de Mre11 et RAD51 avec TRF2 (Zhu et al., 2000). O'Connor et collaborateurs ont montré également que dans les cellules humaines le complexe MRN interagit avec le shelterin via hRAP1 (O'Connor et al., 2004). Le complexe MRN est également impliqué dans le maintien de la longueur des télomères dans les cellules de mammifères. Dans les fibroblastes issus de patients Nbs1, la longueur des télomères baisse de 25% (Ranganathan et al., 2001). Dans ces cellules, l'expression de hTERT ou de Nbs1 n'induit pas l'allongement des télomères raccourcis. Cependant, lorsque hTERT et Nbs1 sont exprimés simultanément, la longueur des télomères est sensiblement augmentée et la capacité de prolifération est restaurée. Il semble alors que le complexe MRN coopère avec la télomérase pour le maintien de la longueur des télomères.

Le complexe MRN est également impliqué dans le maintien des télomères en l'absence de la télomérase dans les cellules de mammifères et la levure (Muntoni et al., 2005). Nbs1 et TRF1 colocalisent dans les APBs des lignées ALT (Wu et al., 2000 ; Zhu et al., 2000). L'interaction physique entre l'extrémité C-terminale de Nbs1 et TRF1 a été observée durant la fin de la phase S et la phase G2 (Wu et al., 2000). De plus, la délétion de Nbs1 inhibe la formation des PML-NBs et, par conséquent, empêche l'activation du mécanisme ALT (Jiang et al., 2005). Récemment, Jiang avait montré que la surexpression de Sp100 induit la formation des agrégats dépourvus des protéines PML et par conséquent, l'inhibition de la formation des APBs. Le complexe MRN est séquestré dans ces agrégats induisant la répression du mécanisme ALT. Cette répression se manifeste par un raccourcissement progressif des télomères (Jiang et al., 2005 ; Jiang et al., 2007).

3.5 Le complexe SMC5/6 :

Potts et Yu ont observé que l'apparition spontanée de foyers nucléaires contenant le complexe SMC 5/6 (Structure Maintenance of Telomere) est une caractéristique commune des cellules ALT (Potts and Yu, 2005). Le complexe SMC5/6 contient un hétérodimère SMC5–SMC6 et au moins 6 protéines non SMC, parmi lesquelles nous retrouvons une ubiquitine dotée d'activité (SUMO) ligase, nommée MMS21. Il a déjà été montré que ce complexe est recruté au niveau des cassures double-brins et qu'il recrute, à son tour, la cohésine (Potts et al., 2006). Cette dernière est impliquée dans les recombinaisons homologues des chromatides sœurs (Strom et al., 2004). Potts et Yu ont montré aussi que le complexe SMC 5/6 est présent dans les APBs des cellules ALT. La réduction de l'abondance du complexe par l'interférence ARN cause une diminution substantielle des échanges entre chromatides sœurs et la formation des

APBs. La délétion de MMS21 ou SMC5 dans les cellules ALT mais pas celle des cellules télomérase positives, induit le raccourcissement progressif et le dysfonctionnement des télomères, ainsi que l'augmentation de la proportion des cellules en sénescence. Les auteurs ont montré aussi que l'activité SUMO de MMS21 est nécessaire pour la formation des APBs. Cette protéine stimule la SUMOylation de quatre protéines télomériques du complexe shelterin TRF1, TRF2, TIN2 et Rap1. L'inhibition de la SUMOylation de TRF1 ou TRF2 empêche la formation des APBs. Ces résultats ont amené les auteurs à émettre la suggestion que le complexe SMC5/6 facilite la recombinaison homologue et l'allongement des télomères dans les cellules ALT en modifiant des protéines télomériques nécessaires à la formation des APBs.



Figure (III-3) Implication des complexes MRN et SMC5/6 dans la formation des APBs (Reddel., 2007).

La formation des APBs nécessite les protéines du complexe shelterin TRF1, TRF2, RAP1 et TIN2, et le complexe de recombinaison MRN. MMS21, un composant du complexe SMC5/6 catalyse la SUMOylation de TRF1, TRF2, RAP1 et TIN2 pour intégrer ces protéines à l'ADN télomérique au niveau des extrémités chromosomiques ou extrachromosomiques.

3.6 <u>BLM et WRN :</u>

Les protéines WRN et BLM sont des hélicases de la famille RecQ. BLM présente une activité 3'-5' ADN hélicase dépendante de l'ATP. L'activité de WRN est couplée à une activité exonucléase. Ces hélicases sont également impliquées dans la réplication de l'ADN et dans le

maintien de la taille des télomères (Bachrati., 2003 ; Khakhar et al., 2003). BLM est associée transitoirement avec la protéine de recombinaison RPA et les PML (Sanz et al., 2000). La protéine P53 facilite l'accumulation des BLM dans les PML-NBs alors qu'elle inhibe l'activité exonucléase de WRN.

L'interaction de P53 avec RPA réprime les recombinaisons homologues en séquestrant RPA dans les sites de recombinaison (Romanova and al., 2004). L'expression de BLM et sa localisation dans les structures PML-NBs sont fortement régulées au cours du cycle cellulaire, avec un pic d'expression en S/G2.

En S/G2, les protéines RAD51 et RPA sont associées à BLM dans les PML-NBs. Bischof et ses collaborateurs suggèrent que BLM pourrait intervenir dans les mécanismes de réparation de la recombinaison en G2 suite à des dommages à l'ADN et que PML jouerait un rôle dans l'organisation de BLM et RAD51 au niveau des sites de réparation (Bischof O., et al., 2001). L'interaction de BLM avec les protéines télomériques TRF1 et TRF2 a été mise en évidence dans les cellules ALT (Yankiwiski et al., 2000 ; Stavropoulos et al., 2002). Ainsi, il a été démontré que la surexpression transitoire de BLM augmente la synthèse de l'ADN télomérique exclusivement dans les lignées humaines ALT (Stavropoulos et al., 2002). Ces données montrent clairement que BLM est requise pour la mise en place du mécanisme ALT.

3.7 <u>Autres protéines :</u>

Déjardin et Kingston ont décrit un protocol appelé **PICh** (proteomics of isolated chromatin segments) utilisant des sondes spécifiques d'acides nucléiques pour isoler l'ADN génomique avec ses protéines associées, ce qui permet l'identification et la purification des protéines associées à l'ADN. La purification de la chromatine télomérique humaine par la technique de PICh a permis l'identification de la majorité des facteurs télomériques connus et la découverte d'un grand nombre de nouvelles associations. De plus, les auteurs ont comparé la présence des protéines associées aux télomères dans les cellules ALT (lignée WI38-VA13) et les cellules télomérase positives (lignée HeLa). Les différentes protéines liées aux télomères des deux lignées sont indiquées dans **le tableau 3** (Déjardin and Kingston., 2009).

WI38-VA13	HeLa	WI38-VA13 et HeLa	Facteurs non retrouvés
PML Rad9 Rad1 Hus1 MMS21 SMC6 TOPO 3a BLM	Gar1 NHP2 NAT10	TRF1, TRF2, RAP1, POT1, TIN2, TPP1, OBFC1, Apollo, MRE11, Rad50, NBS1, DNA- PKc, Ku70, Ku86, Fen-1, RPA, CDK1, HP1a, HP1b, HP1g, PARP1, SP100 (ALT	SMC5 (ALT) SIRT6 Tankyrase 1 WRN Rad51D TERT DKC

Tableau (3)

Protéines associées aux télomères identifiées par la technique de PICh (Déjardin and Kingston., 2009).

4. <u>Répresseurs du mécanisme ALT :</u>

Plusieurs candidats ont été proposés comme des répresseurs du mécanisme ALT. Shigeeda et ses collaborateurs ont étudié in vitro la perte d'hétérozygotie (LOH) dans des lignées de cellules humaines immortalisées télomérase positives et ALT. Une perte d'hétérozygotie, détectée sur une région du chromosome 8 est observée avec une fréquence plus élevée dans les lignées ALT (Shigeeda et al., 2003). Les travaux de l'équipe ont montré également que le gène de WRN est proche du loci perdu dans les cellules ALT. Les cellules de patients atteints du syndrome de Werner (WS) présentent une instabilité chromosomique importante. En effet, l'inhibition de WRN stimule les échanges des chromatides sœurs dans des régions télomériques, suggérant que WRN soit un répresseur du mécanisme ALT (Laud et al., 2005). Il a été montré que l'inhibition des gènes du complexe MMR (MisMatch Repair) et de la télomérase génère un phénotype similaire au mécanisme ALT laissant proposer un rôle répresseur du mécanisme ALT par le système MMR (Bechter et al., 2004b). Il semble que P53 soit aussi un potentiel répresseur du mécanisme ALT. En effet, l'immortalisation de lignées cellulaires ALT est associée avec la perte de l'expression du type sauvage de P53 (Rogan et al., 1995) ou suite à l'expression d'un allèle mutant de P53 (Opitz et al., 2001). De plus, Razak et collaborateurs ont proposé que la réintroduction de P53 entraîne une inhibition de la croissance des cellules ALT en perturbant les recombinaisons des télomères (Razak et al., 2004).

5. <u>Recombinaison des télomères par le mécanisme ALT :</u>

Les recombinaisons entre les télomères sont normalement des événements rares dans les cellules. Les cellules ALT présentent des niveaux élevés de trois formes distinctes de recombinaisons des télomères par rapport aux cellules non-ALT.

5.1 <u>Recombinaison inter-chromosomique :</u>

L'élongation des télomères par recombinaison a été mise en évidence dans les cellules GM847 de phénotype ALT, par insertion d'un tag dans des répétitions télomériques (Dunham et al., 2000). Lorsqu'il est inséré dans les séquences télomériques, le tag est copié d'un télomère à un autre, le nombre de copie est augmenté en fonction du doublement de population. Après 63 doublements, le tag est retrouvé dans au moins 5 télomères. Ceci a amené les auteurs à conclure que le mécanisme ALT se produit par le biais de la recombinaison homologue. En outre, lorsque le tag est inséré dans un emplacement subtélomérique, aucune duplication n'a été observée dans les cellules GM847. Le transfert du même chromosome marqué dans une lignée télomérase positive n'induit pas sa duplication. Il a donc été retenu que la réplication d'ADN télomérique dépendante de la recombinaison homologue se produit uniquement dans les lignées ALT (Dunham et al., 2000). L'analyse quantitative post réplicative, par la technique de CO-FISH, montre une augmentation significative du nombre des échanges entre les télomères dans les lignées ALT comparativement aux lignées télomérase positives (Londono-Vallejo et al., 2004; Bechter et al., 2004b). Un modèle de recombinaison des télomères a été proposé; le simple-brin court de l'extrémité 3' envahit un autre brin télomérique et s'hybride sur le brin complémentaire, il l'utilise comme une matrice pour la synthèse de nouvelles répétitions télomériques, ces dernières peuvent se convertir en une région double-brin (Figure III-4-B).



Figure (III-4)Les trois formes de la recombinaison des télomères chez les
cellules ALT.

Les cellules ALT présentent trois formes de recombinaisons télomériques : (A) les échanges entre chromatides sœurs: (i) la ligne rouge représente la séquence T2AG3, et la ligne bleu C3TA2; (ii) après réplication semi-conservative de l'ADN (la ligne pointillée représente le nouveau ADN synthétisé); (iii) la recombinaison homologue entre les télomères peut induire (iv) des échanges télomériques post-réplicatifs. Les échanges post-réplicatifs peuvent également se produire entre les télomères non sœurs ou avec les répétitions d'ADN extrachromsomique télomérique. (B) L'élongation des télomères par recombination homologue dans les cellules ALT requière (ii) l'envahissement d'un brin télomérique par le simple-brin de l'extrémité 3' du télomère adjacent, suivie par l'extension du brin envahi par la DNA polymérase (ligne rouge pointillée). (iii) le brin C est ensuite hybridé (ligne bleu pointillée), (iv) entraînant l'élongation du télomère. (C) la résolution de la jonction t-loop: (i) La résolution des jonctions de la t-loop induit la formation de t-cercle et de télomères tronqués (d'après Cesare and Reddel., 2007).

5.2 <u>Recombinaison t-loop, cercle télomérique et ECTR :</u>

Dans les cellules ALT, le maintien de la taille des télomères pourrait être effectué indirectement grâce aux structures en boucles appelées t-loop. La protéine télomérique TRF2

est essentielle pour la formation de la t-loop. L'équipe de De lange a mis en évidence le rôle de la recombinaison homologue dans le mécanisme ALT. En effet, l'expression d'un dominant négatif de TRF2 dépourvu de son domaine basique (TRF2^{ΔB}) dans les tissus de mammifères, induit la délétion de la t-loop et l'attrition rapide des télomères (Wang et al., 2004). Ces délétions sont dépendantes de la protéine XRCC3, impliquée dans la résolution des jonctions de Holliday. Ces résultats suggèrent que TRF2 est nécessaire pour la formation de la t-loop et devrait réprimer la recombinaison homologue au niveau des télomères. L'absence d'un domaine basique fonctionnel de TRF2 provoque la résolution incorrecte de la jonction de la t-loop par recombinaison homologue, un raccourcissement du télomère et la génération des segments d'ADN linéaire (ECTR) ou circulaire (rolling circle). Ces structures peuvent être utilisées comme amorce pour d'autres télomères via des mécanismes similaires à ceux présents chez *K. lactis* en utilisant de l'ADN circulaire (Cesare et al., 2004).

La formation de l'ADN circulaire a été également observée chez la souris après délétion de l'isoforme POT1A (Wu et al., 2006). La corrélation de taille entre la portion circulaire de la tloop et l'ADN circulaire généré par recombinaison homologue suggère que les deux structures dérivent de la même source et qu'elles correspondent à une résolution de la jonction (Cesare and Griffith, 2004). Récemment, Compton et al ont montré que, dans les cellules ALT, les deux protéines XRCC3 et NBS1, impliquées dans la résolution des jonctions de Holliday, sont nécessaires pour la formation des t-cercles extrachromosomiques, et que leurs délétion par RNAi, ou bien l'inhibition de NBS1 via la surexpression de SP100, induit la perte des t-cercles (Compton et al., 2007). Cependant, la perte des t-cercles n'altère ni la prolifération cellulaire ni la taille des télomères, ce qui suggère que ces structures ne sont pas nécessaires pour le maintien du mécanisme ALT.

5.3 Les échanges entre chromatides sœurs :

Les échanges de chromatides sœurs résultent de la réparation des cassures générées lors de la réplication, par échange de brins entre les chromatides sœurs. Les cellules ALT subissent des échanges télomériques post réplicatifs appelés T-SCEs (Telomere Sister Chromatid Exchanges) avec une fréquence relativement élevée en comparaison avec les cellules télomérase positives mais sans augmentation du taux des SCEs au niveau des sites chromosomiques interstitiels. Ce type d'échange a été visualisé grâce à la technique de CO-FISH utilisée habituellement pour déterminer l'orientation des chromosomes (Bechter et al., 2003 ; Londono-Vallejo et al., 2004). Un nouveau modèle du mécanisme ALT a été présenté dans lequel les échanges télomériques, s'ils sont inégaux et se produisent à une fréquence

suffisamment élevée, permettent aux cellules d'allonger leurs télomères et de se multiplier indéfiniment. En effet, l'échange entre deux cellules proches de la sénescence conduit l'une de ces cellules à entrer en sénescence alors que l'autre cellule va présenter des télomères plus longs et va pouvoir survivre (Bailey et al., 2004). L'inégalité des T-SCE pourrait être responsable des événements rapides d'allongement et de raccourcissement des télomères observés dans les cellules ALT.

6. Coexistence de la télomérase et ALT :

Contrairement à la télomérase, présente à de faibles niveaux ou absente dans la majorité des cellules somatiques humaines normales, le mécanisme ALT n'a jamais été observé dans les cellules normales (Kim et al., 1994 ; Bacchetti et al., 1995). Lorsque la lignée ALT GM847 est fusionnée avec des lignées de fibroblastes primaires ou avec des cellules télomérase positives, le mécanisme ALT est réprimé (Perrem et al., 1999). Ces observations indiquent que le mécanisme ALT résulte de la perte d'une fonction normale (Cesare et al., 2007). Une seule étude a montré l'activation du mécanisme ALT en inhibant la télomérase. En effet, dans une lignée cellulaire de cancer de colon, après inhibition de la télomérase, un seul clone échappe à la crise en activant un mécanisme ALT atypique qui ne présente pas d'APBs (Bechter et al., 2004). Ces travaux suggèrent que le recours au mécanisme ALT résulte d'une perte de fonction due à des mutations récessives et constitue un mécanisme d'échappement à la thérapie anti-télomérase. Ainsi, l'élucidation de détails moléculaires de la voie ALT est critique pour cibler ces tumeurs, aussi bien que les tumeurs ALT positives découlant des tissus mésenchymateux. In vitro, l'induction d'une activité télomérase dans des cellules qui maintenaient leurs télomères grâce à un mécanisme ALT a montré que les cellules étaient capables d'utiliser les deux mécanismes en même temps afin d'assurer le maintien de la taille des télomères (Cerone et al., 2001). La coexistence des deux mécanismes pourrait donc avoir des conséquences dans le cadre de thérapies anti cancéreuses ciblant la télomérase.

IV. <u>G-quartets et G-quadruplexes :</u>

1. <u>Définition et structures :</u>

Les structures secondaires de guanosines monophosphates ont été mises en évidence dès le début des années 1960, lorsque Gellert et ses collègues ont remarqué que de fortes concentrations d'acide guanylique, mises en solution dans l'eau, forment un agrégat gélatineux (Gellert et al., 1962). L'unité constitutive élémentaire de l'ADN quadruplexe est le

quartet ou tétrade de guanines (G-quartet). Les G-quartets comprennent quatre guanines reliées dans un plan cyclique par un réseau de huit liaisons hydrogène de type Watson-Crick (N(1)H et N(2)H) et Hoogsteen (N(7) et (O)6) (**Figure IV-1**). Dans des conditions de pH neutre ou faiblement basique, les associations entre guanines induisent la formation d'agrégats ordonnés et solubles de 5'-GMPa. La formation de ces agrégats est favorisée par des cations alcalins comme Na⁺, K⁺ et Rb⁺ (Pinnavaia et al., 1978). La stabilisation de ces structures est fortement dépendante de la nature du cation central selon l'ordre suivant: K^+ >NH₄>Rb⁺>Na⁺>Li⁺=Cs⁺ (Wong and Wu., 2003). En l'absence de cations, les G-quadruplexes ne peuvent se former. Les G-quadruplexes 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). L'engagement du N7 de la guanine protège le site des modifications chimiques telles que la méthylation par le dimethyl sulfate (Vilias et al., 2000). Cette propriété unique rend la distinction des structures G-quadruplexes des simple-brins ou des duplexes d'ADN possible par footprinting DMS. Les G-quadruplexes se différencient par la stoichiométrie de leurs brins et l'arrangement de leurs boucles.

Un G-quartet et un exemple d'une structure en G-quadruplexe parallèle sont représentés sur **la figure IV-1**. La structure G-quadruplexe plane délimite en son centre une zone chargée électronégativement par les liaisons carboxyles et permet ainsi le recrutement de cations.



Figure (IV-1) Structure d'un G-quartet et un exemple de la formation d'un Gquadruplexe dans le promoteur de C-myc (d'après Qin and Hurley., 2008).

La formation de structures secondaires à partir d'oligonucléotides contenant 3 déoxyguanosines est mise en évidence au début des années 1960 (Ralph et al., 1962), alors que la formation de structures à quatre brins n'a été démontrée qu'en 1975 par diffraction aux rayons X sur une fibre de poly(dG) (Sasisekharan et al., 1975 ; Zimmerman et al., 1975). Le

G-quadruplexe peut être formé à partir de fragments d'ADN ou d'ARN présentant au moins deux guanines successives. La structure peut faire intervenir un ou plusieurs brins d'acides nucléiques qui s'associent de différentes façons selon le nombre de guanines consécutives qu'ils comportent et l'enchaînement des répétitions de guanines. On distingue alors plusieurs types de structures quadruplexes : intermoléculaires (tétra- ou bimoléculaires) et intramoléculaires (**Figure IV-2**). Les structures bimoléculaires et intramoléculaires sont caractérisées par la présence de boucles (formées par les nucléotides situés entre des blocs de guanines successives) pouvant présenter plusieurs conformations : latérales, diagonales, en forme de V ('V-shaped') ou en forme de N.



Figure (IV-2) A)- Structures G-quadruplexe et molécularité : G-quadruplexes tétramoléculaire, bimoléculaire et intramoléculaires,

B)-: boucles de G-quadruplexes (pour revue Anh Tuân Phan et al., 2006).

2. <u>Formation des G-quadruplexes :</u>

Les structures G-quadruplexes ne se forment qu'en présence de cations, le potassium et le sodium lient et stabilisent plusieurs structures en G-quadruplexe (Sen et al., 1990). Généralement, le potassium induit la plus grande stabilité des G-quadruplexes en raison de sa bonne coordination avec les huit atomes d'oxygène carbonyl présents sur les plans de tétrades adjacents (Sen et al., 1990; Xu et al., 1993; Hud et al., 1996). Cependant, un même oligomère d'ADN peut former différentes structures G-quadruplexes en présence de K⁺ ou Na⁺. La concentration ionique intracellulaire étant 140mM de K⁺, alors que celle de Na⁺ est de 5 à 15mM (Albert., 2002; Sten., 2002). Les conditions physiologiques sont donc parfaitement favorables pour la formation et la stabilisation de ces structures. Il existe un ordre préférentiel pour la stabilisation de ces structures : $K^+ > Rb^+ > Na^+ > Li^+ = Cs^+$ pour les cations alcalins, et Sr^{2+} $> Ba^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ pour les cations alcalinoterreux (Venczel and Sen., 1993). L'ordre établi est corrélé avec la taille du cation et le niveau d'interaction entre l'acide nucléique et le cation. Le cation central est important pour la stabilisation mais aussi pour le type desquadruplexes. Le simple brin télomérique, en présence de Na⁺, va adopter une structure antiparallèle présentant 3 boucles dans le prolongement des quartets terminaux dont une diagonale (Figure VI-2-b). En revanche, il peut adopter, en présence de K⁺, une structure dans laquelle les 3 boucles sont diagonales et externes aux plateaux de quartets (Wang and Patel, 1992 ; Parkinson et al., 2002). Le type de G-quadruplexe est directement dépendant de la taille de la structure des boucles externes (Hazel et al., 2004). Les guanines formant les quartets peuvent présenter également une conformation glycosidique syn ou anti (Figure IV-3) provenant d'un changement d'orientation dans l'enchaînement du sucre avec la base. Cette variabilité va induire une variation dans la taille des sillons.



Figure (IV-3)

Conformations glycosidiques des guanines et conséquences sur la taille des sillons (d'après Paramasivon et al., 2007).

La formation des structures G-quadruplexes nécessite la présence de régions simple-brins ou l'ouverture du duplexe Watson-Crick. En effet, il a été montré que, dans des conditions proches de ces conditions physiologiques, le duplexe Watson-Crick représente la forme prédominante sur la séquence en tandem d(AGGG(TTAGGG)₃)/ d((CCCTAA)3CCCT) (Sacca et al., 2005 ; Minhas et al., 2006).

3. <u>Mise en évidence de l'existence *in vivo* des G-4 et rôles</u> <u>biologiques des G-quadruplexes :</u>

De nombreuses techniques expérimentales ont été utilisées pour démontrer la formation *in vitro* des structures G-quadruplexes à partir de séquences oligonucléotidiques particulières, parmi lesquelles nous citons les méthodes donnant un aperçu structural détaillé telles que la résonance magnétique nucléaire RMN (Da Silva., 2007) et la cristallographie (Campbell and Parkinson., 2007), ainsi que les méthodes binaires, la fusion UV (Mergny et al., 1998; Rachwal et al., 2007), la spectrosopie, le dichroisme circulaire (Paramasivan et al., 2007) et l'utilisation des tags fluorescents appropriés (Mergny and Maurizot., 2001; Ying et al., 2003). Toutefois, aucune de ces techniques n'est suffisamment adaptée pour la détection de structures G-quadruplexes dans le génome. L'utilisation de certaines formes d'algorithmes sera essentielle afin d'identifier des cibles potentielles au niveau génomique. Un certain nombre d'algorithmes ont été utilisés (**Tableau 4**), dont la plupart sont basés sur une variété d'expériences de biophysique, en particulier celles qui recherchent l'impact de la longueur de la boucle (Hazel et al., 2004; Risitano et al., 2004).

Année	Terminologie	Auteurs	Longueur de G- tract	Longueur de la boucle
2004	QGRS (quadruplexe de séquences G-rich)	D'Antonio and Bagga	Généralement 2,3 ou 4	1 vers le haut, avec une seule boucle
2005	quadruplexes	Todd and Neidle	3-5	1-7
2005	PQS (séquences quadruplexes putatives)	Huppert and Balasubramanian	3+	1-7
2006	PG4 (G4 potentiel)	Chowdhury	2-5	1-5

Tableau (4)

Principales méthodes de prédiction des motifs G-quadruplexes spécifiques décrites comme des variantes de la règle générale $G_{x1}N_{L1}G_{x2}N_{L2}G_{x3}N_{L3}G_{x4}$, lorsque la longueur de la boucle et celle des G-tétrades varient (Huppert., 2008). L'algorithme «*Quadparser*», recherchant les séquences du type d(G₃₊N₁₋₇G₃₊N₁₋₇G₃₊N₁₋₇G₃₊) a permis d'identifier 379000 séquences non chevauchantes pouvant former des Gquadruplexes intramoléculaires (Seeman., 1998 ; Huppert and Balasubramanian., 2005; Seeman and Lukeman., 2005 ; Feldkamp and Niemeyer., 2006). Cependant, il est important de mentionner que ces algorithmes ne permettent qu'une prédiction d'un potentiel de formation de ces structures, puisque l'ADN génomique est en grande partie sous la forme d'un duplexe Watson-Crick, dans lequel l'appariement G-C, très stable, doit limiter le repliement en G-quadruplexes. Le désappariement du duplexe sera essentiel pour la formation de G-quadruplexes et se produit au cours des processus tels que la réplication, la transcription et la recombinaison.

Des études bioinformatiques récentes révèlent une forte présence de séquences potentiellement capables de former des G-quadruplexes dans tous les génomes analysés jusqu'alors. Ces séquences sont fortement enrichies à certains endroit de génome notamment au niveau des régions de commutation des chaînes lourdes des immunoglobulines (Shih et al., 2004 ; Rothemund.,2006), de l'ADN ribosomique (Kaucher et al., 2006), dans les régions de promoteurs de gènes (Davis and Spada., 2007) (facteur 1 α de l'hypoxie HIF1- α et VEGF) et d'oncogènes (bcl2, kras, c-kit, ou encore c-myc) (**Figure VI-4**), les minisatellites et les télomères que nous aborderons au paragraphe suivant.

La présence des G-quadruplexes dans ces régions clés du génome eucaryote suggère qu'elles sont impliquées dans des rôles biologiques essentiels. Un rôle conservé de contrôle transcriptionnel, d'épissage ou de traduction pour ces structures secondaires a été suggéré. Outre ce rôle putatif dans le contrôle de l'expression des gènes, les G-quadruplexes semblent intervenir dans de nombreux autres processus cellulaires, comme la biogénèse des ribosomes et la maturation des ARN ribosomiques, la recombinaison homologue, la régulation de la taille des télomères par inhibition de la télomérase, et l'inhibition de la réplication des ADN ribosomiques et des télomères. Ainsi, des séquences riches en G présentes dans quelques promoteurs de gènes comme *Rb, c-myc, PDGF-A, c-myb, c-abl, c-ets, c-fes/fps, csrc,c-yes, c-vas* et *Ki-ras* formant des G-quadruplexes sont impliquées dans la régulation en *cis* de la transcription (Maiti et al., 2003; Riou et al., 2003). Il a été démontré que la formation des G-quadruplexes induit l'alignement des chromosomes pendant la recombinaison mais aussi des recombinaisons illégitimes (Fahlman and Sen, 1998; Sen and Gilbert, 1988). L'implication des G-quadruplexes dans ces mécanismes où l'ADN est activement ouvert est cohérente avec

l'idée que le G-quadruplexe ne peut se former que lorsque l'ADN (ou l'ARN) se trouve sous forme simple-brin.

Des publications récentes identifiant une densité élevée des régions susceptibles de former les G-quadruplexes dans des régions génomiques adjacentes aux sites de début de la transcription, révèle ainsi la signification biologique de ses structures (Huppert and Balasubramanian., 2005 ; Todd et al., 2005 ; Eddy and Maizels., 2006 ; Huppert and Balasubramanian., 2007 ; Zhang et al., 2008).

De nombreux travaux sur les G-quadruplexes ont été réalisés *in vitro* sur des oligomères synthétiques, les fragments de restrictions et les plasmides recombinants. Il est particulièrement difficile d'obtenir des preuves directes convainquantes sur l'existence des G-quadruplexes *in vivo* par l'étude de ces segments d'ADN chromosomique dans des cellules intactes. La formation des G-quadruplexes ADN/ARN dans les cellules a été également publiée au cours de ces dernières années.



Figure (IV-4) Structures G-quadruplexes intramoléculaires et séquences de certains promoteurs en présence d'ions K⁺ déterminées par RMN : c-myc, c-kit, bcl2.

Les guanines de conformation syn sont en rose, celles de conformation anti en rouge (d'après *Qin and Hurtey.*, 2008).

Malgré la prédiction d'un grand nombre de séquences susceptibles de former des Gquadruplexes, l'existence de ces structures *in vivo* reste controversée et n'est soutenue que par deux études. La première, réalisée en 2001, est la visualisation à l'aide d'anticorps extrêmement affins des G-quadruplexes formés par les télomères du Cilié protozoaire *Stylonychia lemnae* (Schaffitzel et al., 2001). Schaffitzel et ses collaborateurs ont généré des anticorps spécifiquement dirigés contre une structure G-quadruplexe bimoléculaire. Les deux fragments Ab désignés sous les noms Sty 3 et Sty 49 reconnaissent spécifiquement des G-quadruplexes parallèle/parallèle ou parallèle/antiparallèle formés par l'ADN télomérique du cilié. La même équipe a pu montré aussi l'importance de deux protéines télomériques (TEBPa et ß) dans la formation de cette structure suggérant alors un rôle important des G-quadruplexes dans le métabolisme des télomères (Paeschke et al., 2005). La deuxième étude a montré la formation de G-quadruplexes au cours de la transcription chez *E. coli*, par microscopie électronique (Duquette et al., 2004). Ces expériences représentent la première preuve expérimentale de la présence de G-quadruplexes *in vivo*. En revanche, on ne peut pas exclure la possibilité que des anticorps favorisent la formation des G-quadruplexes (Riou., et al., 2003). L'identification de protéines spécifiques de l'ADN G-quadruplexe, incluant MyoD, les protéines se liant aux G-quadruplexes de *tetrahymena*, et d'autres protéines télomériques est un élément indirect en faveur de l'existence des G-quadruplexes (Macaya et al., 1993; Williamson., 1994; Shafer and Smirnov, 2000; Arthanari and Bolton., 2001).

4. <u>G-quadruplexes et télomères :</u>

La plus grande concentration de motifs G-quadruplexe a été retrouvée au niveau des répétitions télomériques d(TTAGGG)n humaines et de nombreux vertébrés (Blackburn., 1991; Cechet al., 2000). Bienqu'elle soit différente chez quelques espèces, la séquence télomérique contient des régions capables de former des G-quadruplexes. C'est le cas de Tetrahymena d(T4G4)n (Wang and Patel., 1994) et Oxytricha nova d(T2G4)n (Wang and Patel., 1995). Ces séquences se replient spontanémment pour former un G-quadruplexe dans des conditions physiologiques in vitro, avec une stabilité relativement élevée (Balagurumoorthy and Bramachari., 1994), aussi bien en solution qu'en structure cristallisée (Wang Y et al., 1993; Parkinson G. N., et al., 2002). Une première structure G-quadruplexe télomérique a été résolue en présence d'ions de sodium par RMN par l'équipe de D. Patel. Cette structure dite antiparallèle en raison de l'alternance régulière de la polarité des brins est caractérisée par une boucle diagonale et deux boucles latérales (Wang and Patel., 1993a; Wang and Patel., 1993b) (Figure VI-5). Cependant, en présence de potassium, les Gquadruplexes formés présentent un fort polymorphisme. Le groupe de Neidel a pu résoudre une structure présentant des brins parallèles et des boucles de type «double chain reversal» (Parkinson et al., 2002). Deux autres structures hybrides dites parallèles/antiparallèle formées par des séquences télomériques ont été également caractérisées par RMN (Phan et al., 2006; Ambrus et al., 2006 ; Luu et al., 2006 ; Dai et al., 2007).

Les télomères constituent aussi des cibles d'intêret considérable pour la fixation de ligands spécifiques (Neidel and Parkinson., 2002; Oganesian and Bryan., 2007; Patel et al., 2007). En effet, puisque le brin G télomérique est plus long que le brin C, les G-quadruplexes peuvent être formées sans perturber l'autre brin et sans dénaturation du duplexe.



Figure (IV-5) Structures G-quadruplexes intramoléculaires télomériques humaines.

a) forme antiparallèle 5'-AG3(T2AG3)3-3', résolue par RMN en conditions Na⁺, (Wang., 1993), b) forme parallèle 5'-AG3(T2AG3)3-3', résolue par cristallographie en conditions de K^+ (Parkinson et al., 2002), c) forme hybride 5'-A3G3(T2AG3)3A2-3', résolue par RMN en conditions K^+ , (Ambrus et al., 2006; Dai et al., 2007) d) forme hybride 2' (5'-T2AG3(T2AG3)3T2-3', résolue par RMN en conditions K^+ (d'après (Dai et al., 2008). Les guanines de conformation syn sont représentées en rose, celles de conformation anti en jaune.

5. les autres G-quadruplexes potentiels du génome :

Outre les télomères, le génome des vertébrés contient de nombreuses régions riches en répétitions de guanines qui peuvent former *in vitro* des structures G-quadruplexes.

5.1 Les régions de commutation des gènes d'immunoglobulines IgH :

Des répétitions riches en Guanine, d'une longueur de 1 à 10 kb, ont été retrouvées au niveau des chaines lourdes des immunoglobulines dites régions switch. Elles sont capables de former *in vitro* des G-quadruplexes intermoléculaires (Sen and Gilbert., 1988). Suite à cette découverte, les auteurs ont suggéré un rôle possible *in vivo*. L'étude de la transcription de ces régions *in vitro* et *in vivo* montre que des boucles-G sont formées co-transcriptionnellement et qu'elles contiennent des G-quadruplexes sur le brin non transcrit et un hétéroduplexe ARN/ADN sur l'autre brin.

5.2 ADN ribosomique :

L'ADN ribosomique possède des séquences très riches en guanines consécutives pouvant former des G-quadruplexes (Hanakahi et al., 1999). La transcription et la maturation de l'ADNr se produisent au niveau du nucléole. Il a été démontré que la nucléoline, une des protéines les plus abondantes du nucléole, reconnaît les G-quadruplexes et stimule leur transcription. L'interaction de la nucléoline avec les G-quadruplexes empêche la renaturation du duplexe et permet ainsi au brin matrice d'être transcrit de nombreuses fois. Comme les gènes des chaines lourdes des IgH, l'ADNr est le siège de processus de recombinaison permettant de maintenir son intégrité. Chez la levure, l'absence de Sgs1, une hélicase capable de résoudre les structures G-quadruplexes, provoque une fragmentation nucléolaire et une instabilité de l'ADN ribosomique (Hershman et al., 2008).

5.3 Les promoteurs de gènes :

La formation des G-quadruplexes a été démontrée dans des régions de promoteurs de nombreux gènes humains incluant des protooncogènes importants c-MYC (Siddiqui-Jain et al., 2002 ; Seenisamy et al., 2004; Hurley et al., 2006 ; Yang and Hyrley., 2006) , VEGF (Sun et al., 2005), HIF-1 α (Armond et al., 2005), Ret (Guo et al., 2007), KRAS (Cogoi and Xodo., 2006), Bcl-2 (Dexheimer et al., 2006 ; Dai et al., 2006), c-Kit (Rankin et al., 2005 ; Fernando et al., 2006 ; Phan et al., 2007 ; Shirude et al., 2007 ; Todd et al., 2007), PDGF-A (Qin et al., 2007) et c-Myb (Lee Palumbo et al., 2008). Les motifs de polypurine/polypyrimidine sont localisés au niveau des régions riches en GC des promoteurs et contiennent quatre blocs ou

plus d'au moins deux guanines consécutives sur le brin riche en Guanine. Dans la région proximale, les séquences riches en GC de ces promoteurs sont généralement hypersensibles aux nucléases et peuvent former une structure altérée avec un seul brin, ce qui est souvent une caractéristique des gènes transcriptionnellement actifs (Sun et al., 2005). Plusieurs études montrent que des structures G-quadruplexes intramoléculaires se forment dans des régions de certains promoteurs et jouent un rôle critique dans la régulation transcriptionnelle. Les Gquadruplexes qui se forment dans la région du promoteur des oncogènes sont récemment apparus comme des cibles pour le développement d'agents anticancéreux (Hurley et al., 2006). Il a été décrit que les séquences d'ADN riche en Guanine dérivant des régions polypurine/polypyrimidine des promoteurs c-MYC, VEGF, HIF-1a, Ret, Bcl-2, c-Kit et KRAS, forment in vitro des G-quadruplexes de trois tétrades (Figure VI-6), alors que PDGF-A et c-Myb forment des types de structures G-quadruplexes différents. Notamment, la comparaison des motifs formant des G-quadruplexes dans ces gènes révèle une similitude apparente de séquences. Ces motifs d'ADN fournissent un mécanisme de régulation transcriptionnelle impliquant une interconversion entre le G-quadruplexe, le simple-brin ouvert et le duplexe d'ADN. L'extrémité 3' de chaque séquence est composée d'un motif identique (G₃N₁G₃), capable de former une boucle de type «double chain reversal» (Figure VI-6-B). La séquence de la boucle au niveau de l'extrémité 5', dans la majorité des cas, est composée d'un seul nucléotide.

Le promoteur le plus étudié contenant des structures G-quadruplexes est celui du gène *c-myc*. Une structure G-quadruplexe parallèle a été identifiée dans l'élément NHE III1 (NHE pour nuclease hypersensitive element) du promoteur du gène *c-myc*, cette structure fonctionne comme un répresseur de transcription (Hurley, 2001; Lemarteleur et al., 2004). La surexpression de *c-myc* est associée avec un nombre important de tumeurs malignes de l'homme, parmi lequelles celles du sein, du côlon, du col de l'utérus, les cancers des poumons à petites cellules, l'ostéosarcome, le glioblastome et les leucémies myéloïdes.

		G	G ₃ N ₁₋₃ G ₃		N ₂₋₉	G ₃ N ₁ G ₃	
	c-MYC (1:2:1) 5	- GGG	т	GGG	G A	GGG T	GGG -3
	c-MYC (1:6:1) 5	- GGG	A	GGG	TGGGGA	GGG T	GGG -3
	VEGF 5	- GGG	С	GGG	ссбб	GGG C	GGG -3
	HIF-1a 5	- GGG	A	GGG	GAGAGG	GGG C	GGG -3
(\mathbf{A})	RET 5	- GGG	С	GGG	G C G	GGG C	GGG -3
	KRAS m(1:9:1) 5	- GGG	A	GGG	AAGGAGGGA	GGG A	GGG -3
	KRAS m(1:5:1) 5	- GGG	A	GGG	AAGGA	GGG A	GGG -3
	c-kit21 5	- GGG	С	GGG	CGCGA	GGG A	GGG -3
	Bcl-2 5	- GGG	CGC	GGG	AGGAAGG	GGG C	GGG -3
(B)	×	3.					

Figure (IV-6) A) Comparison des motifs formant les G-quadruplexes à trois tétrades (G3N1-3 G3N2-9G3N1G3) de certains promoteurs de gènes, (B) face d'un G-quadruplexe à trois tétrades, montrant une boucle de type «double-chain reversal» contenant une base (d'après Qin and Hurley., 2008).

5.4 Les minisatelites :

Les minisatellites sont des séquences d'ADN consituées de répétitions en tandem d'un motif de 15 à 100 paires de bases sur quelques centaines à quelques milliers de paires de bases. Ce type de structures est présent dans tous les génomes, eucaryotes comme procaryotes. Certains minisatellites humains sont extrêmement instables : ils sont qualifiés de minisatellites hypermutables (Jeffreys et al., 1999). Ces minisatellites hypermutables peuvent servir de biomarqueurs d'exposition à des agents génotoxiques tels que les radiations ionisantes.

Des répétitions de Guanine ont été observées au niveau de l'ADN minisatellite, elles sont susceptibles de former des G-quadruplexes intramoléculaires tels que le minisatellite de souris Pc-1 (locus Ms6-hm) d'unité de répétition d(CAGGG), le minisatellite du locus D4S43 (humain) d'unité de répétition d(GGGGAGGGGGAAGA) et la région polymorphique associée au gène de l'insuline ILPR d'unité de répétition d(ACAGGGGTGTGGGGG) (Kennedy et al., 1995 ; Lew et al., 2000).
6. Les quadruplexes d'ARN :

Les séquences d'ARNm codant ou non codant contiennent de nombreux blocs de guanine repliés en G-quadruplexes considérablement stables (Cheong and Moore., 1992; Sacca et al., 2005 ; Kumari et al., 2007). Le motif SC1 (GGAAGGAGUGGCUGGG) de l'ARNm est présent dans des régions 5'UTR et 3'UTR de gènes et est capable de former un Gquadruplexe unimoléculaire à deux plateaux (Riou et al., 2003). De telles structures pourraient jouer un rôle essentiel dans la régulation et la traduction d'ARN. Le syndrome de l'X fragile est la première cause de retard mental héréditaire. Il est causé par la perte de fonction (capacité à lier l'ARN) de la protéine FMRP et / ou la répression du gène de FMR1 codant pour la protéine. Des études ont montré que cette protéine est capable de reconnaître les ARNs en G-quadruplexe par l'intermédiaire de la boite RGG et d'induire des modifications de la traduction des ARNm reconnus (Darnell et al., 2001; Darnell et al., 2004 ; Schaeffer et al., 2001). Parmi les protéines présentant un motif sc1, nous retrouvons la sémaphorine 3F, l'histone H4 (Riou et al., 2003). Ainsi, le facteur de croissance fibroblastique FGF-2 qui contient une séquence spécifique nommée IRES (Internal Ribosome EntrySite) A) et est capable de former un G-quadruplexe. Cette structure secondaire de IRES pourrait jouer un rôle important dans l'activité traductionnelle de la protéine (Bonnal et al., 2003).

7. <u>Protéines reconnaissant les G-quadruplexes :</u>

L'un des arguments quant à la formation des structures G-quadruplexes *in vivo* est certainement l'identification de nombreuses protéines, chez différentes espèces, interagissant de manière privilégiée avec les G-quadruplexes *in vitro* (Fry., 2007). Ces protéines ont été identifiées par retard de migration sur gel, en utilisant généralement des G-quadruplexes bi ou tétramoléculaires.

7.1 La nucléoline et hnRNP :

La nucléoline est une protéine nucléolaire qui possède une activité hélicase, exprimée aussi dans le cytoplasme, et à la surface des cellules activées en multiplication rapide où elle fonctionne comme un récepteur pour des facteurs de croissance (Srivastava and Pollard., 1999). Il a été démontré que la nucléoline reconnaît *in vitro* des structures tétramoléculaires de G-quadruplexes (Hanakahi et al., 1999; Dempsey et al., 1999). Elle se lie également aux boucles-G formées cotranscriptionnellement par des ADN riches en blocs de guanine

(duquette et al., 2004). Bates et ses collaborateurs ont corrélé le rôle prolifératif d'oligonucléotides riches en guanine, formant des G-quadruplexes, et leur interaction spécifique avec la nucléoline (Bates et al., 1999). De plus, il a été démontré que la nucléoline est une cible du ligand de G-quadruplexe du NHE III1 de c-myc, le CX-3543.

La protéine hnRNP-A1 appartient au complexe protéique hnRNP. Cette protéine intervient dans l'épissage des ARNm, ainsi que dans la régulation de la taille des télomères en se fixant aux séquences télomériques (Labranche H., et al., 1998 ; Fukuda H., et al., 2002). Son fragment protéolytique UP1 est également capable de reconnaître des séquences G-riches hypervariables de l'ADN minisatellite chez la souris. Ce fragment possède aussi une fonction de désassemblage des G-quadruplexes de type (TTAGGG)₄ (Fukuda et al., 2002). La nucléoline et des protéines de hnRNP sont capables de s'associer dans les cellules B pour former un complexe LR1 qui possède une forte affinité pour jouer un rôle important au niveau des régions «switch» des immunoglobulines ainsi que dans les processus de recombinaison (Dempsey et al., 1999).

7.2 <u>Les hélicases et les topoisomérases :</u>

Des hélicases ATP dépendantes de la famille RecQ telle que BLM et WRN chez l'Homme déficientes dans les syndromes de Bloom (BS) et de Werner (WS), et Sgs1 chez la levure dissocient les G-quadruplexes tétramoléculaires très stables pendant la réplication et la transcription (Sun H., et al., 1998 ; Sun H., et al., 1999 ; Fry M., et al., 1999). Dans les cellules ALT, il a été démontré que les hélicase BLM et WRN pourraient résoudre les structures G-quadruplexe pendant la recombinaison (Riou et al., 2003). Chez la souris, la protéine RTEL, dotée d'une activité hélicase et impliquée dans la stabilité génétique, la survie cellulaire et le développement embryonnaire, pourrait être requise pour résoudre des G-quadruplexes qui peuvent apparaître pendant la réplication, la transcription, les mécanismes de réparation de l'ADN et de la recombinaison (Ding et al., 2004).

Des topoisomérases sont également capables de reconnaître les structures G-quadruplexes, parmi lesquelles nous retrouvons les topoisomérases II et III qui vont s'associer à BLM, WRN et Sgs1 pour relaxer les G-quadruplexes (Wu et al., 2000a; Wu et al., 2000b; Wu and Hickson, 2002) et la topoisomérase I qui fixe des G-quadruplexes inter et intramoléculaire (Arimondo et al., 2000).

Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, une hélicase de type DEAH (DNA/RNA helicase) sert à résoudre les structures de G-quadruplexes unimoléculaires apparaissant au cours de la réplication de l'ADN (Cheung et al., 2002).

7.3 <u>Autres protéines fixant les G-quadruplexes :</u>

Une nucléase nommée GQN1 (*G quartet nuclease* 1) a été identifiée dans des extraits de cellules B (Sun et al., 2001). Sa fonction serait de participer aux processus de recombinaison des gènes d'immunoglobulines en association avec le complexe LP1. Cette nucléase coupe spécifiquement les G-quadruplexes bi et tétramoléculaire.

Les protéines télomériques, Rap1 et TBP, sont également capables d'induire la formation de structures G-quadruplexes (Fang et al., 1993 ; Giraldo et al., 1994a ; Giraldo et al., 1994b). La protéine qTBP42 purifiée à partir de foie de rat a été identifiée comme un homologue de *CArG-box binding factor A* (CBF-A) de souris contenant cinq domaines conservés de fixation aux acides nucléiques (Weisman-Shomer et al., 2002).

Les domaines RNP1 ou au ATP/GTP-*binding box* de CBF-A de la protéine qTBP42 sont capables de déstabiliser les quadruplexes bimoléculaires de type G'2 d(CGG)n. Plusieurs doigts de zinc synthétiques (Gq1 à 4) ont également été identifiés par leurs liaisons spécifiques aux G-quadruplexes (Isalan et al., 2001). D'autres protéines fixant les G-quadruplexes sont indiquées dans le **tableau 5**, en précisant leur origine, leur poids moléculaire et leur constante de dissociation (kd).

Introduction

Nom	Organisme	Mw ^a	Kd ^b	G-quadruplexe reconnu	Référence	
MutSa	H. sapiens	116	~1	région "switch" de Ig (Sγ2B) G4 tétra- ou bimoléculaire	Larson et al., 2005	
MyoD	H. sapiens	34,5	nd	d(ACTGTCGTACT2GATAT4G4T4 G4) (télomère Oxytricha nova)	Walsh et al., 1992 ;	
			1,7	d(CATG5CG3AGG3CG3GTGT) (Intégrine 26)	Etzioni et al., 2005 ;	
			nd	d(CTGAG2AG4CTG2AG3ACCAC) (sMtCK) G4 bimoléculaire	Yaf et al., 2005	
Trombine	H. sapiens	70	25	d(GGTTGGTGTGGTTGG) (aptamère) G4 intramoléculaire	Bock et al., 1992	
QUAD	O. cuniculus (lapin)	58	2,5-7	d(TACAGGGGAGCTGGGGTAGA) (région "switch" Ig) G4 bimoléculaire ?	Weisman et al., 1993, 1994	
TEBP	O. nova α + β (N-terminal)	56 -α 28 -β	nd	d(TTTTGGGGGTTTTTGGGG) (télomère Oxytricha nova) G4 bimoléculaire	Horvath et al., 2001	
Sty3	S. lemnae	nd	0,125	d(TTTTGGGGT) G4 tétramoléculaire "parallèle"	Schaffitzel et al	
			171	d(GGGG(TTTTGGGG)3) G4 intramoléculaire "antiparallèle"	2001	
Sty49	S. lemnae	nd	3 d(TTTTGGGGT) G4 tétramoléculair "parallèle"		Schaffitzel et al	
			5	d(GGGG(TTTTGGGG)3) G4 intramoléculaire "antiparallèle"	2001	
G4p1 G4p2	S. cerevisiae	42	2	d(TATG5AGCTG4AAGGTG3ATTT	Frantz et al., 1995	
		32	4,4	G4 tétramoléculaire		
g5p	Bactériophage filamenteux Ff	9,7	nd	Aptamères G4 intramoléculaires ?	Olivier	
				d(GTTTTTGGGGGCTTTTC) r(GUUUUUGGGGGCUUUUC) G4 tétramoléculaires	et al., 2000; Wen et al., 2001	
NCp	VIH	69	~8	d(TTGGGGGGGGTACAGTGCA) (ADN flap central de HIV) G4 tétramoléculaires	Lyonnais et al., 2003	

Mw : poids moléculaire en kDa.

Kd : constante de dissociation exprimée nM. nd : non déterminé. c 106 kDa sur SDS-PAGE.

Tableau (5)

Protéines fixant les quadruplexes.

8. Ligand des G-quadruplexes :

La structure des G-quadruplexes est particulièrement adaptée à la reconnaissance par des molécules aromatiques planes de surface étendue, par conséquent, de nombreux ligands ont été développés en ce sens. Dans la plupart des cas, la stabilisation des G-quadruplexes provient des interactions de type π -stacking entre le ligand et un des quartets externes auxquelles s'ajoutent des interactions électrostatiques entre la molécule chargée positivement et le squelette anionique du quadruplexe (Figure VI-7). Afin d'obtenir une forte affinité pour le G-quadruplexe, il est important de trouver un équilibre entre la surface aromatique et le nombre de charges du ligand. Le brin télomérique riche en guanines est capable de se replier en plusieurs structures G-quadruplexes qui diffèrent par la position de la boucle. Des données récentes suggèrent que la conformation prédominante est acquise dans les conditions physiologiques (Ambrus et al., 2006; Luu et al., 2006; Xu et al., 2006). Ces structures sont maintenant étudiées dans de nombreux organismes, de E.Coli à l'homme (Duquette et al., 2004). L'activité optimale de la télomérase nécessite un simple-brin déplié, or la formation des G-quadruplexes in vitro inhibe directement l'élongation du télomère par la télomérase (Zahler et al., 2001). Par conséquent, des ligands qui lient sélectivement les G-quadruplexes et les stabilisent devraient interférer avec la conformation et l'allongement des télomères.



Figure (IV-7)

Sites d'interaction des ligands avec les G-quadruplexes.

La recherche de petites molécules ciblant les G-quadruplexes télomériques constitue une stratégie pour inhiber la reconnaissance de la télomérase sur son substrat, le télomère, et induire la mort des cellules cancéreuses (Lavelle et al., 2000 ; Mergny et al., 2002).

En effet, la stabilisation de ces structures par des ligands permettrait d'inhiber la reconnaissance de la télomérase et d'empêcher l'élongation des télomères (Mergny et al., 1998a). En 1991, une première étude a montré que les G-quadruplexes télomériques pouvaient être stabilisés en présence de l'ion K⁺ permettant ainsi l'inhibition de l'élongation des télomères par la télomèrase (Zahler et al., 1991). Quelque années plus tard, Sun et ses collaborateurs ont découvert un composant de petite taille, le 2,6-diamidoanthraquinone, capable des stabiliser les G-quadruplexes (Sun et al., 1997). Depuis cette découverte, le nombre de ligands identifiés et agissant sur la télomérase par stabilisation des G-quadruplexes a augmenté rapidement au cours de ces dernières années incluant 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) (voir tableau 1 pour revue De Cian et al., 2008; Monchaud and Teulade-Fichou., 2008). Notre équipe a également identifié des dérivés d'éthidium, de dibenzophénanthrolines, de triazines, de pyridine dicarboxamides capables d'interagir avec les structures G-quadruplexes télomériques et de bloquer l'activité de la télomérase (Riou et al., 2000 ; Mergny et al., 2001 ; Korppel et al., 2001; Lemarteleur et al., 2004; Pennarun et al., 2005; Brassard et al., 2007). Nous ne présentons ici que le ligand utilisé pendant ce travail, la télomestatine.



Figure (IV-8)

Structure des ligands des G-quadruplexes.

A. la porphyrine TMPyP4, B. l'acridine BRACO19, C. L'éthidium et D. son dérivé le 9944. E. des triazines 12459, F et 115405, G. 2,6-pyridine-dicarboxamide 307A.

- La télomestatine

Kazuo Shin-ya et ses collaborateurs étaient les premiers chercheurs qui ont publié l'efficacité de la télomestatine à lier les G-quadruplexes. Il s'agit d'un composé naturel extrait de *Steptomyces anulatus* cultivé dans un milieu de glycérol. Après extraction et séparation sur des couches organiques aqueuses, l'échantillon obtenu sous forme d'une poudre de couleur

blanche jaunâtre est analysé par RMN ¹H et RMN ¹³C. La structure est composée de 5 fractions d'oxazole (anneau D à H), un thiazoline (anneau A), et deux methyloxazoles (B et C) (**Figure VI-9**). En raison de sa nature cyclique, la télomestatine est essentiellement plane, ce qui la rend très utile dans la stabilisation des G-quadruplexes (Shin-ya et al., 2000).



Figure (IV-9)

Structure de la télomestatine.

La télomestatine est décrite comme la molécule induisant la meilleur inhibition de l'activité télomérase avec une CI50 de 5nM et présente une forte affinité pour la séquence d[T2AG3]₄. Mu-Yong Kim et Kazuo Shin-ya ont montré qu'il existe une grande similarité structurale entre la Télomestatine et le G-quadruplexe (**Figure VI-10**).



Figure (IV-10) Comparaison de la structure d'un G-quadruplexe (A) et de la télomestatine (B)

Ceci suggère que l'inhibition de la télomérase par la télomestatine pourrait être due à sa capacité à faciliter la formation des structures G-quadruplexes, ou stabiliser les structures préexistantes. Expérimentalement, il a été constaté que des concentrations croissantes de télomestatine induisent la formation de G-quadruplexes intramoléculaires, mais n'a pas

d'influence significative sur la formation de G-quadruplexes intermoléculaires (Kim et al., 2001). En 2003, Kim a montré que la télomestatine est également capable d'induire un arrêt de la prolifération des cellules ALT et télomérase positives en présence de concentrations subtoxiques (Kim M. Y., et al., 2003). Il a montré également que la télomestatine est capable de stabiliser les structures G-quadruplexes existantes et faciliter la formation de nouvelles structures G-quadruplexes à partir du duplexe d'ADN. Ainsi, la télomestatine se lie fortement aux structures G-quadruplexes intramoléculaires et ne se dissocie pas facilement de ces structures. Par la suite, Nakajima avait examiné l'effet de la télomestatine sur l'inhibition de la télomérase dans les cellules leucémiques primaires. Les cellules ont été incubées avec 5 µM de la télomestatine pendant 10 jours. Les chercheurs se sont rendu compte que la télomestatine induit un raccourcissement des télomères et un taux élevé d'apoptose (Nakajima et al., 2003). D'autres travaux ont été réalisés pour tester l'efficacité de la télomestatine comme inhibiteur de la télomérase humaine dans des cellules leucémiques. Shin-ya a constaté que l'activité télomérase pour chaque lignée de cellules cancéreuses testée est diminuée d'un facteur 2 en utilisant 2 µM de télomestatine. La télomestatine diminue ainsi l'expression de l'ARNm de la sous unité hTERT, essentielle pour l'activité télomérase (Tauchi and Shin-ya., 2003). Après un mois de traitement avec la télomestatine, les lignées cellulaires ont cessé de se multiplier et ont également présenté des caractéristiques morphologiques associés à l'apoptose. De plus, le traitement des cellules normales de la moelle osseuse par la télomestatine n'affecte pas les fonctions et la viabilité des cellules, suggérant que la télomestatine permet d'éliminer préférentiellement les cellules leucémiques. Puisque la télomestatine induit un dysfonctionnement des télomères, plusieurs voies de réponse aux dommages à l'ADN sont activées en présence de la télomestatine. La culture des cellules avec des quantités modérées de télomestatine augmente de façon remarquable l'expression des kinases ATM et Chk2 kinase, et des inhibiteurs de cyclin-dependent kinase P21CIPI et P27KIPI (Tauchi T., et al., 2003). Le nombre de cellules en phase G1 du cycle cellulaire a été considérablement augmenté avec une diminution concomitante de cellules en phase S, ce qui indique que la télomestatine empêche la réplication des cellules. Un travail récent de notre équipe a montré que l'introduction de la télomestatine à des doses pharmacologiques inhibe in vitro la liaison de la protéine télomérique POT1, sur l'extension 3' simple-brin du télomère et la délocalisation de cette protéine des télomères (Gomez et al., 2006).

V. Les topoisomérases :

L'objectif de ce chapitre est d'introduire les différents acteurs de la régulation de la topologie de l'ADN : les topoisomérases. Tout d'abord, nous expliquons la nécessité d'opérer des modifications topologiques dans la molécule d'ADN. Nous présentons ensuite une vue d'ensemble des différentes enzymes de la classe des topoisomérases, qui sont les acteurs de la topologie de l'ADN. Une attention particulière est portée à la description de la topoisomérase III α , qui constitue l'objet de mon travail de thèse.

1. <u>Généralités :</u>

Le fonctionnement biologique normal de l'ADN n'est assuré que s'il se présente sous la topologie appropriée. La double hélice d'ADN constitue une structure stable bien adaptée à la transmission et à la sauvegarde de l'information génétique. Cependant, de nombreux aspects du métabolisme de l'ADN, comme la réplication, la réparation de l'ADN, la transcription, et tous les phénomènes de recombinaison et de transposition, demandent l'accès à une forme simple-brin dans laquelle les bases nucléotidiques sont accessibles, permettant l'intervention de protéines de remodelage. Les processus vitaux dépendent et influent sur le niveau de superenroulement de l'ADN. En effet, ils introduisent naturellement des boucles ou des noeuds dans la double hélice. Par exemple, la séparation des deux brins d'ADN, au cours de la réplication entraîne un surenroulement positif en amont qui doit être contrôlé pour éviter l'arrêt du processus. Cette modification ne peut s'effectuer qu'en modifiant le nombre d'enlacements de l'ADN (qui correspond au nombre de fois où un brin traverse l'autre dans l'espace) et nécessite le clivage d'au moins un des brins de l'ADN et une rotation contrôlée de ce brin avant refermeture de la cassure (Wang., 1998) (Figure V-1). Il apparaît alors évident que la régulation de la topologie de l'ADN est indispensable à la survie des cellules et nécessite la présence d'un système enzymatique permettant de résoudre les contraintes existantes sur l'ADN au cours de son métabolisme. Cette action de contrôle topologique est effectuée par des enzymes nucléaires, appélées les ADN topoisomérases.



Figure (V-1) Exemple de surenroulement de l'ADN durant la transcription par la topoisomérase II.

La Topoisomérase II réunit deux régions de l'ADN et introduit un surenroulement par coupure transitoire et recombinaison des brins d'ADN. Une partie de la double hélice se sépare en deux brins, permettant à l'ARN polymérase (et probablement d'autres facteurs de transrégulation) d'initier la transcription (Cockerill and Garrard., 1986).

2. <u>Définition et historique :</u>

La première topoisomérase a été découverte en 1971 en purifiant une enzyme à partir d'extraits d'Escherichia coli, cette protéine est capable de relaxer les surenroulements négatifs d'une molécule d'ADN circulaire. (Wang., 1971). La découverte de cette protéine, mentionnée précédemment «protéine @», et nommée maintenant Topoisomérase I d'E.coli, a fourni un nouvel outil pour la manipulation de la topologie de l'ADN, les ADN topoisomérases. Depuis cette découverte, des études successives ont élargi la famille des topoisomérases grâce à la découverte de nouveaux membres dans tous les organismes incluant les eubactéries (Wang., 1971), virus (Liu et al., 1979), eucaryotes (Shelton et al., 1983) et archaebactéries (Guipaud et al., 1997). Les topoisomérases, régulateurs de la topologie de l'ADN, sont présentes chez tous les organismes vivants. Ces enzymes génèrent des coupures transitoires de l'ADN et catalysent le passage des segments d'ADN à travers ces coupures avant de les refermer. Elles peuvent ainsi changer le nombre d'enlacement (Lk) d'une molécule d'ADN, mais aussi les décaténer et les dénouer. Elles permettent donc d'ajouter ou d'ôter les superenroulements de l'ADN. En fait, il se forme une liaison phosphodiester covalente temporaire entre l'enzyme et l'ADN. La figure V-2 montre le principe de la réaction, dans le cas des topoisomérases II ou IA : un groupement OH est laissé côté 3' sur le squelette (alors qu'il est laissé 5' pour les topoisomérases IB). Malgré une différence de séquences considérable entre les enzymes bactériennes, archéennes et eucaryotes, des conformations structurales proches sont toutefois retrouvées dans leur domaines d'activité (Champoux., 2001 ; Corbett and Berger., 2004). En 1995, Froelich-Ammon et Osheroff ont pu montrer que les topoisomérases sont essentielles pour la viabilité cellulaire (Froelich-Ammon and Osheroff., 1995). Toutes les topoisomérases présentent des points communs tels que leur structure en forme de pince qui va permettre les activités de coupure de l'ADN et de transfert de brins, un résidu tyrosine au niveau de leur site actif pour cliver la liaison phosphodiester de l'ADN (Wang., 2001), une cavité de stockage temporaire des fragments d'ADN, et un changement conformationnel associé à une rotation ou un mouvement de l'ADN.



Figure (V-2)

Cassure temporaire du squelette de l'ADN par les topoisomérases de type IA.

La réaction de transestérification entre la tyrosine catalytique et le groupement phosphate de l'ADN conduit à une coupure transitoire de l'ADN et en même temps à la formation d'un intermédiaire covalent avec l'enzyme.

Au cours de la réplication et de la transcription, les topoisomérases permettent d'éliminer les surenroulements, qui peuvent s'accumuler en amont par rapport à l'avancement de la fourche de réplication sur la double-hélice d'ADN. Les topoisomérases sont aussi essentielles au cours de l'assemblage, de la condensation et de la ségrégation des chromatides (Wang., 1996 ; Nitiss., 1998). L'implication des topoisomérases dans la recombinaison et la réparation de dommages sur l'ADN a également été démontrée (Wang et al., 1990 ; Wang., 1991). Dans ce contexte, il est évident que la régulation de la topologie, et ainsi de la superhélicité, est indispensable au cours de chaque étape du métabolisme de l'ADN (Wang., 2002).

3. <u>Classification des topoisomérases</u>

Deux classes de topoisomérases ont été identifiées, I et II, chacune est divisée en deux sousclasses A et B. La classification des topoisomérases de type IA, IB, IIA et IIB se justifie par leurs différences structurales et par le mécanisme mis en œuvre.

	Enzyme	Structure	ATP	Fonction	
Type I	Topo I (type IA)	monomère	non	relaxation de l'excès de supertours (-)	
	Topo III (type IA)	monomère	non	décaténation derrière la fourche de réplication	
Type II	Topo IV	hétérotétramère	oui	Génération de supertours (-), Relaxation des supertours (+)	
	Gyrase	hétérotétramère	oui	Décaténation, Relaxation des supertours (+)	

Tableau (6)

Classification des enzymes topoisomérases.

3.1 <u>Topoisomérase de type I</u> :

Les topoisomérases de type I sont des enzymes essentiellement monomériques qui permettent de désenchevêtrer les brins d'ADN en coupant et en ressoudant un seul brin d'ADN. Les topoisomérases de type IA sont représentées par les topoisomérases I et III bactériennes ainsi que par les topoisomérases III eucaryotes alors que la classe IB contient la topoisomérase I eucaryote et la topoisomérase de pox virus (Wang ., 1996). Les familles IA et IB diffèrent par la liaison formée entre la tyrosine catalytique et l'ADN. Les Topos IA se lient de manière covalente à un groupement 5' phosphate de l'ADN permettant ainsi la coupure d'une liaison phosphodiester sur l'un des deux brins d'ADN. Cette coupure provoque alors un changement conformationnel permettant le positionnement correct du résidu Tyr319 qui engendre la coupure de l'ADN et entraîne ainsi l'ouverture de l'enzyme et le passage du second brin d'ADN dans la cavité de l'enzyme. Après la fermeture de la cavité de l'enzyme, le brin d'ADN clivé est alors ressoudé par la TopoIA. Ces topoisomérases sont capables de relâcher les supertours négatifs seulement, sans aller jusqu'à une relaxation complète (Champoux, 2001). Inversement, les Topoisomérases IB forment une liaison avec une extrémité 3' phosphate de l'ADN permettant aux deux extrémités de la double hélice d'effectuer une rotation libre autour du brin demeuré intact et libérer ainsi la tension accumulée (Champoux and Dulbecco 1972). Les enzymes de cette classe sont capables de relâcher les supertours positifs comme négatifs, la relaxation étant cette fois-ci complète. Le processus de coupurefermeture ne nécessite pas d'hydrolyse d'ATP à l'exception d'une topoisomérase assez singulière, la réverse gyrase (Kikuchi et al., 1984; Confalonieri et al., 1993). Il n'existe pas d'homologie structurale entre les topoisomérases IB et les autres topoisomérases. Plusieurs structures cristallines ont été obtenues pour les différentes enzymes appartenant à cette classe, aussi en présence d'ADN (Redinbo et al., 1998; Shuman., 1998; Stewart et al., 1998 ; Redinbo et al., 1999 ; Redinbo et al., 2000). Les topoisomérases I sont constituées de quatre domaines formant une architecture toroïdale contenant une cavité chargée positivement dévolue à l'interaction avec l'ADN (Lima et al., 1994 ; Changela et al., 2001).



Figure (V-3)

Représentation des deux états générés pendant le cycle catalytique des topoisomérases IA.

Les quatre domaines et la cavité dans laquelle l'ADN se fixe sont représentés (d'après Corbett et Berger., 2006).

Les topoisomérases de type IA sont généralement associées avec la recombinaison et la réparation de l'ADN. Leur rôle dans la réplication a été démontré grâce aux expériences sur des protéines reconstituées de réplication (Hiasa and Marians., 1994; Hiasa and Marians, 1996), et au niveau cellulaire, par le cloisonnement anormal de l'ADN visible au microscope dans les cellules dépourvues de l'activité des topoisomérases IA (Goodwin et al., 1999; Zhu et al., 2001). Ceci devrait être dû à la résolution incomplète des recombinaisons au moment de la ségrégation des chromosomes. Cependant, et en dehors de ces implications, la contribution effective des enzymes IA, sur une base moléculaire *in vivo*, reste à démontrer. À ce jour, la

topoisomérases la mieux caractérisées est la topoisomerase IB, qui semble fonctionner à la fois dans le noyau et dans les mitochondries.



Figure (V-4)

Modes d'actions des topoisomérases.

Il existe trois types de topoisomérases capables de modifier la superhélicité de l'ADN selon trois mécanismes distincts. Les topoisomérases de type IA (à gauche) catalysent le passage d'un brin de la double hélice au travers du second brin (le brin clivé). Les topoisomérases de type IB (au centre) clivent un brin de la double hélice ce qui permet la rotation libre du brin clivé autour du brin demeuré intact. Enfin, les topoisomérases de type II (à droite) réalisent le clivage des deux brins d'une hélice d'ADN et le passage d'une double hélice à travers le duplexe clivé. Lk représente la variation du nombre d'enlacement pour un cycle catalytique ; sa valeur traduit la modification de la contrainte topologique (d'après Corbett et Berger 2004).

3.2 <u>Topoisomérases de type II :</u>

Les topoisomérases de type II sont généralement des dimères ou des tétramères, classées aussi en deux sous classes, les topoisomérases IIA et IIB. La classe IIB n'est représentée que par une seule enzyme, la topoisomérase VI d'*hyperthermophiles d'archaea*, (Bergerat et al., 1997), alors que la classe IIA contient la gyrase bactérienne, la topoisomérase IV bactérienne, les topoisomérases II de levure et de drosophile, les topoisomérases II α et β des mammifères et la topoisomérase II du phage T4 (Champoux, 2001). Ces enzymes catalysent la rupture simultanée des deux brins de la double hélice. Il se forme alors un complexe covalent ADNprotéine qui permet le passage d'une double hélice au travers d'une autre. Cette coupure est opérée par deux groupements tyrosines (appartenant à deux sous-unités identiques de l'enzyme) sur chaque squelette de la molécule d'ADN. Contrairement au topoisomérases de type I, chaque cycle catalytique des topoisomérases II requiert l'hydrolyse de deux molécules d'ATP.

4. <u>L'inhibition des topoisomérases comme stratégie</u> <u>anticancéreuse :</u>

Les topoisomérases sont des cibles de nombreux agents anticancéreux, les inhibiteurs de topoisomérase sont devenus aujourd'hui un traitement standard de plusieurs pathologies malignes. En effet, en raison de leur taux de croissance et leur prolifération rapide, les cellules cancéreuses surexpriment les topoisomérases et deviennent alors plus sensible à leurs inhibiteurs. Inhiber ces enzymes crée des dommages importants à l'ADN des cellules dont le seul devenir sera la mort. Au niveau chimique, de nombreuses molécules possèdant une affinité particulière pour les topoisomérases peuvent inhiber sélectivement leur activité dans les cellules cancéreuses. C'est le cas de la camptothécine et de ses dérivés, inhibiteurs des topoisomérases de type I. Leurs mécanisme d'action correspond à la stabilisation d'un complexe intermédiaire TopoI-ADN, nommé complexe de clivage. Après le clivage normal du brin d'ADN, l'inhibiteur se fixe sur le complexe topoisomérase-ADN clivé, ce qui induit la stabilisation du complexe, et empêche la religation du brin d'ADN (**Figure V-5**).



Figure (V-5) Mécanisme d'action des inhibiteurs des topoisomérases de type I.

Lors de la réplication, cette coupure va bloquer la fourche de réplication de l'ADN, et provoquer l'interruption du cycle de la division cellulaire et ainsi aboutir à la mort de la cellule.

5. <u>La topoisomérase III :</u>

5.1 <u>Généralités :</u>

La topoisomérase III a été identifiée pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae* comme un gène indispensable pour supprimer les recombinaisons entre des séquences répétées (Wallis et al., 1989). Les cellules eucaryotes supérieures présentent deux types de TopoIII, TopoIII α et TopoIII β . Hanai et ses collaborateurs ont découvert le gène *TOP3* de la topoisomérase III α humaine (hTopoIII α), localisé en une seule copie sur le chromosome 17 en position (17p11.2-12) (Hanai et al., 1996). Il code pour une protéine de 110kDa dont la séquence comprend 976 acides aminés. Son homologue murin est très exprimé dans les testicules (Seki et al., 1998). Le gène codant pour la topoisomerase III β a été découvert en 1997 et fait partie du locus du gène de l'immunoglobuline l situé sur le chromosome 22q11 (Kawasaki et al, 1997). La Topoisomérase III α présente une forte homologie de séquence avec la topoisomérase III de levure, à savoir 44% d'identité de séquence et 61% de similarité. L'homologie qu'elle présente avec les topoisomérases I et III bactériennes est moins forte, 24% d'identité et 44% de similarité. Cependant, la Topoisomérase III α ressemble plus à la Topoisomérase I d'*E. coli* plutôt qu'aux autres topoisomérases IA du point de vue de l'organisation de la protéine en domaines.

L'analyse de l'ARNm de la TopoIII α par Northern a montré que l'enzyme est exprimée dans de nombreux tissus sous la forme de trois transcrits de tailles 7.2, 6 et 4 kilobases (Fritz et al., 1997). Les séquences taguées ont été obtenues à partir de banques de cDNA provenant du cœur de l'homme adulte (Waye et al, 1995), de la rate et du foie, et les cDNA ont été obtenues à partir de cellules T de l'hépatome (Hanai et al, 1996). Il semble également que l'expression de la protéine soit régulée différemment dans des tissus tels que les testicules (Seki et al., 1998). Les travaux de Lodge et collaborateurs ont montré aussi, grâce à un nouvel anticorps monoclonal produit contre la hTopo III α (TOPO3a-1A4), que la protéine est exprimée dans une large gamme de tissus, et plus spécialement avec une forte concentration dans les cellules endothéliales et les fibroblastes du stroma (Lodge et al., 2000). Aucune relation n'a été observée entre l'expression de la TopoIII α et la prolifération tumorale. Son expression dans les tissus néoplasiques est souvent la même, en comparaison avec le même type de tissu normal, bien que certaines tumeurs montrent soit une augmentation de l'expression de la TopoIII α comme l'adénome colique, soit une diminution de son expression comme le carcinome gastrique et le carcinome à petites cellules des bronches.

5.2 <u>Structure :</u>

Les topoisomérases de la famille IA présentent une grande similarité de séquence suggérant une forte conservation structurale de ces enzymes (Corbett et al., 2004). La TopoIII, comme les autres topoisomérases de type IA, est composée de deux parties : un domaine central de 67kDa contenant tous les motifs conservés, en particulier les motifs formant le site actif de la protéine, suivie d'une extrémité carboxyl terminale (Figure V-6-a) (Wang., 1996 ; Bergert., 1998; Champoux., 2001; Corbett and Berger., 2004). La comparaison des séquences montre que la région C-terminale ne présente pas le même niveau de conservation par rapport au noyau. Le domaine C-terminal peut varier considérablement en longueur et joue un rôle dans les interactions protéine-ADN (Beran-Steed and Tse-Dinh., 1989; Zhang et al., 1996; Ahumada and Tse-Dinh., 1998). Chez la TopoIII d'E.coli, la délétion de ce domaine est nocive bien qu'elle ne réprime pas complètement son activité (Zhong and DiGate., 1994). En l'absence de l'ADN, la tyrosine catalytique participe à un réseau de liaisons hydrogène avec les résidus conservés d'un domaine voisin et reste inaccessible à l'ADN. Les données structurales confirment que toutes les topoisomérases de type IA montrent une architecture toroidale commune formée par quatre domaines protéiques conservés (figure b) (Lima et al., 1993; Lima et al., 1994; Mondragon and DiGate., 1994; Perry and Mondragon., 2003). Le domaine I (TOPRIM) appelé ainsi car il se retrouve dans certaines Topos mais aussi dans des primases bactériennes, ou encore dans d'autres enzymes qui catalysent des transferts de groupements phosphate ou qui hydrolysent des liaisons phosphodiesters (Aravind et al., 1998). Il est constitué de 4 ou 5 feuillets β parallèles entourés d'hélices α , et possède un ion métallique divalent, et est retrouvé dans les topoisomérase de type IA, IB, IIB aussi bien que dans la primase bactérienne (Aravind et al., 1998). Le domaine II consiste en un repliement β qui enveloppe le reste de l'enzyme en délimitant la cavité centrale (Lima et al. 1994; Mondragon & DiGate, 1999). Le domaine III contient la tyrosine du site actif, il se compose, comme une partie du domaine IV, d'un motif hélice ailée (WHD pour winged-helix domain). Le site actif de l'enzyme est enterré à l'interface entre les deux domaines I et III. L'interface des domaines I, III et IV forme un sillon chargé positivement responsable de la liaison avec le simple-brin de l'ADN, et constitue également la barrière de la protéine controlant l'accès vers l'intérieur de l'enzyme (Changela et al. 2001).



Figure (V-6) Organisation et structure des topoisomérases de type IA.

a) les structures primaires des domaines des topoisomérases I et III d'E.coli. Les domaines sont indiqués par des couleurs et les résidus catalytiques marqués sont indiqués comme des barres noires. (b) Structure de la topoisomerase III d'E.coli complexée avec l'ADN. L'ADN lié est coloré par atome et montré comme des bâtons. La tyrosine catalytique (Y, cyan sphere) est localisée à l'interface des domaines I et III (Changela et al. 2001). (c) La rotation de la structure en (b) Par 90° révèle la décaténation de la loop projetée vers le bas de l'enzyme (Changela et al. 2001). (d) la fermeture du site actif de la TopoIII d'E.coli en absence de l'ADN. La tyrosine du site actif forme une liaison hydrogène avec les deux aspartates conservés (Mondragon and DiGate., 1999). (e) La conformation "pré-clivage" du site actif de la TopoIII d'E.coli lié à l'ADN (Changela et al. 2007).

5.3 <u>Fonctions cellulaires :</u>

La topoisomérase III est une enzyme bien conservée pendant l'évolution, cependant, ces fonctions *in vivo* ne sont pas encore totalement élucidées (Wang., 2002). Des études biochimiques ont montré que la topo III d'*E.coli* relaxe négativement les surrenroulements et

délie les nœuds simple-brin, ou qui contiennent des régions simple-brin (DiGate and Marians, 1988; Du et al., 1995). Toutefois, elle est plus efficace dans la décaténation des substrats d'ADN contenant des fossés ou des gaps (DiGate and Marians, 1988). La TopoIII est également capable de dissocier les précaténanes produits au cours de la réplication de l'ADN (Hiasa and Marians, 1994; Nurse et al., 2003). Bien que la fonction de décaténation soit assurée par la TopoIV chez E.coli, la TopoIII est aussi capable de séparer les chromosomesfils après réplication en présence d'un mutant de la TopoIV. Cependant, son activité de décaténation nécessite des fragments d'ADN simple-brin et se réduit, lors de la réplication, à la période où les fragments d'Okazaki sont encore présents (Nurse et al., 2003). Des données complémentaires indiquent que la TopoIII joue un rôle cellulaire important. En effet, la suppression des fonctions de la TopoIII chez E.coli provoque un phénomène d'hyperrecombinaison entre des séquences répétées (Whoriskey et al., 1991; Schofield et al., 1992). Chez Schizosaccharomyces. Pombe, l'inactivation de la TopoIII provoque des abérrations de la ségrégation chromosomique pendant la mitose, qui sont létales (Goodwin et al., 1999; Maftahi et al., 1999), alors que chez Saccharomyces cerevisiae, les mutants de Top3 présentent un niveau élevé de recombinaisons homologues entre les courtes séquences d'ADN répétées et un ralentissement de la croissance (Wallis et al., 1989). Les conséquences de la perte de la TopoIIIa ont été mieux étudiées chez les mammifères, il semble que la hTopoIIIα soit indispensable, au moins au cours de l'embryogenèse, puisque le knock-out de son homologue murin est létal (Li and Wang., 1998). La délétion du gène de son isoforme, la topoisomérase III β , semble plus tolérable, puisque les souris Top $3\beta^{-/-}$ survivent à terme, mais leur espérance de vie ainsi que leur fertilité sont réduites par rapport au type sauvage (Kwan and Wang, 2001; Kwan et al., 2003).

Une mutation du gène ATM (Ataxia-Télangiectasia mutated) est caractérisée par la sensibilité aux radiations, l'instabilité génétique et une forte incidence des cancers. L'équipe de Fritz a montré que la transfection de fibroblastes humains A-T, soit avec le vecteur pCAT4.5 codant pour une topoisomérase III α humaine tronquée de 141 acides aminés N-terminaux, soit avec une construction antisens hTopoIII α , est capable de complémenter le phénotype d'hypersensibilité aux rayonnements ionisants des cellules AT (Ataxie-Télangectasie) et de bloquer l'induction de l'apoptose. Inversement, la transfection des mêmes cellules avec un vecteur contenant le cDNA hTopoIII provoque l'augmentation du nombre de cellules apoptotiques et une incapacité à inhiber l'apoptose. Ces résultats suggèrent que la forme tronquée CAT4.5 doit réprimer le phénotype A-T en agissant comme un dominant négatif de la topoIIIα, et présentent la première preuve directe que la hTopoIIIα, comme son homologue de la levure, est impliquée dans le maintien de l'instabilité génétique (Fritz et al., 1997).

Les propriétés biochimiques de la Topoisomérase III α humaine ont été partiellement caractérisées grâce aux travaux de Goulaouic et ses collaborateurs, en purifiant la hTopoIII α en forme recombinante. En effet, les auteurs ont montré que la hTopoIII α est capable de relaxer négativement les surenroulements de l'ADN, ce qui induit la disparition totale du substrat initial et l'apparition de topoisomeres intermédiaires (Goulaouic et al., 1999). Cette relaxation est MgCl2-dépendante, bien qu'une faible concentration soit suffisante pour obtenir une catalyse efficace. Ils ont montré que la hTopoIII α est également capable de cliver le simple-brin d'oligonucléotide et de se lier de façon covalente avec l'extrémité 5' de l'ADN clivé. L'ajout de 0.5M de NaCl inverse la réaction et provoque la religation de l'oligonucléotide. Les expériences utilisant différents oligonucléotides simple-brins ont permis de cartographier 21 sites de clivage et d'identifier la séquence 5'-CANNN<u>1</u>-3'comme une séquence consensus.

Récemment, le groupe de Teng a mis en évidence l'implication de la TopoIII dans les recombinaisons télomère-télomère chez la levure (Tsai et al., 2006). Il a été montré une deuxième activité de la TopoIII avec l'enzyme RecQ de *Escherichia coli* : la résolution de la convergence des fourches de réplication. Cette résolution est la réaction spécifique du couple RecQ/TopoIII et est médiée par l'interaction de ces deux enzymes avec la protéine SSB qui se lie avec l'ADN simple-brin (Suski and Marians., 2008).

5.4 <u>Partenaires de la TopoIII :</u>

L'identification des partenaires de la TopoIII constitue un enjeu majeur pour la compréhension du rôle de la TopoIII et de son mécanisme d'action.

5.4.1 Les hélicase de la famille RecQ :

Les hélicases sont des moteurs moléculaires utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP pour catalyser le remodelage des acides nucléiques, et notamment le déroulement de molécules d'ARN ou d'ADN double-brin. De nombreuses hélicases participent au maintien de l'intégrité du génome, chez l'homme, les gènes de cinq hélicases de la famille RecQ ont été identifiés, et des mutations dans trois d'entre eux : WRN, BLM et RecQL4 sont à l'origine des syndromes de Werner (WS) (Yu et al., 1996), de Bloom (BS) (Ellis et al., 1995) et de Rothmund-Thomson (RTS) (Kitao et al., 1999) respectivement. La mutation des deux copies du gène humain de *BLM* est à l'origine du syndrome de Bloom (BS), une maladie autosomale récessive rare qui se caractérise par une forte instabilité génétique, une prédisposition au

développement de tous les types de cancers et un nanisme (Bachrati and Hickson., 2003; Opresko et al., 2004). Le gène BLM est localisé sur le chromosome 15 en position 15q26.1 et code pour la protéine BLM de 1417 acides aminés, avec une région centrale contenant 7 motifs caractéristiques des hélicases (Ellis et al., 1995). Dans les cellules BS, l'instabilité génétique se manifeste par une augmentation du taux d'échange entre les chromatides sœurs médiée par les recombinaisons homologues et une hyper-recombinaison (Chaganti et al., 1974 ; Kuhn and therman., 2000). La forme tronquée de BLM responsable de BS est non fonctionnelle en raison de la perte de son domaine hélicase catalytique et/ou du domaine NLS localisé sur la région C-terminale de BLM (Hayakawa et al., 2000). BLM présente une activité 3'- 5' ADN hélicase ATP-dépendante et déroule le duplexe d'ADN (Karow et al., 1997). Il a été démontré que BLM joue un rôle dans la réparation de l'ADN via de multiples mécanismes: elle déroule les structures non canoniques de l'ADN causées par le blocage de la fourche, les structures G-quadruplexes et la D-loop (Sunet et al., 1998; Karow et al., 2000; Mohaghegh et al., 2001; Bachrati et al., 2006). Elle empêche également des événements de recombinaisons illégitimes au cours de la réplication, et est impliquée dans le redémarage de la fourche de réplication bloquée (Wu and Hickson., 2006; Bachrati and Hickson, 2008). BLM exerce encore un rôle régulateur dans les recombinaisons homologues, en agissant à la fois comme une antirecombinase qui catalyse la migration inverse des jonctions de Holliday (jonction à quatre brins d'ADN formée au cours du processus de recombinaison) et comme un promoteur de la recombinaison (Karow et al., 2000; Wu and Hickson, 2006; Hanada and Hickson, 2007). Les travaux de Wu et ses collaborateurs ont montré que BLM peut interagir spécifiquement avec la TopoIII α et stimule son activité de passage de brin d'ADN (Wu et al., 2000; Wu and Hickson., 2002). Des études réalisées in vitro ont montré que les actions combinées de l'hélicase BLM et de la TopoIII permettent la résolution de double-jonctions de Holliday sans créer de croisements de brin «crossing over», et fournissent une explication moléculaire aux fréquences élevées d'échanges entre chromatides sœurs observées chez les patients atteints du syndrome de Bloom (Wu and Hickson., 2003). Chez Saccharomyces cerevisiae, l'hélicase Sgs1 (homologue de BLM) a été initialement identifiée comme un suppresseur du phénotype du ralentissement de la croissance induit par la délétion de top3 (Gangloff et al., 1994). Sgs1 interagit avec la top3 via sa région N-terminale. L'interaction de la TopoIII avec les hélicases est considérablement conservée dans l'évolution. En dehors de BLM et Sgs1, la TopoIII interagit avec les hélicases rqh1+ chez S.pombe (Goodwin et al., 1999; Maftahi et al., 1999), RECQL1 (Johnson et al., 2000) et RECQL5 (Shimamoto et al., 2000).





Af: Aspergillus fumigatus; *At*: Arabidopsis thaliana; *Cw*: Crocosphaera watsonii; *Hs*: Homo sapiens; *Lm*: Leishmania major; *Nc*: Neurospora crassa; *Ng*: Neisseria gonorrhoe; *Ma*: Methanosarcina acetivorans; *Os*: Oryza sativa; *Sc*: Saccharomyces cerevisiae; *Sp*: Schizosaccharomyces pombe (D'après Hartung etvPuchta., 2004).

5.4.2 <u>BLAP75/RMI1 :</u>

Chez l'homme, le complexe BLM-TopoIIIα est étroitement associé avec un troisième facteur nommé BLAP75 (pour BLM Associated Protein 75) (Meetei et al., 2003) et RMI1 chez la levure. Cette protéine contenant un domaine de repliement OB, est essentielle pour l'intégrité et la stabilité du complexe BLM *in vivo*. BLAP75 (RMI1) colocalise avec BLM dans les foyers subnucléaires en réponse aux dommages à l'ADN, et sa délétion altère le recrutement

de BLM vers ces foyers. De plus, la déplétion de BLAP75 par siRNA altère la prolifération cellulaire et la phosphorylation de BLM durant la mitose. Les cellules déficientes en BLAP75 présentent un niveau élevé d'échanges entre chromatides sœurs, comme dans le cas de la déplétion de BLM par siRNA. Ceci montre que BLAP75 est un composant essentiel de la machinerie cellulaire associée à BLM/TopoIIIα qui maintient l'intégrité du génome (Yin et al., 2005). Le complexe BLM/TopoIII/BLAP75, ainsi nommé complexe BTB, est impliqué dans la résolution des double-jonctions de Holliday sans croisement (Wu et al., 2006). BLM et TopoIII sont essentielles pour cette résolution et BLAP75 stimule fortement la réaction (Raynard et al., 2006 ; Wu et al., 2006). Contrairement au mode de résolution des jonctions de Holliday classique chez la bactérie, ce nouveau mécanisme ne nécessite pas le clivage endonucléolytique des jonctions de Holliday. Il a été proposé que BLM converge des double-jonctions de Holliday via la migration des branches en des structures hémicaténanes (**Figure**



Figure (V-8) Modèle de la résolution des recombinaisons homologues dépendant de BLM.

(a) Génération d'une extrémité simple brin 3', cette extrémité est dépendante de Rad51, qui ensuite initie la recherche d'homologie. Rad51 catalyse l'invasion du brin d'ADN pour créer une D-loop. Quelques D-loops sont converties en des jonctions de Holliday. BLM intervient pour détruire la D-loop ou pour éliminer les jonctions Holliday par migration des branches.
(b) Model d'action de BLM-Topo IIIa- RMI1, pour éliminer les doubles jonctions Holliday. BLM favorise la convergence de jonctions Holliday par migration des branches afin de créer un hémicatenane. L'hémicatenane est résolu par l'activité de passage de brin de la topoisomérase IIIa, en liaison avec RMI1. Ce processus est appelé dissolution des jonctions Holliday (d'après Hanada and Hickson., 2007).

Ensuite, le complexe TopoIIIa-BLAP75/RMI1 résout les structures hémicaténanes à l'aide de l'activité de passage du simple-brin d'ADN de la TopoIIIa. De cette façon, la double jonction de Holliday est enlevée, sans aucun croisement. Puisque cette réaction est distincte de la résolution classique, elle a été nommée dissolution des jonctions de Holliday (Wu and Hickson., 2003). Des données récentes indiquent que les homologues de BLM et de TopoIIIa chez la drosophile sont également capables de catalyser la dissolution (Plank et al., 2006).

Il est probable que RMI1 interagit principalement avec la TopoIII dans le complexe BTB (Raynard et al. 2008). Contrairement à la protéine RPA, l'activité de la liaison à l'ADN de RMI1 est indispensable pour la stimulation de l'activité hélicase de BLM. La stimulation dépendante de BLM est produite à travers les interactions ADN-protéine et protéine-protéine alors que RMI1 affecte les fonctions de BLM seulement via des interactions spécifiques de type protéine-protéine. Cette différence intéressante suggère que le domaine de repliement OB des protéines RPA et RMI1 présente des mécanismes de stimulation fonctionnellement distincts pour ces deux protéines (Liu and West., 2008).

5.4.3 <u>BLAP18/RMI2 :</u>

Un autre membre du complexe BTB a été récemment isolé et caractérisé, BLAP18/RMI2. C'est un polypeptide de 15.8 kD qui contient également un domaine de repliement OB. Plusieurs données suggèrent que BLAP18/RMI2 soit essentiel pour le fonctionnement du complexe BTB ; BLAP18/RMI2 existe en grande partie avec la TopoIII et BLAP75/RMI1, sa délétion provoque une déstabilisation du complexe BTB et les cellules dépourvues de BLAP18/RMI2 présentent des cassures chromosomiques spontannées et sensibles au traitement par le méthanesulfonate méthyle (Singh et al., 2008 ; Xu et al., 2008). RMI1 et RMI2 interagissent via le domaine OB C-terminal de RMI1 et le domaine OB de RMI2 (**Figure V-9**).



Figure (V-9)

Représentation schématique de hRMI1 et hRMI2.

Les deux protéines recombinantes purifiées RMI1 et RMI2 s'associent de façon stable pour former un complexe hétérodimérique qui améliore fortement la solubilité par rapport à chacune des deux unités individuelles. En effet, il est probable que l'hétérodimère RMI1/RMI2 soit une protéine fonctionnelle réminiscant l'hétérotrimère RPA. Cependant, contrairement à RPA qui montre une très haute affinité pour l'ADN, le complexe RMI ne présente pas d'activité de liaison à l'ADN. Puisque il a été démontré que RMI1 seule se lie à l'ADN (Wu et al., 2006; Raynard et al., 2008), il est probable que l'interaction entre RMI1 et RMI2 inhibe leur habilité à fixer l'ADN. De plus, le domaine de liaison de RMI1 avec l'ADN a été cartographié dans la même région d'interaction avec RMI2 suggérant que l'inhibition se produit par compétition entre la liaison avec l'ADN et l'interaction protéine-protéine (Raynard et al. 2008; Xu et al. 2008). L'interaction stable de RMI1 et RMI2 a incité les équipes de Wang (Xu et al. 2008) et de Meetei (Singh et al. 2008) à analyser les effets de l'hétérodimère sur la capacité du couple BLM/TopoIII à résoudre les double-jonctions de Holliday. Singh et al ont observé une très légère stimulation de la résolution des DJHs qui peut être simplement due à l'amélioration de la stabilité du complexe RMI par rapport à RMI1 seule (Singh et al., 2008).

5.5 Interaction RMI1-RMI2-TopoIII-BLM :

Les recombinaisons homologues offrent un mécanisme cellulaire important pour la réparation des cassures double-brins induites par des agents endommageant l'ADN. Le taux des SCEs (échanges entre chromatides sœurs) normalement formés par les recombinaisons homologues est faible, probablement dû à la résolution des DJHs par l'activité du complexe BLM (Wu and Hickson 2003). De même, la formation spontanée des SCEs qui pourrait être produite lors de la réparation de la fourche de réplication bloquée est également supprimée (Kuzminov 2001; Cox 2002). Dans les cellules normales, il existe d'autres mécanismes pour réinitier la réplication, et il est supposé que le complexe BLM devrait agir par de multiples voies qui conduisent finalement à la reprise de la fourche sans croisement. Dans quelques voies de la réparation de la fourche, l'activité hélicase de BLM seule est suffisante pour la reprise de la fourche, tandis que d'autres voies telles que celles qui impliquent les DJHs nécessitent la présence d'un complexe complet incluant la TopoIII et probablement les protéines RMI (Liu and West., 2008). Les données actuelles suggèrent que RMI2 stabilise le complexe de BLM. Il a été démontré par utilisation d'interférence ARN que la stabilité de chacune des protéines RMI1, RMI2 ou TopoIII est dépendante les unes des autres (Xu et al. 2008; Singh et al. 2008). Ainsi, la perte de chacune des trois protéines induit une diminution significative du niveau protéique des deux autres facteurs. En revanche, le niveau protéique de BLM n'est pas changé et BLM n'a pas d'effet sur la stabilité des trois protéines. Il est probable que RMI1, RMI2 et TopoIII forment un hétérotrimère qui interagit avec BLM et forme un complexe (**Figure V-10**). RMI1 interagit directement avec RMI2 et TopoIII, cependant, il n'est pas clair si RMI2 interagit directement avec la TopoIII ou à travers RMI1.

En plus de son rôle dans la stabilisation, l'utilisation de la forme mutée de RMI2 (RMI2^{K121A}) montre que'elle joue un rôle régulateur de l'interaction du complexe RMI1–RMI2–TopoIII avec BLM (Xu et al., 2008). De plus, la mutation K121A inhibe l'interaction avec BLM de façon indépendante de RMI1 et de TopoIII, alors que ces deux derniers conservent leur interaction avec le mutant.



Figure (V-10)Représentation schématique du complexe de BLM et des
complexes possibles existant dans les cellules humaines
(D'après Liu and West., 2008).

Les interactions directes entre deux protéines sont indiquées par une double flèche continue noire alors que les interactions potentielles sont indiquées par une double flèche pointillée rouge.

Il est clair que la présence de RMI2 est critique pour la stabilité du complexe BLM. Il est également probable que RMI2 sert de médiateur pour lier BLM avec d'autres facteurs importants pour la réponse aux dommages de l'ADN. Il a été suggéré que la complexe RMI1-RMI2-TopoIII reconnaît les sites de dommages de l'ADN et relocalise BLM au niveau de ces sites via des interactions de type protéine-protéine (Liu and West., 2008). Toutefois, RMI1 et RMI2 possèdent une faible affinité pour l'ADN, l'interaction avec l'ADN pourrait être donc effectuée à travers la TopoIIIα.

En résumé, le complexe TopoIIIα/BLM est capable de résoudre *in vitro* des structures de type double-jonctions de Holliday (DHJ) formées au cours de la recombinaison homologue permettant de limiter les processus de croisement. Cette activité est modulée par les deux protéines partenaires, RMI1 qui joue le rôle de guide pour diriger la fixation à l'ADN de la TopoIIIα, et RMI2 qui régule les interactions au sein du complexe.

5.6 <u>TopoIIIα, hélicases, ALT, télomère et cancer :</u>

L'interaction entre les hélicases et les topoisomérases a été conservée au cours de l'évolution. Chez l'homme, l'hélicase BLM interagit physiquement et fonctionnellement avec la TopoIIIa. *In vitro*, le complexe BLM/TopoIIIa supprime les double-jonctions de Holliday sans échange de régions flanquantes (Wu et Hickson., 2003). Dans les cellules ALT, l'hélicase BLM est associée aux télomères et interagit avec les protéines télomériques TRF1 et TRF2 (Lillard-Wetherell et al., 2004). BLM co-localise également dans le noyau avec la TopoIIIa au niveau des corps PML, constituants majeurs des structures APBs caractéristiques des lignées ALT. L'interaction de la TopoIIIa avec BLM qui à son tour interagit avec le télomère et les protéines télomériques présume son implication avec vraisemblablement le complexe BLM dans le contrôle de la structure topologique ou dans les processus de recombinaison des télomères.

De plus, une publication récente a montré que la TopoIII est associée aux télomères et est impliquée dans les recombinaisons télomère-télomère chez la levure (Tsai and al., 2006).

L'importance de comprendre le mécanisme moléculaire de la voie ALT permet la résolution d'un problème crucial et intéressant dans la biologie des télomères, car le mécanisme ALT pourrait être à l'origine d'échecs thérapeutiques et / ou d'acquisition de résistances à la thérapie anticancéreuse basée sur l'inhibition de la télomérase. Par conséquent, l'identification de nouveaux facteurs impliqués dans le mécanisme ALT (dont la TopoIII α) est clairement une étape importante à l'égard de l'efficacité thérapeutique des inhibiteurs de la télomérase en clinique. Étant donné que le maintien des télomères est une étape obligatoire pour la survie des cellules cancéreuses, la combinaison d'un inhibiteur de la télomérase et un inhibiteur des facteurs responsables du mécanisme ALT (dont la TopoIII) pourrait représenter une stratégie thérapeutique anticancéreuse pour bloquer simultanément les deux voies de la télomérase et ALT dans les cellules cancéreuses.

Présentation des objectifs de l'étude

Les mécanismes de recombinaison font intervenir les topoisomérases, enzymes pouvant couper, manipuler et rejoindre des brins d'ADN afin d'en modifier la topologie. La topoisomérase IIIa est étroitement liée à l'hélicase BLM et le couple TopoIIIa/BLM est impliqué dans la résolution des jonctions de Holliday *in vitro* lors de la recombinaison homologue. De plus, BLM est localisée au niveau des extrémités télomériques des lignées ALT et est impliqué dans la résolution des structures G-quadruplexes *in vitro*.

Les objectifs initiaux de notre travail étaient de démontrer l'implication de la TopoIIIa dans les mécanismes ALT chez l'homme et d'étudier les effets d'un ligand de G-quadruplexe sur ces mécanismes.

Au début de notre travail de thèse, une publication du groupe de Teng a démontré le rôle de la TopoIII dans la recombinaison des télomères chez la levure, ce qui nous confortait dans notre approche.

Nous avons utilisé une double approche pour étudier le rôle de la TopoIIIa. Tout d'abord nous avons étudié la localisation et l'interaction de la TopoIIIa avec les télomères et les protéines télomériques. Ensuite, nous avons étudié les conséquences de la déplétion par siRNA de TopoIIIa sur la croissance et la structure des télomères. Cette approche a été effectuée comparativement entre les cellules ALT et télomérase positives.

Afin de mieux appréhender l'effet des ligands de l'ADN G-quadruplexe sur les télomères dans les lignées ALT, nous avons dans une deuxième partie, étudié l'effet de la télomestatine, sur la localisation de la TopoIIIα au niveau des APBs, avec les PML, BLM et les protéines du shelterin, TRF1, TRF2 et TIN2, et sur sa liaison avec l'ADN télomérique.

Nous avons également examiné si le traitement des cellules ALT par la télomestatine induit une modification de l'expression du complexe protéique TopoIIIa/TRF2/BLM. Nous nous sommes intéressés aussi à l'effet de la télomestatine sur la taille du simple-brin télomérique dans une lignée ALT.

Matériels et méthodes

- I. Culture cellulaire
 - **II.** Les plasmides
- III. Agents pharmacologiques utilisés
 - IV. Techniques de biochimie
- V. Techniques de biologie moléculaire

I. <u>Culture cellulaire :</u>

1. <u>Lignées cellulaires :</u>

La lignée cellulaire MRC5V1 de phénotype ALT dérive de la lignée de fibroblastes pulmonaires normaux MRC5 qui ont été immortalisés par l'antigène T de SV40, elle est fournie par Frédérique Megnin-Chanet (Institut Curie, INSERM U350 ORSAY).

La lignée EcR293 dérive de la lignée 293 de cellules embryonnaires rénales et a été obtenue auprès d'Invitrogen.

Les lignées U2OS (ALT), HT1080 et 293T (télomérase positives) proviennent de l'ATCC (Rockville, USA). La WI38-VA13 dérive de fibroblastes pulmonaires normaux WI38 immortalisés par l'antigène T de SV40 et ont été obtenues auprès de Londono-Vallejo (Institut Curie, Paris).

La GM08505, lignée immortalisée par le virus SV40 est issue d'une lignée de cellules déficientes en BLM, contenant une mutation homozygote de BLM (McDaniel et Schultz, 1992).

Les lignées MRC5V1, HT1080 et EcR293 ont été transfectées par le vecteur YFP-TopoIIIa.

La MRC5V1 a été co-transfectée par les constructions YFP–TopoIII α et CFP (TIN2, POT1, ou TRF2). Les lignées transfectées exprimant l'YFP-TopoIII α ont été triées par FACS et sélectionnées par clonage en présence de 400 mg/ml de généticine. Toutes les cellules sont cultivées en atmosphère humide (95 %) avec 5 % de CO₂ dans une étuve thermostatée à 37°C.

2. <u>Entretien des cellules :</u>

Les lignées cellulaires sont cultivées dans des boites de culture en plastique de 25cm² (NUNC), dans le milieu DMEM Glutamax (Invitrogen), complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Invitrogen) en présence de 1% d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine) (GIBCO). La lignée GM08505 est cultivée en milieu RPMI complémenté avec 20% de SVF avec 1% d'antibiotiques. A chaque passage, les cellules sont rincées dans du PBS 1X puis dissociées par action de 500µl de Trypsine-EDTA 1X (*GIBCOTM*) pendant 2 à 5 min à 37°C.

3. <u>Détermination de la viabilité cellulaire :</u>

L'évaluation de la concentration des cellules est effectuée à chaque passage par comptage à l'aide d'un hématimètre de Malassez sous microscope optique à contraste de phase en présence de bleu trypan. Les cellules vivantes ont la capacité à exclure le bleu de trypan dans

le milieu extérieur par l'action de leur barrière cytoplasmique active contrairement aux cellules mortes incapables d'éliminer ce produit qui s'accumule dans les cellules. L'observation des cellules au microscope permet de distinguer les cellules viables des cellules non viables.

3.1. Etude de la viabilité cellulaire en présence de la télomestatine :

Les cellules MRC5V1 ont été ensemencées dans des plaques à 6 puits à raison de 2.10^5 cellules /ml, dans 3ml de milieu de culture complet. Après 24 heures, les cellules adhérentes sont traitées par la télomestatine à des concentrations de 0.5, 1, 2 et 5µM et la viabilité des cellules a été suivie jusqu'à 72h de traitement. La télomestatine est préparée à 5 mM dans MeOH/Me₂SO4 (v/v). A partir de 1 µM, les dilutions sont effectuées dans de l'eau stérile. A la fin du traitement, les cellules adhérentes et détachées sont récupérées et énumérées. Le taux de viabilité est déterminé par le rapport du nombre de cellules vivantes/ le nombre total des cellules.

4. <u>Conservation des cellules :</u>

La congélation permet de conserver les cellules dans un état de viabilité compatible avec une utilisation future. Pour bien réussir la congélation, il est important que les cellules soient en phase exponentielle de croissance. Après lavage et trypsination du tapis cellulaire, le culot est repris dans du milieu contenant 70% de DMEM, 20% de SVF et 10% de dimethyl sulfoxide (DMSO) (*SIGMA*®). La congélation des cellules est réalisée dans des cryotubes de 2ml à raison de 10⁶ cellules/ml qui sont congelés pendant une heure à -20°, puis une nuit à -80° et ensuite transférés dans l'azote liquide. A l'inverse, la décongélation se fait rapidement au bain marie à 37°C, le culot cellulaire est resuspendu dans 2ml de SVF, centrifugé et repris dans du milieu de culture complet. Après la décongélation, il est important de faire au moins deux passages avant de les utiliser pour les manipulations.

II. Les plasmides :

Après amplification PCR, les fragments (YFP-TopoIIIα, CFP-TRF2, CFP-TIN2, h-POT1 ou CFP-POT1) sont digérés par des enzymes de restriction avant d'être insérés dans les vecteurs d'expression (pEYFP-N ou pECFP-C1) en fusion avec les protéines YFP ou CFP. Les différentes constructions utilisées sont reprises dans **le tableau 1**:

Construction	Construction d'origine	Plasmide	Site de digestion enzymatique
YFP-TopoIIIa	pET29H2-TopoIIIa	pEYFP-N1	BamH1, Xba1
CFP-TRF2	pCDNA3.1-TRF2	pECFP-C1	BamH1, Xba1
CFP-TIN2	pCDNA3.1-TIN2	pECFP-C1	BamH1, Xba1
h-POT1	pET22b-POT1	pECFP-C1	NcoI, XhoI
CFP-POT1	pET22b-POT1	pECFP-C1	BamH1, Xba1

Tableau (1)

Constructions utilisées.

III. <u>Agents pharmacologiques utilisés :</u>

1. <u>La télomestatine :</u>

La télomestatine est un produit naturel extrait de *Steptomyces anulatus*préparée, elle est préparée à 5 mM dans MeOH/Me2SO4 (V/V) et conservée à-20°C pendant 30 jours, les dilutions sont effectuées jusqu'à 100µM dans du DMSO, puis dans l'eau.

2. La camptothécine :

La camptothécine provient des laboratoires *Sigma*, c'est un alcaloïde pentacyclique extrait de *camptotheca acuminata* qui agit sur l'ADN topoisomérase I en bloquant la religation et en stabilisant un complexe ternaire camptothécine-ADN-TopoI lié de façon covalente à l'extrémité 5' de l'ADN. La solution est préparée à 1mM dans le DMSO, et les dilutions sont effectuées dans de l'eau stérile.

3. <u>La doxorubicine :</u>

La doxorubicine, isolée en France (laboratoire Rhône-poulenc), est utilisée dans la chimiothérapie du cancer. C'est une molécule appartenant à la famille des anthracyclines d'origine fongique. La doxorubicine s'intercale entre deux paires de bases d'ADN et stabilise la formation d'un complexe de clivage avec la TopoII. C'est une poudre de couleur rouge orangée, dissoute dans de l'eau stérile afin d'obtenir une solution à 10⁻³ M, elle doit être conservée à -20°C à l'abri de la lumière.

IV. <u>Techniques de biochimie :</u>

1. <u>Analyse de l'expression des protéines par western blot :</u>

1.1 <u>Principe :</u>

Le western blot est une des techniques les plus utilisée en biochimie dont le principe est basé sur une réaction anticorps-antigène. La technique permet de détecter la présence d'une protéine donnée dans un extrait à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre cette protéine. Les protéines extraites sont incubées en présence de SDS qui les dénature et leur confère une charge globale négative. Elles sont ensuite séparées sous l'influence d'un champ électrique en fonction de leur masse moléculaire, par passage à travers les mailles du réseau de polyacrylamide. Une fois séparées, les protéines sont électrotransférées à partir du gel de polyacrylamide vers une membrane de PVDF (Polyvinylidin DiFluoride) ou de nitrocellulose. La détection des protéines spécifiques est effectuée sur ces membranes par une réaction immunochimique. Après marquage de la protéine d'intérêt par son anticorps primaire spécifique, ce dernier sera reconnu par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La révélation des protéines se fait sur un film photographique par émission d'un signal luminescent de l'anticorps secondaire.

1.2 Matériels :

1.2.1 Les tampons :

- 1- Tampon de lavage : le PBS-T composé de : PBS 1X; Tween 20, 0.1% final.
- 2- Tampon de migration 10X : Tris 250mM pH 8,3; Glycine 2M; SDS 1%.
- 3- Tampon de tranfert 1X : Tris base 25 mM pH 8.3; Glycine 192mM.

1.2.2 Les gels :

La migration des protéines se fait sur un gel de polyacrylamide constitué de deux gels : gel de concentration et gel de séparation dont la composition est mentionnée dans le tableau 2.

Constituants	Gel de concentration : (4%)	Gel de séparation : (10%)
H2O	12ml	8.1ml
Polyacrylamide (mono/bis 29:1) (30%)	2.7ml	6.7ml
Tris HCL (pH 6.8)0.5M	5ml	5ml
SDS (10%)	100µ1	100µ1
Persulfate d'ammonium (10%)	200µ1	200µ1
EDTA (40%)	40µ1	40µ1
TEMED	15µ1	15µ1

Tableau (2)

Compositions des gels de polyacrylamide.

1.1 Protocole :

1.3.1 Extraction des protéines totales :

Les cellules traitées ou non sont récupérées par trypsination, centrifugées 5 min à 1500 rpm et lavées avec du PBS 1X froid. Les culots cellulaires sont placés dans la glace à 4°C ou congelés à -80°C, si nécessaire. Les culots sont resuspendus dans 100µl 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 1µg/mL chacun). Pour visualiser la protéine BLM, 330M NaCL sont ajoutés à la solution de lyse. Le lysat est incubé 30min à 4° puis centrifugé à 14000rpm pendant 30min pour éliminer les débris de parois. Les surnageants sont transférés dans des tubes Eppendorf propres et peuvent être conservés à -80°C.

1.3.2 Dosage du lysat protéique :

La concentration en protéine des lysats est déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Cette technique de dosage permet d'estimer par spectrophotométrie la concentration en protéines des extraits obtenus. Son principe est basé sur le fait que la longueur d'onde d'absorbance maximale d'une solution de bleu de coomassie augmente de 465 nm à 595 nm quand le colorant est fixé aux acides aminés aromatiques, notamment l'arginine.

200 μ l de réactif de Bradford (Biorad Protein Assay, BIO-RAD) sont ajoutés à 1 μ l d'échantillon dilué dans 800 μ l d'eau pure. La lecture au spectrophotomètre se fait à 595 nm contre une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA 1%) et est linéaire jusqu'à 10 μ g/ μ l de protéines dans l'extrait.

1.3.3 Migration et électro-transfert :

En se référant aux dosages effectués, $40\mu g$ de protéines sont mélangés avec du tampon de Laemmli 2X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8 ; SDS 2 % ; Glycerol 10 % ; dithiothréitol 100 mM ; Bleu de Bromophénol 0,1 %) additionnés de β -mercaptoethanol 5 %, puis dénaturés pendant 10 min à 99°C. Les échantillons peuvent être aliquotés et conservés à -80°C.

La séparation des protéines en fonction de leur taille est réalisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE). Les gels sont composés d'une fraction séparatrice d'acrylamide/bisacrylamide 7,5-12% (selon la taille des protéines) et d'une fraction concentratrice d'acrylamide/bisacrylamide 4%. Les échantillons repris dans du bleu de charge sont déposés sur le gel, un marqueur de masse moléculaire est utilisé comme référence de taille. La migration se déroule à température ambiante, sous un voltage constant de 200V.

Les protéines sont ensuite transférées du gel vers une membrane PVDF (porablot, Macherey Nagel). La membrane est préalablement trempée quelques secondes dans du méthanol avant d'être rincée à l'eau puis équilibrée dans du tampon de transfert. Le transfert s'effectue à 30V pendant une nuit, dans du tampon de transfert et à 4°C.

Après transfert, la membrane est colorée au rouge ponceau (Sigma Chemical Co, USA) à 10 % pour vérifier le transfert et la qualité de la migration, puis rincée abondamment à l'eau.

1.3.4 <u>Hybridation :</u>

Afin de saturer les sites non spécifiques, la membrane est bloquée pendant 1 heure à température ambiante sous agitation dans une solution de PBS-T avec 5% de lait. La membrane est lavée brièvement puis incubée avec les anticorps primaires dilués dans du tampon de saturation sous agitation légère pendant 1h à température ambiante. Après incubation, les membranes sont lavées trois fois, pendant 45 min, dans du tampon PBS 1X-Tween 0,1% avant d'être incubées 45 min avec l'anticorps secondaire anti-IgG correspondant, conjugué à une peroxydase et dilué 2500 fois. Après incubation, trois lavages de 15 min chacun sont nécessaires pour éliminer l'excès d'anticorps secondaire.
1.3.5 Immunodétection :

La révélation des Westerns blots est réalisée par une réaction de chimiluminescence en utilisant le kit SuperSignal®. Ce réactif contient du luminol et du peroxyde d'hydrogène. Sous l'effet de la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire, le luminol est oxydé en présence d'H2O2. La réaction de clivage s'accompagne d'émission de lumière au niveau de la bande protéique d'intérêt et cette dernière sera révélée en exposant la membrane à un film photosensible (Amersham). La membrane est mise alors en présence du réactif pendant 2 à 3 min puis placée dans une cassette d'exposition. Les films sont ensuite développés, fixés et séchés avant d'être scannés et quantifiés par le logiciel ImageQuant. Le poids moléculaire des bandes spécifiques ainsi révélées est déterminé grâce à la migration du marqueur de poids moléculaire déposé. Il est également possible de déshybrider les anticorps et d'utiliser un autre anticorps sur la même membrane. Pour ce faire, les membranes sont rincées au PBS-T puis incubées dans du tampon de déshybridation composé de 0.2M glycine et 0.05% tween, pendant 30 minutes. Les membranes sont ensuite rincées abondamment au TBS-T. Après saturation dans le lait à 5%, les étapes de l'immunodétection, décrites au dessus, sont répétées en utilisant d'autres anticorps primaires. Les anticorps utilisés, leur spécificité, leur concentration et le temps d'incubation sont reportés dans le tableau 3.

Anticorps	Source	Dilution	Incubation
Anti topoIIIa D6	Wu et al (2000)	1/1000	1H
Monoclonal anti TRF2 4A794	Upstate	1/500	1H
Anticorps BLM C18, sc-7790	Santa Cruz	1/100	1H
Monoclonal antiPARP clivé asp 214	Cell Signaling	1/1000	Sur la nuit à 4°C
Monoclonal anti β -actine clone AC-15	Sigma	1/10000	1H
Monoclonal Anti forme active Caspase3	Imgenex	1/500	Sur la nuit à 4°C
Anticorps IIaire IgG de chèvre anti- souris HRP conjugate	Upstate	1/2500	45min
Anticorps IIaire IgG de chèvre anti- lapin HRP conjugate	Upstate	1/2500	45min

Tableau (3)

Anticorps utilisés en western blot

2. L'immunoprécipitation :

2.1 <u>Principe :</u>

L'immunoprécipitation est une technique immunochimique largement répandue. L'immunoprécipitation suivie de SDS-PAGE et d'immunoblotting est principalement employée pour évaluer des interactions protéine/protéine. Son principe consiste à utiliser un anticorps spécifique à une protéine pour fixer cette protéine dans un extrait soluble. Les complexes d'anticorps-protéine sont précipités avec l'ajout d'une forme insoluble de protéines fixant les anticorps tels que la protéine A ou la protéine G.

2.2 <u>Protocole :</u>

Pour les expériences d'immunoprécipitation, les cellules sont ensemencées dans des boîtes de culture de 175cm^2 à raison de 2.5×10^5 cellules/ml. Les cellules sont récoltées et les protéines sont extraites dans 250 µl de tampon de lyse RIPA, 250µl de PBS 1X sont ajoutées au lysat. Après un prétraitement des billes en BSA 3%-PBS, pendant une heure à 4°C, 100 µl des billes de protéines G-Sépharose (GE Healthcare) sont incubées pendant 10min avec 5 mg de lysat protéique à 4°C. Le surnageant est récupéré après centrifugation à 12000 rpm pendant 10min à 4°C. L'extrait protéique est ensuite incubé pendant une nuit à 4 °C soit avec un anticorps spécifique dirigé contre la protéine TopoIIIa, TRF2 ou BLM, soit avec un anticorps non spécifique IgG contrôle (de souris pour TRF2, de lapin pour la TopoIIIa, de chèvre pour BLM). Les extraits sont ensuite lavés 3 fois au PBS1X à 4°. Après centrifugation, les culots sont dénaturés pendant 10 min à 100°C dans 60µl de bleu de charge. Les protéines immunoprécipitées dans les culots sont résolues par électrophorèse PAGE-SDS puis analysées par Western Blot.

3. Immunofluorescence :

L'immunofluorescence est une technique basée sur la formation d'un complexe antigèneanticorps marqué avec un anticorps fluorescent, permettant la visualisation et la localisation de la protéine au microscope à fluorescence.

3.1 <u>Préparation des lames</u> :

Les cellules MRC5V1 et U2OS sont ensemencées à une concentration de 10^4 cellules /ml sur des lamelles placées au fonds de puits de 9.5 cm². Pour le marquage avec l' α -tubuline, les cellules sont cultivées sur des lames de poly-L-lysine. Après les différents temps de traitement

par les ligands ou les siRNAs, le milieu de culture est aspiré, les cellules sont lavées deux fois au PBS1X avant d'être fixées avec 4 % de paraformaldéhyde dans du PBS1X pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées deux fois au PBS 1X puis perméabilisées pendant 15min avec le tampon de perméabilisation préchauffé à 37°C et contenant 20 mM de Tris-HCl (pH 8) ; 50 mM NaCl ; MgCl2 3mM ; sucrose 300 mM et 0,5% triton X-100. Après deux lavages au PBS 1X, les préparations sont mises en saturation pendant 1 heure à température ambiante dans une solution de BSA à 5% dans du PBS 1X. Les lamelles sont ensuite incubées pendant 1 à 2 heures avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation, puis lavées trois fois au PBS1X avant d'être incubées pendant 45 min avec l'anticorps secondaire correspondant. Trois lavages sont également effectuées afin d'éliminer le reste d'anticorps. Par la suite, les lamelles sont montées sur les lames avec une goutte d'un milieu de montage contenant du cytifluor (antifading) et du DAPI à 1µM, puis fixées avec du verni. Les lames peuvent être conservées à 4°C plusieurs semaines. Les différents anticorps utilisés en immunofluorescence, leur spécificité, leur concentration et le temps d'incubation sont indiqués dans **le tableau 4** :

Anticorps	Source	Dilution	Incubation	Espèce
Anticorps topoIIIa Clone D6	Wu et al (2000)	1/1000	1h	Lapin
Anticorps TRF2 4A794	Upstate	1/500	1h	Souris
Anticorps TRF1 C19, sc-1977	Santa cruz	1/1000	2h	Chèvre
Anticorps BLM C18, sc-7790	Santa Cruz	1/100	2h	Chèvre
Anticorps PML-PGsc-966	Santa Cruz	1/100	1h	Souris
Anticorps α-tubuline C B5-1-2	Sigma	1/1000	1h	Souris
Anti phosphoHistone H2A.X (Ser139)	Upstate	1/1000	2h	Souris
Anti TIN2 SC-13651	Santa cruz	1/100	2h	Souris
Alexa fluor 488(Vert)	Invitrogen	1/1000	45min	Souris
Alexa fluor 568(rouge)	Invitrogen	1/1000	45min	Souris
Alexa fluor 568(rouge)	Invitrogen	1/1000	45min	Chèvre

Tableau (4)

Anticorps utilisés en immunofluorescence

3.2 Imagerie :

Les cellules sont analysées à l'aide d'un vidéo-microscope en utilisant des filtres appropriés (filtre DAPI, fluorescence verte et rouge) et un grossissement 100x. L'acquisition des images se fait à l'aide du logiciel *Metamorph* (Roper Scientific, Duluth, GA). Pour chaque acquisition, 60 à 100 plans de 16 bits sont enregistrés avec un pas de 0,12 mm et une faible intensité d'éclairage. Le traitement de données et la déconvolution sont effectués grâce aux logiciels *Metamorph* et *ImageJ*.

V. <u>Techniques de biologie moléculaire :</u>

1. Le gel retard :

1.1 <u>Principe :</u>

L'interaction des protéines purifiées avec l'ADN a été étudiée par la technique de retard sur gel appelée aussi *EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)*. C'est une technique qui permet la visualisation des complexes ADN/protéine fonctionnels. La protéine se fixe sur l'oligonucléotide, la formation du complexe protéine-ADN retarde sa propre migration par rapport à l'ADN libre. La variation de migration de la sonde complexée aux protéines est suivie grâce au marquage radioactif au P³² des sondes nucléotidiques. Il est ainsi possible d'étudier par *EMSA* l'affinité relative des protéines aux oligonucléotides en utilisant des oligonucléotides compétiteurs non marqués.

1.2 <u>Protocole :</u>

1.2.1 Marquages radioactifs des oligonucléotides :

Les oligonucléotides utilisés dans les expériences de fixation directe ou indirecte ont été radioactivement marqués en 5' avec du γ - ATP [³²P], en incubant pendant une heure à 37°C 20pmoles d'oligonucléotide; 80µCi de γ - ATP [³²P];1µl de polynucléotide kinase T4 (T4 PNK) et 2µl de tampon composé de 70 mM Tris-HCl;10 mM MgCl2; 5 mM dithiothreitol; pH 7.6 dans un volume final de 20µl. Les sondes sont ensuite purifiées sur colonnes *Quiagen* (nucleotide removal kit) et conservées à 4°C pendant deux semaines environ.

1.2.2 Choix d'oligonucléotides :

Pour les expériences de fixation directe et indirecte des protéines, nous avons choisi différents oligonucléotides télomériques et non télomériques, capables ou non de former des structures

en G-quadruplexe. La séquence des différents oligonucléotides, ainsi que leurs propriétés sont indiquées dans **le tableau 5**.

Oligonucléotide	Séquence	Taille	Propriété
Brin C	5'CCCTAACCCTAACCCTAACCCTAA 3'	24	Simple brin télomérique
21G	5'GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG 3'	21	Simple brin télomérique forme un G4
21Gmut3	5'GGCTTACGGTTAGCGTTAGGG 3'	21	Simple brin télomérique avec trois mutations guanine empêchant la formation d'un G4
Pu22myc	5'GAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAG 3'	22	Simple brin non télomérique qui forme un G4
Pu22mu	5'GAGGGTGAAGAGGGTGGGGAAG 3'	22	Simple brin non télomérique avec deux mutations de guanine empêchant la formation d'un G4
hPot1S310	5'CCAGCTCTGCTITGCATCTIT3'	21	Simple brin non télomérique
Double brin DS26	5'CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG3' 3'GTTAGCCTAGCTTAAGCTAGGCTAAC 5'	26	Double brin non télomérique
WT-Tel26	5'TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT 3'	26	Simple brin télomérique, forme un G4
Tel1-G	5'ATCGTCCTAGCAAGGGGTTAGGGTTAGGG TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG TTA 3'	62	Simple brin télomérique
Tel1-C	5'CTAACCCTAACCCTAACCCTA 3'	21	Simple brin télomérique
Tel2-G	5'GGCTGCTACCGGCACATCGTCCTAGCAAG GTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG3'	54	Simple brin télomérique complémentaire à Tel2-C
Tel2-C	5'CCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCTTG CTAGGACGATGTGCCGGTAGCAGCC-3'	54	Simple brin télomérique complémentaire à Tel2-G

Tableau (5)

Oligonucléotides utilisés pour l'étude de la fixation des protéines par la technique du gel retard.

1.2.3 Incubation et transfert :

Les expériences de fixation directe de la TopoIIIa, TRF2 ou POT1 sur les oligonucléotides ont été réalisées à 4°C, en incubant pendant 30 min, 2nM d'oligonucléotide radiomarqué avec des concentrations croissantes de protéines, dans un tampon réactionnel (1x) composé de : 50mM d'Hepes (PH 8); 0.1 mg/ml BSA; 1mM DTT; 2% glycérol et de 0.1M Nacl. La réaction de fixation est arrêtée par ajout de 2µl de ficoll à 20%. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 1%, TBE 0.5X et séparés par électrophorèse dans du tampon TBE 0,5X sous 4.5V/cm², pendant 45min à température ambiante. Le gel est ensuite récupéré, fixé 10 min dans un bain d'acide acétique à 10% et séché entre un papier DE81 et un papier Wattman pendant une heure à 60° puis une heure à 80°. Une fois séché, le gel est exposé à un écran photosensible pendant une nuit, puis scanné dans le *phosphoimager* (Typhoon 9210, Amersham). Les bandes obtenues sont quantifiées par le logiciel *ImageQuant*.

1.2.4 Les super shifts :

Les super shifts sont réalisés afin de confirmer la fixation spécifique d'une protéine sur un oligonucléotide. Pour cela, l'anticorps D6 anti-TopoIIIa a été ajouté au même milieu réactionnel, l'interaction de l'anticorps avec sa protéine spécifique retarde encore la migration et une deuxième bande apparaît plus haute qui correspond au complexe ADN-Anticorps-protéine.

1.2.5 Les expériences de compétition pour la fixation de la protéine TopoIIIa :

Les expériences de compétition ont pour but de définir l'affinité de la protéine aux différents oligonucléotides. Pour chaque expérience, deux oligonucléotides, l'un marqué (à une concentration fixe), l'autre non marqué (à des concentrations variables) sont testés. Nous déterminons la concentration d'oligonucléotide non marqué nécessaire pour déplacer la fixation de la protéine sur l'oligonucléotide marqué. La quantité d'oligonucléotide marqué sur lequel est fixée la protéine et la quantité d'oligonucléotide libre ont été quantifiées par le logiciel *ImageQuant*. Pour chaque compétiteur, nous avons calculé le facteur F_0/F qui représente le rapport de la fraction de TopoIII α fixée sur l'oligonucléotide marqué en l'absence de compétiteur divisé par la fraction de TopoIII α fixée sur le même oligonucléotide en présence d'une concentration de compétiteur donnée.

2. <u>Transfection des cellules par le siRNA TopoIIIα et BLM :</u>

2.1 <u>Principe :</u>

En 1998, il a été mis en évidence, chez les nématodes, la capacité des ARN double-brins à induire la dégradation des ARN homologues simple-brins (Fire. A et al, 1998). Plus récemment, ces données ont été rapportées chez d'autres organismes eucaryotes. Sous l'action d'une ribonucléoprotéase cellulaire (Dicer), les ARN double-brins sont découpés en petites molécules de 21 à 23 nucléotides appelées les siRNA pour *small interfering RNA*, ces molécules ont alors la capacité de reconnaître de façon spécifique un ARNm cible dans la cellule et de le dégrader.



Figure (V-1) Principe de l'ARN interférence par siRNA.

A l'intérieur de la cellule, les duplexes de siRNA sont incorporés dans un complexe protéique appelé RISC (RNA-Induced Silencing Complex) où ils servent de guide pour la reconnaissance de la cible et la dégrader. Ceci mène à l'inactivation d'un gène d'une manière séquence spécifique. De nombreuses études suggèrent que les siRNA sont un outil rapide, simple et efficace pour l'étude de la fonction d'un gène.

2.2 Protocole :

Pour les siRNA TopoIII α , les cellules EcR293, HT1080, MRC5-V1, U2OS, et WI38-VA13 sont mises en culture sur des plaques à six puits à raison de $3x10^5$, $4x10^5$, $2.5x10^5$, $1x10^5$, et $6x10^4$ cellules par puit, respectivement. Le nombre de cellules ensemencées de chaque lignée a été déterminé de façon que les cellules soient à semiconfluence au moment de la transfection. Après 18 heures de culture, 100 nM de siRNA (TopoIII α et contrôle) et 33nM de lipofectamine 2000 (Invitrogen) sont incubés séparément 15 min dans des tubes avec 1ml de milieu DMEM dépourvu de SVF et d'antibiotiques, les tubes sont doucement homogénéisés puis la solution contenant le siRNA est versée goute à goute sur celle contenant la lipofectamine, le tout est incubé 20 min à température ambiante. Le milieu de culture des cellules est aspiré, les cellules adhérentes sont lavées au PBS1X pour éliminer tout le sérum, la solution contenant le siRNA et la lipofectamine est ajoutée aux cellules.

Pour les siRNA BLM, les cellules U2OS et HeLA sont ensemencées avec une concentration de 2 à $3x10^5$ cellules par puits, elles sont transfectées par 100 nM de siRNA BLM (Dharmacon) ou de siRNA contrôle non spécifique (Dharmacon) et 33nM de Dharmafectamine.

Six heures après la transfection, le milieu de culture est remplacé par du milieu de culture complémenté avec du SVF mais sans antibiotiques. Après les différents temps de transfection (24, 48 ou 72 h), les cellules sont soit trypsinées et récupérées afin d'étudier l'expression des protéines par western blot, soit fixées pour l'étude de localisation des protéines au niveau du télomère par imagerie. Les différents siRNA utilisés sont indiqués dans **le tableau 6**

Séquences siRNA	Nucléotide
Sil TopoIIIa: 5'ACAUCGGGUUUGAGAUUAU3'	462
Si2 TopoIIIa : 5'CCAGAAAUCUUCCACAGAA3'	788
Si TopoIIIa 3 : 5'GGACAAAUUUGUGGUUCUA3'	1798
Si control : 5'UGCGCUACGAUGGACGAUG 3'	

Tableau (6)

siRNA TopoIII et contrôle utilisés

Le taux de la viabilité cellulaire des cellules transfectées par chaque siRNA est déterminé à l'aide de la coloration par le bleu de trypan. L'efficacité des siRNAs TopoIIIa et BLM est confirmée par l'observation de la diminution spécifique de l'expression des protéines en Western Blot.

3. Expérience d'hybridation en solution :

3.1. <u>Principe :</u>

La technique d'hybridation en solution permet de mesurer la taille du simple-brin télomérique (Gomez et al, 2003b), elle est basée sur la quantité d'hybridation du brin C radiomarqué avec le simple-brin télomérique. Le pourcentage d'hybridation du brin C radiomarqué sur la partie simple-brin télomérique détermine les variations de la longueur du télomère. En cas de raccourcissement ou d'une conformation en G-quadruplexe du simple-brin, la quantité de sonde hybridée sera diminuée.

3.2. Protocole :

Après 72h de traitement à la télomestatine, 10⁶ cellules MRC5V1 sont trypsinées et lavées au PBS 1X, les culots sont récupérés par centrifugation à 1000 rpm pendant 5 min. Les ADN sont extraits à partir de colonnes *Quiagen* (DNA extraction kit) et sont repris dans 70µl du tampon TE (Tris : 10mM pH 8.0, EDTA : 0.5mM). Le dosage de l'ADN est effectué par spectrophotométrie à 280 nm. Afin de réajuster la concentration des ADN dosés, 1µg d'ADN est déposé sur un gel d'agarose 1%, puis révélé dans le phosphoimager (Typhoon 9210, Amersham) après coloration au BET. Les bandes d'ADN sont quantifiées par le logiciel *ImageQuant* et la concentration est réajustée.

Le marquage du brin C est réalisé selon le protocole utilisé pour la technique du retard sur gel, l'hybridation se fait à 50°C pendant 12h, en incubant 1 µg d'ADN en présence de 0.5 pmoles de sonde radiomarquée 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). La séparation des échantillons se fait par électrophorèse 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 ensuite séché sur un papier Whatman à 42°C pendant 30min. Afin de déterminer la quantité des ADN totaux déposés, la fluorescence du BET est évaluée et est exposée à un écran photosensible dans une cassette pendant au moins 24h. Le gel est scanné et le signal de radioactivité est quantifié par rapport à la quantité totale d'ADN.

4. <u>Immunoprécipitation de la chromatine :</u>

4.1. <u>Principe :</u>

L'immunoprécipitation de la chromatine «*ChIP*» consiste à purifier des complexes ADNprotéines, liés par du formaldéhyde. Expérimentalement, les séquences nucléotidiques sont clivées en fragments par sonication. La protéine d'intérêt est immunoprécipitée, l'ADN sur lequel elle était liée est récupéré et amplifié par PCR avec des primers choisis sur les régions promotrices d'intérêt ou bien hybridé avec une sonde spécifique.

4.2. Protocole :

4.2.1 Cross-link et sonication :

Les cellules sont mises en culture dans des boites de pétri de 100mm et sont fixées 10 min dans du formaldéhyde à 37% (270µl pour 10ml de milieu de culture). La réaction de fixation est arrêtée par ajout de 1ml de glycine (10X) pendant 5 min à température ambiante. La boite de pétri est placée sur la glace, le milieu est aspiré et les cellules sont lavées deux fois au PBS1X froid. 1µl de cocktail d'inhibiteurs de protéase dilué 1000 fois dans du PBS1X sont ajoutés aux cellules. Le culot cellulaire est récupéré par centrifugation à 7000g pendant 5min à 4°C, il peut être également conservé à -80°C. 10⁶ cellules sont resuspendues dans 200µl d'un mélange de SDS Lysis Buffer/Proteases Inhibitor Cocktail 1X final. Après 15min de sonication, le surnageant est récupéré par centrifugation à 15000g pendant 10min à 4°C. La sonication permet d'obtenir des fragments de chromatine de 1Kb.

4.2.2 Le pré-clearing :

Pour chaque IP, une solution de 4.5μ l du Cocktail d'inhibiteurs de Protéases et 60 μ l de la protéine G-Sépharose (Amersham; préalablement saturée avec 30 mg de BSA) sont dilués dans 900 μ l du tampon de dilution, le tout est mélangé avec 100 μ l d'ADN soniqué. Un Préclearing d'une heure à 4°C sous rotation est suivi d'une centrifugation à 5000g pendant 1min à 4°C.

4.2.3 Immunoprécipitation :

Pour l'input, 10 μ l de surnageant sont prélevés et conservés à 4°C jusqu'à l'étape d'élution des complexes Protéine/DNA. Les extraits sont ensuite incubés une nuit à 4°C sous rotation, soit avec l'anticorps anti-IgG (1 μ g/ μ l) soit avec l'anticorps d'intérêt (1-10 μ g). Les protéines précipitées sont récupérées par centrifugation pendant 1min à 5000g.

4.2.4 Lavages :

Le culot est lavé avec trois tampons différents. Le premier est à faible teneur en sel, le deuxième à forte teneur en sel et le troisième est riche en LiCL. Après chaque lavage le culot est récupéré par centrifugation de 3000–5000 g, pendant 1min à 4°C. Le culot est ensuite lavé deux fois dans du TE et centrifugé de la même façon.

4.2.5 Elution des complexes ADN/protéines :

L'ADN est élué des billes de sépharose en ajoutant 200µl de tampon d'élution pour l'input et 100µl pour les IP. Après 15min d'incubation, le surnageant est récupéré par centrifugation à 5000g pendant 1min. 100µl de tampon d'élution sont remis sur le culot 15min puis centrifugé, et le surnagent est repris avec le premier.

4.2.6 <u>Reverse cross-link :</u>

Après addition de 8µl de Nacl (5M) dans chaque tube, les échantillons sont incubés une nuit à 65° C. Les échantillons sont ensuite incubés avec la RNaseA pendant 30min à 37° C. La digestion est effectuée en ajoutant une solution de 1 µl de Proteinase K, 4 µl d'EDTA 0.5M et 8 µl Tris-HCl 1M pendant 1-2 h à 45° C.

4.2.6 <u>Purification de l'ADN (IP + INPUT) :</u>

La purification de l'ADN a été réalisée avec le kit de ChIP (*Chromatin Immunoprecipitation Assay Kit, Upstate*) selon le protocole du fournisseur. Les échantillons sont ensuite dosés, l'éluat (ADN purifié) peut être conservé à -20C. Les résultats sont vérifiés par PCR quantitative ou PCR classique.

Résultats

Partie I: Rôle de la topoisomérase IIIα dans la prolifération cellulaire et le maintien de l'élongation des télomères par le mécanisme ALT.

Partie II:La télomestatine (ligand des G-quadruplexes) inhibe la fixation de la Topoisomérase IIIαaux oligonucléotides formant des G-quadruplexes etdéprotège les télomères des cellules ALT.

I. Rôle de la topoisomérase IIIα dans la prolifération cellulaire et le maintien de l'élongation des télomères par le mécanisme ALT

1. <u>Introduction :</u>

Deux types de mécanismes permettent de maintenir la longueur des télomères chez l'homme. Le premier correspond à l'activité de la télomérase et le second à une activité de recombinaison entre les télomères (mécanisme ALT).

Les cellules ALT sont caractérisées par des télomères de taille très hétérogène, la présence de structures APBs formées par l'ADN télomérique, les protéines télomériques et d'autres facteurs impliqués dans la réparation et la recombinaison de l'ADN.

Le(s) mécanisme(s) proposé(s) dans la voie de recombinaison ALT comportent l'envahissement de la partie double-brin d'un autre ADN télomérique (chromosomique ou extra-chromosomique) par l'extrémité 3' simple-brin d'un télomère court, suivi de l'élongation de cette extrémité 3' par synthèse d'ADN en utilisant comme matrice le brin complémentaire (**Figure A**)



Figure (A) Mécanismes proposés dans la voie de recombinaison ALT; a) inter-télomérique, b) intra-télomérique, c) extra-chromosomique.

Plusieurs protéines de la recombinaison sont impliquées dans ce mécanisme, parmi lesquelles SGS-1, une hélicase de la famille **RecQ**, chez la levure déficiente en activité télomérase. Chez l'homme, les équivalents de cette hélicase, **BLM** et **WRN** sont mutés dans plusieurs syndromes (Bloom, Werner...) caractérisés par des phénotypes de sénescence précoce, d'instabilité chromosomique et de forte prédisposition aux cancers (Hanada and Hickson.,

2007). Des données récentes indiquent que ces hélicases sont recrutées aux télomères et interagissent avec les protéines télomériques. Ainsi, l'expression d'un dominant négatif de WRN dans des cellules télomérase positives produit une altération de la protection des télomères en perturbant la réplication du brin G télomérique. Au début de notre travail de thèse une étude a démontré chez la levure le rôle de la topoisomérase III (TopoIII) dans la recombinaison des télomères en absence d'activité télomérase (Tsai et al., 2006).

La TopoIII appartient à la famille ubiquitaire des topoisomérases de type IA, présente chez les procaryotes et chez les eucaryotes. L'inactivation de la TopoIII chez la levure provoque un phénomène d'hyper-recombinaison entre des séquences répétées et une croissance très ralentie (Wallis et al., 1989). Chez les mammifères, deux isoenzymes alpha et beta codés par deux gènes différents sont présents et l'invalidation de l'isoforme alpha est létale au stade embryonnaire. La Topo III est impliquée dans la stabilité du génome et l'association de la Topo III avec les hélicases de la famille RecQ prendrait en charge ou supprimerait divers intermédiaires de recombinaison apparaissant notamment pendant la réplication ou la réparation. Une interaction physique et génétique existe entre TOP3 et SGS-1 chez la levure et notre équipe a démontré avec le groupe de Ian Hickson en 2000 que chez l'Homme la TopoIII et BLM interagissaient *in vitro* et *in vivo* (Wu et al., 2000). Ces deux enzymes colocalisent dans le noyau au niveau des corps PML (Promyelocytic Leukemia).

Contrairement aux Topo I et II, la Topo III est une topoisomérase qui montre une préférence pour l'ADN simple-brin (Goulaouic et al., 1999) et la liaison de BLM à la Topo III stimule l'activité catalytique de l'enzyme (Wu and Hickson., 2002). Le couple BLM/Topo III peut résoudre *in vitro* les doubles jonctions Hollidays apparaissant au cours des recombinaisons en stimulant l'activité décaténase simple-brin de la TopoIII (Wu and Hickson., 2003). Cette activité empêche la formation des « crossing over » lors de la recombinaison et nécessite l'action concertée de ces deux enzymes. Plus récemment, deux autres partenaires de ce complexe, RMI1 et RMI2 ont été identifiés (Meetei et al., 2003 ; Singh et al., 2008 ; Xu et al., 2008). Il a été proposé que le couple fonctionne comme un complexe de réparation en réponse aux défauts de la réplication (Ababou et al, 2000; Wang et al, 2000; Amor-Gueret, 2006).

Une autre activité des hélicases de la famille RecQ est de pouvoir résoudre *in vitro* la formation des structures G-quadruplexes telles que celles formées à l'extrémité télomérique (Sun et al., 1998).

Enfin, il a été démontré que dans les cellules ALT, BLM colocalise également avec les protéines télomériques TRF1 et TRF2 impliquées dans la régulation de la longueur des télomères (Yankiwiski et al., 2000 ; Stavropoulos et al., 2002).

Les activités catalytiques de décaténase simple-brin et de résolution des structures G4 du couple TopoIII/ BLM en font un système enzymatique particulièrement adapté pour résoudre des problèmes de conformation (ouverture et fermeture) de la t-loop et le contrôle des recombinaisons ALT (voir **Figure 7**).

Leur implication effective dans le contrôle de la réplication des télomères chez l'homme restait à démontrer et correspond à notre projet de thèse.

Le fonctionnement potentiel du couple TopoIII/BLM au cours des processus de recombinaison au niveau des télomères, eux mêmes capables de former des structures en G-quadruplexes, et l'intérêt de notre équipe pour les ligands de G-quadruplexe nous ont amenés à étudier si l'activité de la TopoIII aux télomères pouvait être altérée par l'utilisation de ces ligands. Ce qui correspondait à la deuxième partie de notre travail de thèse.

2. <u>But du travail :</u>

L'objectif de cette première partie était d'examiner le rôle de la TopoIIIa dans le maintien des télomères des lignées ALT et télomérase positives en utilisant deux approches complémentaires. Nous avons tout d'abord étudié sa localisation au niveau des APBs avec la protéine PML et les composants du complexe shelterin TRF2, POT1 et TIN2, puis son interaction physique avec TRF2.

En parallèle, nous avons voulu mettre en évidence l'interaction de la TopoIIIα avec l'ADN télomérique, par des expériences de retard sur gel en utilisant des oligonucléotides comportant des séquences télomériques, et par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).

Dans une deuxième approche, nous avons étudié l'importance de la TopoIII α pour la prolifération des cellules ALT et télomérase positives en utilisant les techniques d'ARN interférence. Trois siRNA différents ont été conçus et utilisés pour confirmer les phénomènes observés. En parallèle, nous avons étudié les conséquences de la déplétion de la TopoIII α sur l'intégrité des télomères en examinant d'une part la formation des ponts anaphasiques souvent associés avec le dysfonctionnement des télomères, et d'autre part la formation des TIFs (Telomere Dysfunction-induced foci) au niveau des télomères, détectés par la présence de la forme phosphorylée de γ H2AX. Les résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue EMBO Journal (2008).

3. <u>Publication :</u>

Topoisomerase III α is required for normal proliferation and telomere stability in alternative lengthening of telomeres.

3.1 <u>Résumé en français :</u>

La Topoisomérase III α est associée avec l'hélicase BLM, qui peut jouer un rôle important dans le processus d'élongation des télomères par recombinaison en l'absence de la télomérase (Alternative Lengthening of Telomere). Ici nous montrons que dans les cellules ALT, la TopoIII α colocalise avec les protéines télomériques au niveau des APBs. Dans ces cellules, la TopoIII α immunoprécipite avec TRF2 et BLM. Nous montrons par immunoprécipitation de la chromatine que la TopoIII α est associée avec l'ADN télomérique, suggérant que ces protéines forment un complexe au niveau des séquences télomériques. La déplétion de la TopoIII α par siRNA affecte la prolifération cellulaire des lignées ALT mais pas celle des lignées télomérase positives. De plus, la répression de l'expression de la TopoIII α dans les cellules ALT réduit l'expression des protéines TRF2 et BLM, et provoque une forte augmentation de la formation des ponts anaphasiques, elle induit également la dégradation du simple brin télomérique et l'apparition des dommages à l'ADN. Cependant, le maintien des télomères et le niveau de l'expression de TRF2 n'a pas été affecté dans les cellules télomèrase positives. Nous concluons que la TopoIII α est un facteur important associé aux télomères et essentiel pour le maintien et la stabilité des chromosomes des cellules ALT.

3.2 <u>Publication :</u>

Topoisomerase IIIα is required for normal proliferation and telomere stability in alternative lengthening of telomeres



¹Laboratoire d'Onco-Pharmacologie, JE 2428, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France, ²Laboratoire de Régulation et dynamique des génomes, INSERM U565, CNRS UMR5153, Muséum National d'Histoire Naturelle USM503, Paris, France, ³Institut Curie, Section de Recherche, CNRS UMR 2027, Centre Universitaire, Orsay, France, ⁴Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, CNRS UMR 5089, Toulouse, France, ⁵Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, CNRS UMR 5239, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France and ⁶Laboratoire Télomères et Cancer, CNRS UMR 7147, Institut Curie, Paris, France

Topoisomerase (Topo) IIIa associates with BLM helicase, which is proposed to be important in the alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway that allows telomere recombination in the absence of telomerase. Here, we show that human Topo IIIa colocalizes with telomeric proteins at ALT-associated promyelocytic bodies from ALT cells. In these cells, Topo IIIa immunoprecipitated with telomere binding protein (TRF) 2 and BLM and was shown to be associated with telomeric DNA by chromatin immunoprecipitation, suggesting that these proteins form a complex at telomere sequences. Topo IIIa depletion by small interfering RNA reduced ALT cell survival, but did not affect telomerasepositive cell lines. Moreover, repression of Topo IIIa expression in ALT cells reduced the levels of TRF2 and BLM proteins, provoked a strong increase in the formation of anaphase bridges, induced the degradation of the G-overhang signal, and resulted in the appearance of DNA damage at telomeres. In contrast, telomere maintenance and TRF2 levels were unaffected in telomerase-positive cells. We conclude that Topo IIIa is an important telomere-associated factor, essential for telomere maintenance and chromosome stability in ALT cells, and speculate on its potential mechanistic function.

The EMBO Journal (2008) **27,** 1513–1524. doi:10.1038/ emboj.2008.74; Published online 17 April 2008 *Subject Categories*: genome stability & dynamics; differen-

tiation & death

Keywords: ALT; BLM; G-overhang; telomere; topoisomerase; TRF2

Received: 12 July 2007; accepted: 19 March 2008; published online: 17 April 2008

Introduction

DNA topoisomerases (Topo) are ubiquitous enzymes that are required for nearly all aspects of DNA metabolism (Wang, 1996; Nitiss, 1998; Champoux, 2001). DNA topoisomerases induce transient breaks in DNA that are associated with a covalent topoisomerase/DNA complex to allow strand passage or enzyme swivelling, which results in the topological state modification of DNA. DNA topoisomerases are divided into four groups, type IA, IB, IIA, and IIB (Wang, 2002). Type IA DNA topoisomerases are conserved in all organisms and function to remove highly negative supercoils; they are assumed to have a fundamental role in the regulation of the topology of replication and recombination intermediates (Wu and Hickson, 2001; Wang, 2002). The budding yeast Saccharomyces cerevisiae expresses a single type IA topoisomerase encoded by the TOP3 gene, initially identified in the $top3\Delta$ strain by a slow growth phenotype and hyper-recombination between repetitive DNA sequences, such as rDNA (Wallis et al, 1989). The deletion of SGS1, whose product belongs to the RecQ family of DNA helicases involved in the maintenance of genome stability, suppresses the TOP3 lossof-function phenotype. It was subsequently shown that Sgs1p forms a complex with Top3p (Gangloff et al, 1994; Hickson, 2003).

Humans have two members of the IA subfamily, Topo IIIa and Topo III β (Wang, 2002). Topo III α exists in a complex with BLM, a RecQ helicase whose mutation is responsible for Bloom's syndrome (BS) (Johnson et al, 2000; Wu et al, 2000). In biochemical assays, Topo IIIa has a weak DNA relaxation activity on double-stranded DNA but is able to bind, cleave, and religate single-stranded DNA (Goulaouic et al, 1999). The interaction of BLM with Topo IIIa stimulates the strand passage activity of Topo IIIa (Wu and Hickson, 2002). Furthermore, Topo IIIa and BLM cooperate to convert double Holliday junctions (DHJ) to decatenated products in vitro, suggesting a putative role of the complex in the resolution of recombination intermediates (Wu and Hickson, 2003). Recently, BLAP75/RMI1 was identified as a third component of the BLM/Topo IIIa complex; this protein is also highly conserved among eukaryotes (Chang et al, 2005; Yin et al, 2005). BLAP75/RMI1 recruits Topo III α to DHJ and its depletion by RNA interference increases the frequency of sister chromatid exchanges (Yin et al, 2005; Wu et al, 2006). Under normal cell growth conditions, BLM and Topo IIIa colocalized in promyelocytic (PML) nuclear bodies together with many other proteins, including Rad50, Mre11, NBS1, p53, and Sp100 (Johnson et al, 2000; Yankiwski et al, 2000), and this localization is disrupted in BS cells (Johnson et al, 2000). The Topo IIIa/BLM complex was also proposed to function as a repair complex in response to replication defects and may restart stalled replication forks (Ababou et al, 2000; Wang et al, 2000; Amor-Gueret, 2006). Following camptothecin treatment, a phosphorylated form of BLM dissociates from



^{*}Corresponding author. Laboratoire de Régulation et dynamique des génomes, INSERM U565, CNRS UMR5153, Muséum National d'Histoire Naturelle USM503, 43 rue Cuvier, CP26, 75231 Paris Cedex 5, France. Tel.: + 33 1 40 79 36 98; Fax: + 33 1 40 79 37 05; E-mail: riou@mnhn.fr ⁷These authors contributed equally to this work

the Topo III α /BLM complex at its PML storage sites and accumulates with γ -H2AX at replication damage sites (Rao *et al*, 2005).

Telomeres consist of repetitive G-rich DNA sequences that protect the chromosome ends from fusion and illegitimate recombination. In human somatic cells, telomere length decreases at each round of division and cellular mechanisms that counteract this degradation are able to confer indefinite proliferation potential. Two classes of mechanisms have been described in human tumor cells that allow the maintenance of telomere length. The first requires a specialized enzyme, called telomerase, which is able to copy, as a reverse transcriptase, the short TTAGGG motif at the 3' end of telomeres. Telomerase is composed of a catalytic subunit, hTERT, associated with an RNA containing the template of the telomere repeat unit, hTR. Telomerase is overexpressed in a large number of tumours (about 85%) and is involved in the capping of telomere ends (McEachern et al, 2000). The second mechanism is observed in tumours (about 15%) as well as in immortalized cell lines lacking telomerase activity and involves recombination between telomeres, a mechanism known as alternative lengthening of telomeres (ALT) (Dunham et al, 2000; Londono-Vallejo et al, 2004). ALT cells display a heterogeneous telomere length and particular nuclear foci termed ALT-associated PML bodies (APB) that contain, in addition to PML, telomeric DNA, telomere binding proteins (TRF1 and TRF2), and several proteins involved in DNA synthesis, repair, and recombination. The latter include the MRE11/RAD50/NBS1 complex and the RecQ helicases WRN and BLM (Kim et al, 1995; Yeager et al, 1999; Grobelny et al, 2000; Wu et al, 2000; Huang et al, 2001; Lillard-Wetherell et al, 2004; Tsai et al, 2006). In yeast, telomerasenegative survivors with heterogeneous telomere sequences (type II) also involve a telomere-telomere recombination mechanism that requires Rad50p, Rad52p, and Sgs1p (Huang et al, 2001) as well as Top3 (Kim et al, 1995; Tsai et al, 2006).

Telomeres end in a 3' single-stranded overhang that may be involved in different DNA conformations such as t-loop and/or G-quadruplexes (Mergny et al, 2002; de Lange, 2005). T-loops are created through strand invasion of the 3' telomeric overhang into the duplex part of the telomere and are thought to represent a strategy to protect chromosome ends. They might also correspond to recombination intermediates. TRF2 is required for the establishment of t-loops and these structures are presumably involved in protecting the DNA at the telomeric single/double-strand junction (de Lange, 2005). RecQ helicases associated with the telomeric complex, such as WRN or BLM (Lillard-Wetherell et al, 2004), cooperate with POT1 (protection of telomere 1), a protein that binds specifically to the single-strand telomeric sequence, to unwind telomeric forked duplexes and D-loop structures (Opresko et al, 2005).

Therefore, Topo III α might participate in solving topological issues arising from the action of a RecQ helicase during telomere recombination/replication in the ALT pathway. We have examined whether Topo III α is required for the correct maintenance of telomeres of ALT and telomerase-positive cells. We show that Topo III α interacts with TRF2 independently of its interaction with BLM and forms a complex with TRF2 and BLM at APB in ALT cells. Topo III α interacts with telomeric DNA as shown by chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays in ALT cells and its depletion by small interfering RNA (siRNA) leads to the accumulation of anaphase bridges and to telomere uncapping and is associated with cell growth arrest. As Topo III α interacts *in vitro* with singlestranded telomeric sequences, we suggest that the BLM/Topo III α /TRF2 complex at APB is involved in the maintenance of telomeres in ALT cells, possibly through the resolution of intermediate DNA structures that arise during telomere recombination.

Results

Colocalization of Topo III at APB with PML and shelterin subunits in ALT cells

Indirect immunofluorescence staining with an anti-Topo IIIa antibody detected Topo IIIa protein organized into multiple nuclear foci in the ALT cell lines WI38-VA13, MRC5-V1, and U2OS (Figure 1A and Supplementary Figure S1A). Antibodies that recognize the human TRF2 and PML proteins were used to identify APB in these cells. Topo $III\alpha$ foci were large and bright and an almost complete colocalization (>90%) of Topo IIIa, TRF2, and PML was observed (Figure 1A and Supplementary Figure S1A). To confirm that Topo III α is a component of APB, MRC5-V1 cells were stably transfected with YFP–Topo III α and stained with TRF2 or PML antibodies (Figure 1B and D) or cotransfected with other CFP-tagged shelterin components (CFP-TRF2, CFP-POT1, or CFP-TIN2) (Figure 1C and D). The results showed a strong colocalization of YFP-Topo IIIa, POT1, TIN2, TRF2, and PML in agreement with the indirect immunofluorescence results. Similar experiments were performed in two telomerase-positive cell lines (EcR293 and HT1080) and indicated that YFP-Topo $\ensuremath{\text{III}}\alpha$ perfectly colocalizes with PML (Supplementary Figure S1B). In contrast to ALT cells, only rare colocalizations were observed between TRF2 foci and YFP-Topo IIIa in interphase nuclei from telomerase-positive cells (Figure 1C, arrows, and Supplementary Figure S2). During mitosis, the Topo IIIa signal is absent from condensed chromosomes in both ALT and telomerase-positive cells (Supplementary Figure S2). These results indicate that Topo IIIa is localized at APB in ALT cells. In contrast, Topo IIIa foci mostly correspond to PML foci in telomerase-positive cells in agreement with previous studies (Johnson et al, 2000; Wu et al, 2000).

Topo Illa interacts with TRF2

To test for a physical interaction between telomeric proteins and Topo IIIa, we performed co-immunoprecipitation experiments in U20S, MRC5-V1 ALT, HT1080, and 293T telomerase-positive cell extracts. In the complex precipitated by the Topo IIIa D6 antibody, we detected TRF2 by immunoblotting (Figure 2). A similar result was obtained for EcR293 telomerase-positive cells and WI38-VA13 ALT cells (data not shown). Immunoblotting with an anti-BLM antibody also revealed the presence of BLM in the Topo IIIa complex (data not shown). To investigate this further, the reverse experiments using an anti-TRF2 antibody was performed in telomerase-positive and ALT cells (Figure 2). For unknown reason that could include the presence of the epitope close to the protein interaction region or the relative abundance of these proteins in nuclei, we were unable to reproducibly coimmunoprecipitate Topo IIIa using TRF2 antibody (Figure 2 and data not shown). Despite modifications of the immuno-





Figure 1 Topo III α colocalizes with PML and shelterin components at APB in MRC5-V1 ALT cells. The stable expression of a YFP-tagged Topo III α protein was also used to determine its localization. (A) Colocalization of Topo III α (red, detected by immunofluorescence) with TRF2 or PML (green, detected by immunofluorescence. (B) Representative images of colocalization in MRC5-V1 of Topo III α tagged with YFP (Topo III α ::YFP, green), with TRF2 or PML (red, detected by immunofluorescence). (C) Representative images of colocalization in MRC5-V1 of Topo III α tagged with YFP (Topo III α ::YFP, green) with TIN2 tagged with CFP (blue, TIN2::CFP), POT1 tagged with CFP (blue, POT1::CFP), or TRF2 tagged with CFP (blue, TRF2::CFP). (D) Representative images of colocalization in MRC5-V1 of Topo III α tagged with YFP (Topo III α ::YFP, green), TRF2 tagged with CFP (TRF2::CFP, blue), and PML (red detected by immunofluorescence).

precipitation protocol using milder detergent conditions, the use of nuclear extract, and the use of other TRF2 antibodies, we were unable to recover significant amounts of Topo III α in TRF2 immunoprecipitates (Supplementary Figure S3).



Figure 2 Topo III α /TRF2 complex is detected in telomerase-positive and ALT cells as revealed by immunoprecipitation with D6 Topo III α antibody. The antibodies (TRF2, Topo III, or control IgG) used for immunoprecipitation (IP) are listed at the top of each panel and the antibodies (BLM, Topo III, and TRF2) used for western blot analysis (WB) are listed at the left of each panel. Topo III α communoprecipitates TRF2 in HT1080 or 293T (telomerase-positive) and in U2OS or MRC5-V1 (ALT) cell lines. Reciprocal immunoprecipitation of Topo III α by TRF2 antibody (4A794, mouse) is not detected in 293T, U2OS, or MRC5-V1 and is unreproducible in other cells.

Next, we investigated whether the BLM/Topo III α /TRF2 complex depended on the presence of DNA by evaluating its resistance to DNase treatment. The MRC5-V1 protein extract was treated with DNase I (data not shown). This treatment did not impair the recovery of TRF2 and BLM from Topo III α immunoprecipitates, suggesting the existence of DNA-independent interactions among BLM, Topo III α , and TRF2 in ALT cells.

We further determined whether the TRF2/Topo III α complex was stable in the absence of the BLM protein by using the telomerase-positive and BLM-deficient GM08505 cell line (data not shown). Immunoprecipitation experiments indicated that TRF2 and Topo III α interacted, suggesting that these two proteins form a BLM-independent complex. Thus, we concluded that the presence of BLM is not required for Topo III α /TRF2 interaction.

These data suggest that the Topo III α /TRF2 complex might exist as part of a multiprotein complex in telomerase-positive and ALT cells.

Topo IIIa associates with telomeric DNA in ALT cells

Next, we studied the *in vitro* interaction of purified recombinant Topo III α (Goulaouic *et al*, 1999) with telomeric DNA by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using oligonucleotides corresponding to double-stranded telomeric repeats with a 3' G-rich single-stranded extension (Tel-1) or without the single-stranded region (Tel-2) (Figure 3). Gel shift assays with increasing concentrations of Topo III α were performed



Figure 3 Topo III α interacts with telomeric sequences *in vitro*. EMSA were performed using 5 nM of telomeric template with a 3' single-stranded extension (Tel-1, left panel) or without the single-stranded region (Tel-2, right panel) (see Materials and methods for details) in the presence of increasing concentrations (50, 150, 250, and 350 nM) of purified recombinant Topo III α (Goulaouic *et al*, 1999). For Tel-1, a Topo III α /DNA bandshift was detected at 50 nM, suggesting a preferential binding to the 3' single-stranded extension.

in the presence of 5 nM of radiolabelled oligonucleotide. Topo III α bound to the telomeric substrate with a 3' G-overhang (Tel-1) with a band shift detectable at a concentration as low as 50 nM (Figure 3, left panel). Under the same experimental conditions, a Topo III α band shift was detected on the DNA substrate without the G-overhang extension (Tel-2) at a concentration equal to 150 nM (Figure 3, right panel), suggesting that Topo IIIa bound to the G-overhang sequence, in agreement with the known preference of Topo IIIa for singlestranded DNA (Goulaouic et al, 1999; Chen and Brill, 2007). To determine whether TRF2 and Topo IIIa form a complex at single-stranded telomeric DNA, retardation assays were also performed using the 21G oligonucleotide (Supplementary Figure S4). Owing to its short size (21 nucleotides), the binding of Topo III or TRF2 requires higher protein concentrations (>350 nM). The addition of Topo III α and TRF2 induces the formation of a higher molecular weight complex (see arrow), suggesting the formation of a ternary Topo III α / TRF2/DNA complex. A similar result was obtained with the 21Gmu3 oligonucleotide in which three guanines of the telomeric sequence have been replaced by cytosines (Supplementary Figure S4), indicating that the complex formation is not sequence dependent. A ternary complex was also obtained using the double-stranded DS26 oligonucleotide (Supplementary Figure S4, arrow). In these conditions, the binding of TRF2 on this nontelomeric sequence is nearly undetectable, indicating that Topo IIIa recruits TRF2 onto DNA by direct interaction.

To evaluate whether Topo III α is associated with telomeric DNA, ChIP experiments were performed in ALT and telomerase-positive cells (293T, HeLa, HT1080, MRC5-V1, U2OS, and WI38-VA13). In a first set of experiments, telomeric DNA immunoprecipitated by Topo III α was analysed by PCR amplification (Cawthon, 2002) and a smear indicative of telomeric DNA was detected in all cell lines tested (result not shown).

Determination of the relative Topo III α amount at the telomere, as compared to other repeated sequences in the genome, was performed using a dot blot hybridization assay using telomeric and Alu repeat probes in 293T, MRC5V1, and U2OS cells (Figure 4). TRF2 was used as a positive control. The results indicated that the amount of telomeric DNA recovered by TRF2 immunoprecipitation was nearly



Figure 4 Topo III α interacts with telomeric sequences *in vivo* as shown by ChIP. Three different cell lines (telomerase-positive 293T and MRC5-V1 and U2OS ALT cell lines) were evaluated after ChIP with TRF2 or Topo III α antibodies. IgG antibodies were used as negative controls. Total input fractions (2.5 and 1%) and antibody-recovered fractions (10% of input) were subjected to Southern blot analysis using telomeric or ALU repeat-specific probes. (**A**) Representative ChIP experiment. (**B**) Quantification of radioactivity by ImagequantTM software of the experiment presented in (A). The percentage of precipitated DNA was calculated as a ratio of input (telomeric or Alu) signals and plotted.

equivalent in the telomerase-positive and ALT cell lines (Figure 4B and data not shown). In contrast, the amount of telomeric DNA recovered by Topo IIIa immunoprecipitation was higher in ALT cells than in 293T cell line, and corresponded to a specific association with telomeric sequence when compared to Alu (Figure 4A and B). The relative increase of telomeric DNA immunoprecipitation by Topo IIIa in ALT cells, as compared to 293T (defined as 1), was equal to 3.2 ± 0.7 -fold for U2OS and 5.6 ± 2.9 -fold for MRC5-V1 (Figure 4B and data not shown). These data suggest that Topo IIIa has a marked preference for telomeric DNA in ALT cells. As a hallmark of ALT cells is their extreme heterogeneity in telomere length due to homologous recombination and the presence of extra chromosomal telomeric repeats (ECTR or t-circles) (Dunham et al, 2000; Cesare and Griffith, 2004; Londono-Vallejo et al, 2004; Wang et al, 2004), we cannot exclude the possibility that the increased ratio of Topo III α at telomeric DNA relative to Alu DNA in ALT cells was due to binding to ECTR rather than to telomeres.

siRNA directed against Topo IIIa inhibits ALT cell growth

To examine the importance of Topo III $\!\alpha$ for ALT cell growth, Topo III $\!\alpha$ gene expression was downregulated by

RNA interference using specific siRNA oligonucleotide duplexes. Three siRNAs, Si-1, Si-2, and Si-3 Topo III α , were designed to target the Topo III α cDNA sequence (NM004618) and evaluated for effects on Topo III α expression levels in the MRC5-V1 cell line 72 h after siRNA transfection. Immunoblots indicated that the Topo III α protein level decreased when cells were treated with Si-1 and Si-2 (60–70%) as compared to the control siRNA (Figure 5A). No significant decrease was observed when cells were treated with Si-3. An evaluation of the time course of the effect of Si-1 in MRC5-V1 cells indicated a marked decrease in Topo III α levels at 72–96 h after transfection (76–83%)

(Figure 5B). We next determined the importance of Topo IIIa for the growth of various ALT (MRC5-V1, U2OS, and WI38-VA13) and telomerase-positive (EcR293 and HT1080) cell lines 24-96 h after Si-1 transfection (Figure 5C). In parallel, the efficiency of the Topo IIIa depletion was evaluated by immunoblotting using the anti-Topo IIIa antibody 72 h after transfection (Figure 5C). For the five cell lines tested, the decrease in Topo IIIa protein level ranged from 60 to 80%. Treatment of the three ALT cell lines with Si-1 Topo $III\alpha$ induced a strong reduction in cell growth, as compared to control siRNA-treated cells. Growth inhibition began at 48 h after Si-1 transfection. Cell growth inhibition induced by Si-1 treatment was also associated with a reduction in cell viability determined by Trypan blue exclusion, which decreased to 32, 22, and 50% of controls for MRC5-V1, U2OS, and WI-38-VA13 cells, respectively, but without significant induction of apoptosis, measured by PARP1 and caspase-3 cleavage (Supplementary Figure S6).

In contrast, depletion of Topo III α by RNA interference using Si-1 in telomerase-positive cell lines (EcR293 and HT1080) did not alter the proliferation of these cells compared to cells treated with control siRNA (Figure 5C). This difference between telomerase-positive and ALT cells was also observed when HT1080 and U2OS cells were treated with Si-2 (Supplementary Figure S5A). These results showed that Topo III α is essential for the proliferation of ALT cells but not for telomerase-positive cells over the time course of the assay.

Topo Illα depletion induces anaphase bridge formation, G-overhang signal decrease, and TRF2 depletion in ALT cells

Telomere binding proteins such as TRF2 and its partners such as TIN2, RAP1, and Apollo have a pivotal role in the maintenance of the integrity of telomeres (de Lange, 2005; Lenain *et al*, 2006; van Overbeek and de Lange, 2006). As our results indicated that Topo III α forms a complex with TRF2 in ALT cells, we examined the importance of Topo III α for telomere integrity by analysing the formation of anaphase bridges, usually associated with a telomere dysfunction (Figure 6). In MRC5-V1 and U2OS cells transfected with Si-1 (100 nM), a large number of cells containing anaphase bridges were observed (72–87.5% of cells) as compared to those treated with control siRNA (11–17.5%) (Figure 6A). In contrast, the formation of anaphase bridges was similar (17%) in Topo III α -depleted HT1080 cells compared to cells treated with control siRNA (15%).

Four different kinds of anomalies during anaphase were distinguished in MRC5-V1 cells treated with the siRNA target-

ing Topo III α (Figure 6B). Anaphase cells with one unique bridge (17%; Figure 6B, panel a), multiple bridges (48%; panel b), quasi-complete entanglement (25%; panel c), and cross-shaped bridges (10%; panel d) were observed after Topo III α depletion. These results suggested that chromosome entanglement or telomere dysfunction is induced by Topo III α depletion in ALT cells but not in the telomerasepositive HT1080 cells; treatment of telomerase-positive cells with siRNA had no effect on the percentage of cells that contained anaphase bridges. Similar results were obtained using Si-2 Topo III α in HT1080 or U2OS cells (Supplementary Figure S5B).

To further study the role of Topo III α in the stability or maintenance of the telomere ends, we evaluated the amount of G-overhang telomere DNA in telomerase-positive and ALT cells after treatment with the siRNA targeting Topo III α using solution hybridization experiments (Figure 7A and B). Downregulation of Topo III α in HT1080 cells had no effect on the G-overhang signal, whereas a strong reduction was observed in ALT cells (MRC5-V1, U2OS, WI38-VA13) ranging from 40 to 60% of the signal from corresponding control siRNA.

As Topo IIIa, BLM, and TRF2 can form a complex, we investigated whether Topo IIIa depletion had an effect on the BLM and TRF2 protein levels. Western blot analysis for Topo IIIa, BLM, and TRF2 proteins was performed on cells treated with Si-1 72 h after transfection (Figure 7C and D). Topo III α depletion was associated with a significant decrease in BLM protein levels in telomerase-positive (HT1080) and ALT (MRC5-V1, U2OS) cells, ranging from 36 to 84%. Interestingly, we also observed a decrease in TRF2 protein levels in ALT cells (56-74%) but not in HT1080 cells (2%). These results are consistent with the notion that Topo IIIa, TRF2, and BLM form a complex in ALT cells and that Topo III α and TRF2 interact with telomeric sequences. The reduced protein level of TRF2 in ALT cells treated with Si-1 might be responsible for the telomere dysfunction observed in these cells. Similar results were obtained using Si-2 Topo IIIa in HT1080 or U2OS cells (Supplementary Figure S5C).

Topo IIIa depletion induces telomere dysfunction-induced foci in ALT cells

To determine whether Topo IIIa depletion affected telomere integrity, we also tested ALT cells for DNA damage that colocalized with telomeres. Telomere dysfunction-induced foci (TIF) can be detected due to the presence of γ -H2AX, a phosphorylated variant of histone 2A that associates with DNA double-strand breaks. U2OS cells transfected with Si-1 were analysed after 48 h for γ -H2AXcontaining foci that colocalized with TRF1. There was a low level of γ -H2AX foci in control U2OS cells (11.2 \pm 2.5 foci/ nuclei) with only 5.6 ± 0.5 colocalizing with TRF1 (Figure 8), in agreement with previous observations (Nabetani et al, 2004). Consistent with G-overhang shortening and telomere uncapping (TRF2 loss), in Si-1-treated cells we an increased number of γ-H2AX observed foci $(48.8\pm8.7 \text{ foci/nuclei})$ with $49.7\pm9.3\%$ colocalizing with TRF1 (Figure 8), suggesting that Topo IIIa depletion triggers a DNA damage response that takes place, at least in part, at telomeres.



Figure 5 Effect of Topo IIIα depletion by RNA interference on telomerase-positive and ALT cells growth. (**A**) Representative example of effect of three different siRNAs targeting Topo IIIα (Si-1, Si-2, and Si-3; see sequences in Materials and methods) and a control siRNA (C) on the amount of intracellular Topo IIIα protein at 72 h in the MRC5-V1 (ALT) cell line. The loading control was β-actin. The per cent decrease of Topo IIIα compared to treatment with the control is indicated at the bottom. (**B**) Data from a representative experiment in MRC5-V1 (ALT) cell line with Si-1. Negative control siRNA at 72 h (c_{72}) and the amount of Topo IIIα before treatment (t_0) are shown as controls. The per cent decrease of Topo IIIα relative to the control is indicated at the bottom. (**C**) Effect of Topo IIIα depletion (Si-1, 100 nM) on the growth of telomerase-positive (EcR293 and HT1080) and ALT (MRC5-V1, U2OS, and WI38-VA13) cell lines for up to 96 h after transfection. The results are expressed relative to control siRNA-treated cells, defined as 100%, and correspond to the mean value and standard deviation of three independent experiments. As a control for Topo IIIα depletion, a western blot experiment performed in parallel is presented at the bottom of each growth curve. Protein extracts from Si-1-treated cells at 72 h (Si-1/72 h) or from control siRNA-treated cells (C) were blotted using antibodies against Topo IIIα and β-actin.

BLM depletion reduces ALT cell growth but does not modify Topo IIIa or TRF2 protein levels in telomerase-positive and ALT cells

Our results showing that Topo III α depletion was associated with a significant decrease in BLM protein levels in

telomerase-positive and ALT cells prompted us to check whether BLM depletion has an effect on Topo III α or TRF2 protein levels. We thus analysed Topo III α and TRF2 protein expression after 48 or 72 h of siRNA-mediated depletion of BLM in HeLa cells or U2OS cells. As shown in Figure 9A,

siRNA-mediated depletion of BLM was very efficient, and we did not detect any change in Topo IIIα or TRF2 protein levels in both BLM-depleted HeLa and U2OS cells. However, BLM depletion significantly reduced the growth of U2OS cells, whereas it did not modify the growth of HeLa cells; growth inhibition of BLM-depleted U2OS cells was clearly detectable as early as 48 h after si-BLM transfection (Figure 9B), but was clearly weaker than the growth inhibition induced by Topo III depletion in U2OS cells (Figure 5C and Supplementary Figure S5A).

Discussion

One important finding of this work is that Topo III α is present at telomeric sequences in both ALT and telomerase-positive cells. In ALT cells, ChIP with Topo IIIa antibody indicated that Topo IIIa was preferentially bound to telomeric DNA over Alu sequences and that Topo IIIa colocalized with TRF2 and BLM (Lillard-Wetherell et al, 2004). In telomerase-positive cells, there was a lower or no association of Topo IIIa with telomeric chromatin as evaluated by ChIP and by costaining with TRF2, respectively; however, we observed that a significant amount of TRF2 immunoprecipitated with Topo IIIa antibody in both telomerase-positive and ALT cells. The TopoIIIa/TRF2 complex was also detected in BLM-deficient telomerase-positive cells, indicating that the formation of TRF2/TopoIIIa complexes is independent of BLM. Despite evidence of substantial Topo IIIa and TRF2 association in telomerase-positive cells, the significant interaction of Topo IIIa with telomeric sequences by ChIP, together with the interaction with TRF2 observed by immunoprecipitation may suggest a transient function for Topo IIIa during telomere maintenance or replication. On the other hand, we cannot exclude a direct association between TRF2 and Topo IIIα independent of a telomeric context, linked to additional functions of TRF2 in double-strand break repair of DNA (Mao et al, 2007). We conclude that Topo III α is preferentially recruited to telomeres or at ECTR in ALT cells and that a detectable interaction at telomeric sequences and with TRF2 is also found in telomerase-positive cells, the significance of which remains to be determined.

Our *in vitro* results indicated that Topo III α binds better single-stranded than double-stranded telomeric sequence, a result in agreement with the known preference of Topo III α for single-stranded DNA. As TRF2 can introduce a torsional stress in telomeric DNA, a process that increases

Figure 6 Topo IIIa depletion increases anaphase bridge formation in ALT cell lines. (A) Per cent of cells in mitosis harbouring anaphase bridges 72 h after transfection with control siRNA (grey bar) or Si-1 (white bar). Numbers of cells in mitosis and anaphase, percentage of cells with anaphase bridges, and standard deviation are indicated for each cell line for control siRNA (C) and for the siRNA targeting Topo IIIa Si-1 (Si). Experiments were performed in triplicate, except for WI38-VA13 (single determination). NA indicates not applicable. (B) Representative images of the types of anaphase bridges observed: (a) single anaphase bridge, (b) multiple anaphase bridges, (c) abnormal anaphase bridges or chromosome entanglements, and (d) cross-like anaphase bridges. Cells were immunolabelled with $\alpha\text{-tubulin}$ antibody (green; see Materials and methods) and DNA was stained with DAPI (blue). Only the merge pictures (tubulin/DNA) and the DAPI stainings (DNA) are shown. Magnification and z-variation of this structure from the bottom to the top of the cell are shown under the main pictures.

single-stranded bubbles in duplex DNA (Amiard *et al*, 2007), Topo III α might have a general role in telomere physiology by resolving TRF2-mediated topological



The EMBO Journal VOL 27 | NO 10 | 2008 1519



Figure 7 Effect of Topo III α depletion on G-overhang signal and stability of the Topo III α /BLM/TRF2 complex. (**A**) Representative experiment showing the effect of Topo III α depletion on the telomeric G-overhang signal in HT1080 and U2OS cells. DNA was extracted from cells 72 h after transfection with the control siRNA (C) or with Si-1 (si₁). The G-overhang signal was evaluated by nondenaturing solution hybridization with a telomeric probe. G-overhang: signal obtained with the (AATCCC)₄ probe; EtBr: ethidium bromide DNA staining in the gel. (**B**) Quantification of the effect of Topo III α depletion on the G-overhang signal in four different cell lines. The G-overhang hybridization signal was normalized relative to the EtBr signal. The results are expressed as the percentage of G-overhang signal in control siRNA-transfected cells, defined as 100%. Mean ± s.d. is of three independent experiments, including those presented in (A), except for W138-VA13 (two experiments). (**C**) Representative experiment showing the effect of Topo III α depletion on the stability of the Topo III α /BLM/TRF2 complex in HT1080 and U2OS cells by western blot analysis. Cell extracts were prepared 72 h after transfection with the control siRNA (C) or with Si-1 (si₁). (**D**) Quantification of the effect of Topo III α depletion on the BLM, TRF2, and Topo III α protein levels in HT1080, U2OS, and MRC5-V1 cell lines. The results are expressed as the percentage of protein level remaining relative to control siRNA-treated cells. Mean ± s.d. is of three independent experiments, including those presented in (C).

intermediates. This topological function may explain the transient association of this enzyme with telomeric DNA. TRF2 is known to be recruited at the junction between the duplex repeat and the 3' G-overhang (Stansel *et al*, 2001); therefore, it is also possible that Topo III α is recruited with TRF2 to modulate the t-loop formation. Our experiments do not exclude the requirement for another protein partner to form the complex at telomere. For example, other proteins of the shelterin complex, including POT1 and TPP1, are also recruited to the telomeric G-overhang (Wang *et al*, 2007; Xin *et al*, 2007) and may modulate the action of Topo III α ; finally, BLAP75 was shown to trigger the association of Topo III α with DHJ (Wu *et al*, 2006).

Interestingly, the depletion of Topo III α leads to a rapid telomere defect in ALT cells but not in telomerase-positive

cells. This suggests that Topo III α is essential for the ALT pathway of telomere maintenance. In agreement with this hypothesis, the ALT cells depleted in Topo III α exhibited severe chromosome segregation defects, a loss of the 3' telomeric overhang, the induction of TIF, and a reduced expression of TRF2. The reduced protein level of TRF2 upon Topo III α knockdown was not observed in telomerase-positive cells, suggesting the existence of quantitative or qualitative difference in TRF2/Topo III α interactions between ALT and telomerase-positive cells, in keeping with our observations in immunofluorescence and ChIP experiments.

The depletion of Topo III α also leads to a rapid growth defect in ALT cells but not in telomerase-positive cells. Topo III α has been initially reported to associate with BLM and is targeted to its DNA substrate by RMI1/BLAP75 (Johnson



Figure 8 DNA damage response at the telomere after Topo III α depletion in U2OS cells. U2OS cells were treated for 48 h with control siRNA or with Si-1 and examined for γ -H2AX foci (green) that colocalized with TRF1 (red).

et al, 2000; Wu et al, 2000, 2006; Yin et al, 2005). This protein complex participates in the repair of replication defect and in the control of genomic stability. Interestingly, siRNAmediated depletion of BLM in U2OS cells presented some differences with Topo IIIa depletion. BLM depletion affected less severely the growth of ALT cells but did not affect Topo IIIa and TRF2 protein levels in telomerase-positive or ALT cells, a result consistent with the presence of a stable Topo III/TRF2 complex in BLM-deficient cells (result not shown). In agreement with this, BLAP75 depletion, but not BLM depletion, was found to be essential for the stability of the BLM/Topo III/BLAP75 complex in HeLa cells (Yin et al, 2005). These data suggest that the stability of TRF2 specifically depends on the presence of Topo IIIa in ALT cells, but not BLM, even though all three proteins are components of the same complex. It is worth noting that, in contrast to Topo IIIa depletion, a reduced expression of factors possibly involved in ALT usually does not affect short-term cell viability, even when proteins that are essential for telomere maintenance, such as TRF2, are knocked down to very low levels (Jiang et al, 2007). Therefore, it is not excluded that the telomere defects are due to the decreased TRF2 whereas the ALT cell proliferation effects are more clearly related to Topo IIIa. This once again confirms the notion that TRF2 and Topo $III\alpha$ bear central functions in ALT cells although their exact roles, as compared to telomerase-positive cells, remain to be determined.

In contrast to ALT cells, the growth of telomerase-positive cells was unaffected by siRNA-induced Topo III α depletion. Although we cannot exclude that prolonged (>96 h) depletion of Topo III α might have a delayed effect on cell growth in telomerase-positive cells, our results are in agreement with data obtained when HeLa cells were treated with a short hairpin RNA that inhibited Topo III α expression (Tsai *et al*, 2006). Interestingly, this study also presents the long-term survival and the selection of Saos-2 ALT cell clones where Topo III α has been depleted. In contrast to our study, the long-term selection of Saos-2 clones with a mild Topo III α depletion (40–60%) led to a disappearance of the ALT phenotype and the reactivation of telomerase activity. It is



Figure 9 Effect of BLM depletion on Topo IIIa and TRF2 protein levels and on the growth of telomerase-positive cells and ALT cells. (A) Western blot analysis of Topo IIIa or TRF2 levels after siRNAmediated depletion of BLM in HeLa or U2OS cells. Proteins were extracted at the indicated time points after transfection of HeLa or U2OS cells with anti-BLM siRNA (100 nM) or a control siRNA. BLM (upper panel), Topo IIIa, and TRF2 levels were monitored by western blotting using specific antibodies. The membrane was reprobed with anti-β-actin antibody as a loading control (lower panel). (B) Effect of BLM depletion (Si-BLM, 100 nM) on the growth of telomerase-positive (HeLa) and ALT (U2OS) cell lines for up to 96 h after transfection. In brief, cells were harvested and counted every 24 h using one well for each time point. Cells were then lysed and sonicated and BLM depletion was monitored by western blot analysis (data not shown). The values represent the mean of two independent experiments and error bars indicate variation.

interesting to note that the positive selection of survivors is associated with a modification of the telomere maintenance whereas our study reveals an alteration of the telomere maintenance associated with a growth defect, therefore highlighting the importance of Topo III α for these processes in ALT.

We propose that Topo IIIa depletion in ALT cells results in a rapid accumulation of unresolved, post-replicative, recombination intermediates leading to abnormal mitosis and growth arrest. This model is consistent with the recent observations that BLM and Topo IIIa are involved in sister chromatid disjunction after the onset of anaphase (Chan et al, 2007) and with the finding of a specifically phosphorylated form of BLM that associates with Topo IIIa during mitosis (Dutertre et al, 2002). The telomere-telomere recombination or telomere-ECTR recombination that occurs in ALT may explain the requirement of Topo IIIa to decatenate DHJ and to allow the termination of homologous recombination. In the absence of Topo IIIa, a classical Holliday junction resolution pathway (Wu and Hickson, 2006) may lead to a DNA damage response and disrupt telomere ends. Alternatively, these additional defects might result from the partial loss of TRF2 triggered by Topo IIIa knockdown. Our results suggest that the Topo IIIa/BLM/TRF2 complex is involved in the maintenance of telomere stability and the recombination

processes taking place at the extremities of telomeres of ALT cells.

Materials and methods

Plasmids

Full-length hTRF2 and TIN2 cDNA were cloned into pCDNA3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) by PCR using the Marathon testis cDNA library (Clontech, Palo Alto, CA). The cDNA was completely sequenced and corresponded to the sequence previously released. The CFP-TRF2 plasmid was constructed by insertion of the TRF2 cDNA after PCR amplification from pCDNA3.1-TRF2 vector at the BamHI-XbaI site in the pECFP-C1 plasmid. The CFP-TIN2 plasmid was constructed by insertion of the TIN2 cDNA after PCR amplification from pCDNA3.1-TIN2 vector at the *Bam*HI-*Xba*I site in the pECFP-C1 plasmid. Full-length hPOT1 was previously cloned into the pET22b expression vector by PCR using the Marathon testis cDNA library (Clontech) (Gomez *et al*, 2006a). The CFP-POT1 plasmid was constructed by insertion of the POT1 cDNA from the pET22bPOT1 vector at the BamH1-Xba1 site of the pECFP-C1 plasmid (Clontech). Full-length Topo IIIa cDNA was cloned previously into pET29H2 (Goulaouic et al, 1999). The YFP-Topo III α plasmid was constructed by insertion of the Topo III α cDNA after PCR amplification and enzymatic digestion from pET29H2-Topo IIIα vector at the BamHI-XbaI site in the pEYFP-N1 plasmid.

Cell culture and transfection

EcR293 (Invitrogen), HT1080, 293T (ATCC), MRC5-V1 (a gift from F Megnin-Chanet, Institut Curie, Orsay; Huschtscha and Holliday, 1983), U2OS (ATCC), HeLa, and WI38-VA13 (ATCC) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO from Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (Invitrogen), 100 u of penicillin, and 0.1 mg of streptomycin per ml. The GM08505 cell line is a BLM-deficient, SV40-transformed fibroblast cell line that contains a homozygous frameshift mutation in BLM (Ellis et al, 1995); these cells were grown in DMEM supplemented with 20% SVF and antibiotics (as specified above). Transfection experiments were carried out according to previously described protocols (Gomez et al, 2006a). MRC5-V1, HT1080, and EcR293 were stably transfected with YFP-Topo III vector or MRC5-V1 were cotransfected with YFP-Topo III and CFP constructs (TIN2, POT1, or TRF2). After transfection, cells were selected for 15 days with 400 µg/ml of geneticin and cultures were sorted by FACS analysis and further grown in the presence of $400 \,\mu\text{g/ml}$ geneticin.

siRNA experiments

Double-stranded siRNAs were generated to target human Topo III α mRNA (NM004618) at nucleotides 462 (5'-ACAUCGGGUUUGAGA UUAU-3', Si-1), 788 (5'-CCAGAAAUCUUCCACAGAA-3', Si-2), and 1798 (5'-GGACAAAUUUGUGGUUCUA-3', Si-3). Control siRNA was purchased from Eurogentec (Belgium). Cells were transfected with 100 nM of siRNA duplex using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) without antibiotics and fetal serum (according to the protocol supplied by the manufacturer), at 3×10^5 , 4×10^5 , 2.5×10^5 , 1×10^5 , and 6×10^4 cells per 9.5 cm² culture dish for EcR293, HT1080, MRC5-V1, U2OS, and WI38-VA13, respectively. HT1080 cells were split at 24 h to avoid confluence issues. Cells were counted and viability was determined by Trypan blue exclusion every 24 h using one well for each time point.

For BLM-specific siRNA treatment, U2OS or HeLa cells were used to seed six-well plates $(2-3 \times 10^5 \text{ cells/well})$ and were transiently transfected with 100 nM of a BLM-specific siRNA pool (Dharmacon) or nonspecific control siRNA (ON-TARGETplus siCONTROL Non-targeting Pool, Dharmacon), using DharmaFECT ITM, according to the manufacturer's instructions.

Antibodies and western blots

Primary antibodies used in this work were raised against PML (PG-M3, mouse, sc-966; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), TRF2 (4A794, mouse; Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA), BLM (C18, sc-7790; Santa Cruz Biotechnology), β -actin (clone AC-15, mouse; Sigma, St Louis, MO), active caspase-3 (IMG-144, mouse; Imgenex, San Diego, CA), cleaved PARP (Asp214, rabbit; Cell Signaling Technology, Boston, MA), α -tubulin (clone B-5-1-2, mouse; Sigma), γ -H2AX (mouse; Upstate Biotechnology),

TRF1 (C19, goat, sc-1977; Santa Cruz Biotechnology), and Topo III α (clone D6, rabbit; Wu *et al*, 2000). Secondary antibodies used for western blot experiments were goat anti-rabbit and anti-mouse HRP conjugates (Upstate Biotechnology) and donkey anti-goat HRP conjugates (Abcam, Cambridge, UK). For immunofluorescence experiments, goat anti-mouse Alexa fluor 488 and 568 as well as goat anti-rabbit Alexa fluor 568 (Invitrogen) were used. Immunoblotting was performed according to Douarre *et al* (2005) and autoradiographs were scanned and quantified using the Image-Quant software (GE Healthcare, Munich, Germany).

Co-immunoprecipitation analysis

The protein extract was prepared from 175 cm^2 dishes $(20-30 \times 10^6 \text{ cells})$ for each cell line using RIPA buffer complemented with protease inhibitor cocktail (Complete, Mini, EDTA-free; Roche Applied Science, Indianapolis, IN) and 330 mM NaCl. The extract was precleared by protein G-Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) for 10 min at 4°C. For immunoprecipitation, precleared nuclear extract (5 mg/ml) was mixed with the required antibody or with control IgG for the negative control. After the tubes were rotated overnight at 4°C, 100 µl of protein G-Sepharose beads (settled volume) was added to each sample and the tubes were rotated for another night at 4°C. The beads were collected by centrifugation and washed three times with PBS buffer, eluted with Laemmli loading buffer, and analysed by immunoblotting as described previously (Dutertre *et al*, 2002; Douarre *et al*, 2005).

Chromatin immunoprecipitations

ChIP was performed according to the manufacturer's instructions (Upstate Biotechnology). Dot blot experiments were performed according to Verdun *et al* (2005), using a 650 bp telomeric insert prepared from pUCTelo plasmid and a 100 bp ALU probe prepared by PCR amplification according to Walker *et al* (2003). Alternatively, telomeric sequences in immunoprecipitates were amplified by PCR according to Cawthon (2002).

G-overhang hybridization assays

The nondenaturing hybridization assay to detect the 3' telomeric G-overhang was performed as described previously using the $(AATCCC)_4$ oligonucleotide (Gomez *et al*, 2006b).

Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed according to Gomez et al (2006a), except that α -tubulin staining was as described by Dodson et al (2004). We obtained images of fixed cells using a \times 100 (NA 1.4) plan apochromat objective mounted on a piezo translator (Physik Instrumente, Karlsruhe, Germany) and imaged with a Cool-snap 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 doubleor triple-band dichroic filters (Chroma Technology, Rockingham, VT). Stacks of 60-100 images (16-bit greyscale) were acquired with a z-step of $0.12\,\mu\text{m}$ with a low illumination intensity to avoid photobleaching. 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 analysed. 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).

Electrophoretic mobility shift assay

Supplementary data

Supplementary data are available at *The EMBO Journal* Online (http://www.embojournal.org).

Acknowledgements

We thank H Goulaouic, P Mailliet, R Onclercq-Deliè, G Labarchede-Buhagiar, JL Mergny, C Trentesaux, H Morjani, P Arimondo, and C Morrisson for useful discussions and scientific

References

- Ababou M, Dutertre S, Lecluse Y, Onclercq R, Chatton B, Amor-Gueret M (2000) ATM-dependent phosphorylation and accumulation of endogenous BLM protein in response to ionizing radiation. *Oncogene* **19**: 5955–5963
- Amiard S, Doudeau M, Pinte S, Poulet A, Lenain C, Faivre-Moskalenko C, Angelov D, Hug N, Vindigni A, Bouvet P, Paoletti J, Gilson E, Giraud-Panis MJ (2007) A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion. *Nat Struct Mol Biol* 14: 147–154
- Amor-Gueret M (2006) Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis. *Cancer Lett* **236**: 1–12
- Cawthon RM (2002) Telomere measurement by quantitative PCR. Nucleic Acids Res **30:** e47
- Cesare AJ, Griffith JD (2004) Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Mol Cell Biol* **24**: 9948–9957
- Champoux JJ (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem* **70:** 369–413
- Chan KL, North PS, Hickson ID (2007) BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J* **26:** 3397–3409
- Chang M, Bellaoui M, Zhang C, Desai R, Morozov P, Delgado-Cruzata L, Rothstein R, Freyer GA, Boone C, Brown GW (2005) RMI1/NCE4, a suppressor of genome instability, encodes a member of the RecQ helicase/Topo III complex. *EMBO J* 24: 2024–2033
- Chen CF, Brill SJ (2007) Binding and activation of DNA topoisomerase III by the Rmi1 subunit. *J Biol Chem* **282:** 28971–28979
- de Lange T (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* **19:** 2100–2110
- Dodson H, Bourke E, Jeffers LJ, Vagnarelli P, Sonoda E, Takeda S, Earnshaw WC, Merdes A, Morrison C (2004) Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G2 phase and involves ATM. *EMBO J* **23**: 3864–3873
- Douarre C, Gomez D, Morjani H, Zahm JM, O'Donohue MF, Eddabra L, Mailliet P, Riou JF, Trentesaux C (2005) 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* **33**: 2192–2203
- Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR (2000) Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* **26**: 447–450
- Dutertre S, Sekhri R, Tintignac LA, Onclercq-Delic R, Chatton B, Jaulin C, Amor-Gueret M (2002) Dephosphorylation and subcellular compartment change of the mitotic Bloom's syndrome DNA helicase in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* **277**: 6280–6286
- Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocci S, Proytcheva M, German J (1995) The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* **83**: 655–666
- Gangloff S, McDonald JP, Bendixen C, Arthur L, Rothstein R (1994) The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol Cell Biol* 14: 8391–8398
- Gomez D, O'Donohue MF, Wenner T, Douarre C, Macadre J, Koebel P, Giraud-Panis MJ, Kaplan H, Kolkes A, Shin-ya K, Riou JF (2006a) 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* **66**: 6908–6912
- Gomez D, Wenner T, Brassart B, Douarre C, O'Donohue MF, El Khoury V, Shin-Ya K, Morjani H, Trentesaux C, Riou JF (2006b)

collaborations. This work was supported by the 'Ligue Nationale contre le Cancer, Equipes labellisées' for J-FR and EG, by an European Union FP6 grant (LSHC-CT-2004-502943) and by the 'Institut National du Cancer' for MAG. TW and NT-S were supported by fellowship from the 'Région Champagne-Ardenne'. CD is supported by a fellowship from the 'Association pour la Recherche contre le Cancer'. LG and EB are supported by a fellowship from the 'Ligue Nationale contre le Cancer'.

Telomestatin-induced telomere uncapping is modulated by POT1 through G-overhang extension in HT1080 human tumor cells. *J Biol Chem* **281:** 38721–38729

- Goulaouic H, Roulon T, Flamand O, Grondard L, Lavelle F, Riou JF (1999) Purification and characterization of human DNA topoisomerase IIIalpha. *Nucleic Acids Res* 27: 2443–2450
- Grobelny JV, Godwin AK, Broccoli D (2000) ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/M phase of the cell cycle. *J Cell Sci* **113** (Part 24): 4577–4585
- Hickson ID (2003) RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nat Rev Cancer* **3**: 169–178
- Huang P, Pryde FE, Lester D, Maddison RL, Borts RH, Hickson ID, Louis EJ (2001) SGS1 is required for telomere elongation in the absence of telomerase. *Curr Biol* **11**: 125–129
- Huschtscha LI, Holliday R (1983) Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts. *J Cell Sci* **63**: 77–99
- Jiang WQ, Zhong ZH, Henson JD, Reddel RR (2007) Identification of candidate alternative lengthening of telomeres genes by methionine restriction and RNA interference. Oncogene 26: 4635–4647
- Johnson FB, Lombard DB, Neff NF, Mastrangelo MA, Dewolf W, Ellis NA, Marciniak RA, Yin Y, Jaenisch R, Guarente L (2000) Association of the Bloom syndrome protein with topoisomerase IIIalpha in somatic and meiotic cells. *Cancer Res* **60**: 1162–1167
- Kim RA, Caron PR, Wang JC (1995) Effects of yeast DNA topoisomerase III on telomere structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2667–2671
- Lenain C, Bauwens S, Amiard S, Brunori M, Giraud-Panis MJ, Gilson E (2006) The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair. *Curr Biol* 16: 1303–1310
- Lillard-Wetherell K, Machwe A, Langland GT, Combs KA, Behbehani GK, Schonberg SA, German J, Turchi JJ, Orren DK, Groden J (2004) Association and regulation of the BLM helicase by the telomere proteins TRF1 and TRF2. *Hum Mol Genet* **13**: 1919–1932
- Londono-Vallejo JA, Der-Sarkissian H, Cazes L, Bacchetti S, Reddel RR (2004) Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange. *Cancer Res* **64**: 2324–2327
- Mao Z, Seluanov A, Jiang Y, Gorbunova V (2007) TRF2 is required for repair of nontelomeric DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 13068–13073
- McEachern MJ, Krauskopf A, Blackburn EH (2000) Telomeres and their control. *Annu Rev Genet* **34**: 331–358
- Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, Teulade-Fichou MP, Gilson E (2002) Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res* **30:** 839–865
- Nabetani A, Yokoyama O, Ishikawa F (2004) Localization of hRad9, hHus1, hRad1, and hRad17 and caffeine-sensitive DNA replication at the alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia body. *J Biol Chem* **279:** 25849–25857
- Nitiss JL (1998) Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta* **1400**: 63–81
- Opresko PL, Mason PA, Podell ER, Lei M, Hickson ID, Cech TR, Bohr VA (2005) POT1 stimulates RecQ helicases WRN and BLM to unwind telomeric DNA substrates. *J Biol Chem* **280**: 32069–32080
- Rao VA, Fan AM, Meng L, Doe CF, North PS, Hickson ID, Pommier Y (2005) Phosphorylation of BLM, dissociation from topoisomerase IIIalpha, and colocalization with gamma-H2AX after topoisomerase I-induced replication damage. *Mol Cell Biol* 25: 8925–8937

- Stansel RM, de Lange T, Griffith JD (2001) T-loop assembly *in vitro* involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J* **20**: 5532–5540
- Tsai HJ, Huang WH, Li TK, Tsai YL, Wu KJ, Tseng SF, Teng SC (2006) Involvement of topoisomerase III in Telomere-telomere recombination. J Biol Chem 281: 13717–13723
- van Overbeek M, de Lange T (2006) Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase. *Curr Biol* **16**: 1295–1302
- Verdun RE, Crabbe L, Haggblom C, Karlseder J (2005) Functional human telomeres are recognized as DNA damage in G2 of the cell cycle. *Mol Cell* 20: 551–561
- Walker JA, Kilroy GE, Xing J, Shewale J, Sinha SK, Batzer MA (2003) Human DNA quantitation using Alu element-based polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **315**: 122–128
- Wallis JW, Chrebet G, Brodsky G, Rolfe M, Rothstein R (1989) A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase. *Cell* **58**: 409–419
- Wang F, Podell ER, Zaug AJ, Yang Y, Baciu P, Cech TR, Lei M (2007) The POT1–TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* **445**: 506–510
- Wang JC (1996) DNA topoisomerases. Annu Rev Biochem 65: 635-692
- Wang JC (2002) Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3:** 430–440
- Wang RC, Smogorzewska A, de Lange T (2004) Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* 119: 355–368
- Wang W, Seki M, Narita Y, Sonoda E, Takeda S, Yamada K, Masuko T, Katada T, Enomoto T (2000) Possible association of BLM in decreasing DNA double strand breaks during DNA replication. *EMBO J* **19:** 3428–3435

- Wu L, Bachrati CZ, Ou J, Xu C, Yin J, Chang M, Wang W, Li L, Brown GW, Hickson ID (2006) BLAP75/RMI1 promotes the BLMdependent dissolution of homologous recombination intermediates. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 4068–4073
- Wu L, Davies SL, North PS, Goulaouic H, Riou JF, Turley H, Gatter KC, Hickson ID (2000) The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III. *J Biol Chem* **275:** 9636–9644
- Wu L, Hickson ID (2001) RecQ helicases and topoisomerases: components of a conserved complex for the regulation of genetic recombination. *Cell Mol Life Sci* 58: 894–901
- Wu L, Hickson ID (2002) The Bloom's syndrome helicase stimulates the activity of human topoisomerase IIIalpha. *Nucleic Acids Res* **30:** 4823–4829
- Wu L, Hickson ID (2003) The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* 426: 870–874
- Wu L, Hickson ID (2006) DNA helicases required for homologous recombination and repair of damaged replication forks. Annu Rev Genet 40: 279–306
- Xin H, Liu D, Wan M, Safari A, Kim H, Sun W, O'Connor MS, Songyang Z (2007) TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature* **445**: 559–562
- Yankiwski V, Marciniak RA, Guarente L, Neff NF (2000) Nuclear structure in normal and Bloom syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci* USA 97: 5214–5219
- Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR (1999) Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res* 59: 4175–4179
- Yin J, Sobeck A, Xu C, Meetei AR, Hoatlin M, Li L, Wang W (2005) BLAP75, an essential component of Bloom's syndrome protein complexes that maintain genome integrity. *EMBO J* 24: 1465–1476

4. <u>Résultats complémentaires :</u>

4.1<u>Colocalisation de la TopoIIIα avec PML et TRF2 dans les lignées</u> <u>ALT et télomérase positives :</u>

Nous avons montré que la TopoIIIa colocalise avec les protéines TRF2, PML, TIN2 et POT1 dans la lignée ALT MRC5V1. Afin de confirmer ces résultats, des expériences d'immunofluorescence indirecte ont été réalisées pour étudier la colocalisation de la TopoIIIa avec les protéines TRF2 et PML dans d'autres lignées ALT et de déterminer si cette colocalisation existe dans les lignées télomérase positives.

La figure I-1-A montre une parfaite colocalisation de la TopoIIIα avec TRF2 dans les deux lignées ALT WI38VA13 et U2OS. La TopoIIIα a été visualisée à l'aide de l'anticorps D6 anti-TopoIIIα de lapin.

Sur **la figure I-1-B**, nous observons que la TopoIIIα colocalise avec les PMLs dans les lignées télomérase positives EcR293 et HT1080. Ce qui est cohérent avec les résultats de la littérature (Yankiwski et al., 2000). Pour ces expériences, la TopoIIIα a été visualisée par l'expression de la construction YFP-TopoIIIα. Cependant, aucune colocalisation n'a été observée entre TopoIIIα et TRF2 dans ces deux lignées télomérase positives (**Figure I-1-C**). Ces résultats confirment la différence de localisation de la TopoIIIα entre les lignées ALTs (localisation aux APBs) et les lignées télomérase positives (localisation aux PMLs).



Figure (I-1)

Colocalisation de la Topo IIIα avec TRF2 dans les cellules ALT et avec PML dans les lignées ALT et télomérase positives.

A, Colocalisation de la Topo III α (rouge, détectée par immunofluorescence) avec la protéine TRF2 (vert, détectée par immunofluorescence) dans les cellules de lignées ALT (WI38-VA13, et U2OS). **B**, Colocalisation de la Topo III α détectée par la fluorescence de l'YFP (vert, YFP-Topo III α) avec PML (rouge, détecté par immunofluorescence) dans les lignées télomérase positives (EcR293 et HT1080). **C**, Absence de la colocalisation de la YFP-Topo III α (YFP-Topo III α , vert) avec TRF2 (rouge, détecté par immunofluorescence) dans les deux lignées télomérase positives (EcR293 et HT1080).

4.2<u>Les cellules en mitose n'expriment pas la TopoIIIα :</u>

Les expériences d'immunoprécipitation ont montré que les deux protéines TopoIIIa et TRF2 co-immunoprécipitent dans les lignées télomérase positives, bien que dans les mêmes lignées, les images d'immunofluorescence ne révèlent aucune ou de très rares colocalisations dans les noyaux interphasiques. Suite à ces résultats qui semblent contradictoires, nous avons cherché à vérifier si les deux protéines colocalisent pendant la mitose. Des expériences d'immunofluorescence ont été réalisées sur les deux lignées MRC5V1 (ALT) et HT1080 (télomérase positive) en étudiant des noyaux en mitose.



Figure (I-2)

Détection du signal de la TopoIIIα dans les noyaux mitotiques et interphasiques.

Le signal de TopoIII α (vert, Topo III α YFP) disparaît dans les noyaux mitotiques des cellules MRC5V1 et HT1080. Le signal de TRF2 (rouge, détecté par immunofluorescence) est observé aux extrémités des chromosomes condensés. Dans les noyaux interphasiques (i), la TopoIII α colocalise avec TRF2 dans les cellules ALT MRC5V1, cette colocalisation n'est pas détectée dans les cellules HT1080.

Les résultats présentés dans **la figure I-2** montre que le signal de TopoIII α disparaît des noyaux en mitose dans les cellules MRC5V1 et HT1080 tandis que le signal de TRF2 est maintenu. **La figure I-2** montre aussi en contrôle des cellules en interphase présentant une colocalisation de TopoIII α /TRF2 (MRC5V1) ou une absence de colocalisation (HT1080).

4.3 Interaction physique entre TopoIIIα et TRF2 :

Des expériences supplémentaires de co-immunoprécipitation sur la lignée ALT MRC5V1 ont été réalisées afin de confirmer l'interaction de la TopoIIIα avec la protéine télomérique TRF2. **La figure I-3** montre la détection par western blot de TopoIIIα et TRF2 après immunoprécipitation de la TopoIIIα ou de TRF2.



Figure (I-3) Le complexe Topo IIIa/TRF2 dans les cellules MRC5V1 (ALT).

Les expériences d'immunoprécipitation ont été réalisées avec des extraits nucléaires (800µg) des cellules MRC5-V1 préparés par élution dans 0.35 M NaCl (Riou et al., 1989). Les anticorps polyclonaux de lapin D6 and D7 dirigés contre la TopoIII α permettent la détection de TRF2. Dans l'expérience inverse, l'immunoprécipitation de TRF2 par 8µg de l'anticorps anti-TRF2 de souris (4A794, Upstate) ou l'anti-TRF2 de lapin (H-300, Santa Cruz) ne permet pas de détecter une bande nette de la TopoIII α . Les IgG murines ou de lapin (8µg) ont été utilisées comme contrôles. Les protéines TopoIII α (rTopo III) et TRF2 (rTRF2) recombinantes sont utilisées comme marqueurs des protéines TopoIII α et TRF2. L'input correspond à 100 µg de l'extrait nucléaire. Les Western blots ont été effectués en utilisant les anticorps D6 TopoIII α et 4A794 TRF2.

En utilisant des anticorps commerciaux anti-TRF2 (4A794, H-300) et anti-TopoIIIα (D6 et D7), l'immunoprécipitation de la TopoIIIα avec les anticorps D6 et D7 permet la détection de la protéine TRF2. Cependant, l'immunoprécipitation de TRF2 par les deux anticorps développés chez la souris et le lapin ne permet pas une détection nette de la TopoIIIα. Dans le meilleur des cas, nous observons un signal faible de TopoIIIα comparable au signal détecté après immunoprécipitation avec l'IgG contrôle de souris.

En conclusion de ces expériences, l'utilisation des anticorps anti-TopoIIIa (D6 et D7) permet la mise en évidence de TRF2 alors que l'immunoprécipitation inverse avec les anticorps anti-TRF2 ne détecte pas de complexe avec TopoIIIa. Il est possible que la fraction de TopoIIIa associée à TRF2 soit faible par rapport à la quantité totale de TRF2, ou que l'interaction avec les deux protéines masque les épitopes reconnus par les anticorps anti-TRF2 que nous avons utilisé.

4.4<u>Mise en évidence de l'interaction de la TopoIIIα avec TRF2 *in vitro* <u>au niveau des séquences télomériques :</u></u>

Nos expériences de retard sur gel ont montré que la TopoIII α se lie préférentiellement aux séquences simple-brins télomériques riches en guanine plutôt qu'aux séquences double-brins télomériques. Il a déjà été décrit dans la littérature que la TopoIII α possède une meilleure affinité pour l'ADN simple-brin qui est son substrat catalytique privilégié que pour l'ADN double-brin (Goulaouic et al., 1999 ; Changela et al., 2001). Puisque la TopoIII α ne se fixe pas uniquement aux séquences télomériques, contrairement à TRF2, nous avons utilisé ces propriétés de fixation différentes pour étudier *in vitro* l'interaction entre TopoIII α et TRF2. Les expériences de retard sur gel ont été réalisées en utilisant 5 nM d'oligonucléotides simplebrin (le 21G ou sa forme mutée le 21Gmu3) et d'oligonucléotide double-brin (DS26) en présence des protéines recombinantes purifiées la TopoIII α (700 nM) ou TRF2 (350 nM), ou les deux protéines. Les oligonucléotides ont été marqués au P³².

Nous remarquons que la TopoIIIa interagit avec les trois oligonucléotides. A noter que le DS26 (26 nucléotides) est plus long que le 21G ou 21Gmu (21 nucléotides), et par conséquent le shift de l'oligonucléotide avec la TopoIIIa est plus important. La protéine TRF2 interagit également avec les oligonucléotides simple-brins 21G et 21Gmut3 mais pas avec le doublebrin non télomérique. Une bande retard additionnelle est observée en présence des deux protéines (indiquée par une flèche sur **la figure I-4**), elle correspond au complexe TopoIIIa/TRF2 formé avec l'ADN télomérique et non télomérique.



Figure (I-4) TopoIII a et TRF2 interagissent *in vitro* avec les séquences télomériques et non télomériques.

Les résultats indiquent que la TopoIIIa et TRF2 forment un complexe *in vitro* qui est indépendant de la fixation de TRF2 à l'ADN.

Afin de déterminer quel est le domaine de TRF2 responsable de sa liaison avec la TopoIII α , nous avons testé des mutants de TRF2 : TRF2^{ΔM}, TRF2^{ΔB} et TRF2^{$\Delta M\Delta B$} dont les domaines Myb (M), domaine basique (B) ou les deux sont délétés respectivement et qui nous ont été fournis par M.J Giraud-Panis (ENS lyon)

La protéine TRF2 et les trois mutants ont été incubés en présence de concentrations croissantes de TopoIII α . En présence de TRF2 (**Figure I-5-b**) les bandes retardées sont plus intenses comparativement au témoin TopoIII α (**a**) ce qui indique l'interaction de TRF2 avec

la TopoIII α . En présence des mutants TRF2^{ΔM} et TRF2^{$\Delta B\Delta M$}(**c**, **e**), les bandes retardées diminuent d'intensité et sont comparables au témoin TopoIII α . Cependant, les bandes observées avec le mutant TRF2^{ΔB} (**d**) ont la même intensité que pour TRF2 sauvage, ce qui suggère que la délétion du domaine basique de TRF2 n'inhibe pas l'interaction de TRF2 avec la TopoIII α .



Figure (I-5) Interaction de la TopoIIIa avec la protéine TRF2 et ses mutants $TRF2^{\Delta M}$, $TRF2^{\Delta B}$, $TRF2^{\Delta M\Delta B}$.

Nos résultats suggèrent que la protéine TRF2 interagit avec la TopoIIIα via son domaine myb. Cependant, en raison des faibles quantités de mutants de TRF2 dont nous disposions, nous n'avons pas pu refaire cette expérience qui demeure un résultat préliminaire.

4.5 <u>Effet de la déplétion de la TopoIIIα sur la croissance des lignées</u> <u>ALT et télomérase positives :</u>

Nous avons étudié les conséquences de la déplétion de la TopoIIIα par la séquence si-1 (5'-ACAUCGGGUUUGAGAUUAU-3'). La déplétion de la TopoIIIα altère la croissance cellulaire des lignées ALT (MRC5V1, WI38VA13 et U2OS) mais pas celle des lignées télomérase positives (HT1080 et EcR293), elle induit également la formation de ponts anaphasiques et la diminution du niveau protéique de TRF2. Pour confirmer ces résultats, nous avons bloqué l'expression de la TopoIIIα par un autre siRNA : si-2 (5'-CCAGAAAUCUUCCACAGAA-3'). Les siRNA contrôles ou le si-2 spécifique de l'ARNm de la TopoIIIα ont été transfectés dans les lignées HT1080 et U2OS et la croissance sur 72h des cellules HT1080 et U2OS est représentée dans **la figure I-6-A**.




Effets de la déplétion de la TopoIIIα par RNA interférence sur la croissance des cellules HT1080 et U2OS.

A, Effet du Si-2 et du siRNA contrôle (100 nM) sur la croissance des cellules télomérase positives HT1080 et ALT U2OS après 72h de transfection. Les résultats représentent les valeurs moyennes et les écart-types des échantillons reproduits trois fois. **B**, quantification des ponts anaphasiques formés dans les cellules HT1080 et U2OS après 72h de transfection par 100 nM de Si-2 ou de siRNA contrôle. Le nombre de cellules en anaphase et le pourcentage de cellules présentant des ponts anaphasiques sont indiqués pour chaque lignée cellulaire, pour le siRNA contrôle et pour le siRNA TopoIII α (Si-2).

L'inhibition de l'expression de la TopoIIIa par le si-2 induit une diminution de la croissance des cellules ALT U2OS, mais pas de différence de croissance significative des cellules

télomérase positives HT1080. De plus, le si-2 provoque la formation d'un nombre important de ponts anaphasiques.

L'inhibition de l'expression de la TopoIIIa a été vérifiée par western blot (**Figure I-7**). Nous observons aussi, une diminution de l'expression de TRF2 dans les cellules U2OS mais pas dans les cellules HT1080. Les résultats confirment les données obtenues à l'aide du si-1 dirigé contre la TopoIIIa.



Figure (I-7)

Le niveau des protéines TopoIII α , TRF2 et β actine, 72h après la transfection des cellules HT1080 et U20S avec le SiRNA contrôle ou le Si-2, dirigé contre la TopoIII α .

4.6 <u>Etude de l'induction de l'apoptose par le si RNA TopoIIIα</u> :

Les caspases effectrices de l'apoptose (caspases 3-6-7) sont activées par d'autres caspases en amont et permettent les phases d'exécution terminale de l'apoptose par clivage de multiples substrats cellulaires (Jin and El-Deiry, 2005), notamment par ceux des protéines PARP et des 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). Nous avons cherché à montrer si l'inhibition de l'expression de la TopoIIIa par siRNA provoque l'apoptose. Nous avons étudié le clivage de la procaspase 3 et de son substrat effecteur de l'apoptose, PARP par western blot dans les lignées HT1080 et U2OS, 72 h après la transfection par siRNA-1, en utilisant les anticorps anti-caspase 3 clivée (Imgenex) et anti-PARP clivé asp214 (cell signalling). Un échantillon de cellules HT1080 traitées par 1µM de camptothecine pendant 24h (inducteur d'apoptose) a été utilisé comme un contrôle positif d'apoptose.

Les résultats de western blot présentés dans **la figure I-8** ne montrent pas d'augmentation des formes clivées de la caspase 3 ou de PARP après traitement par le siRNA-1 TopoIIIa, ce qui

indique qu'aucun mécanisme d'apoptose n'est mis en place par la déplétion de la TopoIII α au cours de l'arrêt de croissance des cellules ALT.



Figure (I-8)Effet de la transfection des cellules HT1080 et U2OS par le
SiRNA contrôle et le si-1 Topo IIIα (100 nM) sur le clivage de
PARP et de la Caspase 3.

La répartition des cellules dans le cycle après inhibition de l'expression de la TopoIII α par siRNA-1 a été analysée par cytométrie en flux, afin de déterminer si la déplétion de la TopoIII α induit l'arrêt des cellules dans une phase du cycle cellulaire.



Figure (I-9)

Analyse de la répartition dans le cycle cellulaire des cellules après inhibition de l'expression de la TopoIIIα par siRNA-1.

Les résultats représentés dans la **Figure I-9** ne montrent pas d'accumulation en G2/M après déplétion de la TopoIIIa. Toutefois, les cellules commencent à s'accumuler au début de la phase S, avec une diminution du nombre de cellules en phase G1. De plus, on n'observe pas de cellules en phase subG1, ce qui est cohérent avec l'absence de processus apoptotiques détecté par western blot. Ces résultats préliminaires suggèrent un ralentissement de la

croissance par retard de la phase S, en accord avec le phénotype observé dans les mutants Top3 de levure (Wallis et al., 1999).

4.7 <u>Immunoprécipitation de la TopoIIIα avec la protéine</u> télomérique TRF1 :

L'immunoprécipitation de la TopoIIIa permet de détecter la protéine télomérique TRF2. Nous avons examiné si la TopoIIIa interagit aussi avec la protéine TRF1. Dans ce but, nous avons réalisé l'immunoprécipitation de la TopoIIIa des cellules MRC5V1 avec l'anticorps D6 et nous avons pu détecter un faible signal correspondant à la protéine télomérique TRF1 en utilisant l'anticorps de chèvre anti-TRF1 (Santacruz). Ces résultats confirment l'association de la TopoIIIa avec les protéines du complexe shelterin.



Figure (I-10)Immunoprécipitation de TRF1 avec la TopoIIIα dans les cellules
MRC5V1.

4.8 <u>Rôle de la TopoIIIα dans la stimulation de l'invasion</u>

Les télomères peuvent se replier en une structure appelée t-loop qui résulte de l'invasion du duplexe de l'ADN télomérique par l'extrémité simple-brin. *In vitro*, la formation de ces structures est stabilisée par la protéine télomérique TRF2 (Griffith et al., 1999). Cependant, très peu de données sont connues concernant les mécanismes impliqués dans l'invasion. Amiard et al ont montré que TRF2 provoque le surenroulement positif d'un plasmide contenant des répétitions télomériques (Amiard et al., 2007). Ils ont mis en évidence une corrélation entre l'activité topologique de TRF2 et son habilité à stimuler l'invasion du brin.

Le brin G pourrait servir de substrat pour les processus de recombinaisons impliqués dans l'élongation des télomères par le mécanisme ALT. Nous avons cherché à savoir si la TopoIIIa que nous avons trouvée associée à TRF2, joue un rôle dans l'invasion du brin G.

Les expériences d'invasion ont été réalisés en utilisant comme substrat le plasmide PucTélo contenant un fragment de 500 bp de répétitions télomériques et un oligonucléotide de T8G correspondant à 8 répétitions du brin G télomérique dans les conditions expérimentales décrites par Amiard et al 2007 (voir matériels et méthodes).

Des concentrations croissantes de TopoIII α recombinante (0.1 à 1µM) sont incubées 10min en présence de plasmide PucTélo (200ng), puis l'oligonucléotide T8G marqué en 5' au [³²P] est ajouté et incubé 15min à température ambiante. Les hybrides PucTélo-T8G sont mis en évidence par électrophorèse en gel d'agarose après déprotéinisation par SDS et protéinase K ; et correspondent à la présence d'oligonucléotide marqué migrant au niveau de la forme surenroulée du plasmide PucTélo (non montré).



Figure (I-11)

Effet de la TopoIIIα et de TRF2 sur l'invasion du simple-brin G télomérique.

De façon concomitante à l'invasion, on observe une diminution du signal de l'oligonucléotide libre. Nous observons dans nos conditions expérimentales en l'absence de TopoIII α , une invasion qui correspond à 20% du signal de l'oligonucléotide libre. Nous observons également une stimulation de l'invasion en présence de la TopoIII α , avec un maximum (28%) pour une concentration de 0.5µM puis une inhibition (22%) à une concentration de 1µM. Dans les mêmes conditions, nous détectons une stimulation de l'invasion par TRF2 dont le maximum correspondant à 0.5µM (31%), puis un effet inhibiteur à partir de 1µM. Ces résultats indiquent que la TopoIII α est capable de moduler la réaction d'invasion.

5. <u>Conclusion et discussion</u>

Les APB sont des structures nucléaires particulières des cellules ALT contenant les PML, l'ADN télomérique et plusieurs protéines associées au télomère. Nous avons étudié par immunofluorescence, ChIP et immunoprécipitation l'interaction de la TopoIIIa avec l'ADN télomérique ou ses composants protéiques, TRF2 et TRF1.

Par immunofluorescence, on observe une forte colocalisation de la TopoIII α au niveau des APB des lignées ALT, avec les PML et les protéines télomériques TRF2, POT1 et TIN2. Toutefois, la colocalisation de TopoIII α avec TRF2 a rarement été observée dans les cellules télomérase positives, et est complètement absente pendant la mitose dans les cellules ALT et télomérase positives. De plus, les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont mis en évidence une interaction préférentielle de TopoIII α avec l'ADN télomérique dans les lignées ALT. En revanche, dans les lignées télomérase positives, nous observons une plus faible association de la TopoIII α avec l'ADN télomérique.

Par immunoprécipitation, la TopoIIIα et TRF2 interagissent et forment un complexe protéique avec BLM aussi bien dans les lignées ALT que télomérase positives.

L'ensemble de ces données indiquent que la TopoIIIa est recrutée au niveau des télomères des lignées ALT, et que cette interaction est aussi observée, sans colocalisation détectable par immunofluorescence, dans les lignées télomérase positives.

Ce dernier point suggère soit une fonction transitoire de la TopoIIIa pendant la réplication des télomères, soit une différence quantitative des mécanismes nécessitant la TopoIIIa entre les lignées ALT et télomérase positives. Il existe en effet une activité de TRF2 indépendante des télomères dans la signalisation des cassures double-brins de l'ADN (Mao et al., 2007).

L'association *in vitro* et *in vivo* de la TopoIIIa avec les séquences télomériques et avec TRF2 suggère un (des) rôle (s) potentiel (s) de la TopoIIIa dans la réplication télomérique ou la recombinaison des télomères.

Outre le rôle de la TopoIIIα dans le mécanisme de recombinaison ALT, cette enzyme pourrait intervenir dans le contrôle de la formation de la t-loop. Amiard et collaborateurs ont montré que TRF2 induit une modification de la topologie de l'ADN qui favoriserait l'invasion du simple-brin télomérique (Amiard et al., 2007).

Nos résultats montrent que la TopoIIIα est capable de stimuler l'invasion du brin G télomérique avec un ordre de grandeur comparable à celui produit par TRF2.

Le mécanisme proposé pour TRF2 est le suivant : le domaine basique de TRF2 fixe l'ADN double-brin et modifie la superhélicité du plasmide en créant des régions simple-brins, ce qui favoriserait l'accessibilité à l'oligonucléotide.

De la même façon, la TopoIIIa pourrait moduler la formation des régions simple-brins à la manière de la protéine SSB. En effet, un mutant Y/F de TopoIIIa, catalytiquement inactif stimule aussi l'invasion du brin (JF Riou, résultats non publiés). En présence d'excès de TopoIIIa, l'activité de relaxation de l'enzyme et/ou la saturation des sites simple-brins provoquerait une inhibition de l'invasion.

Le rôle de la TopoIII α dans le maintien de l'intégrité des télomères a été mis en évidence grâce à une stratégie d'interférence RNA (siRNA) développée sur des cellules de lignées ALT et télomérase positives. Le siRNA TopoIII α diminue l'expression de la protéine de 60 à 70% et provoque un arrêt de la croissance des cellules ALT mais pas des cellules télomérase positives. La déplétion de la TopoIII α s'accompagne d'une forte baisse de TRF2 et BLM dans les lignées ALT et induit la formation massive de pontages anaphasiques (85% des cellules en mitoses) qui représentent un signe caractéristique d'un dysfonctionnement des télomères. Cette dysfonction télomérique se traduit aussi par une forte diminution de l'extension 3' simple-brin et la formation des TiF (Telomere induced Foci). Cependant, la déplétion de la TopoIII α n'affecte pas l'expression de la protéine TRF2 dans les lignées télomérase positive ni n'induit de dysfonction télomérique.

Ceci nous laisse supposer que les mécanismes fonctionnels du complexe TopoIIIa/TRF2 ne sont pas les mêmes dans les lignées ALT et télomérase positives.

Une des différences essentielles entre les cellules ALT et télomérase positives est la présence d'APBs correspondant au siège des recombinaisons télomériques. Il est vraisemblable que la perte de TopoIIIα affecte les processus de recombinaison dans les cellules ALT, ce qui reste à démontrer par des expériences de T-SCE dans les cellules humaines.

La déplétion de la TopoIIIa altère rapidement la croissance des cellules ALT, cependant, ces mêmes cellules ne présentent pas les mêmes effets dans le cas de la déplétion de son partenaire BLM. Nos résultats montrent que la déplétion de BLM altère de façon moins

sévère la croissance des lignées ALT et n'affecte pas le niveau protéique de la TopoIIIα et de TRF2.

Ces résultats suggèrent que la stabilité de la protéine TRF2 dépend principalement de la présence de la TopoIIIα et non de BLM, malgré la mise en évidence de l'interaction de BLM avec TRF2 dans les lignées ALT (Yankiwiski et al., 2000 ; Stavropoulos et al., 2002).

D'autre part, la déplétion de BLAP75 par le siRNA induit une déficience de la phosphorylation de BLM durant la mitose et altère le complexe de BLM, et la prolifération des cellules HeLa (Yin et al., 2005). De plus, la déplétion de BLAP75 induit une diminution radicale du niveau protéique de la TopoIIIa (10 fois ou plus) et une réduction modérée du niveau de la protéine BLM (environ deux à trois) (Yin et al, 2005). Ces données indiquent qu'au sein du complexe BTB, la stabilité de la TopoIIIa dépend de BLAP75 et non de BLM. Ces données sont cohérentes avec nos résultats qui montrent que le niveau protéique de TopoIIIa n'est pas affecté en absence de BLM dans les lignées ALT. Il serait alors intéressant d'étudier l'effet de la délétion de la TopoIIIa sur le niveau protéique de BLAP75.

Puisque la déplétion de TRF2 n'affecte pas la viabilité cellulaire (Jiang et al., 2007), nous supposons que l'arrêt de la croissance cellulaire est davantage lié à la TopoIIIα alors que les dommages des télomères peuvent être liés à la diminution du niveau protéique de TRF2.

Contrairement aux cellules ALT, la déplétion de la TopoIII α n'a pas un effet significatif sur la croissance des cellules télomérase positives. Il n'est pas exclu que la déplétion de la TopoIII α à long terme (expériences de ShRNA) puisse avoir des conséquences sur la croissance cellulaire des lignées télomérase positives. Le type d'approche ShRNA a été effectué dans les cellules HeLa qui ne montrent pas d'altération de la croissance (Tsai et al, 2006). Dans cette étude et contrairement à nos résultats, la déplétion à long terme de la TopoIII α dans la lignée ALT Saos-2 provoque la disparition du phénotype ALT et la réactivation de l'activité télomérase. Il est intéressant de noter dans ce travail que la sélection des clones survivants est associée avec une modification de la maintenance du télomère alors que notre étude révèle l'altération de la maintenance des télomères associée avec des défauts de la croissance cellulaire. Ces défauts peuvent aussi résulter de la perte partielle de TRF2 induite par la déplétion de la TopoIII α .

En conclusion, nous proposons que la déplétion de la TopoIIIa provoque une accumulation rapide des intermédiaires post-réplicatifs non résolus, conduisant à des mitoses anormales et l'arrêt de la croissance cellulaire. Ce modèle est consistent avec un travail récent qui montre l'implication de la TopoIIIa et de BLM dans la disjonction des chromatides sœurs après le

début le l'anaphase (Chan et al, 2007), et avec l'association spécifique de la forme phosphorylée de BLM avec la TopoIIIα durant la mitose (Dutertre et al, 2002).

Le mécanisme de recombinaison des télomères dans les cellules ALT expliquerait le rôle essentiel de la TopoIIIa dans la résolution des double-jonctions de Holliday afin d'achever la recombinaison homologue. En effet, en absence de TopoIIIa la résolution de ces intermédiaires devrait s'effectuer par une résolution classique de la jonction de Holliday, ce qui pourrait conduire à une réponse de dommage à l'ADN délétère pour les télomères.

Nos résultats suggèrent que le complexe TopoIIIa/TRF2/BLM est impliqué dans le maintien de la stabilité des télomères et des processus de recombinaison au niveau des extrémités télomériques des cellules des lignes ALT.

II: La télomestatine (ligand des G-quadruplexes) inhibe la fixation de la Topoisomérase IIIα aux oligonucléotides formant des G-quadruplexes et déprotège les télomères des cellules ALT

1. <u>Introduction :</u>

Les télomères jouent un rôle important dans l'intégrité des chromosomes. Ils protègent les extrémités des chromosomes des recombinaisons illégitimes, de la dégradation et de la fusion (Blackburn., 2001). Les télomères sont associés avec six facteurs protéiques (TRF1, TRF2, POT1, TPP1, TIN2 et RAP1) formant le complexe shelterin essentiel pour l'intégrité du génome (Palm and De Lange., 2008). Ces protéines protègent l'extension simple-brin de la dégradation (Smogorzewska et al., 2004).

Dans les cellules déficientes en télomérase, le maintien de la longueur des télomères est assuré par le mécanisme ALT (Alternative Lenghtening of Telomeres) qui fait intervenir des recombinaisons entre les télomères (Cesare and Reddel., 2008). Les cellules ALT sont caractérisées par l'absence de l'activité télomérase, l'hétérogénéité de la taille des télomères et la présence de foyers spécifiques nommés APBs pour ALT-associated PML bodies.

Les oligonucléotides riches en guanine peuvent adopter une structure à quatre brins appelée G-quadruplexes. Il a été démontré que cette structure est capable d'inhiber l'activité télomérase *in vitro* (Mergny et al., 2002). 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). La stabilisation des G-quadruplexes par ces ligands constitue une stratégie qui permet l'altération des fonctions des télomères et l'inhibition de la croissance cellulaire. Parmi les molécules étudiées par notre groupe, la télomestatine, est un des ligands de G-quadruplexes les plus actifs et sélectifs (Shin-ya et al., 2001 ; Kim et al., 2002 ; Rosu et al., 2003). Cependant, très peu de données sont connues sur l'effet de la télomestatine ou d'autres ligands sur les cellules ALT, à l'exception de leur effet sur la prolifération cellulaire (Gowan et al., 2001 ; Riou et el., 2002; Kim et al., 2002; Pennarun et al., 2005). Les ligands de G-quadruplexes inhibent également l'activité des hélicase BLM et WRN (Li et al., 2001). Ces hélicases sont associées avec les APBs des lignées ALT et interagissent avec les composants du shelterin (Grenobly et al., 2000 ; Lillard-Wetherell et al., 2004 ; Yeager at al., 1999). Chez l'homme, BLM interagit avec la TopoIIIα et deux autres protéines BLAP75 et BLAP18 (RMI1 et RMI2 chez la levure) qui forment un complexe essentiel pour le maintien de l'intégrité du génome grâce à sa fonction de résolution des recombinaisons homologues (Mankourin and Hickson., 2007). Dans ce complexe, TopoIIIa et BLM coopèrent in vitro pour la conversion les doublejonctions de Holliday en des produits de décaténation (Wu and Hickson., 2003). BLAP75/RMI1 guide la liaison à l'ADN de la TopoIII α (Wu et al., 2006 ; Raynard et al., 2006 ; Chen and Brill., 2007) et BLAP18/RMI2 régulent les interactions protéines-protéines du complexe (Singh et al., 2008 ; Xu et al., 2008). Le complexe TopoIII α /BLM fonctionne comme un complexe de réparation en réponse aux défauts de la réplication et permet le redémarrage de la fourche de réplication bloquée (Wang et al., 2000 ; Abadou et al., 2000 ; Amor-gueret., 2006). Le traitement par la camptothécine induit la dissociation de la forme phosphorylée de BLM de son complexe de stockage TopoIII α /BLM au niveau de PML qui s'accumule avec γ -H2AX au niveau des sites des dommages réplicatifs (Rao et al., 2005).

La TopoIIIa qui appartient à la famille IA des ADN topoisomérases, est conservée dans différents organismes. Elle supprime les surenroulements négatifs lorsque le simple-brin d'ADN est exposé (Wang et al., 2002). Cet accès au simple-brin peut être fourni par un surenroulement négatif de l'ADN ou par l'ajout de protéines qui se lient à l'ADN simple brin (RPA, RMI1) afin de faciliter la fixation de la TopoIII (Chen et al., 2007).

La diversité structurale des complexes formés au niveau des télomères au cours de la réplication nécessite des facteurs capables de moduler la topologie de l'ADN, ainsi que la formation et la résolution de la t-loop. Parmi ces facteurs, la TopoIIIa, est un composant essentiel associé aux télomères des lignées ALT (Tsai et al., 2006; Temime-smaali et al., 2008).

2. <u>But du travail :</u>

Le but est de déterminer si la fixation de la TopoIIIa aux séquences télomériques et sa colocalisation aux APBs dans les lignées ALTs est modulée par la formation de Gquadruplexe, nous avons utilisé la télomestatine comme outil moléculaire pour former des Gquadruplexes *in vitro* et *in vivo* au niveau des cellules ALTs.

3. <u>Résultats :</u>

3.1 <u>La TopoIIIα se lie aux G-quadruplexes mais préfère les structures</u> <u>simple-brins :</u>

Nous avons montré dans la première partie de notre travail de thèse que la TopoIIIα purifiée interagit avec les séquences simple-brins télomériques. Comme ces dernières peuvent former des structures G-quadruplexes, nous avons étudié l'influence de la présence des répétitions de guanine sur la liaison de la TopoIIIα avec l'ADN.

Nous avons étudié l'interaction de la TopoIIIa purifiée avec l'ADN par la technique de retard sur gel ou EMSA *(Electrophoretic Mobility Shift Assay)*. Les oligonucléotides utilisés dans ces expériences sont indiqués dans **le tableau 1**.

Oligonucléotide	Séquence	Propriétés
Brin C	5'CCCTAACCCTAACCCTAA 3'	Simple-brin télomérique
21G	5'GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG 3'	Simple-brin télomérique forme un G-4
21Gmut3	5'GGCTTACGGTTAGCGTTAGGG 3'	Simple brin télomérique avec trois mutations guanine empêchant la formation d'un G4
Pu22myc	5'GAGGGTGGGGGGGGGGGGGAAG 3'	Simple brin non télomérique qui forme un G4
Pu22mu	5'GAGGGTGAAGAGGGTGGGGAAG 3'	Simple brin non télomérique avec deux mutations de guanine empêchant la formation d'un G4
hPot1S310	5'CCAGCTCTGCTTTGCATCTTT3'	Simple brin non télomérique
Double brin DS26	5'CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG3' 3'GTTAGCCTAGCTTAAGCTAGGCTAAC 5'	Double brin non télomérique
WT-Tel26	5'TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT 3'	Simple brin télomérique, forme un G4

Tableau (1)

Oligonucléotides utilisés.



Fixation directe de la TopoIIIα sur les séquences A : 21C, B : 21C, C : 21Gmu et D : WT26.

La figure II-1 représente les gels d'électrophorèse de fixation directe de la TopoIIIa sur les oligonucléotides suivants : brin C (A), 21G (B), 21Gmut3 (C) et le WT26 (D).

Les gels retards montrent que la TopoIIIα interagit aussi bien avec les séquences télomériques riches en cytosines (**Figure II-1 A**) qu'avec les séquences riches en guanines (**Figure II-1 B**, **C** et **D**). Nous constatons également qu'elle se fixe bien aux oligonucléotides 21G et WT26 (plus long que le 21G) susceptibles de former des structures G-quadruplexes (figure II-1 B et C) et à la forme mutée du 21G (21Gmut3). Ainsi, nous observons que la TopoIIIα a une légère préférence pour le 21Gmut3, incapable de former une structure en G-quadruplexe.

Afin de quantifier les différences de la liaison de la TopoIIIα avec les différents nucléotides, nous avons réalisé des expériences de compétition pour la fixation de la TopoIIIα, en utilisant les oligonucléotides simple-brins radiomarqués (21G, 24C et S310), et des oligonucléotides compétiteurs non marqués susceptibles de former un G-quadruplexe (21G et Pu22myc) ou incapables de former ces structures (21Gmu, Pu22mu et le S310).

La figure II-2 représente les expériences de compétition avec les oligonucléotides 21G, 21Gmu (a, b et d) ou Pu22myc, le pu22mu (c, e et f) pour la fixation de la TopoIIIa sur les oligonucléotides marqués S310 (a, b et c), 21G (d et e) ou 24C (f). La figure II-3 représente la quantification de ces expériences.

En prenant l'exemple de **la figure c**, l'inhibition de la fixation de la TopoIII α sur le S310 nécessite une concentration de Pu22myc trois fois supérieure à celle de sa forme mutée le Pu22mu. Les mêmes différences entre les oligonucléotides formant des structures en G-quadruplexe et leurs formes mutées ou qui ne forment pas un G-quadruplexe, ont été obtenues pour la fixation de la TopoIII α sur 21G et 24C (**Figure II-3**).

L'IC₅₀ des oligonucléotides compétiteurs incapables de former un G-quadruplexe est de 4.3 à 10.1 fois plus faible que celle des oligonucléotides formant un G-quadruplexe, ce qui indique que la TopoIII α préfère les oligonucléotides simple-brins plutôt que les oligonucléotides susceptibles de former un G-quadruplexe.







La TopoIIIa se lie préférentiellement aux oligonucléotides simple-brins comparativement aux séquences d'oligonucléotides formant un G-quadruplexe. La figure II-2 présente les expériences de compétition pour la fixation de la TopoIIIa (50 nM) sur les oligonucléotides (20 nM) S310 (a, b), 21G ou 24C marqués avec le [P^{32}] en présence des oligonucléotides non marqués Pu22myc ou le Pu22mu dont les concentrations sont indiquées en bas de chaque gel.

Afin d'examiner l'effet des ions sur la préférence de fixation de la TopoIIIa sur les oligonucléotides, nous avons réalisé la même expérience de compétition entre le 21G et le 21Gmut3 pour la fixation de la TopoIIIa sur le S310 dans des conditions de KCl. Le résultat est représenté sur **la figure II-2-b**, et montre de la même façon que la TopoIIIa présente une préférence pour les séquences simple-brins comparativement aux séquences formant un G-quadruplexe.



Figure (II-3)Quantification des expériences de compétition entre les
oligonucléotides 21G, 21Gmu et Pu22, Pu33mu pour la fixation
de la TopoIII sur les séquences S310, 21G et 24C radiomarquées.

La quantification des expériences de compétition pour la fixation de la TopoIIIa aux oligonucléotides S310 (en haut), 21G (au milieu), et le 24C (en bas) avec des concentrations croissantes (1 à 1000 nM) des oligonucléotides compétiteurs non marqués 21G (cercles fermés), 21Gmu (cercles ouverts), Pu22myc (triangles fermés), et Pu22mu (triangles ouvert). La fraction d'oligonucléotide liée avec la TopoIIIa et la fraction d'oligonucléotide libre ont été quantifiées par le logiciel Image Quant. Nous avons calculé, pour chaque compétiteur, un facteur f_0/f qui représente le rapport de la fraction de la TopoIIIa fixée sur l'oligonucléotide marqué en l'absence de compétiteur (f_0) sur la fraction de la TopoIIIa fixée sur l'oligonucléotide marqué en présence d'une concentration déterminée du compétiteur (f). Les résultats représentés sur la figure II-3 correspondent à la moyenne de trois expériences.

3.2 <u>Le traitement par la télomestatine inhibe la liaison de la TopoIIIα</u> <u>avec le brin G télomérique :</u>

Par la suite, nous avons voulu déterminer si la stabilisation de la formation des Gquadruplexes interfère avec la liaison de la TopoIIIα sur le brin G télomérique. Le ligand utilisé, la télomestatine a été isolée à partir de *Streptomyces annulatus*, il se fixe de façon puissante et sélective aux G-quadruplexes télomériques et les stabilise (Shin-ya et al., 2001 ; Kim et al., 2002 ; Rosu et al., 2003). Dans ces expériences, nous avons utilisé l'oligonucléotide Wt26 susceptible de former un G-quadruplexe (Ambrus et al., 2006).



Figure (II-4) La télomestatine inhibe la fixation de la TopoIIIa et de POT1 sur le brin G télomérique.

A, Expérience de gel de retard en utilisant 50nM de TopoIIIα et l'oligonucléotide Wt26 marqué au P³² en présence de concentrations indiquées de télomestatine. **B**, Expérience de gel de retard en utilisant 50 nM de TopoIIIα et 20nM d'oligonucléotide S310 marqué au P³² en présence des concentrations indiquées de télomestatine. **C**, expérience de gel de retard en utilisant 30 nM de POT1 et 20nM de Wt26 marqué au P³² en présence des concentrations indiquées de télomestatine de gel de retard en utilisant 30 nM de POT1 et 20nM de Wt26 marqué au P³² en présence des concentrations indiquées de télomestatine inhibe la fixation de la TopoIIIα et de POT1 sur le Wt26, qui forme un G-quadruplexe, mais pas le S310 incapable de former cette structure.

En présence de la télomestatine, nous observons une forte inhibition de la formation du complexe TopoIII α - WT26 (**Figure II-4-A**). Une inhibition partielle du couple TopoIII α -WT26 est observée à 0.03 µM de télomestatine, qui devient totale en présence de 0.1 µM de télomestatine (IC₅₀ =60 nM).

Ces résultats indiquent que la stabilisation des G-quadruplexes par un ligand spécifique, la télomestatine, inhibe fortement la liaison de la TopoIIIa sur le simple-brin télomérique.

Notre équipe avait montré précédemment que la télomestatine inhibe aussi la fixation de la protéine de protection du télomère POT1 sur le brin G télomérique par des expériences couplées de transcription et de traduction (Gomez et al., 2006).

Nous avons utilisé la protéine recombinante POT1 purifiée, pour vérifier l'effet de la télomestatine sur sa fixation sur l'oligonucléotide Wt26, et comparer les résultats avec l'effet de la télomestatine sur la TopoIII α . Nous constatons que la télomestatine inhibe également la fixation de POT1 sur le WT26 (IC₅₀=100 nM) (**Figure II-4-C**). Ces valeurs sont proches de celles obtenues pour l'inhibition de la fixation de la TopoIII α aux oligonucléotides télomériques T8G, Wt26 et 21G (60-300 nM).

Par la suite, nous avons testé l'effet de la télomestatine sur la fixation de la TopoIII α sur un oligonucléotide non télomérique (S310) ou télomérique incapable de former un G-quadruplexe (21Gmu). Nos résultats montrent que la télomestatine (de 0.1 à 10 μ M) n'a pas d'effet sur la fixation de la TopoIII α sur l'oligonucléotide simple-brin non télomérique S310 (**Figure II-4-B**).



Figure (II-5)



Expérience de retard sur gel montrant la fixation de la TopoIIIa purifiée (50 nM) au 21Gmu (A) (20 nM) et au 21G (B) marqués par le P^{32} en présence des concentrations indiquées de télomestatine. La télomestatine n'a pas d'effet sur la fixation de la TopoIIIa sur la séquence télomérique mutée qui ne forme pas un G-quadruplexe.

La télomestatine inhibe la liaison de la TopoIII α sur le 21G formant un G-quadruplexe (IC₅₀ égale à 300 nM), en revanche, sa liaison avec la séquence mutée 21Gmu incapable de former un G-quadruplexe n'est pas inhibée par la télomestatine (IC₅₀ >10 μ M) (**Figure II-5**).

3.3 <u>Le traitement par la télomestatine induit la diminution du niveau</u> protéique des protéines TopoIIIα, TRF2, et BLM et désorganise les APBs dans les cellules ALT MRC5-V1 :

Nous avons montré dans la première partie des résultats que la TopoIII α colocalise avec les protéines télomériques dans les APBs des cellules ALT (Temime-smaali et al., 2008). Afin d'examiner l'effet du traitement par la télomestatine sur le recrutement de la TopoIII α aux APBs dans les cellules ALT en culture, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence en utilisant la lignée MRC5V1 transfectée par une construction YFP-TopoIII α . Nous avons vérifié tout d'abord si la construction YFP-TopoIII α colocalise avec la TopoIII α endogène. En utilisant l'anticorps D6 dirigé contre la TopoIII α . L'observation des images obtenues montre que la protéine YFP-TopoIII α colocalise aux mêmes sites que la protéine endogène (**Figure II-6**). Cette construction peut donc être utilisée pour étudier les effets cellulaires de la télomestatine sur la localisation de la TopoIII α .



Figure (II-6)Colocalisation du signal de TopoIIIα-YFP avec la TopoIIIα endogène

Images représentant des cellules MRC5V1 contrôles ou traitées par $2\mu M$ de télomestatine pendant 48h. La TopoIIIa est détectée par l'YFP-TopoIIIa (vert) ou par utilisation d'anticorps D6 (rouge), l'ADN est coloré par le Dapi (bleu). Le marquage YFP-TopoIIIa des cellules MRC5V1 contrôles et traitées colocalise avec la TopoIIIa endogène (A). La télomestatine réduit le nombre de foyers et l'intensité du signal de la TopoIIIa endogène et de l'YFP-TopoIIIa (B). Afin de déterminer une éventuelle délocalisation de la TopoIII α par la télomestatine dans les lignées ALT, les cellules MRC5V1-TopoIII-YFP ont été traitées par 2µM de télomestatine pendant 48 heures (<IC₅₀) pour laquelle la majorité des cellules sont viables. Les cellules sont ensuite fixées et marquées avec l'anticorps D6. L'observation des cellules indique une réduction du signal YFP au niveau des télomères. Le signal de TopoIII α détecté par l'anticorps D6 anti-TopoIII α diminue également dans les cellules traitées par la télomestatine, ce qui indique que la télomestatine altère le niveau protéique de la TopoIII α (**Figure II-6**). De plus, l'analyse de l'expression de la TopoIII α après traitement des cellules MRC5V1-YFP-TopoIII α par la télomestatine, la diminution du niveau protéique est dépendante de la durée de traitement et de la concentration (**Figure II-7**).



Figure (II-7)

Effet de la télomestatine sur le niveau protéique des protéines TopoIIIα, TRF2 et BLM dans la lignée ALT MRC5V1-YFP-TopoIIIα.

Les cellules MRC5V1-YFP-TopoIII α sont traitées par 0.5, 1, 2 et 5 μ M de télomestatine pendant 24, 48, ou 72 h. Le niveau protéique de la TopoIII α , BLM, TRF2, et de l'actine a été détecté par western blot. La télomestatine induit une diminution significative des protéines TopoIII α , TRF2, et BLM en fonction de la concentration de la télomestatine et de la durée du traitement.

Après 72h de traitement par $2\mu M$ de la télomestatine, nous observons une perte presque complète de la protéine TopoIII α (par rapport à l'actine).

Nous avons montré dans la première partie, que les protéines TopoIIIa, BLM, et TRF2 forment un complexe dans les lignées ALT. Puisque le traitement des cellules ALT MRC5V1 par la télomestatine induit une diminution de l'expression de la TopoIIIa, nous avons cherché à vérifier si ce traitement aurait un effet sur l'expression de TRF2 et BLM. La diminution de l'expression de la TopoIIIa est associée avec une diminution significative du niveau protéique de TRF2 et BLM (**Figure II-7**), ce qui indique que la télomestatine provoque l'altération du complexe TopoIIIa/TRF2/BLM dans les lignées ALT.

Dans l'optique de vérifier si l'altération des protéines TopoIII α , TRF2 et BLM est due un état apoptotique des cellules, nous avons examiné le clivage de la procaspase 3 dans les cellules MRC5V1-YFP-TopoIII α traitées à la télomestatine. Nous n'avons pas observé de clivage de la procaspase3 jusqu'à 72h de traitement par les concentrations de 1 à 5 μ M de télomestatine (**Figure II-8**). Ceci permet de conclure que les concentrations de télomestatine utilisées n'induisent pas l'apoptose des cellules ALT pendant 72h. Nos résultats suggèrent, comme dans le cas de la déplétion de la TopoIII α par siRNA (voir **Figure I-8**), que la télomestatine provoque la dégradation du complexe TopoIII α /TRF2/BLM dans les cellules ALT.



Figure (II-8) Le traitement par la télomestatine n'induit pas l'apoptose des cellules MRC5V1-YFP-TopoIIIα après 72 h de traitement à des concentrations de 1 à 5μM.

Nous avons montré que la TopoIII α est localisée dans les APBs des lignées ALT. Afin de mieux analyser l'effet de la télomestatine sur l'organisation des APBs dans les cellules MRC5-V1/YFP-TopoIII α , les cellules ont été traitées par 2µM de télomestatine pendant 48 h, ces conditions induisent une réduction de l'expression des protéines TopoIII α , TRF2 et BLM sans altérer la viabilité cellulaire.

Dans les cellules traitées par la télomestatine, nous avons examiné la localisation nucléaire de la TopoIIIa. Les images obtenues montrent un changement important dans l'organisation

nucléaire d'YFP-TopoIII dans les APBs : la télomestatine réduit la localisation de la TopoIII α avec les PML à 21 % dans les cellules traitées à la télomestatine (87% dans les cellules non traitées) (**Figure II-9-A**) et avec TRF2 (**Figure II-9-B**) à 20 % dans les cellules traitées à la télomestatine (82% dans les cellules non traitées).



Figure (II-9) La télomestatine induit une délocalisation de la TopoIIIa des PML et TRF2.

Images représentant les cellules MRC5-V1/YFP-TopoIII contrôles ou traitées par $2\mu M$ de la télomestatine pendant 48h. A, YFP-TopoIIIa (vert), PML (rouge). L'ADN est coloré par le dapi en bleu. B, YFP-TopoIIIa (vert), TRF2 (rouge). L'ADN est coloré par le dapi (bleu). La télomestatine induit une diminution de la colocalisation de la TopoIIIa des PML et de TRF2 MRC5V1-YFP-TopoIII.

La transfection des cellules MRC5V1 par l'YFP-TopoIII et le CFP-TRF2 et l'utilisation de l'anticorps anti-PML nous a permis de visualiser les trois protéines TopoIIIa, PML et TRF2 en même temps. Une parfaite colocalisation des protéines TopoIIIa, TRF2 et PML est

observée dans les cellules contrôles alors que dans les cellules traitées par la télomestatine les trois protéines sont observés dans des foyers séparés (**Figure II-10**).



Figure (II-10)La colocalisation de la protéine TopoIIIα avec PML et TRF2 est
inhibée par le traitement télomestatine.

Images représentant des cellules MRC5V1-YFP-TopoIII α non traitées et traitées avec 2 μ M de télomestatine pendant 48 h; YFP-TopoIII α est représenté en vert, TRF2 en rouge (détectée par immunofluorescence), et PML est en bleu (détectée par immunofluorescence).

Nous avons ensuite vérifié par immunoprécipitation avec l'anticorps D6 l'interaction de la TopoIII α avec TRF2 dans les cellules MRC5V1 traitées par la télomestatine (2 μ M, 48h). Les protéines TopoIII α et TRF2 sont détectées par western blot en utilisant les anticorps D6 anti-TopoIII α et l'anti-TRF2 (mouse). Les résultats représentés dans **la figure II-11** montrent que l'immunoprécipitation de la TopoIII α permet de détecter la protéineTRF2 dans le contrôle non traité alors que la protéine TRF2 est absente dans les immunoprécipitats de cellules traitées.





Nos résultats montrent que le traitement par la télomestatine provoque la délocalisation de TopoIIIα de PML et TRF2 et provoque la perte de l'interaction de TopoIIIα et TRF2.

Par la suite, nous avons cherché à savoir si la télomestatine induit la délocalisation de la TopoIII α des autres protéines télomériques. Nous avons examiné la localisation de la TopoIII α avec TRF1 et TIN2. Les images obtenues montrent la perte de colocalisation entre l'YFP-TopoIII α et les deux protéines TIN2 et TRF1 (**Figure II-12 A** et **B**).

Après le traitement des cellules par la télomestatine seulement 20% d'YFP-TopoIII colocalisent avec PML et TRF2 et environ 45% d'YFP-TopoIII colocalise avec TRF1 ou TIN2 (**Figure II-13**).



Figure (II-12) La télomestatine induit la délocalisation de la TopoIIIa de TIN2 et TRF1.

Images représentant des cellules MRC5V1-YFP-TopoIIIa non traitées et traitées avec 2 μ M de télomestatine pendant 48h. A, YFP-TopoIIIa (vert) TIN2 : rouge (détecté par immunofluorescence). L'ADN est coloré par le dapi en bleu. B, YFP-TopoIIIa (vert) TRF1 : rouge (détecté par immunofluorescence). L'ADN est coloré par le dapi (bleu). La colocalisation de la TopoIII avec TIN2 et TRF1 observée dans les cellules non traitées est diminuée par le traitement télomestatine.



Figure (II-13)Quantification de la colocalisation entre la TopoIIIα et PML,
TRF2, TRF1, TIN2, et BLM dans les cellules MRC5V1 non
traitées et traitées par la télomestatine (2μM, 48h).

La télomestatine induit une délocalisation de la TopoIII des PML et les composants du shelterin mais pas de BLM. Les résultats sont exprimés par le pourcentage relatif des foyers de la TopoIII qui colocalisent avec les foyers de PML, TRF2, TRF1, TIN2, ou BLM et sont déterminés par l'analyse de plus de 50 noyaux.

Puisque la TopoIII α forme un complexe avec BLM, nous avons examiné l'effet de la télomestatine sur l'intégrité de ce complexe. Les cellules MRC5V1-TopoIII α YFP témoins et traitées par la télomestatine à 2µM pendant 48h ont été marquées avec l'anticorps anti-BLM. Les images d'immunofluorescence obtenues montrent la colocalisation de la TopoIII α avec BLM dans les cellules témoins et les cellules traitées par la télomestatine, ce qui signifie que la télomestatine n'altère pas l'interaction entre la TopoIII α et BLM (**Figure II-14**), malgré la diminution du niveau protéique de BLM après le traitement par la télomestatine montrée par western blot (**Figure II-7**).



Figure (II-14)Colocalisation de la TopoIIIα avec BLM dans les cellules non
traitées et traitées par la télomestatine.

Images représentant des cellules MRC5V1-YFP-TopoIII α non traitées et traitées avec 2 μ M de télomestatine pendant 48h. YFP-TopoIII α : vert, BLM: rouge (détecté par immunofluorescence). L'ADN est coloré par le dapi en bleu. La télomestatine n'a pas d'effet sur la colocalisation de la TopoIII α avec BLM.

Pour confirmer ce point, une expérience d'immunoprécipitation de la TopoIII α a été réalisée sur les cellules MRC5V1-YFP-TopoIII α témoins et les cellules traitées par la télomestatine (2µM, 48h). L'immunoprécipitation de la TopoIII α permet de détecter par western blot la protéine BLM dans les cellules normales et les cellules traitées par la télomestatine. Ce résultat confirme le maintien du complexe TopoIII α /BLM dans les cellules ALT traitées par la télomestatine.

En conclusion, les résultats obtenus indiquent que la télomestatine diminue la quantité du complexe TopoIII/BLM/TRF2 et perturbe la formation des APBs des lignées ALT mais n'altère pas l'interaction TopoIIIa/BLM.



```
Figure (II-15)
```

La télomestatine n'induit pas la perte d'interaction physique entre TopoIIIa et BLM.

3.4 <u>Induction d'une réponse aux dommages de l'ADN au niveau des</u> <u>télomères des cellules ALT :</u>

Afin de déterminer si la perturbation des APBs induite par la télomestatine affecte l'intégrité des télomères, nous avons cherché à mettre en évidence la formation des TIFs (Telomere dysfunction-induced foci) par la détection des foyers γ H2AX, décrits comme marqueurs précoces de cassures double-brins au niveau de l'ADN et impliqués dans l'initiation et le déclenchement des voies de dommages à l'ADN. La détection des foyers γ H2AX a été réalisée dans les cellules MRC5V1 contrôles et traitées par la télomestatine dans les conditions induisant une réduction de l'expression de la protéine TopoIII α sans altérer la viabilité cellulaire (2 μ M, 48h). Après 48h de traitement, les cellules sont fixées puis marquées avec un anticorps reconnaissant la forme phosphorylée de l'histone H2AX sur la sérine 139 (γ H2AX).

Afin de vérifier la présence des foyers γ H2AX au niveau de l'ADN télomérique, un immunomarquage avec un anticorps spécifique anti-TRF1 a été réalisé conjointement avec l'anticorps anti- γ H2AX. Sur les images obtenues nous observons une augmentation significative du nombre de foyers γ H2AX qui colocalisent avec TRF1 dans les cellules traitées par la télomestatine (**Figure II-16**), dans les cellules témoins le nombre de foyers γ H2AX est de 14 ± 6 foyers/noyau; dont seulement 8% (± 2%) de colocalisation avec TRF1. En présence de la télomestatine, le nombre de foyers γ -H2AX augmente à 68 ± 4 foyers/noyau dont (46 ± 4%) colocalise avec TRF1.



Figure (II-16)Détection des foyers γ-H2AX et de TRF1 par
immunofluorescence dans les cellules MRC5V1 témoins et
traitées par la télomestatine.

A, analyse de la présence des foyers γ -H2AX (vert) et leur colocalisation avec la protéine de protection des télomères TRF1 (rouge) dans les cellules MRCV5V1 témoins et traitées par 2 μ M de télomestatine pendant 48 h. **B**, Quantification de la colocalisation des foyers γ -H2AX avec TRF1. Les résultats sont exprimés par le pourcentage relatif du nombre des foyers et sont déterminés par l'analyse de plus de 50 noyaux.

Les résultats indiquent que le traitement par la télomestatine de la lignée MRC5V1 provoque une réponse de type dommages à l'ADN au niveau des télomères.

Par la suite, et dans le but de déterminer si la TopoIII α est associée avec les sites de dommages de l'ADN induits par la télomestatine, nous avons analysé la localisation de la TopoIII α par rapport aux foyers γ -H2AX dans les cellules MRC5V1-TopoIII/YFP témoins et

traitées par la télomestatine (2μ M, 48h). Les images obtenues montrent que la TopoIII α ne colocalise pas avec les foyers γ -H2AX dans les cellules témoins et que la télomestatine ne modifie pas cette localisation. Ceci est en accord avec les résultats précédants. Puisque la télomestatine dissocie la TopoIII α de TRF1 qui colocalise avec γ H2AX, il nous semble logique que la TopoIII α ne soit pas associée aux foyers γ H2AX.



Figure (II-17)Détection des foyers γ-H2AX et de TopoIIIa dans les cellules
MRC5V1 TopoIII/YFP témoins et traitées par la télomestatine.

Analyse de la localisation du signal YFP-TopoIII (vert) par rapport aux foyers γ -H2AX (rouge) dans les cellules MRC5V1-YFP-TopoIII α témoins et traitées par 2 μ M de télomestatine pendant 48 h.

3.5 La télomestatine induit une dégradation du simple brin télomérique

Il n'est pas exclu que les dommages à l'ADN induits après le traitement des cellules par la télomestatine puissent être la conséquence d'un raccourcissement des extrémités télomériques. Pour vérifier cette hypothèse, l'effet de la télomestatine sur le brin G télomérique de la lignée MRC5V1 a été étudié en mesurant leur longueur par la technique d'hybridation en solution. Cette technique consiste à hybrider dans des conditions non dénaturantes l'ADN génomique avec une sonde oligonucléotidique complémentaire au brin G télomérique.

Après traitement par des concentrations croissantes de télomestatine (0.5, 1, 2 et 5 μ M), une diminution du signal d'hybridation a été détectée à partir de 0.5 μ M et atteint 50% de la

valeur du contrôle à 1 μ M de télomestatine (**Figure II-18**). Ce résultat est en accord avec d'autres travaux qui montrent que la télomestatine induit la dégradation du simple-brin dans les cellules télomérase positives (Gomez et al., 2004 ; Douarre et al., 2005 ; Brassart et al., 2007).

En conclusion nos résultats indiquent que la télomestatine induit une réponse aux dommages de l'ADN importante au niveau des télomères qui est associée avec une perte de l'extension télomérique simple-brin.



Figure (II-18) La télomestatine induit une dégradation du simple-brin télomérique.

A. L'ADN a été extrait à partir des cellules MRC5V1-YFP-TopoIIIa non traitées ou traitées par la télomestatine pendant 48 h aux concentrations indiquées. Le signal du brin G a été évalué par la technique d'hybridation en solution non dénaturante en présence de la séquence télomérique radiomarquée (AATCCC)₄. Le gel est également coloré avec le bromure d'éthidium pour vérifier la quantité d'ADN déposée. **B.** Quantification de l'expérience représentée en A. Le signal d'hybridation a été normalisé par rapport au signal du bromure d'éthidium. Les résultats sont exprimés en pourcentage du signal du brin G des cellules témoins non traitées, pour lesquelles le signal est définit par 100%.

4. <u>Discussion</u>

La stabilisation par des ligands des structures G-quadruplexes au niveau des télomères provoque une déprotection des télomères caractérisée par la fusion des extrémités télomériques, la formation de ponts anaphasiques, et la dégradation du simple-brin (Gomez et al., 2004 ; Incles et al., 2004; Leonetti et al., 2004; Pennarun et al., 2005). Ces effets ont été mis en évidence dans les cellules télomérase positives. De plus, la télomestatine provoque l'exclusion des protéines télomériques indispensables pour l'intégrité des télomères telles que TRF2 et POT1. Cette déprotection des télomères est associée avec une réponse aux dommages de l'ADN sur une partie des extrémités télomériques. Notre équipe a obtenu des résultats similaires avec un dérivé de pyridine dicarboxamide, la Raphaine A (Rodriguez et al., 2008).

Puisque ces dérivés ont initialement été développés comme des agents inhibiteurs de la télomérase, nous avons voulu étudier l'action de la télomestatine en absence de la télomérase, dans un modèle ALT, où l'élongation des télomères est maintenue par un mécanisme de recombinaison. En effet, à l'exception de leurs effets sur la croissance cellulaire, aucune information n'est connue concernant le mécanisme d'action des ligands des G-quadruplexes sur ces modèles ALTs (Gowan et al., 2001 ; Riou et al., 2002 ; Kim et al., 2003 ; Pennarun et al., 2005).

Dans cette étude, nous avons montré que la télomestatine permet une dégradation rapide du simple-brin télomérique dans les cellules ALT MRC5V1-TopoIII-YFP. Cette dégradation est induite à court terme à partir de faible concentration de télomestatine (2µM, 48h). La dégradation du simple-brin télomérique pourrait être reconnue comme un signal de dommage de l'ADN à l'origine de l'arrêt de la croissance cellulaire observé. Notre équipe avait également mis en évidence l'effet de la télomestatine sur la longueur du brin G télomérique dans la lignée ALT WI38-VA13 (Lemarteleur et al., 2005). Il semble donc que l'altération de la longueur du simple-brin télomérique soit un marqueur de l'activité de la télomestatine, aussi bien dans les cellules ALT que dans les cellules télomérase positives.

Nous avons montré également que la télomestatine provoque une importante réponse de type dommage de l'ADN dans la lignée ALT MRC5V1, mise en évidence par la formation de nombreux foyers γ H2AX qui colocalisent aux télomères. Ce résultat contraste avec des travaux antérieurs sur les lignées télomérase positives où seulement une faible fraction des extrémités télomériques forment des TIFs (Telomere Induced Foci) (Gomez et al., 2006b ; Wu et al., 2008), suggérant que les dommages de l'ADN induits par la télomestatine ont lieu

principalement dans les régions extra-télomériques où des séquences susceptibles de former des structures en G-quadruplexe ont été identifiées (Huppert., 2008). Il est aussi possible que les G-quadruplexes stabilisés par la télomestatine soient dissociés dans les régions télomériques. Il n'est pas exclu que des résolvases spécifiques des G-quadruplexes, comme par exemple l'hélicase FANCJ puissent résoudre les structures en G-quadruplexes afin d'éviter le blocage de la réplication et l'accumulation des dommages de l'ADN (Wu et al., 2008).

La réponse aux dommages de l'ADN observée dans les cellules ALT traitées par la télomestatine est associée avec une forte diminution du niveau protéique du complexe TopoIIIa/TRF2/BLM. Le même effet a été observé après la déplétion de la TopoIIIa par siRNA dans les cellules ALT (Temime-smaali et al., 2008). La déplétion des protéines TopoIIIa, TRF2 et BLM par la télomestatine est en accord avec l'hypothèse que ces trois protéines forment un complexe spécifique dans les lignées ALT. Il est probable que l'altération d'une seule protéine induise l'altération des deux autres.

Il s'avère que l'altération du simple-brin télomérique et la formation des TIFs dans les cellules ALT traitées par la télomestatine ne provoquent pas l'apoptose des cellules. Cependant, il n'est pas exclut qu'un traitement plus long puisse induire l'apoptose, ce qui serait intéressant de vérifier.

Les APBs sont des structures spécifiques des lignées ALT qui sont formés par la protéine PML, l'ADN télomérique et les protéines associées aux télomères, TRF1 et TRF2. Nous avons montré par imagerie que le traitement des cellules ALT par la télomestatine provoque la dissociation de la TopoIIIa des PML, de TRF2 et des autres composants du shelterin ; TRF1 et TIN2.

L'utilisation de la construction MRC5V1TopoIII/YFP-TRF2/CFP nous a permis de visualiser les trois protéines TopoIII α , TRF2 et PML qui sont réparties dans des foyers séparés, suite au traitement par la télomestatine, avec TRF2 qui est également exclu des PML. L'équipe de Ide a montré que la télomestatine induit la dissociation de TRF2 des télomères dans les cellules cancéreuses (Tahara et al., 2006) et donc l'exclusion de la TopoIII α des PML pourrait être liée avec la dissociation de TRF2 des télomères. La perte de l'interaction physique entre la TopoIII α et TRF2 a également été vérifiée par immunoprécipitation. Ce qui suggère que la localisation de chacune de ces deux protéines des télomères est assurée par l'autre et que la télomestatine altère cette interaction. Ainsi, la délocalisation de la TopoIII α de TRF2 induite par la télomestatine pourrait être associée avec celle d'autres protéines télomériques. Ces résultats suggèrent que la télomestatine provoque la dissociation des APBs. Bien que leur organisation structurale soit encore mal connue, des publications récentes suggèrent qu'il existe une relation étroite entre la formation des APBs, la présence des protéines du shelterin et le maintien des télomères par les mécanismes de recombinaison (Jiang et al., 2007; Zhong et al., 2007).

Des travaux récents du groupe d'Arturo Londono-Vallejo indiquent que les APBs formeraient une plate-forme (appelée Bouquets télomériques) permettant la résolution d'intermédiaires de réplication des télomères. Ces structures permettraient une organisation spatiotemporelle des télomères qui serait requise pour la complétion des réactions de recombinaison.

La télomestatine provoquerait une redistribution des télomères devenus «non protégés» à la suite de la destruction de la plate-forme ou du bouquet télomérique.

Il a été démontré que la déplétion des composants du shelterin incluant TRF1, TRF2 et TIN2 réduit la formation des APBs (Jiang et al., 2007), et puisque la télomestatine inhibe la fixation de la TopoIII α sur le brin G *in vitro*, une des explications les plus simples est que la télomestatine altère les interactions entre les télomères et les protéines reconnaissant les télomères, parmi lesquelles, la TopoIII α , en inhibant l'assemblage correct des APBs. Une autre possibilité serait que la télomestatine induise un effet indirect sur la structure des télomères.

En effet, bien que TRF2 ne soit pas directement liée avec le brin télomérique G, la stabilisation des G-quadruplexes pourrait induire des altérations structurales indirectes au niveau des extrémités télomériques conduisant à l'exclusion ou la délétion de TRF2.

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 la télomestatine puisse altérer une telle structure (Smogorzewska and de Lange, 2004; Tauchi et al., 2003; van Steensel et al., 1998).

Plusieurs preuves indiquent que TRF2 affecte la structure des télomères et réprime la recombinaison homologue au niveau de la t-loop (Palm and De lange., 2008). Il a été récemment montré que le domaine C-terminal de TRF2 est impliqué dans la modification de la topologie de l'ADN télomérique, afin de promouvoir l'invasion du duplexe d'ADN et de se lier aux jonctions de Holliday (Fouche et al., 2006 ; Amiard et al., 2007).

Ces éléments nous permettent de proposer que la TopoIIIa ait un rôle essentiel dans la physiologie des télomères des lignées ALT en catalysant la résolution des intermédiaires

topologiques produits par TRF2 afin de moduler la formation de la t-loop ou les processus de recombinaison.

Il est probable que la TopoIIIα catalyse soit la résolution de la D-loop formée au niveau de la t-loop soit les double-jonctions Holliday formées durant la recombinaison des télomères. La stabilisation des G-quadruplexes par la télomestatine pourrait interférer avec la formation ou la résolution de la t-loop ou avec la résolution des jonctions de Holliday aux extrémités télomériques.

La différence majeure entre les cellules ALT et les cellules télomérase positives est la présence ou l'absence des APBs qui correspondent au siège de la recombinaison. Par conséquent, l'inhibition de la résolution des jonctions de Holliday pourrait être plus délétère pour la structure des télomères dans les ALTs que l'inhibition de la formation ou la résolution de la t-loop, puisque la TopoIII α a un rôle essentiel uniquement dans les ALTs. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la formation ou la résolution de la t-loop soit un processus critique que dans les cellules ALTs.

En conclusion, nous avons montré que la télomestatine induit un dysfonctionnement des télomères des lignées ALT, associé avec une altération des APBs et la délétion du complexe TopoIIIa/TRF2/BLM. Ces résultats confirment l'intérêt des ligands de G-quadruplexe dans la thérapie des cellules tumorales de type ALT.

Afin de compléter ce travail, des expériences visant à déterminer si la TopoIIIa contrôle effectivement la recombinaison des télomères dans les cellules de mammifères et si la télomestatine agit directement sur la TopoIIIa ou indirectement via TRF2, seront d'un grand intérêt.

La télomestatine pourrait aussi occasionner une altération ou un blocage de la réplication des télomères. Ainsi, il serait intéressant de mettre en évidence la formation de foyers γ H2AX au niveau de la fourche de réplication après incorporation de Brdu, et d'étudier la localisation de la TopoIII α par rapport aux sites de la fourche de réplication après traitement par la télomestatine.
Conclusions et perspectives

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans le cadre de l'identification de nouvelles cibles pour la thérapie anticancéreuse, mais également de la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans leurs actions.

Cibler l'immortalisation des cellules tumorales due au maintien des extrémités télomériques par l'expression de la télomérase constitue un axe de recherche en oncologie qui a été développé. Cependant, aucune équipe n'était intéressée par les cellules déficientes en télomérase et dont le maintien des extrémités télomériques est assurée par un mécanisme de recombinaison.

Dans ce travail de thèse, deux types d'approches ont été abordés : l'une basée sur l'inhibition d'une protéine dont nous supposions un rôle au niveau des télomères «la topoisomérase III α », l'autre par l'interaction directe de composés avec les séquences télomériques afin de stabiliser ces séquences et de désorganiser la structure télomérique. Cette seconde approche, basée sur une conformation particulière que peut adopter l'ADN télomérique, constitue l'activité principale de notre laboratoire depuis quelques années.

La première partie de notre travail nous a permis d'étudier les propriétés de la TopoIII α , sa localisation et son interaction avec les télomères et les conséquences de sa déplétion dans les lignées ALT et télomérase positives.

Dans la deuxième partie, nous avons caractérisé le mécanisme d'action de la télomestatine dans les cellules ALT et montré son activité inhibitrice sur la TopoIIIα *in vitro*.

La TopoIIIa est localisée pendant l'interphase dans les APBs des lignées ALT avec les PML et les composants du shelterin, TRF1, TRF2, TIN2 et POT1. Dans les lignées télomérase positives, la TopoIIIa colocalise également avec le PML, cependant, de très rares colocalisations ont été observées avec TRF2. Au cours de la mitose, la TopoIIIa est exclue du noyau dans les lignées ALT et télomérase positives.

L'interaction physique de la TopoIIIa avec les protéines télomériques TRF2 et TRF1 a été démontrée par immunoprécipitation de la TopoIIIa. Cependant, des problèmes liés à la spécificité de l'anticorps anti-TRF2 nous ont empêchés de reproduire la réaction inverse (détection de la TopoIIIa en immuno-précipitant TRF2). L'hélicase BLM co-immunoprécipite également avec la TopoIIIa et TRF2 dans les lignées ALT et télomérase positives, ce qui indique l'existence d'un complexe TopoIIIa/BLM/TRF2 dans ces deux lignées. Nous suggérons aussi l'existence d'un autre complexe TopoIIIa/TRF2 indépendant de BLM.

En effet, alors que la déplétion de TopoIIIa induit une dégradation de BLM et TRF2, la déplétion de BLM ne modifie pas l'expression des protéines TRF2 et TopoIIIa. L'identification récente de RMI2, un quatrième partenaire du complexe RTR (RecQ/TopoIII/RMI) et de son rôle dans la régulation des interactions protéine-protéine dans ce complexe indique qu'il existe une grande diversité des associations possibles de ces partenaires entre eux (Voir figure V-10). Un des points non résolus que soulève notre travail correspond à la participation des protéines RMI1 (BLAP75) et RMI2 au complexe TopoIIIa/BLM/TRF2 formé aux télomères. Cette étude peut être effectuée par une approche directe en utilisant des anticorps dirigés contre ces protéines ou des constructions taggées. D'autre part, puisque l'essentiel du complexe RTR a été identifié en utilisant la protéine BLM comme «amorce», il serait intéressant de rechercher les partenaires de TopoIIIa par une approche protéomique en utilisant cette dernière comme amorce.

Enfin, un travail publié début 2009 qui utilise une approche d'immunoprécipitation de la chromatine couplée à une analyse protéomique confirme que la TopoIIIα est une protéine spécifique associée à la chromatine télomérique des cellules ALT (Déjardin et al., 2009).

L'ensemble de nos résultats suggèrent que la TopoIIIa n'a pas le même rôle dans les cellules télomérase positives et les cellules ALT.

D'autres perspectives de ce travail sont la validation de l'interaction de la TopoIIIa avec les autres composants du shelterin, savoir si son interaction avec TRF2 est directe et quels sont les domaines de TopoIIIa impliqués dans cette interaction. La déplétion de la TopoIIIa pourrait avoir des conséquences sur l'expression et la localisation des autres protéines télomériques, et inversement, il est essentiel de savoir si l'association de la TopoIIIa avec le télomère dépend des autres facteurs télomériques. De même, les mécanismes de recombinaison des lignées ALT impliquant le complexe TopoIIIa/BLM/TRF2 restent à élucider et pourrait être étudiés par la technique de co-FISH (Arnoult et al., 2008).

Nous montrons dans la deuxième partie de notre travail de thèse que la fixation de la TopoIII α aux séquences télomériques est bloquée par la stabilisation des structures G-quadruplexes et que la télomestatine provoque dans les cellules ALT un dysfonctionnement télomérique identique à celui obtenu par la déplétion de la TopoIII α par siRNA (**Figure II-19**). Ces résultats suggèrent que la télomestatine pourrait se révéler aussi comme un inhibiteur des fonctions télomériques de la TopoIII α . Des expériences complémentaires de ChIP permettraient de compléter les données d'immunofluorescence.

Outre les télomères, la télomestatine pourrait agir pour bloquer les fonctions de la TopoIIIa sur d'autres sites du génome susceptibles de former des G-quadruplexes. A ce titre, une

approche génomique par ChIP des régions du génome où la fixation de la TopoIII α est altérée par la télomestatine serait intéressante à réaliser.

L'arrêt de la croissance cellulaire induit par la déplétion de la TopoIIIa suggère qu'un inhibiteur catalytique de la TopoIIIa pourrait être utilisé comme agent thérapeutique dans les cellules ALT. Ceci dit, il n'est pas exclu que l'arrêt de la croissance soit dû à une fonction non télomérique de la TopoIIIa, ou à un effet indirect relié à la déplétion de la TopoIIIa.

Il serait intéressant de déterminer si la réintroduction d'un mutant Y/F catalytiquement inactif de la TopoIII α après déplétion de la protéine endogène restaurerait la croissance cellulaire.



Figure II-19 Modèle d'action de la Télomestatine dans les cellules ALT

Bibliographie

Ababou M, Dutertre S, Lecluse Y, Onclercq R, Chatton B, Amor-Gueret M. ATM-dependent

phosphorylation and accumulation of endogenous BLM protein in response to ionizing radiation, Oncogene (**2000**) 19: 5955–5963.

Abraham RT. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases, Genes Dev (2001) 15: 2177-96.

Ahumada A and Tse-Dinh Y CThe Zn(II) binding motifs of E. coli DNA topoisomerase I is part of a high-affinity DNA binding domain, Biochem. Biophys. Res. Commun (**1998**) 251: 509–514.

Alberts B, Molecular Biological of the Cell, 4th edition, Garland, New York, (2002).

Ambrus A, Chen D, Dai J X, Jones R A, Yang D Z. Solution structure of the biologically relevant g-quadruplex element in the human c-MYC promoter, Implications for g-quadruplex stabilization, Biochemistry (**2005**) 44: 2048-2058.

Ambrus A, Chen D, Dai J, Bialis T, Jones R A, Yang D. Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution, Nucleic Acids Research (**2006**) 34: 2723-2735.

Amor-Gueret M. Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis, Cancer Lett (**2006**) 236: 1–12.

Arnoult N, Shin-Ya K, Londoño-Vallejo JA. Studying telomere replication by Q-CO-FISH: the effect of telomestatin, a potent G-quadruplex ligand., Cytogenet Genome Res (**2008**) 4: 229-236.

Arvin L, Leipe DD and Koonin E V. Toprim – a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins, Nucleic Acids Research (**1998**) 26: 4205–4213.

Arimondo P B, Riou J F, Mergny J L, Tazi J, Sun J S, Garestier T. Interaction of human DNA topoisomerase I with G-quartet structures, Nucleic Acids Res (**2000**) 24: 4832-4838.

Arthanari H, Bolton P H, Functional and dysfunctional roles of quadruplex DNA in cells, Chem. Biol (2001) 8: 221-230.

Arturo Londono-Vallejo J, Der-Sarkissian H, Cazes L, Bacchetti S and Reddel RR. Alternative Lengthening of Telomeres Is Characterized by High Rates of Telomeric Exchange, Cancer research (**2004**) 64: 2324–2327.

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: 7585-7590.

Autexier C and Lue NF. The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase, Annu Rev Biochem (**2006**) 75: 493-517.

Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriauli L, Giulotto E, Lingner J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends, Science (2007) 5851:798-801.

Bacchetti S and Counter C M. Telomeres and telomerase in human cancer, Int. J. Oncol (1995) 7: 423–432.

Bachand F and Autrxier C. Functional Regions of Human Telomerase Reverse Transcriptase and Human Telomerase RNA Required for Telomerase Activity and RNA-Protein Interactions, Molecular and cellular biology (**2001**) 1888–1897.

Bachrati CZ, Borts R H and Hickson I D. Mobile D-loops are a preferred substrate for the Bloom's syndrome helicase. Nucleic Acids Res (**2006**) 34: 2269 – 2279.

Bachrati CZ, Hickson ID. RecQ helicases: suppressors of tumorigenesis and premature aging, Biochem J (**2003**) 374: 577–606.

Bae NS and Baumann P. A RAP1/TRF2 complex inhibits nonhomologous end-joining at human telomeric DNA ends, Mol Cell (**2007**) 26: 323-334.

Bailey SM, Brenneman MA, Goodwin EH. Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase negative cells, Nucleic Acids Res (**2004**) 32: 3743-3751.

Bakkenist C J, Kastan M B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation, Nature (2003) 421: 499-506.

Balagurumoorthy P, Bramachari S K. Structure and stability of human telomeric sequence, J. Mol. Biol (**1994**) 269: 21858-21869.

Bates P J, Kahlon J B, Thomas S D, Trent J O, and Miller D M. Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding, J Biol Chem (**1999**) 274: 26369-26377.

Baumann P and Cech TR. Pot1, the Putative Telomere End-Binding Protein in Fission Yeast and Humans, Science (**2001**) 292: 1171–1175.

Bechter OE, Zou Y, Shay JW, Wright WE. Homologous recombination in human telomerase-positive and ALT cells occurs with the same frequency, EMBO Rep (**2003**) 4: 1138-1143.

Bechter OE, Zou Y, Walker W, Wright WE, Shay JW. Telomeric recombination in mismatch repair deficient human colon cancer cells after telomerase inhibition, Cancer Res (**2004**) 64: 3444-3451.

Benetti R, M. Garcia-Cao, M.A. Blasco, Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres, Nat. Genet (**2007**) 39: 243-250.

Beran-Steed R K and Tse-Dinh Y CThe carboxy terminaldomain of Escherichia coli DNA topoisomerase I confers higheraffinity to DNA, Proteins (**1989**) 6, 249–258.

Berger JM, Structure of DNA topoisomerases, Biochim. Biophys. Acta (1998) 1400: 3-18.

Bergerat A, De Massy B, Gadelle D, Varoutas P C, Nicolaset A and Forterre P. An atypical topoisomerase II from Archaea with implications for meiotic recombination, Nature (**1997**) 386: 414-417.

Bermudez Y, Erasso D, Johnson NC, Alfonso MY, Lowell NE, Kruk PA. Telomerase confers resistance to caspase-mediated apoptosis, Clin Interv Aging (**2006**) 2:155-167.

Bernardi R, Scaglioni PP, Bergmann S, Horn HF, Vousden KH and Pandolfi PP. PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus, Nat. Cell Biol (**2004**) 6:665–672.

Bernardi R, Guernah I, Jin D, Grisendi S, Alimonti A, Teruya-Feldstein J, Cordon-Cardo C, Simon MC, Rafii S, Pandolfi PP. PML inhibits HIF-1 α translation and neoangiogenesis through repression of mTOR, Nature (**2006**) 442: 779–785.

Bianchi A, Shore D. How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex, Mol Cell (**2008**) 2:153-165.

Bianchi A, Smith S, Chong L, Elias P and De LangeT. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA, EMBO J (**1997**)17: 1785-1794.

Blackburn E H. Structure and function of telomeres, Nature (1991) 350, 569-573.

Blackburn EH and Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena, J Mol Biol (**1978**) 120: 33-53

Bock L C, Griffin L C, Latham J A, Vermaas E H and Toole J J. Selection of singlestranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin, Nature (**1992**) 355, 564-566.

Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells, Science (**1998**) 279, 349-352.

Boulton SJ, Jackson SP. Components of the Ku-dependent nonhomologous endjoining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. EMBO J (**1998**)17:1819–28.

Brassart B, Gomez D, De Cian A, Paterski R, Montagnac A, Qui KH, Temime-Smaali N, Trentesaux C, Mergny JL, Gueritte F, Riou JF. A new steroid derivative stabilizes gquadruplexes and induces telomere uncapping in human tumor cells, Mol Pharmacol (**2007**) 3: 631-640.

Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L and De Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2, Nat. Genet (**1997**) 17:231–235.

Broccoli D, Young JW, de Lange T. Telomerase activity in normal and maligant hematopoietic cells, Proc Natl Acad Sci USA (**1995**) 92: 9082-9086.

Bryan TM and Reddel RR. Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells, Eur J Cancer (1997) 5: 767-773.

Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity, EMBO J (**1995**) 14:4240–4248.

Bundock P and Hooykaas P. Severe developmental defects, hypersensitivity to DNAdamaging agents, and lengthened telomeres in Arabidopsis MRE11 mutants, Plant Cell (2002) 14: 2451–2462.

Campbell NH, Parkinson GN. Crystallographic studies of quadruplex nucleic acids, Methods (2007) 43: 252-263

Campisi J, Kim S H. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection, Exp Gerontol (**2001**) 10: 1619-1637.

Cao Y, Li H, Deb S, Liu JP. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity, Oncogene (**2002**) 20: 3130-3138.

Cayuela ML, Flores JM, Blasco MA. The telomerase RNA component Terc is required for the tumour-promoting effects of Tert overexpression, EMBO reports (**2005**) 6: 268–274.

Cech T R. Life at the end of the chromosome: telomeres and telomerase, Angew. Chem. Int. Ed (2000) 39: 34-43.

Celli GB and De Lange T. DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion, Nat. Cell Biol (**2005**) 7:712–718.

Cerone MA, Autexier C, Londono-Vallejo JA, Bacchetti S. A human cell line that maintains telomeres in the absence of telomerase and of key markers of ALT, Oncogene (**2005**) 24: 7893-7901.

Cerone MA, Londono-Vallejo JA, Bacchetti S. Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells, Hum. Mol. Genet (**2001**) 10: 1945-1952.

Cesare AJ, Griffith JD. Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops, Mol. Cell. Biol (**2004**) 24: 9948–9957.

Chaganti R S, Schonberg S, and German J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A (1974) 71: 4508–4512.

Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. Annu.Rev.Biochem (2001) 70:369-413.

Champoux J J and Dulbecco R. An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA a possible swivel for DNA replication polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cellsdye binding assay, Proc Natl Acad Sci U S A (**1972**) 69: 143-146.

Chan SW and Blackburn EH. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin, Oncogene (**2002**) 4: 553-63.

Chang S, Khoo CM, Naylor ML, Maser RS, DePinho RA. Telomere-based crisis: functional differences between telomerase activation and ALT in tumor progression, Genes Dev (2003) 17: 88–100.

Chang W, Dynek JN, Smith S. TRF1 is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after release from telomeres, Genes Dev (2003) 17:1328–1333

Changela A, Digate R J and Mondragon A. Crystal structure of a complex of a type IA DNA topoisomerase with a single-stranded DNA molecule, Nature (**2001**) 411: 1077–1081.

Changela A, Digate R J and Mondragon A. Structural studies of E. coli topoisomerase–III DNA Role of DNA topoisomerases in governing chromosome topology complexes reveal a novel type IA topoisomerase–DNA conformational intermediate, Journal of Molecular Biology (**2007**) 368: 105–118.

Chen J L, Blasco M A and Greider CW. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. Cell (**2000a**) 100: 503-514.

Chen Y, Yang Y, van Overbeek M, Donigian JR, Baciu P. A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins, Science (**2008**) 319:1092–1096.

Cheong C and Moore P B. Solution structure of an unusually stable RNA tetraplex containing G- and U-quartet structures, Biochemistry (**1992**) 31: 8406-8414.

Cheung I, Schertzer M, Rose A, Lansdorp PM. Disruption of dog-1 in Caenorhabditis elegans triggers deletions upstream of guanine-rich DNA, Nature Genet (**2002**) 31 : 405-409.

Ching RW, Dellaire G, Eskiw CH and Bazett-Jones DP. PML bodies: a meeting place for genomic loci? J. Cell Sci (2005) 118: 847–854.

Cogoi S, Xodo LE. G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS protooncogene and its effect on transcription, Nucleic Acids Res (2006) 34: 2536-2549.

Colgin LM, Baran K, Baumann P, Cech TR and Reddel RR. Human POT1 Facilitates Telomere Elongation by Telomerase, Curr. Biol (**2003**) 13: 942–946.

Colgin LM, Wilkinson C. The hTERTalpha splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity, Neoplasia (**2000**) 5: 426-32.

Collins K. The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes, Nat. Rev. Mol. Cell Biol (**2006**) 7: 484–494.

Compton SA, Choi JH, Cesare AJ, Ozgur S and Griffith JD. Xrcc3 and Nbs1 are required for the production of extrachromosomal telomeric circles in human alternative lengthening of telomere cells, Cancer Res (**2007**) 67: 1513-1519.

Condemine W, Takahashi Y, Zhu J, Puvion-Dutilleul F, Guegan S, Janin A, de Thé H. Characterization of endogenous human promyelocytic leukemia isoforms, Cancer Res (**2006**) 66: 6192–6198.

Confalonieri F, Elie C, Nadal M, de La Tour C, Forterreet P and Duguet M. Reverse gyrase: a helicase-like domain and a type I topoisomerase in the same polypeptide, Proc Natl Acad Sci U S A (**1993**) 10: 4753-4757.

Corbett KD, Berger JM. Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases, Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct (**2004**) 33:95-118.

Counter CM, Hahn WC, Wei W, Caddle SD, Beijersbergen RL, Lansdorp PM, Sedivy JM, Weinberg RA. Dissociation among in vitro telomerase activity, telomere maintenance, and cellular immortalization, Proc Natl Acad Sci USA (**1998**) 95: 14723-14728.

Coustry F, Sinha S, Maity SN and Crombrugghe B The two activation domains of the CCAAT-binding factor CBF interact with the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex, Biochem (**1998**) 331: 291-297.

Crowe DL, Nguyen DC. Mechanism of telomerase repression during terminal differentiation of normal epithelial cells and squamous carcinoma lines, Int J Oncol (**2005**) 3: 847-854.

D'Adda di F, Reaper PM, Clay-Farrace L. A DNA damage checkpoint response in telomereinitiated senescence, Nature (**2003**) 426:194-198.

Dai J, Chen D, Jones RA, Hurley LH and Yang D. NMR solution structure of the major Gquadruplex structure formed in the human BCL2 promoter region, Nucleic Acids Res (**2006**) 34: 5133-5144.

D'Amours D, Jackson SPThe Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signaling, Nat. Rev. Mol. Cell Biol (2002) 3:317–27

D'Antonio L, Bagga P. Computational methods for predicting intramolecular G-quadruplexes in nucleotide sequences, Computational Systems Bioinformatics Conference, IEEE (2004) 561-562.

Dantzer F, Giraud-Panis MJ, Jaco I, Ame JC, Schultz. Functional interaction between poly(ADP-ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2, Mol. Cell Biol (**2004**) 24: 1595–607

Da Silva MW. NMR methods for studying quadruplex nucleic acids, Methods (2007) 43: 264-277.

De Armond R, Wood S, Sun D, Hurley LH, Ebbinghaus SW. Evidence for the presence of a guanine quadruplex forming region within a polypurine tract of the hypoxia inducible factor 1alpha promoter, Biochemistry (**2005**) 44: 16341-16350.

De Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres, Genes Dev (**2005**) 19: 2100-2110.

Dellaire G and Bazett-Jones DP. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress, Bioessays (**2004**) 26: 963–977.

Dempsey LA, Sun H, Hanakahi L A and Maizels N. G4 DNA binding by LR1 and its subunits, nucleolin and hnRNP D, A role for G-G pairing in immunoglobulin switch recombination, J Biol Chem (**1999**) 274: 1066-1071.

Deng Z, Dheekollu J, Broccoli D, Dutta A, Lieberman PM. The origin recognition complex localizes to telomere repeats and prevents telomere-circle formation, Curr. Biol (2007) 17:1989–1995.

Der-Sarkissian H, Bacchetti S, Cazes L, Londoño-Vallejo JA. The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells, Oncogene (**2004**) 6:1221-1228.

De Stanchina E, Querido E, Narita M, Davuluri RV, Pandolfi PP, Ferbeyre G, Lowe SW. PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions, Mol Cell (**2004**) 4: 523-535.

Dexheimer TS, Sun D, Hurley LH. Deconvoluting the structural and drug-recognition complexity of the G-quadruplex-forming region upstream of the bcl-2 P1 promoter, J. Am. Chem. Soc (2006) 128: 5404-5415.

DiGat, RJ and Marians KJ. Identification of a potent decatenating enzyme from Escherichia coli, J Biol Chem (**1988**) 263: 13366–13373.

Ding H, Schertzer M, Wu X, Gertsenstein M, Selig S, Kammori M. Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein, Cell (2004) 7: 873-886.

Du SM, Wang H, Tse-Dinh YC and Seeman NC. Topological transformations of synthetic DNA knots, Biochemistry (**1995**) 34: 673–682.

Dudognon C, Pendino F, Hillion J, Saumet A, Lanotte M, Ségal-Bendirdjian E.Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance, oncogene (**2004**) 45:7 469-74.

Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. Telomere maintenance by recombination in human cells, Nat Genet (**2000**) 26: 447-450.

Duquette ML, Handa P, Vincent JA, Taylor AF and Maizels N. Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA, Genes Dev (2004) 18: 1618-1629.

Dutertre S, Sekhri R, Tintignac LA, Onclercq-Delic R, Chatton B, Jaulin C, Amor-Guéret M. Dephosphorylation and subcellular compartment change of the mitotic Bloom's syndrome DNA helicase in response to ionizing radiation, J Biol Chem (**2002**) 8:6280-6286.

Eddy J, Maizels N. Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome, Nucleic Acids Res (2006) 34: 3887-3896.

Ellis NA, Groden J, Ye TZ, et al. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases, Cell (**1995**) 83 : 655-666.

Eskiw, C. H., Dellaire, G. & Bazett-Jones, D. P. Chromatin contributes to structural integrity of promyelocytic leukemia bodies through a SUMO-1-independent mechanism, J. Biol. Chem (**2004**) 279: 9577–9585.

Etzioni S, Yafe A, Khateb S, Weisman-Shomer P, Bengal E and Fry M. Homodimeric MyoD preferentially binds tetraplex structures of regulatory sequences of muscle-specific genes, J Biol Chem (**2005**) 280: 26805-26812.

Fahlman R Pand Sen D. Cation-regulated self-association of synapsable DNA duplexes, J Mol Biol (**1998**) 280: 237-244.

Fang G. and Cech T. R. The beta subunit of Oxytricha telomere-binding protein promotes Gquartet formation by telomeric DNA, Cell (**1993**) 5: 875-885.

Fasching CL, Bower K, Reddel RR, Telomerase-independent telomere length maintenance in the absence of alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia bodies, Cancer Res (**2005**) 65: 2722-2729.

Fasching CL, Neumann AA, Muntoni A, Yeager TR, Reddel RR. DNA damage induces alternative lengthening of telomeres (ALT) associated promyelocytic leukemia bodies that preferentially associate with linear telomeric DNA, Cancer Res (**2007**) 67: 7072–7077.

Feldkamp U, Niemeyer CM. Rational design of DNA nanoarchitectures, Angew.Chem. Int. Ed (2006) 45: 1856-1876.

Fernando H, Reszka AP, Huppert J, Ladame S, Rankin S, Venkitaraman AR, Neidle S. Balasubramanian S., A conserved quadruplex motif located in a transcription activation site of the human c-kit oncogene, Biochemistry (**2006**) 45:7854-7860.

Folini M, Brambilla C, Villa R, Gandellini P, Vignati S, Paduano F, Daidone MG, Zaffaroni N. Antisense oligonucleotide-mediated inhibition of hTERT, but not hTERC, induces rapid cell growth decline and apoptosis in the absence of telomere shortening in human prostate, cancer cells (**2005**) 4:624-34.

Francia S,Weiss RS, Hande MP, Freire R, d'Adda di Fagagna F. Telomere and telomerase modulation by the mammalian Rad9/Rad1/Hus1 DNA-damage-checkpoint complex, Curr. Biol (**2006**) 16:1551–1558.

Frantz JD and Gilbert W. A novel yeast gene product, G4p1, with a specific affinity for quadruplex nucleic acids. J Biol Chem, (**1995**) 270: 20692-20697.

Frantz JD and Gilbert W. A yeast gene product, G4p2, with a specific affinity for quadruplex nucleic acids, J Biol Chem (**1995**) 270: 9413-9419.

French SL, Osheim YN, Cioci F, Nomura M and Beyer AL. In exponentially growing Saccharomyces cerevisiae cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes, Mol Cell Biol (**2003**) 23: p. 1558-68.

Fritz E, Elsea SH, Patel PI and Meyn MS Overexpression of a truncated human topoisomerase III partially corrects multiple aspects of the ataxiatelangiectasia phenotype. Proc Natl Acad Sci USA (**1997**) 94: 4538–4542

Froelich-Ammon S.J. and Osherof N. Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism, J. Biol. Chem (**1995**) 270:21429–21432.

Frontini, M., Imbriano, C., diSilvio, A., Bell, B., Bogni, A., Romier, C., Moras, D., Tora, L., Davidson, I., and Mantovani, R. NF-Y recruitment of TFIID, multiple interactions with histone fold TAF(II)s. J Biol Chem (2002) 277: 5841-5848.

Fry M. Tetraplex DNA and its interacting proteins, Front. Biosci (2007) 12: 4336-4351

Fujimoto K, Kyo S. 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**) 13: 2557-2562.

Fukuda H, Katahira M, Tsuchiya N, Enokizono Y, Sugimura T, NagaoM,*et al.* Unfolding of quadruplex structure in the G-rich strand of the minisatellite repeat by the binding protein UP1. Proc Natl Acad Sci USA (**2002**) 99 : 12685-12690.

Gangloff S, McDonald JP, C. Bendixen, L. Arthur, and R. Rothstein. The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase, Mol. Cell. Biol (**1994**) 14:8391–8398.

German J, Crippa LP and Bloom D. Bloom's syndrome. III. Analysis of the chromosome aberration characteristic of this disorder, Chromosoma (**1974**) 48: 361–366.

Giraldo R and Rhodes D. The yeast telomere-binding protein RAP1 binds to and promotes the formation of DNA quadruplexes in telomeric DNA, Embo J (**1994a**) 10: 2411-2420.

Giraldo R, Susuki M, Chapman L and Rhodes D. Promotion of parallel DNA quadruplexes by a yeast telomere binding protein: a circular dichroism study, Proc Natl Acad Sci U S A (1994b) 16: 7658-7662.

Gire V, Roux P, Wynford-Thomas D. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence, EMBO J (2004) 23: 2554-2563.

Gomez D, Mergny JL, Riou JF. Detection of telomerase inhibitors based on Gquadruplex ligands by a modified telomeric repeat amplification protocol assay, Cancer Res (**2002**) 62: 3365-3368.

Gomez D, O'Dononhue MF, Wenner T, Douarre C, Macadre J, Koebel P. 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 (**2006b**) 66: 6908-6912.

Gomez D, Wenner T, Brassart B, Douarre C, O'Donohue MF, El Khoury V, Shin-Ya K, Morjani H, Trentesaux C and Riou JF. Telomestatin-induced telomere uncapping is modulated by POT1 through G-overhang extension in HT1080 human tumor cells, J Biol Chem (**2006a**) 281: 38721-38729.

Gonda TJ, Gough NM, Dunn AR and de Biaquire J. Nucleotide sequence of cDNA clones of the murine myb protooncogene, EMBO J (**1985**) 2003–2008.

González-Suárez E, Geserick C, Flores JM, Blasco MA. Antagonistic effects of telomerase on cancer and aging in K5-mTert transgenic mice, Oncogene (**2005**)13: 2256-70.

Goodwin A, Wang SW, Toda T, Norbury C and Hickson ID Topoisomerase III is essential for accurate nuclear division in Schizosaccharomyces pombe. Nucleic Acids Res (**1999**) 27: 4050–4058.

Greider CW and Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis, Nature (1989) 337: 331-337.

Greider C W. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer, Proc Natl Acad Sci U S A (**1998**) 1: 90–92.

Griffith J, Bianchi A and De Lange T. TRF1 Promotes Parallel Pairing of Telomeric Tracts in Vitro, J Mol Biol (**1998**) 1:79-88.

Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H and De Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop, Cell (**1999**) 97: 503-14.

Grobelny JV, Godwin AK, Broccoli D, ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/M phase of the cell cycle, J. Cell Sci (**2000**) 113: 4577-4585.

Grobelny JV, Kulp-McEliece M and Broccoli D. Effects of reconstitution of telomerase activity on telomere maintenance by the alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway, Hum. Mol. Genet (**2001**)10:1953–1961.

Guilleret I, Yan P, Guillou L, Braunschweig R, Coindre JM, Benhattar J. The human telomerase RNA gene (hTERC) is regulated during carcinogenesis but is not dependent on DNA methylation, Carcinogenesis (**2002**) 23: 2025-2030.

Guipaud O, Marguet, E KM Noll, Bouthier de la Tour C and Forterre P. Both DNA gyrase and reverse gyrase are present in the hyperthermophilic bacterium thermotoga maritima, Proc. Natl. Acad. Sci (**1997**) 94:10606–10611.

Guo Q, Lu M, Marky L A, and Kallenbach N R, Interaction of the dye ethidium bromide with DNA containing guanine repeats, Biochemistry (**1992**) 31: 2451-2455.

Guo K, Pourpak A, Beetz-Rogers K, Gokhale V, Sun D, Hurley LH. Formation of pseudosymmetrical G-quadruplex and i-motif structures in the proximal promoter region of the RET, J. Am. Chem. Soc (**2007**) 129: 10220-10228.

Haendeler J, Hoffmann J. Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphorylation of tyrosine 707, Mol Cell Biol (2003) 13: 4598-610.

Hanaoka S, Nagadoi A, Yoshimura S, Aimoto S, Li B. NMR structure of the hRap1 Myb motif reveals a canonical three-helix bundle lacking the positive surface charge typical of Myb DNAbinding domains. J. Mol. Biol (**2001**) 312:167–175

Hanai R, Caron PR, Wang JC. Human TOP3: a single-copy gene encoding DNA topoisomerase III.Proc Natl Acad Sci U S A (**1996**) 8:3653-3657.

Hanakahi L A, Sun H and N. Maizels. High affinity interactions of nucleolin with G-Gpaired rDNA, J Biol Chem (**1999**) 274: 15908-15912.

Hande MP, Samper E. Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice, J Cell Biol (**1999**) 4: 589-601.

Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts, Nature (**1992**) 345: 458-60.

Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, Arruda I and Robinson MO. A mammalian telomerase-associated protein (**1997a**) Science 275: 973-977.

Harrington L, Zhou W, McPhail T, Oulton R, Yeung DS, Mar V, Bass M B and Robinson M O. Human telomerase contains evolutionarily conserved catalytic and structural subunits, Genes Dev (**1997b**) 11: 3109-3115.

Harrington L. Biochemical aspects of telomerase function, Cancer Lett (2003) 194:139–54.

Hartsuiker E, Vaessen E, Carr AM, Kohli J. Fission yeast Rad50 stimulates sister chromatid recombination and links cohesion with repair, EMBO J (**2001**) 20:6660–71

Hayakawa S, Kaneko H, Fukao T, Kasahara K, Matsumoto T, Furuichi Y and Kondo N. Characterization of the nuclear localization signal in the DNA helicase responsible for Bloom syndrome, Int. J. Mol. Med (**2000**) 5: 477–484.

Hazel P, Huppert JL, Balasubramanian S, Neidle S. Loop-length dependent folding of Gquadruplexes, J. Am. Chem. Soc (**2004**) 126:16405-16415.

Henderson E, Hardin C C, Walk S K, Tinoco I Jr, Blackburn E H. Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs, Cell (**1987**) 51: 899-908.

Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells, Oncogene (**2002**) 21: 598-610.

Henson JD, Hannay JA, McCarthy SW, Royds JA, Yeager TR, Robinson RA, Wharton SB, Jellinek DA, Arbuckle SM, Yoo J, Robinson BG, Learoyd DL, Stalley PD, Bonar SF, Yu D, Pollock RE, Reddel RR, A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astrocytomas, Clin, Cancer Res (**2005**) 1: 217-225.

Herbig U, Jobling W A., Chen BP, Chen D J. and Sedivy J M. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a), Mol Cell (**2004**) 4: 501-513.

Hershman SG, Chen Q, Lee JY, Kozak ML, Yue P, Wang LS, Johnson FB. Genomic distribution and functional analyses of potential G-quadruplex-forming sequences in Saccharomyces cerevisiae, Nucleic Acids Res (2008) 1:144-156.

Hiasa H and Marians KJ. Topoisomerase III, but not topoisomerase I, can support nascent chain elongation during theta-type DNA replication, J Biol Chem (**1994**) 269:32655–32659.

Hiasa H and Marians KJ Two distinct modes of strand unlinking during theta-type DNA replication, J Biol Chem (**1996**) 271: 21529–21535.

Hisatomi H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Nagao K, Kanamaru T, Hirata H, Hibi N and Tsukada, Y. Expression profile of a gamma-deletion variant of the human telomerase reverse transcriptase gene, Neoplasia (**2003**) 5: 193-197.

Hoare SF, Bryce LA, Wisman GB, Burns S, Going JJ, van der Zee AG, Keith WN., Lack of telomerase RNA gene hTERC expression in alternative lengthening of telomeres cells is associated with methylation of the hTERC promoter, Cancer Res (**2001**) 61: 27-32.

Hockemeyer D, Palm W, Else T, Daniels JP, Takai KK. Telomere protection by mammalian POT1 requires interaction with TPP1, Nat. Struct. Mol. Biol (**2007**) 14:754–761.

Hockemeyer D, Sfeir AJ, Shay JW, Woodring E Wright and Titia de Lange, POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end, The EMBO Journal (**2005**) 24: 2667–2678.

Hockemeyer D, Sfeir AJ, Shay JW, Wright WE and De Lange T. POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end, Embo J (**2005**) 24: 2667-2678.

Horvath MP and Schultz SC. DNA G-quartets in a 1.86 A resolution structure of an Oxytricha nova telomeric protein-DNA complex, J Mol Biol (**2001**) 310: 367-377.

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) 14:1621–31

Hsu HL, Gilley D, Blackburn EH, Chen DJ. Ku is associated with the telomere in mammals, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (**1999**) 96:12454–12458.

Hsu HL, Gilley D, Galande SA, Hande MP, Allen B. Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining, Genes Dev (**2000**) 14:2807–2812

Hu P, Beresten SF, van Brabant AJ, Ye TZ, Pandolfi PP, Johnson FB, Guarente L and Ellis NA. Evidence for BLM and Topoisomerase IIIalpha interaction in genomic stability, Hum. Mol. Genet (**2001**) 10: 1287–1298.

Huard, S, Moriarty TJ and Autexier C. The C terminus of the human telomerase reverse transcriptase is a determinant of enzyme processivity, Nucleic Acids Res (2003) 31: 4059-4070.

Hud NV, Smith FW, Anet FA, Feigon J. The selectivity for Kb versus Na in DNA quadruplexes is dominated by relative free energies of hydration: a thermodynamic analysis by 1H NMR, Biochemistry (**1996**) 35: 15383-15390.

Hughes TR,Weilbaecher RG,Walterscheid M, Lundblad V. Identification of the single-strand telomeric DNA binding domain of the Saccharomyces cerevisiae Cdc13 protein, Proc Natl Acad Sci USA (**2000**) 97:6457–6462.

Huppert JL, Balasubramanian S. Prevalence of quadruplexes in the human genome, Nucleic Acids Res (2005) 33: 2908-2916.

Huppert JL, Balasubramanian S. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome, Nucleic Acids Res (**2007**) 35: 406-413.

Hurley LH, Von Hoff DD, Siddiqui-Jain A, Yang D. Drug targeting of the c-MYC promoter to repress gene expression via a G-quadruplex silencer element, Semin Oncol (**2006**) 33: 498-512.

Isalan M, Patel SD, Balasubramanian S, Choo Y. Selection of zinc fingers that bind singlestranded telomericDNAin the G-quadruplex conformation, Biochemistry (**2001**) 40 : 830-836.

Ishov AM. PML is critical for ND10 formation and recruits the PML-interacting protein daxx to this nuclear structure when modified by SUMO-1, J Cell Biol (**1999**) 147: 221–234

Jeffreys A J. Human minisatellites, repeat DNA instability and meiotic recombination, Electrophoresis (**1999**) 20: 1665-1675.

Jensen K, Shiels C and Freemont PS. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. Oncogene (2001) 20: 7223–7233.

Jiang WQ, Zhong Z, Henson H, JD, Neumann AA, Chang AC, Reddel RR, Suppression of alternative lengthening of telomeres by Sp100-mediated sequestration of the MRE11/RAD50/NBS1 complex, Mol. Cell Biol (**2005**) 25: 2708-2721.

Jiang WQ, Zhong ZH, Henson JD, Reddel RR. Identification of candidate alternative lengthening of telomeres genes by methionine restriction and RNA interference, Oncogene (2007) 26: 4635-4647.

Jiang XR, Jimenez G, Chang E, et al. Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype, Nat Genet (**1999**) 21: 111-114.

Johnson FB, Marciniak RA, McVey M, Stewart SA, Hahn WC, Guarente L. The Saccharomyces cerevisiae WRN homolog Sgs1p participates in telomere maintenance in cells lacking telomerase, EMBO J (2001) 20: 905–13.

Kanaya T, Kyo S. Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription, Clin Cancer Res (**2000**) 4: 1239-1247.

Karlseder J, Kachatrian L, Takai H, Mercer K, Hingorani S, Jacks T and De Lange T, Targeted Deletion Reveals an Essential Function for the Telomere Length Regulator Trf1, Mol Cel Biol (**2003**) 23: 6533–6541.

Karlseder J, Smogorzewska A, de Lange T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss, Science (**2002**) 295: 2446-2449.

Karow JK, Chakraverty RK, Hickson ID. The Bloom's syndrome gene product is a 30–50 DNA helicase, J Biol Chem (**1997**) 272:30611–30614.

Karow JK, Constantinou A, Li JL, West SC, Hickson ID. The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of Holliday junctions, Proc Natl Acad Sci USA (**2000**) 97: 65504-65508.

Kaucher MS, Harrell WA, Davis JT. A unimolecular G-quadruplex that functions as a synthetic transmembrane Na+ transporter, J Am Chem Soc (**2006**) 128: 38-39.

Kawasaki K, Minoshima S, Nakato E, Shibuya K, Shintani A, Schmeits JL, Wang J and Shimizu N. One-megabase sequence analysis of the human immunoglobulin lambda gene locus, Gen Rese (**1997**) 7: 250–261.

Kelleher C, Kurth I, Lingner J. Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro, Mol. Cell Biol (**2005**) 25:808–818.

Kelleher C, Teixeira MT, Forstemann K, Lingner J. Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate, Trends Biochem Sci (**2002**) 27:572–579.

Kennedy GC, German MS and Rutter WJ. The minisatellite in the diabetes susceptibility locus IDDM2 regulates insulin transcription, Nat Genet (**1995**) 9: 293-298.

Khakhar RR, Cobb JA, Bjergbaek L, Hickson ID, Gasser SM and Wu L. RecQ helicases: multiple roles in genome maintenance, Trends Cell Biol (**2003**) 9: 493-501.

Kikin O, D'Antonio L, Bagga P. A web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences, Nucleic Acids Res. 34 (2006) W676-W682.

Kikin O, Zappala Z, D'Antonio L, Bagga PS. databases of quadruplex forming G-rich sequences in pre-mRNAs and mRNAs, Nucleic Acids Res (**2008**) 39:141-148.

Kikuchi A and Asai K. Reverse gyrase--a topoisomerase which introduces positive superhelical turns into DNA, Nature (**1984**) 309: 677-681.

Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, Duncan EL., Reddel RR, and Jefferson RA. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types, Hum Mol Genet (**1997**) 6: 2011-2019.

Kim H and Chen J. c-Myc interacts with TRF1/PIN2 and regulates telomere length, Biochem Biophys Res Commun (**2007**) 4: 842–847.

Kim MY, Vankayalapati H, Shin-ya K, Wierzba K and Hurley LH. Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular G-quadruplex, J Am Chem Soc (**2001**) 123: 1262-1263.

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL and Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer, Science (**1994**) 266:2011–2015.

Kim SH, Beausejour C, Davalos AR, Kaminker P, Heo SJ, Campisi J. TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. J. Biol. Chem (**2004**) 279:43799–43804

Kim SH, Kaminker P, Campisi J. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. Nat. Genet (**1999**) 23:405–12

Kimura A, Ohmichi M. Induction of hTERT expression and phosphorylation by estrogen via Akt cascade in human ovarian cancer cell lines, Oncogene (**2004**) 26: 4505-4515.

Kironmai KM, Muniyappa K. Alteration of telomeric sequences and senescence caused by mutations in RAD50 of *Saccharomyces* cerevisiae, Genes Cells (**1997**) 2: 443–455.

Kishi S, Zhou XZ, Ziv Y, Khoo C, Hill DE. Telomeric protein Pin2/TRF1 as an important ATM target in response to double strand DNA breaks, J Biol Chem (**2001**) 276: 29282–29291.

Kitao S, Shimamoto A, Goto M, et al. Mutations in RECQL4 cause a subset of cases of Rothmund-Thomson syndrome Nat Genet 1999 ; 22 : 82-4.

Klempnauer KH and Sippel AE. The highly conserved amino-terminal region of the protein encoded by v-myb oncogene function as a DNA-binding domain, EMBO J (**1987**) 6: 2719–2725.

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

Kostadinov R, Malhotra N, Viotti M, Shine R, D'Antonio L, Bagga P. a database of quadruplex forming G-rich sequences in alternatively processed mammalian pre-mRNA sequences, Nucleic Acids Res (**2006**) 34: 119-124.

Kumari S, Bugaut A, Huppert JL and Balasubramanian S. An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation, Nat Chem Biol (**2007**) 3: 218-221.

Kwan KY and Wang JC. Mice lacking DNA topoisomerase IIIb develop to maturity but show a reduced mean lifespan, Proc Natl Acad Sci USA (**2001**) 98: 5717–5721.

Kwan KY, Moens PB and Wang JC. Infertility and aneuploidy in mice lacking a type IA DNA topoisomerase IIIb, Proc Natl Acad Sci USA (**2003**) 100: 2526–2531.

Kyo S, Takakura M. Estrogen activates telomerase, Cancer Res (1999) 23:5917-21.

Kyo S, Takakura M. Sp1 cooperates with to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT), Nucleic Acids Res (**2000**) 3: 669-677.

Lafontaine DL and Tollervey D. Birth of the snoRNPs: the evolution of the modificationguide snoRNAs, Trends Biochem Sci (**1998**) 23: 383-388.

Larson ED, Duquette ML, Cummings WJ, Streiff RJ and Maizels N. MutSalpha binds to and promotes synapsis of transcriptionally activated immunoglobulin switch regions, Curr Biol (2005) 15: 470-474.

Laud PR, Multani AS, Bailey SM, Wu L, Ma J, Kingsley C, Lebel M, Pathak S, DePinho RA, Chang S. Elevated telomere-telomere recombination in WRN-deficient, telomere dysfunctional cells promotes escape from senescence and engagement of the ALT pathway, Genes Dev (**2005**) 19: 2560–2570.

Lavelle F, Riou J F, Laoui A, Mailliet P. Telomerase: a therapeutic target for the third millennium? Crit Rev Oncol Hematol (2000) 34: 111-126.

Lazzerini DE, De Lange T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1, Nature (**2007**) 448:1068–1071.

Lee Palumbo S, Memmott RM, Uribe DJ, Krotova-Khan Y, Hurley LH, Ebbinghaus SW. A novel G-quadruplex forming GGA repeat region in the c-myb promoter is a critical regulator of promoter activity, Nucleic Acids Res (**2008**) 36: 1755-1769.

Lee TH, Perrem K, Harper JW, Lu KP, Zhou XZ. The F-box protein FBX4 targets PIN2/TRF1 for ubiquitin-mediated degradation and regulates telomere maintenance, J Biol Chem (**2006**) 281:759–768

Lehming, N., A. Le Saux, J. Schuller, and M. Ptashne. Chromatin components as part of a putative transcriptional repressing complex, Proc Natl Acad Sci USA (**1998**) 95:7322–7326.

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**) 11:1223–1229.

Lei M, Zaug AJ, Podell ER and Cech TR. Switching human telomerase on and off with hPOT1 protein in vitro, J Biol Chem (**2005**) 280: 20449-20456.

Lemarteleur T, Gomez D, Paterski R, Mandine E, Mailliet P, Riou J F. Stabilization of the cmyc gene promoter quadruplex by specific ligands inhibitors of telomerase, Biochem Biophys Res Commun (**2004**) 323: 802-808. Lenain C, Bauwens S, Amiard S, Brunori M, Giraud-Panis MJ, Gilson E.. The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair, Curr. Biol (2006) 16:1303–1310.

Lendvay TS, Morris DK, Sah J, Balasubramanian B and Lundblad V. Senescence mutants of Saccharomyces cerevisiae with a defect in telomere replication identify three additional EST genes, Genetics (**1996**) 144: 1399-1412.

Lew A, Rutter WJ and Kennedy GC. Unusual DNA structure of the diabetes susceptibility locus IDDM2 and its effect on transcription by the insulin promoter factor Pur-1/MAZ, Proc Natl Acad Sci U S A (**2000**) 97: 12508-12512.

Li B, de Lange T. Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. Mol. Biol. Cell (**2003**) 14:5060–5068.

Li B, Oestreich S, De Lange T. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution, Cell (**2000**) 101:471–83.

Lillard-Wetherell K, Machwe A, Langland GT, Combs KA, Behbehani GK, Schonberg SA, German J, Turchi JJ, Orren DK, Groden J, Association and regulation of the BLM helicase by the telomere proteins TRF1 and TRF2. Hum Mol Genet (**2004**) 17: 1919-32.

Lima CD, Wang JC, Mondragon A. Crystallization of a 67 kDa fragment of Escherichia coli DNA topoisomerase I, J. Mol. Biol. (**1993**) 232: 1213-1216.

Lima CD, Wang JC. A. Mondragon, Three-dimensional structure of the 67 K N-terminal fragment of E. coli DNA topoisomerase I, Nature (**1994**) 367: 138-146.

Lin JJ, Zakian VA. The Saccharomyces CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNAbinding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo, Proc. Natl. Acad. Sci USA (**1996**) 93:13760–13765.

Lin SY and Elledge S J. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase, Cell (**2003**) 113: 881-889.

Lingner J, Cech TR, Hughes TR and Lundblad V. Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. Proc Natl Acad Sci USA (**1997**) 94: 11190-11195.

Lingner J, Cooper JP, Cech TR. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem, Science (**1995**) 269:1533–34

Liu D, O'Connor MS, Qin J, Songyang Z. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. J. Biol. Chem (**2004**) 279:51338–513342.

Liu D, Safari A, O'Connor MS. PTOP interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres, Nature Cell Biol (**2004**) 6, 673-680.

Liu LF, Liu CC and Alberts BM. T4 DNA topoisomerase: a new ATP-dependent enzyme essential for initiation of T4 bacteriophage DNA replication, Nature (**1979**) 281:456–461.

Liu Y, West SC. More complexity to the Bloom's syndrome complex, Genes Dev (2008) 20: 2737-2742.

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**) 279:13241–13248.

Lodge AJ, Anderson JJ, Ng SW, Fenwick F, Steward M, Haugk B, Horne CHW and Angus B. Expression of topoisomerase IIIa in normal and neoplastic tissues determined by immunohistochemistry using a novel monoclonal antibody, British Journal of Cancer (**2000**) 4: 498–505.

Lombard DB, Guarente L. Nijmegen breakage syndrome disease protein and MRE11 at PML nuclear bodies and meiotic telomeres, Cancer Res (**2000**) 60:2331–2334

Londono-Vallejo JA, Der-Sarkissian H, Cazes L, Bacchetti S, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange, Cancer Res (2004) 64: 2324-2327.

Luu KN, Phan AT, Kuryavyi V, Lacroix L, Patel DJ. Structure of the human telomere in K+ solution: An intramolecular (3+1) G-quadruplex scaffold, J. Am.Chem. Soc (**2006**) 128: 9963-9970.

Lyonnais S, Gorelick RJ, Mergny JL, Le Cam E and Mirambeau G. G-quartets direct assembly of HIV-1 nucleocapsid protein along single-stranded DNA, Nucleic Acids Res, (2003) 31: 5754-5763.

Macaya R F, Schultze P, Smith F W, Roe J A, Feigon J, Thrombinbinding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (**1993**) 90: 3745-3749.

Maftahi M, Han C, Langston LD, Hope JC, Zigouras N and Freyer GA. The top3 (+) gene is essential in Schizosaccharomyces pombe and the lethality associated with its loss is caused by Rad12 helicase activity, Nucleic Acids Res (**1999**) 27: 4715–4724.

Mankouri HW, Hickson ID. The RecQ helicase-topoisomerase III-Rmi1 complex: a DNA structure-specific 'dissolvasome? Trends Biochem Sci (**2007**) 12:538-546.

Manolis KG, Nimmo ER, Hartsuiker E, Carr AM, Jeggo PA, Allshire RC. Novel functional requirements for nonhomologous DNA end joining in *Schizosaccharomyces pombe*, EMBO J (**2001**) 20:210–21

Mao Z, Seluanov A, Jiang Y, Gorbunova V. TRF2 is required for repair of nontelomeric DNA double-strand breaks by homologous recombination, Proc Natl Acad Sci U S A (**2007**) 32:13068-13073.

Marciniak RA, Cavazos D, Montellano R, Chen Q, Guarente L, Johnson F.B., A novel telomere structure in a human alternative lengthening of telomeres cell line, Cancer Res (2005) 65: 2730-2737.

Masutomi K, Possemato R, Wong JM, Currier JL, Tothova Z, Manola JB, Ganesan S, Lansdorp PM, Collins K, Hahn WC. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses, (**2005**) 23:8222-8227.

Masutomi K, Yu EY, Khurts S, Ben-Porath I, Currier JL, Metz GB, Brooks MW, Kaneko S, Murakami S, DeCaprio JA, Weinberg RA, Stewart SA, Hahn WC.Telomerase maintains telomere structure in normal human cells, Cell (**2003**) 2: 241-253.

Mateyak MK, Zakian VA. Human PIF helicase is cell cycle regulated and associates with telomerase, Cell Cycle (**2006**) 23:2796-2804.

Mcclintock B. The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome brocken at meiosis, Proc Natl Acad Sci U S A (**1939**) 25: 405-416.

Mceachern MJ, Krauskopf A and Blackburn EH. Telomeres and their control, Annu Rev genet (2000) 34: 331-358.

Meetei AR, Sechi S, Wallisch M, Yang D, Young MK, Joenje H, Hoatlin ME and Wang W. A multiprotein nuclear complex connects Fanconi anemia and Bloom syndrome, Mol. Cell. Biol (**2003**) 23: 3417–3426.

Mergny JL and Helene C. G-quadruplex DNA: a target for drug design, Nat Med (**1998a**) 12: 1366-1367.

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, Helene C. Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay, Proc Natl Acad Sci USA (**2001**) 98: 3062-3067.

Mergny JL, Maurizot J. Fluorescence resonance energy transfer as a probe for G-quartet formation by a telomeric repeat, ChemBioChem (**2001**) 2:124-132

Mergny JL, Phan A, Lacroix L. Following G-quartet formation by UV-spectroscopy, FEBS Lett (**1998b**) 435: 74-78.

Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, Teulade-Fichou M P, Gilson E. Natural and pharmacological regulation of telomerase, Nucleic Acids Res (**2002**) 30: 839-865.

Minhas G S, Pilch D S, Kerrigan J E, Lavoie E J, Rice J E. Synthesis and G-quadruplex stabilizing properties of a series of oxazole-containing macrocycles, Bioorg Med Chem Lett (2006) 16: 3891-3895.

Mitchell JR, Cheng J, Collins K. A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 30 end, Mol. Cell Biol (**1999a**) 19: 567–576.

Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita, Nature (**1999b**) 402: 551–555.

Miyoshi T, Kanoh J, Saito M, Ishikawa F. Fission yeast Pot1-Tpp1 protects telomeres and regulates telomere length, Science (**2008**) b320:1341–44

Mohaghegh P, Karow JK, Brosh R M, Bohr VA and Hickson ID. The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases, Nucleic Acids Res (**2001**) 29, 2843 – 2849.

Molenaar C, Wiesmeijer K, Verwoerd NP, Khazen S, Eils R, Tanke HJ, Dirks RW. Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes, EMBO J (**2003**) 24: 6631-6641

Moller A, Sirma H, Hofmann T G, Staege H, Gresko E, Ludi KS, Klimczak E, Droge W, Will H and Schmitz M L. Sp100 is important for the stimulatory effect of homeodomaininteracting protein kinase-2 on p53-dependent gene expression, Oncogene (**2003**) 22:8731– 8737.

Monchaud D, Teulade-Fichou MP. A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands, Org. Biomol. Chem (**2008**) 6: 627-636.

Mondragon A, DiGate R. The structure of Escherichia coli DNA topoisomerase III, Structure (**1999**) 7: 1373-1383.

Morales CP, Holt SE, Ouellette M. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase, Nat Genet (**1999**) 21: 115-118.

Moreau S, Ferguson JR, Symington LS. The nuclease activity of Mre11 is required for meiosis but not for mating type switching, end joining, or telomere maintenance, Mol.Cell Biol (**1999**)19:556–66.

Moyzis R K, Buckingham J M, Cram L S, Dani M, Deaven L L, Jones M D. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)n, present at the telomeres of human chromosomes, Proc Natl Acad Sci U S A (**1988**) 18: 6622-6626.

Munoz-Jordan JL, Cross GA, De Lange T and Griffith JD. T-loops at trypanosome telomeres, Embo J (**2001**) 20: 579-88.

Muntoni A, Reddel RR. The first molecular details of ALT in human tumor cells, Hum. Mol. Genet (**2005**) 14: 191–196.

Murchie AI, Lilley DM. Retinoblastoma susceptibility genes contain 50 sequences with a high propensity to form guanine-tetrad structures, Nucleic Acids Res (**1992**) 20: 49-53.

Murnane JP, Sabatier L, Marder BA, Morgan WF. Telomere dynamics in an immortal human cell line, EMBO J (**1994**) 13: 4953-4962.

Murzin AG. OB (oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for nonhomologous sequences. EMBO J. (**1993**) 12:861–867

Nabetani A, Yokoyama O, Ishikawa F. Localization of hRad9, hHus1, hRad1 and hRad17, and caffeine-sensitive DNA replication at ALT (alternative lengthening of telomeres)-associated promyelocytic leukemia body, J Biol Chem (**2004**) 279: 25849–25857.

Naka K, Ikeda K and Motoyama N. Recruitment of NBS1 into PML oncogenic domains via interaction with SP100 protein, Biochem. Biophys. Res. Commun (**2002**) 299 : 863–871.

Nakajima A, Tauchi T, Sashida G, Sumi M, Abe K, Yamamoto Km, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Telomerase inhibition enhances apoptosis in human acute leukemia cells: possibility of antitelomerase therapy, Leukemia (**2003**)17: 560-567.

Nakamura M, Masutomi K. Efficient inhibition of human telomerase reverse transcriptase expression by RNA interference sensitizes cancer cells to ionizing radiation and chemotherapy, Hum Gene Ther (**2005**) 7: 859-868.

Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB and Cech TR. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human, Science (**1997**) 277: 955-959.

Nakamura TM, Moser BA, Russell P. Telomere binding of checkpoint sensor and DNA repair proteins contributes to maintenance of functional fission yeast telomeres. Genetics (**2002**) 161:1437–1452

Negorev D, Maul GG. Cellular protein localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot, Oncogene (**2001**) 20: 7234-42.

Neidle S and Parkinson GH. Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery, Nat. Rev. Drug Discov (**2002**) 1: 383-393.

Ng LJ, Cropley JE, Pickett HA, Reddel RR and Suter CM. Telomerase activity is associated with an increase in DNA methylation at the proximal subtelomere and a reduction in telomeric transcription, Nucleic Acids Research (2009) 1-8.

Nitiss J L, Pourquieret P, Pommier Y. Aclacinomycin A stabilizes topoisomerase I covalent complexes, Cancer Res (**1997**) 57: 4564-4569.

Nugent CI, Hughes TR, Lue NF, Lundblad V. Cdc13p: a single-strand telomeric DNAbinding protein with a dual role in yeast telomere maintenance, Science (**1996**) 274:249–252.

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**) 27 :28585-28591.

O'Connor MS, Safari A, Xin H, Liu D, Songyang Z. A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly, Proc Natl Acad Sci USA (2006) 103:11874–79

Oganesian L and Bryan TM. Physiological relevance of telomeric G-quadruplex formation: a potential drug target, Bioessays (**2007**) 29: 155-165.

Ogden GR, Connor E, Chisholm DM. Dyskeratosis congenita: report of a case and review of the literature, Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol (**1988**) 65: 586–591.

Ogino H, Nakabayashi K, Suzuki M, Takahashi EI, Fujii M, Suzuki T, Ayusawa D. Release of telomeric DNA from chromosomes in immortal human cells lacking telomerase activity, Biochem. Biophys. Res. Commun (**1998**) 248: 223–227.

Oh S, Song Y. The Wilm's tumor 1 tumor suppressor gene represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene, J Biol Chem (**1999**) 52:37473-37478.

Oliver AW, Bogdarina I, Schroeder E, Taylor IA and Kneale GG. Preferential binding of fd gene 5 protein to tetraplex nucleic acid structures. J Mol Biol (**2000**) 301: 575-84.

Olovnikov AM. A theory of marginotomy : the incomplete copying of template margin in enzymatic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. J Theor Biol (**1973**) 41: 181-190.

Opresko PL, Cheng WH, Bohr VA Junction of RecQ helicase biochemistry and human disease, J Biol Chem (**2004**) 279: 18099–18102

Opresko PL, von Kobbe C, Laine JP, Harrigan J, Hickson ID, Bohr VA. Bohr Telomerebinding Protein TRF2 Binds to and Stimulates the Werner and Bloom Syndrome Helicases, JBC (**2002**) 277: 41110–41119.

O'Reilly M, Teichmann SA, Rhodes D. Telomerases, Curr. Opin. Struct. Biol (1999) 9: 56-65.

Ou TM, Lu YJ, Tan JH, Huang ZS, Wong KY, Gu LQ. G-quadruplexes: Targets in anticancer drug design, ChemMedChem (**2008**) 3: 690-713.

Ouellette MM, Aisner DL, Savre-Train I, Wright WE, Shay JW. Telomerase activity does not always imply telomere maintenance, Biochem Biophys Res Commun (**1999**) 254: 795-803.

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**) 10:847-854

Palm W and De Lange T. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres, Annu. Rev. Genet (2008) 42: 21-34.

Pandita TK. ATM function and telomere stability, Oncogene (2002) 4: 611-618.

Paramasivan S, Rujan I, Bolton PH. Circular dichroism of quadruplex DNAs: applications to structure, cation effects and ligand binding, Methods (**2007**) 43: 324-331.

Park MJ, Jang YK, Choi ES, Kim HS, Park SD. Fission yeast Rap1 homolog is a telomerespecific silencing factor and interacts with Taz1p, (**2002**) 2: 327-33.

Parkinson GN, Lee MPH, Neidle S. Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA, Nature (**2002**) 417: 876-880.

Patel DJ, Phan AT, Kuryavyi V, Human telomere, oncogenic promoter and 50-UTR Gquadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics, Nucleic Acids Res (2007).

Pearson M, Carbone R, Sebastiani C, Cioce M, Fagioli M, Saito S, Higashimoto Y, Appella E, Minucci S, Pandolfi PP and Pelicci PG. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras, Nature (**2000**) 406:207–210.

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

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**) 12: 6662-6667.

Pennarun G, Granotier C, Gauthier L R, Gomez D, Hoffschir F, Mandine E, Riou J F, Mergny JL, Mailliet P, Boussin F D. Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands, Oncogene (2005).

Perrem K, Bryan, TM, Englezou A, Hackl T, Moy EL, Reddel RR. Repression of an alternative mechanism for lengthening of telomeres in somatic cell hybrids, Oncogene (**1999**) 18: 3383–3390.

Perrem K, Colgin LM, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Coexistence of alternative lengthening of telomeres and telomerase in hTERT-transfected GM847 cells, Mol. Cell. Biol (**2001**) 21:3862-3875.

Perry K and Mondragon A. Structure of a complex between E. coli DNAtopoisomerase I and single-stranded DNA, Structure (**2003**) 11, 1349-1358.

Phan AT, Modi YS, Patel DJ. Propeller-type parallel-stranded g-quadruplexes in the human c-myc promoter, J. Am. Chem. Soc (**2004**) 26: 8710-8716.

Phan AT, Kuryavyi V, Burge S, Neidle S, Patel DJ. Structure of an unprecedented G-quadruplex scaffold in the human c-kit promoter, J. Am. Chem. Soc. (**2007**) 129, 4386-4392.

Phan, AT, Luu KN, Patel DJ. Different loop arrangements of intramolecular human telomeric (3+1) G-quadruplexes in K+ solution, Nucleic Acids Res (**2006**) 34: 5715-5719.

Pinnavaia T J, Marshall C L, Mettler C M, Fisk C L, Miles H T, and Becker E D, Alkali metal ion specificity in the solution ordering of a nucleotide, 5'-guanosine monophosphate, J. Am. Chem. Soc (**1978**) 100: 3625-3627.

Pirzio LM, Freulet-Marriere MA. Human fibroblasts expressing hTERT show remarkable karyotype stability even after exposure to ionizing radiation, Cytogenet Genome Res (**2004**) 104: 87-94.

Pitt C W, Valente L P, Rhodes D and Simonsson T. Identification and Characterization of an Essential Telomeric Repeat Binding Factor in Fission Yeast, Journal of Biological Chemistry (**2008**) 283: 2693–2701.

Plank J L, Wu J and Hsieh TS. Topoisomerase IIIalpha and Bloom's helicase can resolve a mobile double Holliday junction substrate through convergent branch migration, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (**2006**) 103: 11118 – 11123.

Potts PR, Porteus MH and Yu H. Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks, EMBO J (2006) 14:3377-88.

Potts PR and Yu H. The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins, Nat. Struct. Mol. Biol (**2007**) 14:581–90

Qin Y, Hurley LH. Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA Gquadruplexes found in eukaryotic promoter regions, Biochimie (**2008**) 8:1149-1171.

Qin Y, Rezler EM, Gokhale V, Sun D, Hurley LH. Characterization of the G-quadruplexes in the duplex nuclease hypersensitive element of the PDGF-A promoter and modulation of PDGF-A promoter activity by TMPyP4, Nucleic Acids Res (**2007**) 25:7698-7713.

Rachwal PA, Fox KR. Quadruplex melting, Methods (2007) 43: 291-301.

Raices M, Verdun RE, Compton SA, Haggblom CI, Griffith JD. C. Elegans telomeres contain G-strand and C-strand overhangs that are bound by distinct proteins, Cell (**2008**) 132:745–757.

Ralph RK, Connors WJ, and Khorana HG. Secondary Structure and Aggregation in Deoxyguanosine Oligonucleotides, J. Am. Chem. Soc (**1962**) 84: 2265-2266.

Ranganathan V, Heine WF, Ciccone DN, Rudolph KL, Wu X. 2001. Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit, Curr. Biol (**2002**) 11: 962-966.

Rankin S, Reszka AP, Huppert J, Zloh M, Parkinson GN, Todd AK, Ladame S, Balasubramanian S, Neidle S. Putative DNA quadruplex formation within the human c-kit oncogene, J. Am. Chem. Soc. (**2005**) 127:10584-10589.

Raynard S, Bussen W and Sung P. A double Holliday junction dissolvasome comprising BLM, topoisomerase IIIalpha, and BLAP75, J. Biol. Chem (**2006**) 281: 13861-13864.

Razak ZR, Varkonyi RJ, Kulp-McEliece M, Caslini C, Testa JR, Murphy ME, Broccoli D. p53 differentially inhibits cell growth depending on the mechanism of telomere maintenance, Mol Cell Biol (**2004**) 13: 5967-77.

Reddel R R. A SUMO ligase for ALT, Nature Structural and Molecular Biology (2007) 14: 570-571.

Risitano A, Fox KR. Influence of loop size on the stability of intramolecular G-quadruplexes, Nucleic Acids Res (**2004**) 32: 2598-2606.

Riou JF, Gomez D, Lemarteleur T and Trenteseaux C. G-quadruplex DNA: myth or reality? Bull Cancer (**2003**) 4: 305-313.

Riou J F, Guittat L, Mailliet P, Laoui A, Renou E, Petitgenet O, Megnin-Chanet F, Helene C, Mergny J L. Cell senescence and telomere shortening induced by a new 13 series of specific G-quadruplex DNA ligands, Proc Natl Acad Sci (**2002**) 99: 2672-2677.

Rodriguez R, Müller S, Yeoman JA, Trentesaux C, Riou JF, Balasubramanian S. A novel small molecule that alters shelterin integrity and triggers a DNA-damage response at telomeres, J Am Chem Soc (**2008**) 47:15758-15759.

Rogan EM, Bryan TM, Hukku B, Maclean K, Chang ACM, Moy EL, Englezou A, Warneford SG, Dalla-Pozza L and Reddel RR. Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li Fraumeni syndrome fibroblasts, Mol. Cell. Biol (**1995**) 15: 4745-4753.

Roninson IB, Broude EV and Change BD. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells, Drug Resist Updat (**2001**) 5: 303-313.

Rothemund PWK. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns, Nature (**2006**) 440: 297-302.

Sacca B, Lacroix L, and Mergny JL. The effect of chemical modifications on the thermal stability of different G-quadruplex-forming oligonucleotides, Nucleic Acids Res (**2005**) 33: 1182-1192.

Salomoni P and Pandolfi PP. The role of PML in tumor suppression, Cell (2002) 108: 165-170.

Sanz MM, Proytcheva M, Ellis NA, Holloman WK, German J. BLM, the Bloom's syndrome protein, varies during the cell cycle in its amount, distribution, and co-localization with other nuclear proteins, Cytogenet Cell Genet (**2000**)91:217-23.

Sasisekharan V, Zimmerman S, Davies D R. Structure of Helical 5'-Guanosine Monophosphate, J. Mol. Biol (**1975**) 92: 171-179.

Schaffitzel C, Berger I, Postberg J, Hanes J, Lipps HJ and Pluckthun A. In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with Stylonychia lemnae macronuclei, Proc Natl Acad Sci U S A (2001) 98:8572-8577.

Schoeftner S and Blasco MA. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II, Nat Cell Biol (**2008**) 10: 228–236

Schofield MA, Agbunag R, Michaels ML and Miller JH. Cloning and sequencing of Escherichia coli mutR shows its identity to topB, encoding topoisomerase III, J. Bacteriol (1992) 174: 5168–5170.

Seeler JS, Marchio A, Sitterlin D, Transy C and Dejean A. Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (**1998**) 95:7316–7321.

Seeman NC. DNA nanotechnology: Novel DNA constructions, Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct (**1998**) 27: 225-248.

Seeman NC, Lukeman PS. Nucleic acid nanostructures: bottom-up control of geometry on the nanoscale, Rep. Prog. Phys (**2005**) 68: 237-270.

Seenisamy J, Rezler EM, Powell TJ, Tye D, Gokhale V, Joshi CS, Siddiqui-Jain A and Hurley LH, The dynamic character of the G-quadruplex element in the c-MYC promoter and modification by TMPyP4, J. Am. Chem. Soc (**2004**) 126:8702-8709.

Seimiya H, Sawada H. Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. Embo J (**2000**) 11: 2652-2661.

Seki T, Seki M, Katada T, Enomoto T. Isolation of a cDNA encoding mouse DNA topoisomerase III which is highly expressed at the mRNA level in the testis. Biochim Biophys Acta (**1998**) 2:127-131.

Seki T,Seki M, R. Onodera, T. Katada, and T. Enomoto. Cloning of cDNA encoding a novel mouse DNA topoisomerase III (Topo III β) possessing negatively supercoiled DNA relaxing activity, whose message is highly expressed in the testis, J. Biol. Chem (**1998**) 273:28553–28556.

Sen D and Gilbert W. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis, Nature (**1988**) 334: 364-366.

Sen D, Gilbert W. A sodium-potassium switch in the formation of four-stranded G4-DNA, Nature (**1990**) 344: 410-414.

Serakinci N, Christensen R. Ectopically hTERT expressing adult human mesenchymal stem cells are less radiosensitive than their telomerase negative counterpart, Exp Cell Res (**2007**) 5: 1056-1067.

Shafer R H, Smirnov I. Biological aspects of DNA/RNA quadruplexes, Biopolymers (2001) 56: 209-227.

Shakirov EV, Surovtseva YV, Osbun N, Shippen DE.. The Arabidopsis Pot1 and Pot2 proteins function in telomere length homeostasis and chromosome end protection, Mol. Cell Biol (**2005**) 25:7725–7733.

Sharma GG, Gupta A. hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair, Oncogene (2003) 1: 131-146.

Shelton ER, N Osheroff and DL Brutlag. DNA topoisomerase II from drosophila melanogaster: purification and physical characterization, J. Biol. Chem (**1983**) 258:9530–9535.

Shigeeda N, Uchida M, Barrett JC, Tsutsui T. Candidate chromosomal regions for genes involved in activation of alternative lengthening of telomeres in human immortal cell lines, Experimental Gerontology (2003) 641-651.

Shimamoto A, Nishikawa K, Kitao S and Furuichi Y. Human RecQ5 β , a large isomer of RecQ5 DNA helicase, localizes in the nucleoplasm and interacts with topoisomerases 3α and 3β , Nucleic Acids Res (**2000**) 7, 1647–1655.

Shin-ya K, Wierzba K, Matsuo K, Ohtani T, Yamada Y, Furihata K, Hayakawa Y and Seto H. Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from Streptomyces anulatus, J. Am. Chem. Soc (2000) 124: 2098-2099.

Shih WM, Quispe JD, Joyce GF. A 1.7 kilobase single-stranded DNA that folds into a nanoscale octahedron, Nature (**2004**) 427: 618-621.

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

Shirude PS,Okumus B, Ying L, Ha T, Balasubramanian S. Singlemolecule conformational analysis of G-quadruplex formation in the promoter DNA duplex of the proto-oncogene c-kit, J. Am. Chem. Soc (**2007**) 129:7484-7485.

Shklover J, Etzioni S, Weisman-Shomer P, Yafe A, Bengal E, Fry M. MyoD uses overlapping but distinct elements to bind E-box and tetraplex structures of regulatory sequences of muscle-specific genes, Nucleic Acids Res (2007) 35:7087-7095.

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**) 99:11593-11598.

Simonsson T, Pribylova M, Vorlickova M. A nuclease hypersensitive element in the human cmyc promoter adopts several distinct i-tetraplex structures, Biochem. Biophys. Res. Commun (2000) 278:158-166.

Singh TR, Ali AM, Busygina V, Raynard S, Fan Q, Du CH, Andreassen PR, Sung P and Ruhikanta Meetei A. BLAP18/RMI2, a novel OB-fold-containing protein, is an essential component of the Bloom helicase–double Holliday junction dissolvasome, Genes Dev (**2008**) 22: 2856-2868.

Smith LL, Coller HA, Roberts JM. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation, Nat Cell Biol (**2003**) 5:474-479.

Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G and de Lange T. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. Mol Cell Biol

Soder AI, Hoare SF, Muire S, Balmain A, Parkinson EK, Keith WN. Mapping of the gene for the mouse telomerase RNA component, Terc, to chromosome 3 by fluorescence in situ hybridization and mouse chromosome painting, Genomics (**1997**) 41: 293-294.

Soder AI, Going JJ, Kaye SB, Keith WN. Tumour specific regulation of telomerase RNA gene expression visualized by in situ hybridization, Oncogene (**1998**) 16: 979-983.

Srivastava M and Pollard HB. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights, Faseb J (**1999**) 13:1911-1922.

Stansel RM, de Lange T, Griffith JD. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3'telomeric overhang, EMBO J (**2001**) 20:5532–40.

Stavropoulos DJ, Bradshaw PS, Li X, Pasic I, Truong K, Ikura M, Ungrin M, Meyn MS. The Bloom syndrome helicase BLM interacts with TRF2 in ALT cells and promotes telomeric DNA synthesis, Hum Mol Genet (**2002**) 25:3135-3144.

Sten-Knudsen O. Biological Membranes: Theory of Transport, Potentials and Electric Impulses, Cambridge University Press (**2002**) 396-397.

Sternsdorf T, Jensen K, Reich B and Will H. The nuclear dot protein Sp100, characterization of domains necessary for dimerization, subcellular localization, and modification by small ubiquitin-like modifiers, J. Biol. Chem (**1999**) 274:12555–12566.

Stewart L, Redinbo MR, Qiu X, Hol WG, Champoux JJ. A model for the mechanism of human topoisomerase I, Science (**1998**) 5356:1490-1491.

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**) 4: 492-496.

Stewart SA, Hahn WC, O'Connor BF, Banner EN, Lundberg AS, Modha P, Mizuno H, Brooks MW, Fleming M, Zimonjic DB, Popescu NC, Weinberg RA. Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism, Proc Natl Acad Sci U S A (2002) 20:12606-12611.

Strom L, Lindroos HB, Shirahige K and Sjogren. Postreplicative recruitment of cohesin to double-strand breaks is required for DNA repair, C. Mol. Cell (**2004**)16: 1003–1015.

Sun D, Guo K, Rusche JJ and Hurley LH. Facilitation of a structural transition in the polypurine/polypyrimidine tract within the proximal promoter region of the human VEGF gene by the presence of potassium and G-quadruplex-interactive agents, Nucleic Acids Res (2005) 33: 6070-6080.

Sun H, Bennett R J and Maizels N. The Saccharomyces cerevisiae Sgs1 helicase efficiently unwinds G-G paired DNAs, Nucleic Acids Res (**1999**) 9: 1978-1984.

Sun, H, Yabuki A and Maizels N. A human nuclease specific for G4 DNA, Proc Natl Acad Sci U S A (**2001**) 98: 12444-12449.

Sun H, Karow JK, Hickson ID and Maizels N. The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA, J. Biol.Chem (**1998**) 273: 27587 – 27592.

Surovtseva YV, Shakirov EV, Vespa L, Osbun N, Song X, Shippen DE. Arabidopsis POT1 associates with the telomerase RNP and is required for telomere maintenance, EMBO J (2007) 26:3653–3661.

Szostecki C, Guldner H H, Netter HJ and Will H. Isolation and characterization of cDNA encoding a human nuclear antigen predominantly recognized by autoantibodies from patients with primary biliary cirrhosis, J. Immunol (**1990**) 145:4338–4347.

Takata H, Tanaka Y, Matsuura A. Late S phase-specific recruitment of Mre11 complex triggers hierarchical assembly of telomere replication proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell (**2005**)17:573–83

Tarsounas M, Munoz P, Claas A, et al. Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein. Cell (2004) 117: 337–347.

Tauchi T, Shin-ya K, Sashida G, Sumi M, Nakajima A, Shimamoto T, Ohyashiki J, Ohyashiki K. 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**) 22:5338-5347.

Tesmer VM, Ford LP, Holt SE, Frank BC, Yi X, Aisner DL, Ouellette M, Shay JW and Wright WE. Two inactive fragments of the integral RNA cooperate to assemble active telomerase with the human protein catalytic subunit (hTERT) in vitro. Mol Cell Biol (**1999**) 19: 6207-6216.

Theobald DL, Cervantes RB, Lundblad V, Wuttke DS. Homology among telomeric endprotection proteins, Structure (**2003**) 11:1049–1050

Theobald DL and Wuttke DS. Prediction of multiple tandem OB-fold domains in telomere endbinding proteins Pot1 and Cdc13. Structure (**2004**) 12:1877–1879.

Todd AK, Haider SM, Parkinson GN, Neidle S. Sequence occurrence and structural uniqueness of a G-quadruplex in the human c-kit promoter, Nucleic Acids Res (2007) 35: 5799-5808.

Todd AK, Johnston M, Neidle S. Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA, Nucleic Acids Res (**2005**) 33: 2901-2907.

Tokutake Y, Matsumoto T, Watanabe T, Maeda S, Tahara H, Sakamoto S. Extrachromosomal telomere repeat DNA in telomerase-negative immortalized cell lines, Biochem Biophys Res Commun (**1998**) 3: 765-772.

Trotman LC, Alimonti A, Scaglioni PP, Koutcher JA, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function, Nature (**2006**) 441: 523-527.

Ueno M, Nakazaki T, Akamatsu Y, Watanabe K, Tomita K. Molecular characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* nbs1+ gene involved in DNA repair and telomere maintenance, Mol. Cell Biol (**2003**) 23:6553–6563

Ulaner GA, Hu JF. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts, Cancer Res (**1998**)18: 4168-72.

Van Overbeek M, de Lange T. Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase, Curr. Biol (**2006**) 16:1295–1302.

Van Steensel, Smogorzewska BA and de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions, Cell (**1998**) 92:401–413.

Vaziri H, Benchimol S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span, Curr Biol (**1998**) 8: 279-82.

Veldman T, Etheridge KT and Counter CM. Loss of hPot1 function leads to telomere instability and a cut-like phenotype, Curr Biol (**2004**) 14: 2264-2270.

Venczel E A, Sen D. Parallel and Antiparallel G-DNA Structures from a Complex Telomeric Sequence, Biochemistry (**1993**) 32: 6220-6228.

Vialas C, Pratviel G, Meunier B, Oxidative damage generated by an oxo-metalloporphyrin onto the human telomeric sequence. Biochemistry (**2000**) 39: 9514-9522.

Wallis JW, Chrebet G, Brodsky G, Rolfe M and Rothstein R. A hyper-recombination mutation in S. cerevisiae identifies a novel eukaryotic topoisomerase, Cell (**1989**) 58:409–419.

Walsh K and Gualberto A. MyoD binds to the guanine tetrad nucleic acid structure, J Biol Chem (**1992**) 267: 13714-13718.

Wang F, Podell ER, Zaug AJ, Yang Y, Baciu P, Cech TR and Lei M. The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor, Nature (**2007**) 445: 506-510.

Wang J, Xie L Y. Myc activates telomerase, Genes Dev (1998)12: 1769-74.

Wang JC. Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega, J Mol Biol (**1971**) 3: 523-533.

Wang JC. DNA topoisomerases: why so many? J Biol Chem (1991) 11: 6659-6662.

Wang JC. DNA topoisomerases, Annu Rev Biochem (1996) 65: 635-692.

Wang JC. Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine, Q Rev Biophys (**1998**) 2: 107-144.

Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective, Nat Rev Mol Cell Biol (**2002**) 6: 430-440.

Wang JC, Caronet PR, Kim R A. The role of DNA topoisomerases in recombination and genome stability: a double-edged sword? Cell (**1990**) 3: 403-406.

Wang RC, Smogorzewska A and de Lange T. Homologous recombination generates T-loopsized deletions at human telomeres, Cell (**2004**) 119: 355-68. Wang Y, Patel DJ. Solution Structure of a Parallel-Stranded G-Quadruplex DNA, J. Mol. Biol (**1993a**) 234: 1171-1183.

Wang Y. Patel DJ. Solution Structure of the Human Telomeric Repeat D Ag(3)(T(2)Ag(3))3 G-Tetraplex. Structure (**1993b**) 1: 263-282.

Wang Y, Patel DJ. Solution structure of the Tetrahymena telomeric repeat d[(T2G4) G-tetraplex, Structure (**1994**) 2:1141-1156.

Wang Y, Patel DJ. Solution structure of the Oxytricha telomeric repeat d[G4(T4G4)3] G tetraplex, J. Mol. Biol (**1995**) 251:76-94.

Wang Z, Kyo. Tamoxifen regulates human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression differently in breast and endometrial cancer cells, Oncogene (**2002**) 22: 3517-3524.

Wang Z, Kyo S. Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase gene expression via activation of mitogen-activated protein kinase signalling pathway, Cancer Res (2000) 19: 5376-53681.

Wang Z Q, Kuo YH, Schnur D, Bowen J P, Liu S Y, Han F S, Chang J Y, Chenget Y C, Lee K H. New 4 beta-arylamino derivatives of 4'-O-demethylepipodophyllotoxin and related compounds as potent inhibitors of human DNA topoisomerase II, J Med Chem (**1990**) 9: 2660-2666.

Wasylyk C, Schlumberger S E, Criqui-Filipe P and Wasylyk B. Sp100 interacts with ETS-1 and stimulates its transcriptional activity. Mol. Cell. Biol (**2002**) 22: 2687–2702.

Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA, Nat New Biol (1972) 94: 197-201

Waye MMY, Cheung HKY, Lam WY, Law PTW, Lo ASY, Lui VWY, Luk SCW, Tsui SKW, Tung CKC, Yam NYH, Liew CC and Lee CY Miami Winter Biotechnology Symposium Proceedings: Advances in gene technology: protein engineering and structural biology, Whelan WJ (ed) (**1995**) 6: 90.

Weisman-Shomer P, Cohen E, Fry M. Distinct domains in the CArG-box binding factor A destabilize tetraplex forms of the fragile X expanded sequence d(CGG)n, Nucleic Acids Res (2002) 30 : 3672-3681.

Weisman-Shomer P and Fry M. A protein from hepatocyte chromatin that binds selectively to guanine-rich quadruplex DNA, J Biol Chem (**1993**) 268: 3306-3312.

Weisman-Shomer P and Fry M. Stabilization of tetrahelical DNA by the quadruplex DNA binding protein QUAD, Biochem Biophys Res Commun (**1994**) 205: 305-311.

Wen, J.D., C.W. Gray, and D.M. Gray, SELEX selection of high-affinity oligonucleotides for bacteriophage Ff gene 5 protein, Biochemistry (**2001**) 40: 9300-10.
Wheelhouse RT, Sun D, Han H, Han FX and Hurley LH. Cationic Porphyrins as Telomerase Inhibitors: the Interaction of Tetra-(N-methyl-4-pyridyl) porphine with Quadruplex DNA, J. Am. Chem. Soc (**1998**) 120: 3261-3262.

Whoriskey SK, Schofield MA and Miller JH. Isolation and characterization of Escherichia coli mutants with altered rates of deletion formation, Genetics (**1991**) 127: 21–30.

Wick M, Zubov D. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT), Gene (**1999**) 1: 97-106.

Wiesmeijer K, Molenaar C, Bekeer IM, Tanke HJ and Dirks RW. Mobile foci of Sp100 do not contain PML: PML bodies are immobile but PML and Sp100 proteins are not, J. Struct. Biol (**2002**) 140:180–188.

Williamson J R, G-quartet structures in telomeric DNA, Annu. Rev.Biophys. Biomol. Struct. (1994) 23: 703-730.

Williamson JR, Raghuraman M K, Cech T R. Monovalent cationinduced structure of telomeric DNA: the G-quartet model, Cell (**1989**) 59, 871-880.

Wilson S, Warr N, Taylor DL, Watts FZ. The role of *Schizosaccharomyces pombe* Rad32, the Mre11 homologue, and other DNA damage response proteins in nonhomologous end joining and telomere length maintenance. Nucleic Acids Res (**1999**) 27:2655–2661.

Wong A and Wu G. Selective Binding of Monovalent Cations to the Stacking G-Quartet Structure Formed by Guanosine 5'-Monophosphate: A Solid-State NMR Study, J. Am. Chem. Soc (**2003**) 125: 13895-13905.

Wong VC, Ma J, Hawkins CE. Telomerase inhibition induces acute ATM-dependent growth arrest in human astrocytomas, Cancer Lett (**2009**) 1:151-159.

Woodring EW and Shay JW. Telomere-binding factors and general DNA repair, Nature genetic (2005) 37: 116-118.

Wu G, Jiang X, Lee WH, Chen PL. Assembly of functional ALT-associated promyelocytic leukemia bodies requires Nijmegen breakage syndrome 1, Cancer Res (**2003**) 63:2589–2595.

Wu G, Lee W-H, Chen PL. NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells: implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres, J Biol Chem (**2000**) 275:30618–30622.

Wu KJ, Grandori C. Direct activation of TERT transcription by c-MYC, Nat Genet (1999) 2: 220-224.

Wu L, Chan K L, Ralf C, Bernstein DA, Garcia P L, Bohr VA, Vindigni A, Janscak P, Keck J L and Hickson I D. The HRDC domain of BLM is required for the dissolution of double Holliday junctions, EMBO J (**2005**) 24: 2679–2687.

Wu L, Bachrati CZ, Ou J, Xu C, Yin J, Chang M, Wang W, Li L, Brown GW and Hickson I D BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (**2006**) 103: 4068 – 4073.

Wu L, Davies SL, North PS, Goulaouic H, Riou JF, Turley H, Gatter KC and Hickson ID. The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III, J. Biol. Chem (**2000**) 275: 9636 – 9644.

Wu L, Davies SL, Levitt NC, Hickson ID. Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with RAD51, J Biol Chem (2001) 22:19375-19381.

Wu L, Hickson ID. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination, Nature (2003) 426: 870-874.

Wu L and Hickson ID. The Bloom's syndrome helicase stimulates the activity of human topoisomerase IIIalpha, Nucleic Acids Res (**2002**) 30: 4823 - 4829.

Wu L, Multani AS, He H, Cosme-Blanco W, Deng Y, Deng JM, Bachilo O, Pathak S, Tahara, H, Bailey SM, Deng Y, Behringer RR, Chang S. Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres, Cell (**2006**) 126: 49–62.

Wu P, de Lange T. No overt nucleosome eviction at deprotected telomeres, Mol Cell Biol (2008) 18:5724-5735.

Wu ZQ, Yang X, Weber G, Liu X. 1 Plk1 Phosphorylation of TRF1 Is Essential for Its Binding to Telomeres, J Biol Chem (**2008**) 37:25503-25513.

Xin H, Liu D, Wan M, Safari A, Kim H. TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase, Nature (**2007**) 445: 559–562.

Xu D, Guo R, Sobeck A, Bachrati CZ, Yang J, Enomoto T, Brown GW, Hoatlin ME, Hickson ID and Wang W. RMI, a new OB-fold complex essential for Bloom syndrome protein to maintain genome stability, Genes and Dev (**2008**).

Xu D, Popov N, Hou M, Wang Q, Bjorkholm M, Gruber A. Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells, Proc Natl Acad Sci U S A (**2001**) 7: 3826-3831.

Xu Q, Deng H, Braunlin W H, Selective localization and rotational immobilization of univalent cations on quadruplex DNA, Biochemistry (**1993**) 32: 13130-13137.

Xu Y, Sugiyama H. Highly efficient photochemical 20-deoxyribonolactone formation at the diagonal loop of a 5-iodouracil-containing antiparallel G-quartet, J. Am. Chem. Soc (**2004**) 126: 6274-6279.

Xu Y, Sugiyama H. Structural and functional characterizations of the G-quartet and i-motif elements in retinoblastoma susceptibility genes (Rb), Nucleic Acids Symp (**2005**) 49: 177-178.

Xu Y, Noguchi Y, Sugiyama H. The new models of the human telomere d [AGGG(TTAGGG)3] in Kb solution, Bioorganic and Medicinal Chemistry (**2006**) 14: 5584-5591.

Xu Y, Sugiyama H. Formation of the G-quadruplex and i-motif structures in retinoblastoma susceptibility genes (Rb), Nucleic Acids Res (**2006**) 34: 949-954.

Yang D, Hurley LH. Structure of the biologically relevant G-quadruplex in the c-MYC promoter, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids (**2006**) 25: 951-968.

Yang Y, Chen Y, Zhang C, Huang H and Weissman S M..Nucleolar Localization of hTERT Protein Is Associated with Telomerase Function, Exp Cell Res (**2002**) 2:201-209.

Yankiwski V, Marciniak RA, Guarente L, Neff NF. Nuclear structure in normal and Bloom syndrome cells, Proc Natl Acad Sci U S A (**2000**) 10:5214-5219.

Yasui W, Tahara E, Tahara H. Immunohistochemical detection of human telomerase reverse transcriptase in normal mucosa and precancerous lesions of the stomach, Jpn J Cancer Res (**1999**) 90: 589-595.

Ye JZ, Donigian JR, Van Overbeek M, Loayza D, Luo Y. TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres, J. Biol. Chem (**2004a**) 279:47264–472671

Ye JZ, Hockemeyer D, Krutchinsky AN, Loayza D, Hooper SM. POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex, Genes Dev (**2004b**) 18:1649–1654

Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR. Telomerasenegative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body, Cancer Res (**1999**) 59: 4175–4179

Yi X and Shay J W. Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells, Nucleic Acids Res (2001) 23: 4818-4825.

Yi X, Tesmer VM, Savre-Train I, Shay JW and Wright W EBoth transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. Mol Cell Biol (**1999**) 19: 3989-3997.

Yin L, Hubbard A K. NF-kappa B regulates transcription of the mouse telomerase catalytic subunit, J Biol Chem (**2000**) 47: 36671-36675.

Yin J, Sobeck A, Xu C, Meetei A, Hoatlin M, Li L and Wang W. BLAP75, an essential component of Bloom's syndrome protein complexes that maintain genome integrity, EMBO Journal (**2005**) 24: 1465–1476

Ying LM, Green JJ, Li HT, Klenerman D, Balasubramanian S. Studies on the structure and dynamics of the human telomeric G-quadruplex by single-molecule fluorescence resonance energy transfer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2003) 100 : 14629-14634

Yoshida H, Ichikawa H, Tagata Y, Katsumoto T, Ohnishi K, Akao Y, Naoe T, Pandolfi PP, Kitabayashi I. PML-RARA inhibits PML IV enhancement of PU.1-induced C/EBPE expression in myeloid differentiation, Mol. Cell. Biol (**2007**) 27: 5819–5834.

Yu CE, Oshima J, Fu YH. Positional cloning of the Werner's syndrome gene, Science (**1996**) 272: 258-62.

Yu GL, Bradley JD, Attardi LD and Blackburn EH. In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs, Nature (**1990**) 344: 126-132.

Zahler AM, Williamson JR, Cech TR and Prescott DM. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures, Nature (**1991**) 350: 718-720.

Zhang HL and DiGate RJ. The carboxyl-terminal residues of Escherichia coli DNA topoisomerase III are involved in substrate binding, J. Biol. Chem (**1994**) 269: 9052–9059.

Zhang HL, MalpureS, Li Z, Hiasa H and DiGate RJ. The role of the carboxyl-terminal amino acid residues in Escherichia coli DNA topoisomerase III-mediated catalysis, J. Biol. Chem (**1996**) 271: 9039–9045.

Zhang P, Chan S L. TERT suppresses apoptotis at a premitochondrial step by a mechanism requiring reverse transcriptase activity and 14-3-3 protein-binding ability, Faseb J (2003) 16: 767-769.

Zhang R, Lin Y, Zhang C T: a database listing potential G-quadruplex regulated genes, Nucleic Acids Res. (2008) 36: 372-376.

Zhao J, Bilsland A, Jackson K, Keith WN. MDM2 negatively regulates the human telomerase RNA gene promoter, BMC Cancer (**2005**) 5: 6.

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: 111-119.

Zhao JQ, Glasspool RM, Hoare SF, Bilsland A, Szatmari I, Keith WN. Activation of telomerase rna gene promoter activity by NF-Y, Sp1, and the retinoblastoma protein and repression by Sp3, Neoplasia (**2000**) 2:531-539.

Zhu J, Wang H, Bishop JM, Blackburn EH. Telomerase extends the lifespan of virustransformed human cells without net telomere lengthening, Proc Natl Acad Sci USA (**1999**) 96: 3723-3728.

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: 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 DNA-containing double minute chromosomes, Mol Cell (**2003**) 12: 1489-1498.

Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q. hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization, Cell (**1997**) 90: 785-795.

Zimmerman SB, Cohen GH, Davies DR. X-Ray Fiber Diffraction and Model-Building Study of Polyguanylic Acid and Polyinosinic, Acid. J. Mol. Biol (**1975**) 92: 181-192.

Annexes

1. Liste des publications scientifiques co-signées :

TEMIME-SMAALI, N., GUITTAT, L., SIDIBE, A., SHIN-YA, K., TRENTESAUX, C. AND RIOU J.F. (2009)

The G-quadruplex ligand telomestatine impaires binding of topoisomérase IIIalpha to Gquadruplex-forming oligonucléotides and uncaps telomeres in ALT cells. Soumis à PLoSOne.

TEMIME-SMAALI N, GUITTAT L, WENNER T, BAYART E, DOUARRE C, GOMEZ D, GIRAUD-PANIS MJ, LONDONO-VALLEJO A, GILSON E, AMOR-GUÉRET M, RIOU JF.

Topoisomerase IIIalpha is required for normal proliferation and telomere stability in alternative lengthening of telomeres. EMBO J. 2008 May 21; 27(10):1513-24.

DE CIAN A, LACROIX L, DOUARRE C, <u>**TEMIME-SMAALI N**</u>, TRENTESAUX C, RIOU JF, MERGNY JL.

Targeting telomeres and telomerase. Biochimie. 2008 Jan; 90(1):131-55.

BRASSART B, GOMEZ D, DE CIAN A, PATERSKI R, MONTAGNAC A, QUI KH, <u>**TEMIME-SMAALI N**</u>, TRENTESAUX C, MERGNY JL, GUERITTE F, RIOU JF.

A new steroid derivative stabilizes g-quadruplexes and induces telomere uncapping in human tumor cells. Mol Pharmacol. 2007 Sep; 72(3):631-40.

2. <u>Congrès</u>

1. DENNIS GOMEZ, BERTRAND BRASSART, CELINE DOUARRE, <u>NASSIMA</u> <u>TEMIME</u>, KAZUO SHIN-YA, HAMID MORJANI, CHANTAL TRENTESAUX & JEAN-FRANÇOIS RIOU.

Telomere Uncapping Induced by G-quadruplex Ligands in Human Cells. First International Meeting on Quadruplex DNA, 21-24 Avril 2007, Louisville, USA. Telomere uncapping induced by G-quadruplex ligands in human cells.

2. LIONEL GUITTAT, ANNE DE CIAN, <u>NASSIMA TEMIME-SMAALI</u>, AURORE GUEDIN, PATRIZIA ALBERTI, CHANTAL TRENTESAUX, JEAN-LOUIS MERGNY AND JEAN-FRANÇOIS RIOU Cellular effects of G-quadruplex ligands. Sixièmes rencontres de Figeac de la SFBBM, Figeac, France. 27 sept-1er Oct 2008.

3. WENNER T, <u>**TEMINE** N</u>, GOMEZ D, DOUARRE C, MORJANI H, LONDONO-VALLEJO A, AMOR-GUERET M ET RIOU J-F.

La Topoisomerase IIIalpha interagit avec TRF2 au télomère et est nécessaire à la protection des télomères et à la stabilité de l'extension 3' simple-brin dans des lignées ALT. XXVème FORUM DE CANCEROLOGIE, juin 2006. Paris.

4. NASSIMA TEMIME-SMAALI, LIONEL GUITTAT AND JEAN-FRANÇOIS RIOU

Topoisomerase IIIα is required for normal proliferation and telomere stability in Alternative Lengthening of Telomeres. Mol Cancer Med Meeting, Gerrards Cross, U K, October 2007.

5. CELINE DOUARRE, BERTRAND BRASSART, DENNIS GOMEZI, PAMELA DELLA GASPERA, <u>NASSIMA TEMIME</u>, HAMID MORJANI, JEAN-FRANÇOIS RIOU AND CHANTAL TRENTESAUX.

The G-quadruplex ligand 12459 induces two different DNA damage responses associated with senescence or apoptosis. First International Meeting on Quadruplex DNA, Telomere uncapping induced by G-quadruplex ligands in human cells. Avril 2007, Louisville, USA.

6. **<u>NASSIMA TEMIME-SMAALI</u>**, LIONEL GUITTAT AND JEAN-FRANÇOIS RIOU

Topoisomerase IIIα is required for normal proliferation and telomere stability in Alternative Lengthening of Telomeres. 4th European Telomerase Meeting. Ladenburg, Germany. March 2008.

7. JEAN-FRANÇOIS RIOU, <u>NASSIMA TEMIME</u>, CÉLINE DOUARRE, MARIE-JOSÈPHE GIRAUD PANIS, HAMID MORJANI, ARTURO LONDON-VALLEJO, MOUNIRA AMOR GUERET, ERIC GILSON.

Human topoisomerase IIIα interacts with TRF2 at telomere and is required for telomere stability in ALT cells. EMBO workshop DNA Topoisomerases & Supercoiling, Frejus, France, 17-22 June 2007.

8. THOMAS WENNER , <u>NASSIMA TEMIME-SMAALI</u>, LIONEL GUITTAT, MARIE-JOSÈPHE GIRAUD-PANIS, CÉLINE DOUARRE, DENNIS GOMEZ, ARTURO LONDONO-VALLEJO, MOUNIRA AMOR GUERET, ERIC GILSON, AND JEAN-FRANÇOIS RIOU. Topoisomerase IIIalpha, an essential telomeric-associated factor in ALT cells. AACR Special Conference: The role of telomere and telomerase in Cancer Res, San-Francisco, USA, December 2007. Poster session

9. <u>TEMIME N</u>, WENNER T. AND RIOU JF.

Effet du ligand de G-quadruplexe, la télomestatine, sur l'interaction de la topoisomérase IIIa avec les structures télomériques, journée jeune chercheurs Reims 2006.

10. WENNER T, **<u>TEMIME N</u>**,GOMEZ D, DOUARRE C, MORJANI H, LONDONO-VALLEJO A³, AMOR-GUERET M⁴ ET RIOU J-F

La Topoisomerase IIIalpha interagit avec TRF2 au télomère et est nécessaire à la protection des télomères et à la stabilité de l'extension 3' simple-brin dans des lignées ALT. Journée IFR Reims 2006

The G-quadruplex ligand telomestatin impairs binding of Topoisomerase Πα to Gquadruplex-forming oligonucleotides and uncaps telomeres in ALT cells

Nassima Temime-Smaali¹, Lionel Guittat², Assitan Sidibe², Kazuo Shin-ya³, Chantal Trentesaux^{1,2} and Jean-François Riou^{1,2}

¹ Laboratoire d'Onco-Pharmacologie, JE 2428, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq Jay, 51096 Reims, France.

² Laboratoire de Régulations et Dynamique des Génomes, INSERM U565, CNRS UMR7196, Muséum National d'Histoire Naturelle USM503, 43 rue Cuvier, CP26, Paris Cedex 5, 75231, France.

³ Biomedicinal Information Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Biological Systems Control Team, 2-42 Aomi, Koto-ku, Tokyo 135-0064, Japan.

Corresponding author: Jean-François Riou, riou@mnhn.fr

Running Title: Telomestatin uncaps telomeres in ALT

Abstract:

In Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) cell lines, specific nuclear bodies called APBs (ALT-associated PML bodies) concentrate telomeric DNA, shelterin components and recombination factors associated with telomere recombination. Topoisomerase IIIq (Topo III) is an essential telomeric-associated factor in ALT cells. We show here that the binding of Topo III to telomeric G-overhang is modulated by G-quadruplex formation. Topo III binding to G-quadruplex-forming oligonucleotides was strongly inhibited by telomestatin, a potent and specific G-quadruplex ligand. In ALT cells, telomestatin treatment resulted in the depletion of the Topo III/BLM/TRF2 complex and the disruption of APBs and led to the segregation of PML, shelterin components and Topo III. Interestingly, a DNA damage response was observed at telomeres in telomestatin-treated cells. These data indicate the importance of G-quadruplex stabilization during telomere maintenance in ALT cells. The function of TRF2/Topo III/BLM in the resolution of replication intermediates at telomeres is discussed.

The telomeres that cap chromosome ends are composed of tandem repeats of the sequence d(TTAGGG)n with a 3' single-stranded extension (G-overhang) associated with six protein factors (TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 and POT1) that form a protecting complex (shelterin) essential for genome stability ¹. Telomeres shorten at each round of cell division and cellular mechanisms that counteract this degradation confer indefinite proliferation potential characteristic of cancerous cells ². Two mechanisms have been reported in the maintenance of telomere length. The first requires a specialized enzyme, called telomerase, which is able to copy, as a reverse transcriptase, the short TTAGGG motif at the 3' end of telomeres; the activity of telomerase is tightly controlled by shelterin ². The second mechanism involves recombination between telomeres, a mechanism known as Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) ³. ALT cells are characterized by the absence of telomerase activity, heterogeneous telomere length and the presence of nuclear foci termed ALT-associated PML bodies (APBs) that contain telomeric DNA, telomeric proteins TRF1 and TRF2, and DNA recombination/repair proteins ³.

In vitro, DNA oligonucleotides composed of the G-overhang DNA sequence may adopt a four-stranded structure called a G-quadruplex. Both direct and indirect evidence suggests that G-quadruplexes are also present in eukaryotic cells and that formation of this structure must be tightly regulated to allow DNA replication and cell division (for a review, see ⁴). The binding of specific ligands to the telomeric G-quadruplex is a strategy to alter telomere functions and to inhibit cell growth. A number of G-quadruplex ligands have been synthesized during the last decade ⁵. These compounds were initially derived from DNA intercalators ⁶ and now present selective binding properties to G-quadruplexes relative to duplex rather or single-stranded DNA ⁵. The initial therapeutic rationale for use of these compounds in treatment of cancer was that inhibition of telomerase activity would inhibit unchecked cell proliferation ^{7,8}, but several pieces of evidence suggest that these ligands must be considered as telomere targeting agents rather than simple telomerase inhibitors ⁹⁻¹¹.

The natural product telomestatin, is one of the most potent and selective G-quadruplex binding small molecules known ¹²⁻¹⁴. Treatment with telomestatin leads to uncapping of POT1 from telomeres which results in loss of single- and double-stranded telomeric DNA and inhibits growth of tumor cells ¹⁵. However, little is known about the effect of this compound or other G-quadruplex ligands on telomerase-negative ALT cell lines, except that except that telomestatin inhibits cell proliferation^{8,13,16,17}.

G-quadruplex ligands also inhibit the activity of RecQ helicases WRN and BLM ¹⁸. These helicases are associated with APBs in ALT cells and interact with shelterin components ¹⁹⁻²¹. BLM is known to interact with Topoisomerase III α (Topo III) and two other proteins with OB-fold domains, RMI1 and RMI2, to form a RTR complex (RecQ/Topo III/RMI) essential to maintenance of genome stability through its function in the resolution of recombination intermediates (for recent reviews see ^{22,23}). In this complex, Topo III and BLM cooperate to convert double Holliday junctions (DHJ) to decatenated products *in vitro* ²⁴. RMI1 guides the binding of Topo III ²⁵⁻²⁷ and RMI2 regulates other protein-protein interactions in the complex ^{28,29}. The Topo III/BLM complex may function as a repair complex in response to replication defects and may restart stalled replication forks ³⁰⁻³². Following camptothecin treatment, a phosphorylated form of BLM dissociates from the Topo III/BLM complex at its PML storage sites and accumulates with γ -H2AX at damage sites during replication ³³.

Topo III belongs to the Type IA DNA topoisomerase subfamily, which is conserved among different organisms; it removes highly negative supercoils where single-stranded DNA is exposed ³⁴. *In vitro* this access can be provided by altering the secondary structure of the substrate using hyper-negative supercoiling or by the addition of single-stranded binding protein (RPA, RMI1) to assist Topo III binding ²⁷. Structural studies of *E. coli* Topo III revealed that the protein first recognizes the presence of single-stranded DNA through a specific DNA binding region and then induces protein rearrangements that activate the tyrosine catalytic region ³⁵. This ensures the recognition of the correct type of DNA by the active site and explains the requirement for cofactors to generate single-stranded DNA.

Due to the diversity of complex structures that may form at telomere ends during fork progression, there is a requirement for factors that modulate topology, t-loop formation and resolution ^{36,37}. Among these factors, Topo III is an essential telomeric-associated component in ALT cells ^{38,39}. Topo III interacts with telomeric DNA and forms a complex with TRF2 and BLM at telomeres in ALT cells ³⁹. Inhibition of Topo III expression by siRNA reduced ALT cell survival, but did not affect telomerase positive cell lines. Moreover, repression of Topo III expression in ALT cells induced telomere uncapping associated with reduced levels of TRF2 and BLM proteins ³⁹. This data suggested that the Topo III/BLM/TRF2 complex plays

a role in the resolution of topological intermediates that arise during telomere recombination ³⁹.

To examine whether Topo III binding at telomeric sequences and its localization at APBs is modulated by G-quadruplex formation, we have used the selective G-quadruplex ligand telomestatin. We found that Topo III binding is strongly inhibited by stabilization of G-quadruplex structures and that this ligand induces the disruption of APBs in ALT cells. This effect mimics the depletion of Topo III by RNA interference as it induces the depletion of the Topo III/BLM/TRF2 complex and results in telomere uncapping as evidenced by DNA damage at telomeres. We suggest that telomere maintenance in ALT cells may be particularly sensitive to G-quadruplex formation due to the need for the Topo III/BLM/TRF2 complex to resolve or modulate intermediate recombination/replication structures at telomeres.

Materials and Methods

Topo III and POT1 binding assays

Topo III α was purified according to a previously published procedure ⁴⁰. Purified recombinant hPOT1, prepared after baculovirus expression, was a generous gift from Dr. D. Gomez (Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France).

The oligonucleotides used in the study were:

21G: 5'-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-3' 21G mu3: 5'-GGCTTACGGTTAGCGTTAGGG-3' Wt26: 5'-TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT-3' Pu22myc: 5'-GAGGGTGGGGGAGGGTGGGGGAAG-3' Pu22mu: 5'-GAGGGTGAAGAGGGTGGGGGAAG-3' 24C: 5'-CCCTAACCCTAACCCTAA-3' S310: 5'-CCAGCTCTGCTTTGCATCTTT-3'

Oligonucleotides were labelled at the 5' end with $[\gamma^{-32}P]$ -ATP using T4 Polynucleotide Kinase (New England BioLabs[®]).

Electrophoretic mobility shift assays using Topo III or hPOT1 were performed in 10 µL of the following solution: 50 mM HEPES (pH 7.9), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 4% w/v sucrose, 2% v/v glycerol, 0.1 mg/mL BSA, 0.02% w/v bromophenol blue, 20 nM labelled oligonucleotide and Topo III (50 nM) or hPOT1 (30 nM). For competition assays, the indicated concentrations of unlabelled oligonucleotides (1, 3, 10, 30, 100, 300, or 1000 nM) were added to the reaction mixture. For binding inhibition assays, the indicated concentrations of telomestatin were added in a volume of 1 µL. Telomestatin was prepared at 5 mM in 1:1 DMSO/MetOH and was dissolved to 100 μ M in DMSO and further with water. The reaction mixture was incubated at room temperature for 30 min. Each individual mixture was separated immediately by electrophoresis on 1% agarose gels in 0.5X Tris-Borate-EDTA buffer. The gels were run at 80 V for 45 min, dried on Whatman DE81 paper, and visualized by a phosporimager (Typhoon 9210, Amersham). Data was analyzed using ImageQuant software (Amersham) and results were expressed as the ratio between the initial fraction of DNA bound to Topo III (f₀) and the fraction of DNA bound to Topo III in the presence of the competitor (f) as a function of the competitor concentration in abscissa. Values correspond to the mean value of three independent experiments \pm SD.

Cell culture

The MRC5-V1/YFP-Topo III cell line is a stable clone of the ALT cell line MRC5-V1 transfected with YFP-Topo III ³⁹ and was grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO/Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Invitrogen), 10 mM L-glutamine, and 400 μ g/mL of geneticin. After transfection, cells were selected for 15 days with 400 μ g/mL geneticin and cultures were sorted by FACS analysis and further grown in the presence of 400 μ g/mL of geneticin.

Antibodies

Primary antibodies used in this work were raised against PML (PG-M3, mouse, sc-966 Santa Cruz Biotechnology), TRF2 (4A794, mouse, Upstate Biotechnology), BLM (C18, sc-7790 Santa Cruz Biotechnology), β-actin (clone AC-15, mouse, Sigma), active caspase-3 (IMG-144, mouse, Imgenex), γ -H2AX (mouse, Upstate Biotechnology), TRF1 (C19, goat, sc-1977 Santa Cruz Biotechnology), and Topo IIIα (clone D6, rabbit (Wu et al., 2000)). Secondary antibodies used for western experiments were goat anti-rabbit and anti-mouse HRP conjugates (Upstate Biotechnology) and donkey anti-goat HRP conjugates (Abcam). For immunofluorescence experiments, goat anti-mouse Alexa fluor 488 and 568 as well as a goat anti-rabbit Alexa fluor 568 (Invitrogen) were used. Immunoblotting was performed according to ⁴¹.

G-overhang hybridization assays

The nondenaturing hybridization assay to detect the 3' telomeric G-overhang was performed as described previously using the $(AATCCC)_4$ oligonucleotide ⁴².

Immunofluorescence

Cells were plated in 6-well culture plates on glass coverslips. After drug treatment, cells were washed with 1X PBS (pH 7.2), fixed with 4% paraformaldehyde, and permeabilized with 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 300 mM sucrose and 0.5% v/v Triton X-100 for 15 min at room temperature. Cells were then washed twice with PBS (pH 7.2). Cells were blocked with 1% BSA in 1X PBS for 1 hour and incubated with primary antibodies for 1 hour to 2 hours at room temperature. After washing with 1X PBS proteins of interest were detected by incubation for 30 min with fluorescently label secondary antibodies, then washed

with 1X PBS. The nuclear DNA was stained with 0.1 μ g/mL DAPI in PBS (pH 7.2) for 4 min. Cells were mounted in Shandon Immu-Mount medium (Thermo Scientific). Samples were observed with a DMR Leica microscope and images were captured with a Cool Snap HQ camera (Roper Scientific) controlled by Metamorph software (Roper Scientific). Final images are composed of arithmetic stacks of 15-25 deconvolued images, each 0.2 μ M in z-step. Stacks of 15-30 images (16 bit grayscale) were acquired with a z-step of 0.2 μ m with low illumination intensity. For the quantification of co-localizations, 50 nuclei were analyzed and results represent the mean ± SD relative to YFP-Topo III or TRF1 foci, as indicated.

Results

Human Topo III binds to G-quadruplex but prefers single-stranded structures

Purified recombinant Topo III interacts with single-stranded DNA, including the telomeric Goverhang sequence ³⁹. Since telomeric G-overhang is prone to form G-quadruplexes, we have examined whether the presence of guanines repeats influences the DNA binding of Topo III. A direct binding assay for Topo III to the telomeric G-overhang or to a mutated sequence unable to form G-quadruplex indicated that Topo III has a slight preference for singlestranded DNA that cannot fold into a G-quadruplex (result not shown). To quantify differences in binding, we have performed competition experiments with radioactively labeled single-stranded oligonucleotides (21G, S310 and 24C), unlabeled DNA oligonucleotides able to form G-quadruplex (21G, Pu22myc) or unable to form G-quadruplex (21Gmu, Pu22mu) ^{43,44}. The sequences of oligonucleotides are given in the Materials and Methods section. As an example, Figure 1A presents the analysis of the competition for Topo III binding to oligonucleotide 24C with either the G-quadruplex forming Pu22myc or its mutant Pu22mu, which is unable to fold into G-quadruplex. A 3-fold higher concentration of Pu22myc than Pu22mu was needed to inhibit Topo III binding to single-stranded oligonucleotide 24C. Similar differences between G-quadruplex-forming and mutant oligonucleotides were obtained for Topo III binding to 21G and S310 oligonucleotides (Figure 1B). The IC₅₀s for competition with oligonucleotides that cannot form G-quadruplex was 4.3 to 10.1-fold lower than for G-quadruplex forming oligonucleotides in these experiments (Figure 1B), indicating that Topo III prefers single-stranded oligonucleotides relative to G-quadruplex forming oligonucleotides.

Telomestatin inhibits Topo III binding to the telomeric G-overhang

We next determined whether ligands that stabilize G-quadruplex formation interfere with the binding of Topo III to the telomeric G-strand. Telomestatin was isolated from *Streptomyces annulatus* and potently and selectively binds to and stabilizes telomeric G-quadruplexes ¹²⁻¹⁴. In these experiments, we used the Wt26 oligonucleotide previously shown to form a G-quadruplex ⁴⁵. In the presence of telomestatin, we observed a strong inhibition of Topo III-Wt26 complex as detected by bandshift experiments (Figure 2A). Slight inhibition was observed at 0.03 μ M telomestatin and no complex was observed at 0.1 μ M; the IC₅₀ was 60 nM. In contrast, telomestatin (up to 10 μ M) had no effect on Topo III binding to the single-stranded oligonucleotide S310 (Figure 2B). Telomestatin efficiently inhibited Topo III

binding to G-quadruplex forming 21G (IC₅₀ equal to 300 nM) but not to the mutant sequence 21Gmu (IC₅₀ >10 μ M) (Figure 3A and B). We obtained similar results using other G-quadruplex ligands such as the pyridine dicarboxamide derivative 360A and the steroid derivative funtumine guanylhydrazone ^{17,46} (results not shown). We concluded that the stabilization of the G-quadruplex structure by specific ligands such as telomestatin efficiently impaired Topo III binding.

We previously reported that telomestatin inhibits the binding of POT1 to the telomeric Goverhang in a coupled transcription and translation assay ⁴². The use of purified recombinant POT1 protein under bandshift conditions indicated that telomestatin also inhibited the binding of POT1 to longer oligonucleotides (5'-G₃(T₂AG₃)₇-3', IC₅₀ of 500 nM ⁴⁷) and to Wt26 (IC₅₀ of 100 nM) (Figure 2C). Interestingly, these values are in the same range that of telomestatin for inhibition of Topo III binding to telomere oligonucleotides (60-300 nM). Since telomestatin was shown to uncap POT1 from telomeres in cell culture ^{42,48,49}, we speculated that telomestatin may also alter recruitment of Topo III to telomeres.

Treatment with telomestatin reduces levels of Topo III, TRF2, and BLM and disorganizes APBs in MRC5-V1 ALT cells

Topo III co-localizes with telomeric proteins at APBs in ALT cells ³⁹. To examine the effects of telomestatin treatment on the recruitment of Topo III to these nuclear bodies in cultured cells, we stably transfected a YFP-tagged Topo III construct into MRC5-V1 ALT cells ³⁹. Using a D6 antibody directed against Topo III, it was shown that the tagged protein localizes at the same sites as does the endogenous protein $(^{39,50}$, see also Figure 4A). Therefore, it can be used to investigate the cellular effect of telomestatin on Topo III localization. The YFP-Topo III fluorescence signal, which mostly corresponded to large nuclear foci, was decreased after telomestatin treatment (Figure 4A). The immunofluorescence signal of the D6 antibody was also decreased in telomestatin-treated cells, indicating that telomestatin alters Topo III protein levels (Figure 4A). Further analysis by western blot showed that Topo III protein levels were decreased by telomestatin treatment in a dose- and time-dependent manner (Figure 4B). After 72 hours of treatment with 2 μ M telomestatin, we observed a nearly complete loss of Topo III protein (relative to actin). Since Topo III, BLM, and TRF2 form a complex in ALT cells ³⁹, we next investigated telomestatin treatment had an effect on the BLM and TRF2 protein levels. As shown in Figure 4B, the Topo III decrease was associated with a significant decrease in BLM and TRF2 protein levels, but there was not significant induction of apoptosis as measured by caspase 3 cleavage (result not shown). This suggests that, like siRNA inhibition of Topo III translation ³⁹, telomestatin triggers Topo III/TRF2/BLM complex degradation in ALT cells.

To further analyze the effect of telomestatin on organization of APBs in MRC5-V1/YFP-Topo III cells, we treated cells with 2µM telomestatin for 48 h, because these conditions measurably reduce Topo III, TRF2 and BLM protein levels but cells remain viable. This allowed us to perform nuclear localization studies by microscopy. Microscopic examination of treated cells showed important changes in the nuclear organization of YFP-Topo III at APBs. Telomestatin reduced the co-localization of YFP-Topo III with PMLs (Figure 5A) and with TRF2 (Figure 5B). Double staining with anti-TRF2 and with anti-PML antibodies allowed us to visualize these APBs components in MRC5-V1/YFP-Topo III cells. After telomestatin treatment, YFP-Topo III, TRF2, and PML were observed in separate foci (Figure 6). Similar loss of co-localization was observed between YFP-Topo III and two other factors of the shelterin complex, TIN2 and TRF1 (Figure 7 A and B). After telomestatin treatment, only 20% of YFP-Topo III co-localized with PML and TRF2 and only about 45% of YFP-Topo III co-localized with TRF1 or TIN2 (Figure 8A). Interestingly, telomestatin did not qualitatively alter the co-localization between YFP-Topo III and BLM (Figure 8A and B); however, BLM protein levels decreased after telomestatin treatment as shown by western-blot (Figure 4B), suggesting that telomestatin does not alter the interaction between these two proteins. These results indicate that the G-quadruplex ligand telomestatin decreases the amount of Topo III/BLM/TRF2 complex present in cells and disrupts the formation of APBs.

Telomestatin induces a massive DNA damage response at telomeres in ALT cells

To further determine whether telomestatin-induced ABP disruption affected telomere integrity, we tested MRC5-V1/YFP-Topo III cells for DNA damage that co-localized with telomeres. Telomere dysfunction-induced foci (TIFs) can be detected due to the presence of γ -H2AX, a phosphorylated variant of histone 2A that associates with DNA double-strand breaks ⁵¹. Cells treated with 2 μ M telomestatin for 48 h were analyzed for γ -H2AX-containing foci that co-localized with TRF1 (Figure 9A and B). There was a background level of γ -H2AX foci in untreated MRC5-V1/YFP-Topo III cells of 14 ± 6 foci/nucleus; only 8% (± 2%) of these foci co-localized with TRF1. In the presence of telomestatin, we observed an increased number of γ -H2AX foci to 68 ± 4 foci/nucleus and almost half co-localized with TRF1 (46 ±

4%), suggesting that telomestatin triggers a DNA damage response that mostly takes place at telomeres. However, the analysis of treated cells foci that contain both YFP-Topo III and γ -H2AX indicated that most of the DNA damage response was not associated with Topo III foci (Figure 9C). We then evaluated the amount of G-overhang telomeric DNA signal in MRC5-V1/YFP-Topo III cells after treatment with telomestatin using solution hybridization experiments (Figure 10). A significant reduction of the hybridization was observed in telomestatin-treated cells (40% of the signal observed in untreated cells). This is in agreement with other reports where telomestatin alters telomeric G-overhang in telomerase-positive cell lines^{41,44,46}. Together, these results indicate that telomestatin induces a massive DNA damage response at telomeres.

Discussion

Telomestatin binds specifically to G-quadruplex structures. In cells with telomerase activity, this binding results in telomere uncapping and leads to the G-overhang degradation and the release of telomeric proteins (POT1 and/or TRF2). Telomere uncapping is associated with a DNA damage response on a subset of telomere ends (for a recent review, see ¹⁵). Little was known about the effect of telomestatin or other G-quadruplex ligands in telomerase-negative ALT cell lines, except cell proliferation is inhibited ^{8,16,17,52}. The results discussed here indicate that telomestatin induces G-overhang degradation in MRC5-V1/YFP-Topo III cells, an effect also observed in another ALT cell line, WI38-VA13 cells (result not shown). Our data suggest that alteration of the conformation or length of the telomeric G-overhang is a relevant marker for telomestatin activity in both telomerase positive and ALT cells.

Interestingly, telomestatin provoked a massive DNA damage response at telomeres in ALT cells, a result that contrasts with previous finding for this compound in telomerase-positive cell lines where only a small fraction of DNA damage foci corresponded to TIFs ^{49,53}. Either telomestatin-induced DNA damage mostly takes place in extra-telomeric regions where potential G-quadruplex forming sequences have been identified ⁴ or the G-quadruplexes stabilized by telomestatin may be tightly regulated in telomeric regions. Specific G-quadruplex resolvases may repair these G-quadruplex structures to avoid replication blocks and DNA damage accumulation. For example, the FANCJ helicase suppresses the DNA damage response induced by telomestatin in telomerase-positive cells ⁵³.

The massive DNA damage response at telomeres in ALT cells after telomestatin treatment is accompanied by depletion of the Topo III/BLM/TRF2 complex and by telomere uncapping. These are the same effects observed after Topo III depletion by siRNA in ALT cells ³⁹. Telomestatin treatment also disrupted APBs, as evidenced by the segregation of Topo III, PML, and other shelterin components into separate foci. A close linkage between the formation of APBs, the presence of proteins from the shelterin complex and telomere maintenance by recombination has been suggested, although their structural organization is poorly understood ^{54,55}. These specialized bodies contain recombination proteins that are though to support the processes that maintain telomere length in the absence of telomerase activity. Recent evidence indicates that APBs provide a platform (called telomere bouquets) where post-replicative telomere recombination intermediates are resolved (A. Londono-Vallejo, personal communication). These structures may maintain a spatio-temporal organization of telomeres needed for the completion of these reactions. Our data are consistent with a redistribution of unprotected telomere ends due to the absence of the telomere bouquet after telomestatin treatment.

The mechanistic details of the telomestatin-induced APB disruption are unclear. The depletion of several components of the shelterin complex, including TRF1, TRF2, TIN2 and RAP1 was previously shown to reduce formation of APBs ⁵⁵. Because telomestatin impairs the binding of POT1 and Topo III to the telomeric G-strand in vitro, the simplest explanation is that telomestatin disrupts the interactions to telomeres of telomere-binding proteins, inhibiting correct assembly of proteins on the APB platform. Although TRF2 does not directly bind to the telomeric G-overhang, G-quadruplex stabilization may induce indirect structural alterations at telomere ends leading to the release and depletion of TRF2. Several pieces of evidence indicate that TRF2 affects telomere structure and represses homologous recombination events at the t-loop¹. The N-terminal domain of TRF2 was recently reported to introduce a torsional stress in telomeric DNA, to promote strand invasion into duplex DNA and to bind to Holliday Junction structures ^{37,56}. We have proposed that Topo III might play a general role in ALT telomere physiology by resolving TRF2-mediated topological intermediates to modulate the t-loop formation or to modulate recombination processes ³⁹. It is likely that Topo III, which is essentially a nicking-closing enzyme that recognizes a singlestranded DNA region, catalyzes the resolution of the D-loop formed at t-loop or the double-Holliday junctions formed during telomere recombination.

The t-loop G-quadruplex stabilization by telomestatin may interfere with formation/dissolution or with Holliday junction resolution at telomere ends. In agreement, in vitro experiments indicated that telomestatin inhibited the strand invasion reaction of a Gstrand oligonucleotide into a telomeric duplex suggesting that the ligand is able to block the tloop formation (JF Riou, unpublished results). The specific difference between ALT cells and telomerase-positive cells is due to the respective presence or absence of APBs where recombination takes place. Therefore, the inhibition of the double-Holliday junction resolution by telomestatin might be more deleterious for telomere capping than the inhibition of the t-loop formation/resolution. However we cannot exclude the possibility that the resolution of t-loop formation in ALT cells represents a critical process. Our data provides a possible clue to the important effects of telomestatin at telomeres in ALT cells and further experiments aiming to determine whether Topo III controls recombination at telomeres in mammalian cells or results from the indirect loss of TRF2 triggered by the telomestatin treatment would be of great interest.

In conclusion, our results show that the G-quadruplex ligand telomestatin induces a telomere dysfunction in ALT cells, associated with APBs disruption and Topo III/BLM/TRF2 complex depletion. This emphasizes the interest of G-quadruplex ligands as potential therapeutics in tumor cells with alternative telomere maintenance mechanism.

Figure Legends

Figure 1: Topo III preferentially binds to single-stranded oligonucleotides when compared to G-quadruplex-forming sequences. **A**, Competition experiment for Topo III (50 nM) binding to $[^{32}P]$ -labeled 24C oligonucleotide (20 nM) in the presence of either unlabeled Pu22myc or Pu22mu (see sequences in Material and Methods) at the indicated concentrations (in μ M). **B**, Quantification of the competition experiments for Topo III binding to $[^{32}P]$ -labeled S310 (top), 21G (middle), and 24C (bottom) oligonucleotides (at 20 nM) with increasing concentrations (1 to 1000 nM) of unlabeled 21G (closed circles), 21Gmu (open circles), Pu22myc (closed triangles), and Pu22mu (open triangles) oligonucleotides. Results correspond to the mean \pm SD of three determinations. f₀ is the initial fraction of DNA bound to Topo III and f the fraction of DNA bound to Topo III at a determined concentration of the competitor.

Figure 2: Telomestatin inhibits Topo III and POT1 binding to telomeric G-overhangs. **A**, Bandshift assay using purified Topo III (50 nM) and [32P]-labeled Wt26 in the presence of the indicated concentrations of telomestatin. **B**, Bandshift assay using purified Topo III (50 nM) and [32P]-labeled S310 (20 nM) in the presence of the indicated concentrations of telomestatin. **C**, Bandshift assay using POT1 (30 nM) and [32P]-labeled Wt26 (20 nM) in the presence of the indicated concentrations of telomestatin. Telomestatin inhibits Topo III and POT1 binding to Wt26, which forms a G-quadruplex, but not to S310, which does not.

Figure 3: Inhibition of Topo III binding to telomeric sequence by telomestatin is due to Gquadruplex formation. **A**, Bandshift assay of purified Topo III (50 nM) to [32P]-labeled 21G (20 nM) in the presence of the indicated telomestatin concentrations. **B**, Bandshift assay of purified Topo III (50 nM) to [32P]-labeled 21Gmu (20 nM) in the presence of the indicated telomestatin concentrations. Telomestatin had no effect on binding of Topo III to the telomeric mutant sequence 21Gmu, which cannot form a G-quadruplex.

Figure 4: Effects of telomestatin on Topo III signals and Topo III/TRF2/BLM protein levels in MRC5-V1/YFP-Topo III cells. **A**, Representative images of untreated MRC5-V1/YFP-

Topo III cells and cells treated with 2 μ M telomestatin for 48 h; Topo III was detected by fluorescence of YFP-tagged Topo III (green) or by immunofluorescence using D6 antibody (red). Dapi staining of DNA is shown in blue. Telomestatin induced a decrease of Topo III foci number and intensity. **B**, Cells were treated with telomestatin (0.5 to 5 μ M) for 24, 48, or 72 h and Topo III, BLM, TRF2, and actin protein levels were detected by western blot. Telomestatin induced a dose-dependent decrease in Topo III, TRF2, and BLM.

Figure 5: Telomestatin induces a delocalization of Topo III from PML and TRF2. Representative images are of untreated MRC5-V1/YFP-Topo III cells or cells treated for 48 h with 2 μ M telomestatin. **A**, Topo III detected by fluorescence of YFP-tagged Topo III (green) and PML detected by immunofluorescence (red). Dapi staining of DNA is shown in blue. **B**, Topo III detected by fluorescence of YFP-tagged Topo III (green) and TRF2 detected by immunofluorescence (red). Dapi staining of DNA is shown in blue. **B**, topo III detected by fluorescence (red). Dapi staining of DNA is shown in blue. The extent of colocalization of Topo III and PML and of Topo III and TRF2 is decreased by telomestatin treatment relative to that in untreated cells.

Figure 6: Co-localization of Topo III with PML and TRF2 is inhibited by telomestatin treatment. Representative images are of untreated MRC5-V1/YFP-Topo III cells and cells treated with 2 μ M telomestatin for 48 h; YFP-tagged Topo III is shown in green, TRF2 is shown in red (detected by immunofluorescence), and PML is shown in blue (detected by immunofluorescence).

Figure 7: Telomestatin induces a de-localization of Topo III from TIN2 and TRF1. Representative images are of untreated MRC5-V1/YFP-Topo III cells or cells treated for 48 h with 2 μ M telomestatin. **A**, Topo III was detected by fluorescence of YFP-tagged Topo III (green) and TIN2 was detected by immunofluorescence (red). Dapi staining of DNA is shown in blue. **B**, Topo III was detected by fluorescence of YFP-tagged Topo III (green) and TRF1 was detected by immunofluorescence (red). Dapi staining of DNA is shown in blue. **B**, Topo III was detected by fluorescence of YFP-tagged Topo III (green) and TRF1 was detected by immunofluorescence (red). Dapi staining of DNA is shown in blue. The amount of co-localization between Topo III and TIN2 or Topo III and TRF1 observed in untreated cells was decreased by telomestatin treatment.

Figure 8: Telomestatin induces a delocalization of Topo III from PML and shelterin components but not from BLM. MRC5-V1/YFP-Topo III cells were left untreated or were treated for 48 h with 2 μ M telomestatin. **A**, Quantification of the co-localization between

Topo III and PML, TRF2, TRF1, TIN2, and BLM in untreated and treated cells. Results are expressed as the relative percentage of Topo III α foci that co-localize with PML, TRF2, TRF1, TIN2, or BLM foci and were determined by analysis of more than 50 nuclei. **B**, Topo III was detected by fluorescence of YFP-tagged Topo III (green) and BLM was detected by immunofluorescence (red). Dapi staining of DNA is shown in blue. The co-localization of Topo III and BLM was not altered by telomestatin treatment.

Figure 9: DNA damage response after telomestatin treatment of MRC5-V1/YFP-Topo III cells. **A**, Cells treated for 48 h with 2 μ M telomestatin or left untreated were examined for γ -H2AX foci (green) that co-localized with TRF1 (red). **B**, Quantification of the DNA damage foci that co-localized with TRF1. Results are expressed as the percentage relative to γ -H2AX foci number and were determined by analysis of more than 50 nuclei. **C**, Cells treated for 48 h with 2 μ M telomestatin or left untreated were examined for γ -H2AX foci (red) that co-localized with YFP-Topo III (green). In the magnification at the bottom the co-localization between γ -H2AX and Topo III is indicated by arrows.

Figure 10: Effect of telomestatin on G-overhang signal. **A**, DNA was extracted from untreated MRC5-V1/YFP-Topo III cells or cells treated for 48 h with telomestatin at indicated concentrations. The G-overhang signal was evaluated by non-denaturing solution hybridization with a telomeric probe (AATCCC)₄. The gel was also stained with ethidium bromide. **B**, Quantification of the experiment presented in A. The G-overhang hybridization signal was normalized relative to the ethidium bromide signal. Results are expressed as the percentage of G-overhang signal in control untreated cells, which was defined as 100%.

References

- Palm, W. & de Lange, T. How shelterin protects Mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* 42, 301-34 (2008).
- 2. McEachern, M.J., Krauskopf, A. & Blackburn, E.H. Telomeres and their control. *Annu Rev Genet* **34**, 331-358 (2000).
- 3. Cesare, A.J. & Reddel, R.R. Telomere uncapping and alternative lengthening of telomeres. *Mech Ageing Dev* **129**, 99-108 (2008).
- 4. Huppert, J.L. Hunting G-quadruplexes. *Biochimie* **90**, 1140-8 (2008).
- 5. Monchaud, D. & Teulade-Fichou, M.P. A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands. *Org Biomol Chem* **6**, 627-36 (2008).
- 6. Sun, D. et al. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J Med Chem* **40**, 2113-6. (1997).
- 7. Lavelle, F., Riou, J.F., Laoui, A. & Mailliet, P. Telomerase: a therapeutic target for the third millennium? *Crit Rev Oncol Hematol* **34**, 111-26. (2000).
- 8. Riou, J.F. 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* **99**, 2672-2677. (2002).
- Riou, J.F. G-quadruplex interacting agents targeting the telomeric G-overhang are more than simple telomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 4, 439-43 (2004).
- 10. Kelland, L. Targeting the limitless replicative potential of cancer: the telomerase/telomere pathway. *Clin Cancer Res* **13**, 4960-3 (2007).
- 11. De Cian, A. et al. Reevaluation of telomerase inhibition by quadruplex ligands and their mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17347-52 (2007).
- 12. 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)*, 2702-3 (2003).

- 13. Kim, M.Y., Vankayalapati, H., Shin-Ya, K., Wierzba, K. & Hurley, L.H. Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex. *J Am Chem Soc* **124**, 2098-9. (2002).
- 14. Shin-ya, K. et al. Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from Streptomyces anulatus. *J Am Chem Soc* **123**, 1262-3. (2001).
- 15. De Cian, A. et al. Targeting telomeres and telomerase. *Biochimie* **90**, 131-55 (2008).
- Gowan, S.M., Heald, R., Stevens, M.F. & Kelland, L.R. Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with Gquadruplexes. *Mol Pharmacol* 60, 981-8. (2001).
- Pennarun, G. et al. Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands. *Oncogene* 24, 2917-28 (2005).
- 18. Li, J.L. et al. Inhibition of the Bloom's and Werner's syndrome helicases by Gquadruplex interacting ligands. *Biochemistry* **40**, 15194-202. (2001).
- 19. Lillard-Wetherell, K. et al. Association and regulation of the BLM helicase by the telomere proteins TRF1 and TRF2. *Hum Mol Genet* **13**, 1919-32 (2004).
- 20. Grobelny, J.V., Godwin, A.K. & Broccoli, D. ALT-associated PML bodies are present in viable cells and are enriched in cells in the G(2)/M phase of the cell cycle. *J Cell Sci* 113 Pt 24, 4577-85. (2000).
- 21. Yeager, T.R. et al. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res* **59**, 4175-9. (1999).
- 22. Mankouri, H.W. & Hickson, I.D. The RecQ helicase-topoisomerase III-Rmi1 complex: a DNA structure-specific 'dissolvasome'? *Trends Biochem Sci* **32**, 538-46 (2007).
- 23. Liu, Y. & West, S.C. More complexity to the Bloom's syndrome complex. *Genes Dev* 22, 2737-42 (2008).

- 24. Wu, L. & Hickson, I.D. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* **426**, 870-4 (2003).
- 25. Wu, L. et al. BLAP75/RMI1 promotes the BLM-dependent dissolution of homologous recombination intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4068-73 (2006).
- Raynard, S., Bussen, W. & Sung, P. A double Holliday junction dissolvasome comprising BLM, topoisomerase IIIalpha, and BLAP75. *J Biol Chem* 281, 13861-4 (2006).
- 27. Chen, C.F. & Brill, S.J. Binding and activation of DNA topoisomerase III by the Rmi1 subunit. *J Biol Chem* 282, 28971-9 (2007).
- Singh, T.R. et al. BLAP18/RMI2, a novel OB-fold-containing protein, is an essential component of the Bloom helicase-double Holliday junction dissolvasome. *Genes Dev* 22, 2856-68 (2008).
- 29. Xu, D. et al. RMI, a new OB-fold complex essential for Bloom syndrome protein to maintain genome stability. *Genes Dev* 22, 2843-55 (2008).
- Ababou, M. et al. ATM-dependent phosphorylation and accumulation of endogenous BLM protein in response to ionizing radiation. *Oncogene* 19, 5955-63. (2000).
- 31. Amor-Gueret, M. Bloom syndrome, genomic instability and cancer: the SOS-like hypothesis. *Cancer Lett* **236**, 1-12 (2006).
- 32. Wang, W. et al. Possible association of BLM in decreasing DNA double strand breaks during DNA replication. *Embo J* **19**, 3428-35 (2000).
- Rao, V.A. et al. Phosphorylation of BLM, dissociation from topoisomerase IIIalpha, and colocalization with gamma-H2AX after topoisomerase I-induced replication damage. *Mol Cell Biol* 25, 8925-37 (2005).
- Wang, J.C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev* Mol Cell Biol 3, 430-40 (2002).

- Changela, A., DiGate, R.J. & Mondragon, A. Structural studies of E. coli topoisomerase III-DNA complexes reveal a novel type IA topoisomerase-DNA conformational intermediate. *J Mol Biol* 368, 105-18 (2007).
- Gilson, E. & Geli, V. How telomeres are replicated. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 825-38 (2007).
- 37. Amiard, S. et al. A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 147-154 (2007).
- Tsai, H.J. et al. Involvement of topoisomerase III in telomere-telomere recombination.
 J Biol Chem 281, 13717-23 (2006).
- Temime-Smaali, N. et al. Topoisomerase IIIalpha is required for normal proliferation and telomere stability in alternative lengthening of telomeres. *Embo J* 27, 1513-24 (2008).
- 40. Goulaouic, H. et al. Purification and characterization of human DNA topoisomerase IIIalpha. *Nucleic Acids Res* **27**, 2443-50 (1999).
- 41. Douarre, C. 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* **33**, 2192-203 (2005).
- 42. Gomez, D. 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* **66**, 6908-12 (2006).
- 43. Lemarteleur, T. et al. Stabilization of the c-myc gene promoter quadruplex by specific ligands inhibitors of telomerase. *Biochem Biophys Res Commun* **323**, 802-8 (2004).
- 44. Gomez, D. et al. Interaction of telomestatin with the telomeric single-strand overhang.*J Biol Chem* 279, 41487-94 (2004).
- 45. Ambrus, A. et al. Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular Gquadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res* **34**, 2723-35 (2006).

- 46. Brassart, B. et al. A new steroid derivative stabilizes g-quadruplexes and induces telomere uncapping in human tumor cells. *Mol Pharmacol* **72**, 631-40 (2007).
- 47. Rodriguez, R. et al. A Novel Small Molecule That Alters Shelterin Integrity and Triggers a DNA-Damage Response at Telomeres. *J Am Chem Soc* (2008).
- 48. Tahara, H. et al. G-Quadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells. *Oncogene* **25**, 1955-66 (2006).
- 49. Gomez, D. et al. Telomestatin-induced telomere uncapping is modulated by POT1 through G-overhang extension in HT1080 human tumor cells. *J Biol Chem* 281, 38721-9 (2006).
- 50. Wu, L. et al. The Bloom's syndrome gene product interacts with topoisomerase III. *J Biol Chem* **275**, 9636-44. (2000).
- 51. d'Adda di Fagagna, F. et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194-8 (2003).
- 52. Kim, M.Y., Gleason-Guzman, M., Izbicka, E., Nishioka, D. & Hurley, L.H. The different biological effects of telomestatin and TMPyP4 can be attributed to their selectivity for interaction with intramolecular or intermolecular G-quadruplex structures. *Cancer Res* **63**, 3247-56 (2003).
- Wu, Y., Shin-ya, K. & Brosh, R.M., Jr. FANCJ helicase defective in Fanconia anemia and breast cancer unwinds G-quadruplex DNA to defend genomic stability. *Mol Cell Biol* 28, 4116-28 (2008).
- 54. Zhong, Z.H. et al. Disruption of telomere maintenance by depletion of the MRE11/RAD50/NBS1 complex in cells that use alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem* 282, 29314-22 (2007).
- 55. Jiang, W.Q., Zhong, Z.H., Henson, J.D. & Reddel, R.R. Identification of candidate alternative lengthening of telomeres genes by methionine restriction and RNA interference. *Oncogene* (2007).

56. Fouche, N. et al. The basic domain of TRF2 directs binding to DNA junctions irrespective of the presence of TTAGGG repeats. *J Biol Chem* **281**, 37486-95 (2006).



Figure 1A



Figure 1B







Figure 2

A

С



Figure 3


D6 antibody



Figure 4





Figure 5



Figure 6





Figure 7



В



Figure 8



DNA

merge





Figure 9



Figure 10

A New Steroid Derivative Stabilizes G-Quadruplexes and Induces Telomere Uncapping in Human Tumor Cells

Bertrand Brassart, Dennis Gomez,¹ Anne De Cian, Rajaa Paterski,² Alain Montagnac, Khuong-Huu Qui, Nassima Temime-Smaali, Chantal Trentesaux, Jean-Louis Mergny, Françoise Gueritte, and Jean-François Riou

Laboratoire d'Onco-Pharmacologie, JE 2428. Unité de Formation et de Recherche de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France (B.B., D.G., R.P., N.T.-S., C.T., J.-F.R.); Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U565, Acides Nucléiques: Dynamique, Ciblage et Fonctions Biologiques, Paris, France (A.D.C., J.-L.M.); Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche 5153, Muséum National d'Histoire Naturelle USM503, Département de "Régulations, Développement et Diversité Moléculaire", Laboratoire des Régulations et Dynamique des Génomes, Paris, France (A.D.C., J.-L.M.); and Institut de Chimie des Substances Naturelles, Unité Propre de Recherche CNRS 2301, Gif sur Yvette, France (A.M., K.-H.Q., F.G.)

Received March 29, 2007; accepted June 20, 2007

ABSTRACT

Human telomeric DNA consists of tandem repeats of the sequence d(TTAGGG) with a 3' single-stranded extension (the G-overhang). The stabilization of G-quadruplexes in the human telomeric sequence by small-molecule ligands inhibits the activity of telomerase and results in telomere uncapping, leading to senescence or apoptosis of tumor cells. Therefore, the search for new and selective G-quadruplex ligands is of considerable interest because a selective ligand might provide a telomere-targeted therapeutic approach to treatment of cancer. We have screened a bank of derivatives from natural and synthetic origin using a temperature fluorescence assay and have identified two related compounds that induce G-quadruplex stabilization: malouetine and steroid FG. These steroid derivatives have nonplanar and nonaromatic structures, different from currently known G-quadruplex ligands. Malouetine is a natural product isolated from the leaves of Malouetia bequaaertiana E. Woodson and is known for its curarizing and DNAbinding properties. Steroid FG, a funtumine derivative substituted with a guanylhydrazone moiety, interacted selectively with the telomeric G-quadruplex in vitro. This derivative induced senescence and telomere shortening of HT1080 tumor cells at submicromolar concentrations, corresponding to the phenotypic inactivation of telomerase activity. In addition, steroid FG induced a rapid degradation of the telomeric G-overhang and the formation of anaphase bridges, characteristics of telomere uncapping. Finally, the expression of protection of telomere 1 (POT1) induced resistance to the growth effect of steroid FG. These results indicate that these steroid ligands represent a new class of telomere-targeted agents with potential as antitumor drugs.

Telomeres are nucleoprotein structures that cap the ends of eukaryotic chromosomes; these regions protect chromo-

guanylhydrazone moiety; EtBr, ethidium bromide; TRF, telomere repeat factor.

some ends from fusion and from illegitimate recombination and repair (Blackburn, 2001). 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 (McEachern et al., 2000). 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 (Shay and Wright, 2002). Numerous observations, notably that inhibition of telomerase activity limits tumor cell growth (Hahn et al., 1999), have led to the proposal that telomere and telomerase are potential targets for cancer chemotherapy (Lavelle et al., 2000; Neidle and Parkinson, 2002; Shay and Wright, 2002). ABBREVIATIONS: hTERT, human telomerase reverse transcriptase; PCR, polymerase chain reaction; POT1, protection of telomere 1; TBE,

631

Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on May 12,

This work was supported by grants from the "Ligue Nationale Contre le Cancer, Equipe labelisée 2006" (to J.F.R.), by the Association pour la Recherche contre le Cancer 3365 (to J.L.M.), and from the European Union FP6 "MolCancerMed" program (LSHC-CT-2004-502943 to J.L.M.). D.G. and B.B. have been supported by a postdoctoral fellowship from the Institut de Chimie des Substances Naturelles/Centre National de la Recherche Scientifique. N.T.-S. is supported by a doctoral fellowship from the "Région Champagne Ardenne".

Current affiliation: Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5089, Toulouse. France

Current affiliation: Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, Institut de Recherches en Technologie et Sciences pour le Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique Grenoble, Grenoble, France.

Article, publication date, and citation information can be found at http://molpharm.aspetjournals.org. doi:10.1124/mol.107.036574.

spet Tris-borate-EDTA; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; TRF, terminal restriction fragment; steroid FG, a funtumine derivative substituted with a

In humans, the telomere is composed of tandem repeats of the G-rich duplex sequence 5'-TTAGGG-3', with the G-rich 3' strand extending beyond the duplex to form a 130- to 210base overhang, called the G-overhang (Makarov et al., 1997; Wright et al., 1997). Telomeres are believed to exist in different conformations together with several telomere-associated proteins, such as telomere repeat factors (TRF1, TRF2) and POT1 (Smogorzewska and de Lange, 2004). The G-overhang is accessible for telomerase extension in the open state or inaccessible in a capped (or closed) conformation that involves the formation of a telomeric loop motif (Smogorzewska and de Lange, 2004). Although the telomeric loop structure has not been defined in detail, it may be created by the invasion of the G-overhang into the duplex region of the telomere (Griffith et al., 1999). Uncapping of the telomere ends leads to telomeric dysfunction characterized by end-toend fusion, inappropriate recombination, anaphase bridges, and G-overhang degradation that may lead to either apoptosis or senescence (Blackburn et al., 2000; Duan et al., 2001; Karlseder et al., 2002; Li et al., 2003).

Because of the repetition of guanines, the G-overhang is prone to formation of a four-stranded G-quadruplex structure that has been shown to inhibit telomerase activity in vitro (Mergny et al., 2002; Davies, 2004). Small molecules that stabilize G-quadruplexes are effective as telomerase inhibitors, and several series of compounds have been identified using techniques such as temperature melting fluorescence assays on oligonucleotides (Mergny et al., 2001), electrophoresis analysis of quadruplex formation (Koeppel et al., 2001), electrospray ionization mass spectrometry (Rosu et al., 2003a), and the telomeric repeat amplification protocol that measures telomerase activity in cell extracts (Gomez et al., 2002) (for review, see Guittat et al., 2004). The ligands that stabilize G-quadruplex structures include cationic porphyrins (Han et al., 1999, 2001; Dixon et al., 2007), pervlenes (Fedoroff et al., 2000), amidoanthracene-9,10-diones (Perry et al., 1998), 2,7-disubstituted amidofluorenones (Perry et al., 1999), acridines (Read et al., 1999; Harrison et al., 2003), ethidium derivatives (Koeppel et al., 2001; Rosu et al., 2003a), disubstituted triazines (Riou et al., 2002), fluoroquinoanthroxazines (Kim et al., 2003a), indoloquinolines (Caprio et al., 2000), dibenzophenanthrolines (Mergny et al., 2001), bisquinacridines (Teulade-Fichou et al., 2003), pentacyclic acridinium (Gowan et al., 2001), telomestatin (Shin-ya et al., 2001), and the recently discovered bisquinolinium derivatives (Lemarteleur et al., 2004; Pennarun et al., 2005; De Cian et al., 2007) (for review, see Kerwin, 2000; Cuesta et al., 2003; Guittat et al., 2004; Pendino et al., 2006). Because of the peculiar features of the quadruplex structure, compared with classic double-stranded B-DNA, a selective recognition of telomeric G-quadruplex by small-molecule ligands should be possible (Neidle and Parkinson, 2002; Parkinson et al., 2002; Clark et al., 2003; Ambrus et al., 2006). Some partial selectivity for G-quadruplex relative to duplex DNA was obtained with triazine (Riou et al., 2002) and with ethidium derivatives (Rosu et al., 2003a), and selectivity was significantly enhanced with the natural product telomestatin (Kim et al., 2002, 2003b; Rosu et al., 2003b), with a new series of 2,6-pyridin-dicarboxamide derivatives (Pennarun et al., 2005), and with a porphyrin derivative (Dixon et al., 2007).

To test the paradigm of the lifespan control by telomerase activity and telomere length, G-quadruplex ligands were evaluated in cells. This paradigm is at least partially true because a functional telomerase inhibition was observed in cell lines treated for several weeks with a subtoxic dosage of a compound that provokes a telomere shortening, and this shortening was correlated with the induction of senescence (large morphology of cells and SA- β -galactosidase activity) (Riou et al., 2002). It was also observed that G-quadruplex ligands induce more rapid effects on cell growth than initially expected based on telomerase inhibition. Apoptosis and short-term responses were observed with triazine derivatives (12459, 115405), telomestatin, and more recently with the pyridine dicarboxamide derivatives (307A, 360A) (Riou et al., 2002; Tauchi et al., 2003; Pennarun et al., 2005).

The observation that BRACO-19 causes chromosome endto-end fusions associated with the appearance of p16-associated senescence led to the proposal that G-quadruplex ligands mostly act to disrupt the telomere structure (Incles et al., 2004). Such telomeric dysfunction was also observed in cell lines treated with RHPS4 or with 307A and in cell lines resistant to 12459, with typical images of telophase bridges (Gomez et al., 2003a; Leonetti et al., 2004; Pennarun et al., 2005). Further indirect evidence that G-quadruplex ligands target telomere replication arose from experiments in mutant cell lines resistant to these ligands: These cells present telomere capping alterations, overexpression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), and telomere shortening cross-resistance for different classes of ligands (Gomez et al., 2003a,b; Leonetti et al., 2004; Pennarun et al., 2005).

We have demonstrated that G-quadruplex ligands interfere 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 (Gomez et al., 2004). G-overhang degradation was found to be associated with the onset of senescence (Gomez et al., 2004) or with the onset of apoptosis (Douarre et al., 2005). Recent publications also indicate that G-quadruplex ligands may act by dissociation of telomere binding proteins POT1 and TRF2, uncapping telomeres to make them available for extension (Gomez et al., 2006a,b; Tahara et al., 2006).

To search for novel and more potent G-quadruplex ligands, we have screened a bank of derivatives from natural and synthetic origin using a temperature melting fluorescence assay. Two steroids derived from the natural products malouetine and funtumine were identified and characterized for telomeric G-quadruplex stabilization and telomere elongation inhibition in vitro. Funtumine substituted by a guanylhydrazone moiety (steroid FG) induced antiproliferative activities in HT1080 cells associated with telomere shortening, G-overhang degradation, and anaphase bridge formation suggesting that this steroid ligand is a high-affinity G-quadruplex ligand that binds to telomeres in human cells. These steroid ligands represent a new class of telomere-targeted agents that have potential as antitumor drugs.

Materials and Methods

Compounds and Cells. All oligonucleotides were synthesized and purified by Eurogentec (Seraing, Belgium). Malouetine dichloride, funtumine, and funtumine guanylhydrazone were components of the Institut de Chimie des Substances Naturelles chemical library. Malouetine dichloride and funtumine were isolated from *Malouetia* bequertiana (Janot et al., 1960) and Funtumia latifolia (Janot et al., 1958; Quevauviller and Blanpin, 1958), respectively. Funtumine guanylhydrazone was prepared from funtumine by reaction with aminoguanidine bicarbonate as described previously (Meyer et al. (1967). The structure and purity of the compounds were verified by liquid chromatography/mass spectrometry and NMR spectroscopy (data not shown). Compounds were solubilized at 10 mM in dimethyl sulfoxide. Additional dilutions were made in water. HT1080 human lung carcinoma, H460 lung carcinoma, and HeLa cervix carcinoma were from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). BJhTERT human foreskin fibroblast immortalized with human telomerase reverse transcriptase (hTERT) has been described previously (Bodnar et al., 1998). The cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium with GlutaMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA), supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotics. The HT1080GFP-POT1 cell line was described previously (Gomez et al., 2006b).

Fluorescence Experiments. Initial screening experiments were performed on a LightCycler real-time PCR instrument (Roche, Basel, Switzerland) as described previously (Darby et al., 2002), using a fluorescent oligonucleotide F21D (5'-FAM-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-DabCyl-3'), alone or in the presence of 10 μ M compound. Assays were performed in a buffer containing 0.5 μ M F21D, 10 mM cacodylate, pH 8.0, 0.1 M LiCl, and 5 mM KCl. Excitation wavelength was 470 nm, and emission of fluorescein was recorded at 530 nm.

Quantitative experiments and dose-response results were obtained by real-time PCR (MX3000P; Stratagene, La Jolla, CA) using F21D or F21T (analogous to F21D but with the 3' quencher tetramethylrhodamine) fluorescent oligonucleotides (0.2 μ M). Melting profiles were recorded in a 10 mM Li cacodylate buffer, pH 7.2, with 50 to 100 mM NaCl or 5 to 10 mM KCl. Ionic strength was kept constant by the addition of LiCl. Excitation wavelength was 496 nm, and emission was recorded at 516 nm. For competition experiments, various concentrations of the double-stranded ds26 competitor were added before the melting experiment (Kaiser et al., 2006).

PCR Stop Assay. The stabilization of G-quadruplex structures was investigated by a PCR-stop assay (Lemarteleur et al., 2004) using a test oligonucleotide and a complementary oligonucleotide that partially hybridizes to the last G-repeat of the test oligonucleotide. Sequences of the test oligonucleotides (21G) and the corresponding complementary sequence (anti21G) used here are presented in Fig. 3.

Assay reactions were performed in a final volume of 25 μ l in a 10 mM Tris buffer, pH 8.3, with 50 mM KCl, 1.5 mM Mg(OAc)₂, 7.5 pmol of each oligonucleotide, 1.5 units of *Taq* polymerase, and the amount of the ligand indicated in Fig. 3. Reaction mixtures were incubated in a thermocycler with the following cycling conditions: 94°C for 2 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 30 s. Amplified products were resolved on a 12% nondenaturing polyacrylamide gel in 1× TBE and stained with SYBR Green I (Roche). Fluorescence was analyzed with a Typhoon 9210 PhosphorImager (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK).

Cell Growth Assays. For long-term cell growth studies, cells were seeded at 1×10^4 cells/ml (5 ml) into a 25-cm² tissue-culture flask in the presence or the absence of steroid derivatives, cultured for 4 days, then trypsinized and counted. At each passage, 1×10^4 cells/ml were replated into a new culture flask with fresh medium containing drug solution. Results were expressed as the cumulated population doublings as a function of the time of culture as described previously (Riou et al., 2002). MTT survival assays (4 days or 2 days) were performed in quadruplicate in 96-well plates, as recommended by the manufacturer (Sigma, St. Louis, MO).

Anaphase Bridge Analysis. To determine the presence of anaphase bridges, cells were seeded on glass coverslips in complete culture medium and treated with steroid ligands for 24, 48, and 96 h, then stained with DAPI (Sigma) and mounted. Images of anaphases

A Steroid Ligand Interacts with Telomeric G-Quadruplexes 633

were recorded with an Axiovert 200 M inverted microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) coupled with a Coolsnap HQ camera controlled by MetaMorph software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). At least 50 metaphases were examined.

Detection of SA-\beta-Galactosidase Activity. Endogenous senescence-associated β -galactosidase activity was assessed by a staining using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside as described previously (Dimri et al., 1995) on HT 1080 cultures treated with steroid FG (0.7 μ M) or steroid B1 (10 μ M) at days 4, 8, and 12.

Solution Hybridization Experiments. The nondenaturing hybridization assay to detect the 3' telomere G-overhang was performed as described previously (Gomez et al., 2004). Aliquots (2.5 µg) of undigested genomic DNA were hybridized at 50°C overnight with 0.5 pmol of [y-32P]ATP-labeled (5'-(CCCTAA)₃CCC-3')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 with Pu22myc (5'-GAGGGTGGGGAGGGTGGGGAAG-3'), the reactions were performed in the presence of 10 μ M Pu22myc. Reactions were stopped by the addition of 6 μ l of loading buffer (20% glycerol, 1 mM EDTA, and 0.2% bromphenol blue). Hybridized samples were size-fractionated on 0.8% agarose gels in $1 \times$ TBE buffer containing ethidium bromide (EtBr). Gels were dried on Whatman filter paper. Ethidium fluorescence and radioactivity were determined using a Typhoon 9210 PhosphorImager (GE Healthcare). 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 and represented the mean of three independent experiments.

TRF Analysis. Aliquots of 5 μ g of undigested genomic DNA were hybridized at 37°C overnight with 0.5 pmol [γ -³²P]ATP-labeled (5'-(CCCTAA)₃CCC-3') oligonucleotide in sodium hybridization buffer in the presence of RsaI and HinfI restriction enzymes in a volume of 20 μ l. Reaction was stopped with 2 μ l of proteinase K solution (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 EtBr, washed, and dried on filter paper (Whatman, Maidstone, UK). Ethidium fluorescence and radioactivity were determined and telomeric smears were revealed by using a Typhoon 9210 PhosphorImager (GE Healthcare). The mean length of the TRF corresponds to the peak of the integration curve from three separate experiments.

Results

Stabilization of Telomeric G-Quadruplex Structures by Steroid Derivatives. We initially screened 1000 small molecules, with a broad diversity of structures, using a fluorescence melting assay with a G-quadruplex forming oligonucleotide F21D that mimics 3.5 repeats of the human telomeric motif (Mergny et al., 2001; Gomez et al., 2004). Each compound was first evaluated at 10 μ M in a buffer containing 100 mM LiCl and 5 mM KCl. Under these conditions, the F21D probe has an apparent melting temperature $(T_{1/2})$ of 48°C. Ligands that specifically interact with a G-quadruplex increase the melting temperature of the F21D, as evidenced by plotting fluorescence emission versus temperature. Two compounds, malouetine dichloride and funtumine guanylhydrazone (Fig. 1), gave significant variations of $\Delta T_{1/2}$ (>5°C) (Table 1). These two compounds are steroids from the pregnane series substituted at positions 3 and 17. Malouetine is a steroidal alkaloid isolated from the leaves of Malouetia bequaertiana E. Woodson (genera Apocynaceae) (Janot et al., 1960), known for its curarizing properties (Huu Laine and Pinto Scognamiglio, 1964; McKenzie, 2000) and its ability to bind double-stranded DNA (Gourevitch et al., 1981). Funtumine guanylhydrazone is a funtumine derivative substi-



CULAR PHARMA

tuted with a guanylhydrazone moiety. Funtumine, a steroid isolated from the leaves of *Funtuma latifolia stapf*, was inactive in the fluorescence melting assay ($T_{1/2} < 2^{\circ}C$ at 10 μ M). An epimer of the funtumine guanylhydrazone derivative was reported to present cardiotonic properties (Meyer et al., 1967).

The effect of the two steroids on the stabilities of G-quadruplex structures formed by F21D and F21T (these two probes differ by the nature of the 3' quencher, dabcyl or tetramethylrhodamine, respectively) in different cation conditions and ligand concentrations were studied. As summarized in Table 1, results obtained with the two oligonucleotides were in qualitative agreement. The steroid FG far more efficiently stabilized quadruplexes than malouetine. In K⁺ conditions (i.e., cation conditions; see Table 1) steroid FG induced a 2- to 3-fold higher $\Delta T_{1/2}$ than malouetine (Table 1). It is noteworthy that malouetine had nearly no effect on G-quadruplexes in Na⁺ conditions, whereas the steroid FG had only a slightly lower $\Delta T_{1/2}$ in Na⁺ than in K⁺ ($\Delta\Delta T = 2-4^{\circ}$ C).

The steroid FG was also compared with 360A, a pyridine dicarboxamide derivative (Pennarun et al., 2005), for the F21D fluorescence melting assay in K⁺ conditions. The steroid FG concentration necessary to achieve the same melting curve as that with 2 μ M 360A was 20 μ M (result not shown). Thus, we estimated that this ligand is approximately 10-fold less potent than 360A.

To determine the selectivity of the interaction for the telomeric G-quadruplex relative to duplex DNA, the melting temperature of F21T (0.2 μ M) in the presence of steroid FG (5 μ M) was monitored in the presence of a 26-nucleotide duplex oligonucleotide (ds26) competitor (at 3, 10, and 30 μ M) (Fig. 2). In the presence of 3 μ M ds26 oligonucleotide (i.e., a 15-fold molar excess), the stabilization induced by steroid FG was not significantly lowered. Higher competitor concentrations led to a partial loss of stabilization (Fig. 2); at 30 μ M ds26 (i.e., a 150-fold molar excess), $\Delta T_{1/2}$ was only + 2°C. Thus, the selectivity is at least 15-fold for G-quadruplex DNA relative to duplex DNA.

G-quadruplex stabilization was also evaluated by the PCR stop assay using the 21G and anti-21G oligonucleotides (Lemarteleur et al., 2004). In this assay, 5' to 3' extension by *Taq* polymerase to produce a final double-stranded DNA product is inhibited when the target 21G oligonucleotide folds in a G-quadruplex structure. As shown in Fig. 3, the steroid FG induced a dose-dependent inhibition of PCR product formation. Slight inhibition was evident at 3 μ M and was complete at 30 μ M. Together, these results indicate that steroid FG is a potent and selective G-quadruplex ligand able to impair telomere repeat elongation and/or replication.

Steroid Ligands Induced Senescence in HT1080 Cells. To examine the effects of malouetine and steroid FG on HT1080 cells, we first determined the drug concentrations that inhibited cell viability after 4 days of culture (Fig. 4A). Results indicated that malouetine had very limited antiproliferative properties with an IC₅₀ value higher than 30 μ M, whereas steroid FG had a potent inhibitory effect with an IC₅₀ equal to 1.8 (± 0.3) μ M. Steroid FG also had potent antiproliferative effects on H460 lung carcinoma cells (IC₅₀ = 2 μ M) and to a lesser extent against HeLa cells (IC₅₀ = 5.5 μ M) and BJhTERT immortalized foreskin fibroblast cells (IC₅₀ = 6 μ M).

To examine the long-term effects of these ligands on HT1080 cells, we treated cells with concentrations of steroid lower than the IC₂₀ and measured growth and cell morphologies. Malouetine (at 3 and 10 μ M) and steroid FG (at 0.3 and 0.7 μ M) were evaluated. Treated cells were replated every 4 days (with fresh compound added at each replating), and the cumulated population doubling was measured (Fig. 4B). Treatment of HT1080 cells with 10 μ M malouetine or 0.7 μ M steroid FG induced a population-doubling plateau at day 8, followed by cell growth arrest at days 12 and 16, respectively. The morphologic examination of the cells at the plateau phase showed an increased proportion of flat and giant cells

Fig. 1. Chemical structures of steroid

derivatives



Aspet

LECULAR PHARMACO

Bspet

with the phenotypic characteristics of senescence (Fig. 5). Noticeable increases in the size of the nuclei and in the number of binucleated cells were observed after steroid treatment (Fig. 5A). These giant cells also stained positively for the senescence associated β -galactosidase activity (SA- β -gal) at day 12 of treatment (Fig. 5B). Cells harvested earlier (i.e., after 4 or 8 days of steroid treatment), did not express SA- β gal activity (result not shown), suggesting that the senescence occurs at the terminal phase of the culture. At lower ligand concentrations (3 μ M malouetine or 0.3 μ M steroid FG), HT1080 cells were able to grow continuously up to 36 days with only a slight decrease in doubling time compared with control untreated cells (Fig. 4B).

Steroid Ligands Induced TRF Length Shortening. Treatment of tumor cells with G-quadruplex ligands has been previously reported to induce telomere shortening (Riou et al., 2002). To determine whether steroid ligands inhibited telomere replication, a TRF analysis was performed on DNA samples from steroid-treated HT1080 cells (Fig. 6). For steroid FG (0.7 μ M), a TRF shortening was clearly detectable at day 8 of the treatment (Fig. 6A). Telomestatin $(2 \mu M)$ induced a detectable TRF shortening after 4 days of treatment (Fig. 6A); this concentration provoked a plateau arrest at day 12 (result not shown). In contrast, malouetine (10 μ M) treatment did not result in significant telomere shortening at days 4 or 8. The quantification of these experiments indicated a mean TRF length shortening of 300 and 600 base pairs for steroid FG and telomestatin, respectively (Fig. 6B). These results suggest that steroid FG induced a rapid doublestranded telomere shortening associated with its cell growth arrest properties.

normalized

Fluorescence

At ligand concentrations that do not impair the HT1080 cell growth (for steroid FG, 0.3 μ M), a more significant telomere shortening was observed after 20 days of treatment (Fig. 6A). The TRF size decrease corresponded to 600 bases (Fig. 6B). For malouetine (3 μ M), a slight decrease of the telomere length was detectable in some experiments (Fig. 6A), but this variation was not significant (Fig. 6B), suggesting that malouetine has at best modest effects on telomere length.

Steroid FG Induces a Decrease in Length of the Telomeric G-Overhang. Recent studies have indicated that the telomeric G-overhang represents one of the direct targets of quadruplex ligands (Gomez et al., 2004; Douarre et al., 2005). We analyzed the effect of steroid FG on the telomeric

TABLE 1

 $\Delta T_{1/2}$ of G-quadruplex structures in the presence of steroid ligands and in different cationic conditions

Unl	ess	noted	, values	are	provided	with	1°C	or	better	accuracy.	
-----	-----	-------	----------	-----	----------	------	-----	----	--------	-----------	--

	$\Delta T_{1/2}$ (°C)						
Oligonucleotide	F21D (0	0.2 μM)	$F21T~(0.2~\mu M)$				
Cation conditions	Na ⁺ 50 mM Li ⁺ 50 mM	${ m K^+~5~mM} { m Li^+~95~mM}$	Na^+ 100 mM	K ⁺ 10 mM Li ⁺ 90 mM			
Steroid FG							
$2 \ \mu M$	3.6	5.1	4.3	8.9			
$5 \mu M$	4.2	9.5	9.4 ± 1.9	14.1			
$10 \ \mu M$	11 ± 2.2	13.8	13.7	18.4			
Malouetine							
$2 \ \mu M$	0.9	3	N.S.	3.5			
$5 \mu M$	1.3	4.6	N.S.	3.8			
$10 \ \mu M$	1.4	6.5	1.1	7			

N.S., no stabilization.

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 singlestranded G-overhang signal in undigested genomic DNA samples (Cimino-Reale et al., 2001; Gomez et al., 2004). Treatment of HT1080 cells with 0.7 μ M steroid FG had no effect after 4 days but a strong decrease in the G-overhang signal (55 \pm 8.5%) was observed after 8 days (Fig. 7, A and B). In contrast, treatment of HT1080 cells with malouetine $(10 \ \mu M)$ only induced a modest decrease in the G-overhang signal (16 \pm 11%) after 8 days of treatment (Fig. 7, A and B).

Previous results with telomestatin (Gomez et al., 2004)



analyzed by fluorescence. A, fluorescence-melting behavior of F21T oligonucleotide (0.2 μ M) in 10 mM lithium cacodylate buffer, pH 7.0, and 100 mM NaCl in the absence (black curve) or presence (blue curve) of steroid FG (5 μ M) and in the presence of 3 μ M (red curve), 10 μ M (green curve), and 30 μ M (yellow curve) of ds26 double-stranded oligonucleotide competitor. B, $\Delta T_{1/2}$ for steroid FG (5 μ M) in the presence of ds26 competitor.

636 Brassart et al.

MOL PHARM

CULAR PHARMA

Gspet

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: Steroid FG $(3-100 \ \mu M)$ was added to purified DNA just before the hybridization reaction. This resulted in a detectable inhibition of the G-overhang signal, only at a concentration equal to 30 μ M, but in a cation-dependent manner (Fig. 8B). The inhibition was almost completely reversed in presence of an oligonucleotide that adopts a Gquadruplex structure (Pu22myc, 10 μ M) (Fig. 8, A and B) (Gomez et al., 2004). Because the in vitro inhibition of the G-overhang hybridization assay is only observed at a 50-fold higher concentration of steroid FG than that used to treat cells (0.7 μ M), and the cellular effect was detected after a lag time of 8 days, we reasonably concluded that the ligand induced an effective degradation of the telomeric G-overhang in vivo rather than a modification of the G-overhang conformation that interferes with the hybridization reaction.

Steroid FG Induced Anaphase Bridge Formation in HT1080 Cells. Alterations of telomere capping have been reported during the treatment with G-quadruplex ligands (Izbicka et al., 1999a; Leonetti et al., 2004; Burger et al., 2005; Douarre et al., 2005; Pennarun et al., 2005). These alterations may be evidenced by the formation of anaphase bridges. We examined the anaphase bridge formation in steroid-treated HT1080 cells. Typical images of anaphase bridges were obtained in HT1080 cells treated for 24 h with 0.7 μ M steroid FG, which represented 59 ± 6% of the anaphases examined (n = 50), compared with 0% for controls (Fig. 8C). It is noteworthy that anaphase bridge formation is an early event, in that it is observed within 24 h, before any evidence for antiproliferative or cytotoxic activity. Treatment for 4 days strongly reduced the amount of mitotic cells in the preparation and therefore the number of anaphase bridges (result not shown). Thus, anaphase bridge formation seems to precede the antiproliferative effects of the ligand. These data suggest that steroid FG is able to induce the degradation of the telomeric G-overhang



21G/anti21G →

Fig. 3. Effect of steroid FG on the formation of telomeric 21G quadruplex by a PCR-stop assay. Upper part of the figure illustrates the principle of the assay. The 21G oligonucleotide was amplified with a complementary oligonucleotide (anti-21G) overlapping the last G-repeat by Taq polymerase. Lower part of the figure shows the effect of increasing concentrations of the steroid FG on the PCR-stop assay. The double-stranded 21G/ anti21G DNA formed by PCR amplification is indicated by an arrow.

and to increase the formation of anaphase bridges, indicating that this ligand induces an alteration of the telomere capping in HT1080 cells.

Expression of GFP-POT1 Induced Resistance to Steroid FG. Expression of a green fluorescent protein-POT1 fusion (GFP-POT1) in HT1080 cells increases telomere length and G-overhang signal (Colgin et al., 2003; Gomez et al., 2006b). This cell line model is resistant to the cellular effect of telomestatin (Gomez et al., 2006b). We have examined whether the overexpression of POT1 modulates the cytotoxic activity of steroid FG for short-term treatment (48 h). HT1080GFP-POT1 cells had a noticeable resistance to the effects of steroid FG, compared with parental HT1080 cells (Fig. 9). These results suggest that the cellular effect of the compound is due to a direct effect on telomeres.



Fig. 4. Short-term and long-term effects of steroid ligands on HT1080 cell line. A, survival curves of HT1080 cells treated for 4 days in the presence of various steroid ligand concentrations. B, proliferation curves for long-term cultures of HT1080 cells in the absence or presence of steroid FG (FG, 0.3 and 0.7 μ M) or malouetine (Ma, 3 and 10 μ M). The proliferation is expressed in population doublings as a function of days of culture. A growth arrest of the culture appears at day 8 for malouetine (10 μ M) and day 12 for steroid FG (0.7 μ M). No arrest was observed at lower ligand concentrations (0.3 and 3 μ M) even after 28 days of culture.

Discussion

It has been demonstrated previously that G-quadruplex stabilizing compounds derived from polycyclic structures from natural origin or from synthetic chemistry efforts are potent telomere-interacting agents in vitro and produce senescence or apoptosis in several cancer cell lines (Kerwin, 2000; Mergny et al., 2002; Neidle and Parkinson, 2002; Pendino et al., 2006). We show here that steroid diamine derivatives are also potent G-quadruplex ligands that interact with the human telomeric sequences and inhibit telomere elongation. It is noteworthy that these derivatives differ greatly from previously characterized G-quadruplex ligands because these compounds are nonplanar and nonaromatic. Structural studies will be required to determine their precise mode of interaction with telomeric G-quadruplexes.

Steroidal diamines exert a variety of effects on cells (Mahler and Baylor, 1967) and include substances from natural origin, such as the plant alkaloids irehdiamine A and malouetine (Janot et al., 1960; Goutarel et al., 1967). Their chemical similarity to hormonal steroids suggests that these compounds are able to interact with DNA, as directly shown for malouetine and dipyrandium (Gourevitch et al., 1981; Hui et al., 1989). Biophysical studies led to the conclusion that these derivatives partially insert between base pairs and



A Steroid Ligand Interacts with Telomeric G-Quadruplexes 637

induce a kink in AT-rich DNA structures (Hui et al., 1989). DNA interacting properties have been the basis for the discovery of several classes of G-quadruplex ligands, including porphyrin, acridine, and ethidium derivatives (Harrison et al., 1999; Izbicka et al., 1999b; Koeppel et al., 2001; Kerwin et al., 2002; Guittat et al., 2003), and our results seems to confirm this rule. The chemical modification of these DNAinteracting agents (i.e., trisubstituted acridines for BRACO-19), led to an important improvement in the selectivity for G-quadruplexes over duplex DNA (Burger et al., 2005).

Competition with a double-stranded oligonucleotide (ds26) in the G-quadruplex fluorescence melting assay indicated that malouetine had a poor selectivity but that the steroid FG



Fig. 5. Treatment with steroid ligands induce morphological cell alterations and β-galactosidase expression in HT1080 cells. A, HT1080 cells treated with malouetine (10 μM) or steroid FG (0.7 μM) for 4 days were examined for morphological modifications. Fluorescence for β-actin (red) and for DAPI (blue) were determined on fixed cells and merged. Ligand treatment induced the formation of giant cells with increased cytoplasm and nuclei (left) and the formation of cells with two nuclei (right). B,

SA- β -galactosidase activity in HT1080 cells treated with steroid FG (0.7

 μ M) or malouetine (10 μ M) for 12 days. Cells observed by phase contrast

microscopy show the appearance of a blue coloration and morphologic

modifications characteristics of senescent cells.

Fig. 6. Effects of steroid ligands on double-stranded telomere length in HT1080 cells. A, TRF analysis of DNA samples from HT1080 cells untreated (control) or treated with steroid FG, malouetine, or telomestatin (Telo) for 4, 8, and 20 days at indicated concentrations. The mean TRF length is indicated by a horizontal line and corresponds to the peak of the integration curve measured relative to DNA molecular weight markers. B, mean TRF values (kb) from three independent experiments after steroid FG, malouetine, and telomestatin (Telo) treatment for 4, 8, and 20 days, at their respective indicated concentrations. Control untreated HT1080 cells ("C") are shown on the left.

638 Brassart et al.

selectively bound to G-quadruplex rather than duplex DNA. Although the selectivity was less than that obtained for telomestatin or pyridine-dicarboxamide derivatives (Rosu et al., 2003b; Lemarteleur et al., 2004; Pennarun et al., 2005), these results indicate that it is possible to improve the quadruplex/B DNA selectivity for steroid ligands (Goutarel et al., 1967).

Preliminary experiments using a Pu22myc oligonucleotide, corresponding to the G-quadruplex-forming sequence from the c-myc promoter, indicated that steroid FG does not discriminate between these two types of G-quadruplexes (B. Brassart, unpublished results), similar to many previously reported G-quadruplex ligands (Lemarteleur et al., 2004). However, because the stabilization was very dependent on the nature of the cation (Table 1), one might propose that these molecules have a strong preference for the potassium over the sodium form of the telomeric quadruplex. This observation makes the recent determination of the potassium form of the telomeric quadruplex (Ambrus et al., 2006; Xu et al., 2006) very important, as rational drug design approaches may now be initiated on this physiologically relevant quadruplex.

Biochemical assays indicated that the steroid ligands are less potent than the pyridine dicarboxamide derivative 360A or telomestatin (Lemarteleur et al., 2004; Pennarun et al., 2005). For example, malouetine induced the senescence of HT1080 cells at a 20-fold higher concentration than did telomestatin. However, steroid FG induced senescence on HT1080 cells at submicromolar concentrations. Steroid FG



Fig. 7. Effect of steroid ligands on the telomeric G-overhang in HT1080 cells, evaluated by nondenaturing solution hybridization with 21C telomeric probe (5'-CCC(TAACCC)₃-3'). A, HT1080 cells treated with steroid FG (0.7 μ M) or malouetine for 4 and 8 days, as indicated. Steroid FG induced a strong decrease of the 3' G-overhang signal in HT1080 cells treated eells (*G-overhang*, signal of the gel with the CCC(TAACCC)₃ probe; *Et-Br*, ethidium bromide staining of the gel). B, quantification of the steroid effect in HT1080-treated cells. The G-overhang hybridization signal was normalized relative to the Et-Br signal. The results are expressed relative to untreated DNA (defined as 100%) and correspond to the mean (\pm S.D.) of three independent experiments, including the one presented in A.

exhibited all the characteristics of a telomere interacting agent (double-stranded telomere erosion, G-overhang degradation, anaphase bridge induction), previously reported for other potent G-quadruplex ligands (Izbicka et al., 1999b; Riou et al., 2002; Gomez et al., 2004; Leonetti et al., 2004;



genomic DNA, evaluated by nondenaturing solution hybridization with the telomeric probe 21C. A, steroid FG (3–30 μ M) inhibits the in vitro hybridization reaction to the G-overhang from purified HT1080 DNA. The inhibition is detectable at 30 μ M. 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). B, quantification of the steroid FG effect against purified HT1080 DNA with or without competition with Pu22myc in the presence of KCl (50 mM) or NaCl (50 mM). The inhibition was more efficient in KCl and was reversed by Pu22myc competition in both hybridization conditions. G-overhang hybridization signal is normalized relative to the Et-Br signal. The results are expressed relative to untreated DNA (defined as 100%) and correspond to the mean (\pm S.D.) of three independent experiments. C, steroid FG induces anaphase bridge formation. Representative images of anaphase bridges in HT1080 cells treated for 24 h with steroid FG (0.7 μ M). Cells were stained DAPI and images recorded. Steroid FG induces a 59% (\pm 6%) increase in anaphase bridge formation, compared with control untreated cells (0%).



LECULAR PHARMA

DLECULAR PHARMA

spet

Burger et al., 2005; Douarre et al., 2005; Pennarun et al., 2005; Tahara et al., 2006). We observed differences between in vitro and cellular effects (Figs. 7 and 8) suggesting that steroid FG might have better cellular penetration or intracellular distribution than telomestatin or 360A. It is note-worthy that bis-guanidinium cholesterol derivatives have been developed as transfection agents, because of their membrane solubility and the ability of the two guanidinium functions to bind the phosphate group of DNA (Vigneron et al., 1996).

Steroid FG also had short-term antiproliferative effects. Preliminary observations indicated that the steroid FG (3 μ M) induced apoptosis and DNA damage in HT1080 cells after 24-h treatment (B. Brassart, unpublished results). This feature was previously reported for other G-quadruplex ligands with mild selectivity for quadruplex relative to duplex DNA, such as triazine derivatives (Riou et al., 2002; Douarre et al., 2005). The guanylhydrazone side chain of steroid FG may lead to polyamine biosynthesis inhibition (Davidson et al., 1998). Therefore, we cannot exclude that this ligand has another mechanism of action related to a target in addition to G-quadruplexes. It is noteworthy that the overexpression of POT1 in HT1080 cells induced a significant resistance to the short-term effects of steroid FG emphasizing that telomere targeting contributes, at least in part, to the cytotoxic effect of the compound. On the other hand, because of the presence of many G-quadruplex-forming sequences in other parts of the genome (Huppert and Balasubramanian, 2005; Todd et al., 2005), it is possible that the ligand impairs gene transcription or DNA replication triggering the apoptotic response. Further experiments are undertaken to answer this point.

In conclusion, we reported here a new class of steroid telomere-interacting agents that bind G-quadruplexes and induce telomere uncapping. The steroid FG may have potential for antitumor treatment. The ease with which this steroid can be obtained, together with known chemistry for accessing modifications to this molecule, will allow improvements to the selectivity and the potency of these derivatives.



Fig. 9. Expression of GFP-POT1 in HT1080 cells protected cells from the short-term growth inhibitory effect of steroid FG. Survival curves (MTT assay) of HT1080 and HT1080GFP-POT1 cells treated for 48 h in the presence of various steroid FG concentrations, each point in quadruplicate. The IC₅₀ values for two independent experiments were 1.8 and 2.5 μM for HT1080 cells and 3.5 and 3.7 μM for HT1080GFP-POT1 cells.

A Steroid Ligand Interacts with Telomeric G-Quadruplexes 639

Acknowledgments

We thank Marie-Thérèse Martin and Odile Thoison for performing the NMR and LC-MS measurements of malouetine, funtumine, and funtumine guanylhydrazone and Noël Maroteau for his involvement in the optimization of the ICSN chemical library.

References

- Ambrus A, Chen D, Dai J, Bialis T, Jones RA, and Yang D (2006) Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res* 34:2723– 2735.
- Blackburn EH (2001) Switching and signaling at the telomere. Cell 106:661-673.
- Blackburn EH, Chan S, Chang J, Fulton TB, 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.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, and Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279:349-352.
- Burger AM, Dai F, Schultes CM, Reszka AP, Moore MJ, Double JA, 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.
- Caprio V, Guyen B, Opoku-Boahen Y, Mann J, Gowan SM, Kelland LM, Read MA, and Neidle S (2000) A novel inhibitor of human telomerase derived from 10Hindolo[3,2- b]quinoline. *Bioorg Med Chem Lett* 10:2063–2066.
 Cimino-Reale G, Pascale E, Battiloro E, Starace G, Verna R, and D'Ambrosio E
- Cimino-Reale G, Pascale E, Battiloro E, Starace G, Verna R, and D'Ambrosio E (2001) The length of telomeric G-rich strand 3'-overhang measured by oligonucleotide ligation assay. *Nucleic Acids Res* 29:E35.
 Clark GR, Pytel PD, Squire CJ, and Neidle S (2003) Structure of the first parallel
- Clark GR, Pytel PD, Squire CJ, and Neidle S (2003) Structure of the first parallel DNA quadruplex-drug complex. J Am Chem Soc 125:4066-4067.
- Colgin LM, Baran K, Baumann P, Cech TR, and Reddel RR (2003) Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase. *Curr Biol* **13**:942–946.
- Cuesta J, Read MA, and Neidle S (2003) The design of G-quadruplex ligands as telomerase inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 3:11-21. Darby RA, Sollogoub M, McKeen C, Brown L, Risitano A, Brown N, Barton C, Brown
- Darby RA, Sollogoub M, McKeen C, Brown L, Risitano A, Brown N, Barton C, Brown T, and Fox KR (2002) High throughput measurement of duplex, triplex and quadruplex melting curves using molecular beacons and a Lightcycler. *Nucleic Acids Res* 30:e39.
- Davidson K, Petit T, Izbicka E, Koester S, and Von Hoff DD (1998) Mitoguazone induces apoptosis via a p53-independent mechanism. Anticancer Drugs 9:635– 640.
- Davies JT (2004) G-quartet 40 years later; from 5'-GMP to molecular biology and supramolecular chemistry. Angew Chem Int Edit 43:668-698.
 De Cian A, Delemos E, Mergny JL, Teulade-Fichou MP, and Monchaud D (2007)
- De Cian A, Delemos E, Mergny JL, Teulade-Fichou MP, and Monchaud D (2007) Highly efficient g-quadruplex recognition by bisquinolinium compounds. J Am Chem Soc 129:1856–1857.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, 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 U S A 92:9363-9367.
- Dixon IM, Lopez F, Tejera AM, Esteve JP, Blasco MA, Pratviel G, and Meunier B (2007) A G-quadruplex ligand with 10000-fold selectivity over duplex DNA. J Am Chem Soc 129:1502–1503.
- Douarre C, Gomez D, Morjani H, Zahm JM, O'Donohue MF, Eddabra L, Mailliet P, Riou JF, and Trentesaux C (2005) 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* **33**:2192–2203.
- Duan W, Rangan A, Vankayalapati H, Kim MY, Zeng Q, Sun D, Han H, Fedoroff OY, Nishioka D, Rha SY, 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.
- Fedoroff OY, Rangan A, Chemeris VV, and Hurley LH (2000) Cationic porphyrins promote the formation of i-motif DNA and bind peripherally by a nonintercalative mechanism. *Biochemistry* **39**:15083–15090.
- 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. (2003a) 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 278:50554-505562.
- Gomez D, Aouali N, Renaud A, Douarre C, Shin-Ya K, Tazi J, Martinez S, Trentesaux C, Morjani H, and Riou JF (2003b) Resistance to senescence induction and telomere shortening by a G-quadruplex ligand inhibitor of telomerase. *Cancer Res* 63:6149-6153.
- Gomez D, Mergny JL, and Riou JF (2002) Detection of telomerase inhibitors based on G-quadruplex ligands by a modified telomeric repeat amplification protocol assay. *Cancer Res* **62**:3365–3368.
- Gomez D, O'Donohue MF, Wenner T, Douarre C, Macadre J, Koebel P, Giraud-Panis MJ, Kaplan H, Kolkes A, Shin-ya K, et al. (2006a) 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* 66:6908-6912.
- Gomez D, Paterski R, Lemarteleur T, Shin-Ya K, Mergny JL, and Riou JF (2004) Interaction of telomestatin with the telomeric single-strand overhang. J Biol Chem 279:41487-41494.
- Gomez D, Wenner T, Brassart B, Douarre C, O'Donohue MF, El Khoury V, Shin-Ya K, Morjani H, Trentesaux C, and Riou JF (2006b) Telomestatin-induced telomere uncapping is modulated by POT1 through G-overhang extension in HT1080 human tumor cells. J Biol Chem 281:38721–38729.

640 Brassart et al.

Gourevitch MI, Sempere R, and Parello J (1981) UV spectroscopic studies of the binding of malouetine to double-stranded DNA. *Biochimie* **63**:743-754.

- Goutarel R, Mahler HR, Green G, Khuong-Huu Q, Cave A, Conreur C, Jarreau FX, and Hannart J (1967) Steroidal alkaloids. LXXI. Synthesis of the four 3,20diaminopreg-5-enes (irehdiamine-A and stereoisomers). Comparison of their interactions with the DNA from *E. coli. Bull Soc Chim Fr* **12**:4575–4582.
- Gowan SM, Heald R, Stevens MF, and Kelland LR (2001) Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes. *Mol Pharmacol* **60**:981–988.
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, and de Lange T (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97:**503–514.
- Guittat L, Alberti P, Gomez D, de Cian A, Pennarun G, Lemarteleur T, Belmokhtar C, Paterski R, Morjani H, Trentesaux C, et al. (2004) Targeting human telomerase for cancer therapeutics. *Cytotechnology* 45:75–90.
 Guittat L, Alberti P, Rosu F, Van Miert S, Thetiot E, Pieters L, Gabelica V, De Pauw
- Guittat L, Alberti P, Rosu F, Van Miert S, Thetiot E, Pieters L, Gabelica V, De Pauw E, Ottaviani A, Riou JF, et al. (2003) Interactions of cryptolepine and neocryptolepine with unusual DNA structures. *Biochimie* 85:535–547.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, and Weinberg RA (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* **400**:464–468.
- Han H, Cliff CL, and Hurley LH (1999) Accelerated assembly of G-quadruplex structures by a small molecule. Biochemistry 38:6981-6986.
- Han H, Langley DR, Rangan A, and Hurley LH (2001) Selective interactions of cationic porphyrins with G-quadruplex structures. J Am Chem Soc 123:8902– 8913.
- Harrison RJ, Cuesta J, Chessari G, Read MA, Basra SK, Reszka AP, Morrell J, Gowan SM, Incles CM, Tanious FA, et al. (2003) Trisubstituted acridine derivatives as potent and selective telomerase inhibitors. J Med Chem 46:4463–4476.
- Harrison RJ, Gowan SM, Kelland LR, and Neidle S (1999) Human telomerase inhibition by substituted acridine derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* **9**:2463–2468. Hui XW, Gresh N, and Pullman B (1989) Modelling basic features of specificity in the
- binding of a dicationic stearni diamine to double-stranded oligonucleotides. Nucleic Acids Res 17:4177-4187.
- Huppert JL and Balasubramanian S (2005) Prevalence of quadruplexes in the human genome. *Nucleic Acids Res* 33:2908-2916.
 Huu Laine FK, and Pinto Scognamiglio W (1964) Curarizing activity of 3-beta,20-
- Huu Laine FK, and Pinto Scognamiglio W (1964) Curarizing activity of 3-beta,20alpha-bistrimethylammonium-5-alpha-pregnane dichloride (malouetine) and of its stereoisomers. Arch Int Pharmacodyn Ther 147:209–219.
 Incles CM, Schultes CM, Kempski H, Koehler H, Kelland LR, and Neidle S (2004) A
- Incles CM, Schultes CM, Kempski H, Koehler H, Kelland LR, 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.
- Izbicka E, Nishioka D, Marcell V, Raymond E, Davidson KK, Lawrence RA, Wheelhouse RT, Hurley LH, Wu RS, and Von Hoff DD (1999a) Telomere-interactive agents affect proliferation rates and induce chromosomal destabilization in sea urchin embryos. Anticancer Drug Des 14:355–365.
- Izbicka E, Wheelhouse RT, Raymond E, Davidson KK, Lawrence RA, Sun D, Windle BE, Hurley LH, and Von Hoff DD (1999b) Effects of cationic porphyrins as Gquadruplex interactive agents in human tumor cells. *Cancer Res* 59:639-644.
- Janot MM, Laine F, and Goutarel R (1960) Steroid alkaloids. V. Alkaloids of Malouetia bequaertiana E. Woodson (Apocynaceae): funtuphyllamine B and malouetine. Preliminary communication. Ann Pharm Fr 18:673-677.
- Janot MM, Qui KH, and Goutarel R (1958) Two new sterol alkaloids: funtumine and funtumidine.. C R Hebd Seances Acad Sci 246:3076-3078.Kaiser M, De Cian A, Sainlos M, Renner C, Mergny JL, and Teulade-Fichou MP
- Kaiser M, De Cian A, Sainlos M, Renner C, Mergny JL, and Teulade-Fichou MP (2006) Neomycin-capped aromatic platforms: quadruplex DNA recognition and telomerase inhibition. Org Biomol Chem 4:1049–1057.
- Karlseder J, Smogorzewska A, and de Lange T (2002) Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* **295**:2446-2449.
- Kerwin SM (2000) G-quadruplex DNA as a target for drug design. *Curr Pharm Des* **6:**441–478.
- Kerwin SM, Chen G, Kern JT, and Thomas PW (2002) Perylene diimide Gquadruplex DNA binding selectivity is mediated by ligand aggregation. *Bioorg* Med Chem Lett 12:447-450.
- Kim JH, Lee GE, Kim SW, and Chung IK (2003a) Quinoxaline derivative: a potent telomerase inhibitor leading to cellular senescence of human cancer cells. *Biochem* J 373:523–529.
- Kim MY, Gleason-Guzman M, Izbicka E, Nishioka D, and Hurley LH (2003b) 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.
- Kim MY, Vankayalapati H, Shin-Ya K, Wierzba K, and Hurley LH (2002) Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex. J Am Chem Soc **124**:2098–2099.
- Koeppel F, Riou JF, Laoui A, Mailliet P, Arimondo PB, Labit D, Petitgenet O, Helene C, and Mergny JL (2001) Ethidium derivatives bind to G-quartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes. *Nucleic Acids Res* 29:1087– 1096.
- Lavelle F, Riou JF, Laoui A, and Mailliet P (2000) Telomerase: a therapeutic target for the third millennium? *Crit Rev Oncol Hematol* **34**:111–126.
- Lemarteleur T, Gomez D, Paterski R, Mandine E, Mailliet P, and Riou JF (2004) Stabilization of the c-myc gene promoter quadruplex by specific ligands inhibitors of telomerase. *Biochem Biophys Res Commun* **323**:802-808.
- 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* **66**:1138–1146.
- Li GZ, Eller MS, Firoozabadi R, and Gilchrest BA (2003) Evidence that exposure of

the telomere 3' overhang sequence induces senescence. $Proc\ Natl\ Acad\ Sci\ USA$ 100:527–531.

- Mahler HR and Baylor MB (1967) Effects of steroidal diamines on DNA duplication and mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58:256-263. Makarov VL, Hirose Y, and Langmore JP (1997) Long G tails at both ends of human
- Makarov VL, Hirose Y, and Langmore JP (1997) Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 88:657-666.
- McEachern MJ, Krauskopf A, and Blackburn EH (2000) Telomeres and their control. Annu Rev Genet 34:331–358.
- McKenzie AG (2000) Prelude to pancuronium and vecuronium. Anaesthesia 55:551–556.
- Mergny JL, Lacroix L, Teulade-Fichou MP, Hounsou C, Guittat L, Hoarau M, Arimondo PB, Vigneron JP, Lehn JM, Riou JF, et al. (2001) Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay. *Proc Natl Acad Sci* US A 98:3062–3067.
- Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, Teulade-Fichou MP, and Gilson E (2002) Natural and pharmacological regulation of telomerase. Nucleic Acids Res 30:839-865.
- Meyer K-H, Schütz S, Stoepel K, and Kroneberg H-G (1966), inventors; Bayer Corporation, assignee. Novel steroid guanylhydrazones and their production. U.S. Patent 3,277,081. 1966 Oct 4.
- Neidle S and Parkinson G (2002) Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. Nat Rev Drug Discov 1:383–393.
 Parkinson GN, Lee MP, and Neidle S (2002) Crystal structure of parallel quadru-
- Parkinson GN, Lee MP, and Neidle S (2002) Crystal structure of parallel quadru plexes from human telomeric DNA. Nature 417:876-880.
- Pendino F, Tarkanyi I, Dudognon C, Hillion J, Lanotte M, Aradi J, and Segal-Bendirdjian E (2006) Telomeres and telomerase: pharmacological targets for new anticancer strategies? *Curr Cancer Drug Targets* 6:147–180.
- Pennarun G, Granotier C, Gauthier LR, Gomez D, Hoffschir F, Mandine E, Riou JF, Mergny JL, Mailliet P, and Boussin FD (2005) Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands. Oncogene 24:2917-2928.Perry PJ, Gowan SM, Reszka AP, Polucci P, Jenkins TC, Kelland LR, and Neidle S
- Perry PJ, Gowan SM, Reszka AP, Polucci P, Jenkins TC, Kelland LR, and Neidle S (1998) 1,4- and 2,6-disubstituted amidoanthracene-9,10-dione derivatives as inbibitors of human telomerase. J Med Chem 41:9253–3260
- hibitors of human telomerase. J Med Chem 41:3253–3260.
 Perry PJ, Read MA, Davies RT, Gowan SM, Reszka AP, Wood AA, Kelland LR, and Neidle S (1999) 2,7-Disubstituted amidofluorenone derivatives as inhibitors of human telomerase. J Med Chem 42:2679–2684.
- Quevauviller A and Blanpin O (1958) Pharmacodynamics of funtumine, alkaloid from the leaves of Funtumia latifolia stapf (apocynacées). J Physiol (Paris) 50: 469-471.
- Read MA, Wood AA, Harrison JR, Gowan SM, Kelland LR, Dosanjh HS, and Neidle S (1999) Molecular modeling studies on G-quadruplex complexes of telomerase inhibitors: structure-activity relationships. J Med Chem 42:4538-4546.
- b) (1969) Matching inducting ordanics of quark graphs competence of technicate inhibitors: structure-activity relationships. J Med Chem 42:4538-4546.
 Riou JF, Guittat L, Mailliet P, Laoui A, Renou E, Petitgenet O, Megnin-Chanet F, Helene C, and Mergny JL (2002) Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands. Proc Natl Acad Sci U S A 99:2672-2677.
- Rosu F, De Pauw E, Guittat L, Alberti P, Lacroix L, Mailliet P, Riou JF, and Mergny JL (2003a) Selective interaction of ethidium derivatives with quadruplexes: an equilibrium dialysis and electrospray ionization mass spectrometry analysis. *Biochemistry* 42:10361–10371.
- Rosu F, Gabelica V, Shin-ya K, and De Pauw E (2003b) Telomestatin-induced stabilization of the human telomeric DNA quadruplex monitored by electrospray mass spectrometry. *Chem Commun (Camb)* (21):2702–2703.
- Shay JW and Wright WE (2002) Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2:257–265.
- Shin-ya K, Wierzba K, Matsuo K, Ohtani T, Yamada Y, Furihata K, Hayakawa Y, and Seto H (2001) Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from *Streptomyces* anulatus. J Am Chem Soc 123:1262–1263.
- Smogorzewska A and de Lange T (2004) Regulation of telomerase by telomeric proteins. Annu Rev Biochem 73:177–208.
- Tahara H, Shin-Ya K, Seimiya H, Yamada H, Tsuruo T, and Ide T (2006) Gquadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells. Oncogene 25:1955–1966.
 Tauchi T, Shin-Ya K, Sashida G, Sumi M, Nakajima A, Shimamoto T, Ohyashiki JH,
- Tauchi T, Shin-Ya K, Sashida G, Sumi M, Nakajima A, Shimamoto T, Ohyashiki JH, 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. Teulade-Fichou MP, Carrasco C, Guittat L, Bailly C, Alberti P, Mergny JL, David A,
- Teulade-Fichou MP, Carrasco C, Guittat L, Bailly C, Alberti P, Mergny JL, David A, Lehn JM, and Wilson WD (2003) Selective recognition of G-qQuadruplex telomeric DNA by a bis(quinacridine) macrocycle. J Am Chem Soc 125:4732–4740.
- Todd AK, Johnston M, and Neidle S (2005) Highly prevalent putative quadruplex sequence motifs in human DNA. *Nucleic Acids Res* 33:2901-2907.
 Vigneron JP, Oudrhiri N, Fauquet M, Vergely L, Bradley JC, Basseville M, Lehn P,
- Vigneron JP, Oudrhim N, Fauquet M, Vergely L, Bradley JC, Basseville M, Lehn P, and Lehn JM (1996) Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93:**9682–9686.
 Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, and Shay JW (1997) Normal
- Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, and Shay JW (1997) Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* 11:2801–2809.
- Xu Y, Noguchi Y, and Sugiyama H (2006) The new models of the human telomere d[AGGG(TTAGGG)3] in $\rm K^+$ solution. Bioorg Med Chem 14:5584–5591.

Address correspondence to: Jean-François Riou, Laboratoire d'Onco-Pharmacologie, JE 2428, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne-Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, F-51096 Reims, France. E-mail: jf.riou@univreims.fr

ULAR PHARMAG

spet



Available online at www.sciencedirect.com



BIOCHIMIE

Biochimie 90 (2008) 131-155

www.elsevier.com/locate/biochi

Review

Targeting telomeres and telomerase

Anne De Cian^{a,b}, Laurent Lacroix^{a,b}, Céline Douarre^c, Nassima Temime-Smaali^c, Chantal Trentesaux^c, Jean-François Riou^{c,*}, Jean-Louis Mergny^{a,b,**}

^a INSERM, U565, Acides nucléiques: dynamique, ciblage et fonctions biologiques, 43 rue Cuvier, CP26, Paris Cedex 05, F-75231, France

^b CNRS, UMR5153 – Muséum National d'Histoire Naturelle USM503, Département de 'Régulations, développement et diversité moléculaire'',

Laboratoire des Régulations et dynamique des génomes, 43 rue Cuvier, CP26, Paris Cedex 05, F-75231, France

^c Laboratoire d'Onco-Pharmacologie, JE 2428, UFR de Pharmacie, Université de Reims Champagne Ardenne, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims, France

Received 7 June 2007; accepted 16 July 2007 Available online 24 July 2007

Abstract

Telomeres and telomerase represent, at least in theory, an extremely attractive target for cancer therapy. The objective of this review is to present the latest view on the mechanism(s) of action of telomerase inhibitors, with an emphasis on a specific class of telomere ligands called G-quadruplex ligands, and to discuss their potential use in oncology. © 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Telomere; Telomerase; Quadruplex; Shelterin; Anticancer agents

1. Introduction

The telomeres of human cells protect chromosomal ends from fusion events; they range in size from 3 to 15 kb and are composed of tandem repeats of the sequence 5'-GGTTAG-3' [1] with a 3' overhang of the G-strand which plays an important structural and functional role [2–5]. In human somatic cells, telomere length decreases with each cell division event [6]; reversion of this degradation by a telomere maintenance mechanism increases cellular replicative capacity.

A telomere maintenance mechanism is provided by a specialized enzyme called telomerase, first identified in ciliates [7]. In human cells, telomerase functions as a reverse transcriptase to add multiple copies of the 5'-GGTTAG-3' motif to the end of the G-strand of the telomere [8]. In the majority of tumor cells (85–90%), this enzyme is overexpressed [9]. Even in normal stem cells, the level of telomerase activity is low or absent [10]. The catalytic subunit of the human enzyme, a protein called hTERT, uses the RNA subunit (hTR) as a template to add 5'-GGTTAG-3' repeats to the ends of chromosomes (for recent reviews, see [11,12]). Telomerase is involved in telomere capping [13] and in the DNA-damage response [14].

Besides telomerase, other mechanisms to maintain telomere length have been found in human tumors. Telomerase activity is absent in about 15% of tumors and the telomere lengthening is obtained by recombination events between telomeres, known as alternative lengthening of telomere (ALT) [15]. Lack of telomerase gene expression in ALT cells is associated with chromatin remodeling/methylation of the hTR and hTERT gene promoters [16,17]. Telomere lengths are longer and more heterogeneous in ALT cells than in telomerase-positive cells. The exact mechanisms involved in recombination at telomeres are poorly understood. In ALT cells, telomeric sequences and telomeric proteins are associated in large nuclear complexes to form APBs (ALT-associated PML bodies) that also contain recombination factors.

^{*} Corresponding author.

^{**} Corresponding author at: INSERM, U565, Acides nucléiques: dynamique, ciblage et fonctions biologiques, 43 rue Cuvier, CP26, Paris Cedex 05, F-75231, France. Tel.: +33 1 40 79 36 89.

E-mail addresses: jf.riou@univ-reims.fr (J.-F. Riou), mergny@mnhn.fr (J.-L. Mergny).

The unlimited proliferative potential of cancer cells depends on telomere maintenance [18]. Most telomere related antitumor strategies target the telomerase-dependent mechanism of telomere maintenance. Telomerase could become a reliable marker [19] for some but not all cancers as well as a target of inhibitors of immortal cell growth [20]. The validation of telomerase as a potential target for oncology was obtained by the expression of a dominant negative mutant of the catalytic subunit in tumor cells; expression results in the inhibition of telomerase activity, reduction in telomere length, as well as delayed cell death and abrogation of tumorigenicity *in vivo* [20].

Several classes of telomerase inhibitors have been developed and inhibit this enzyme through the targeting of its RNA or catalytic components. Telomerase inhibitors are chemically diverse and include modified oligonucleotides as well as small molecules of natural and synthetic origins. Telomere interacting agents such as quadruplex ligands could in principle act both on telomerase positive and ALT cells. To our knowledge, no specific inhibitor has been specifically designed to inhibit the ALT pathway. This strategy would be viable only if the conversion of an ALT tumor into a telomerase-positive tumor is an improbable event. Telomerase activity has been recovered from ALT cancer cells by using a small hairpin RNA directed against human topoisomerase IIIa, but the broad applicability of this finding remains to be confirmed [21]. In vitro experiments to analyze whether the pathways coexist suggest that the ALT pathway may be active in telomerase positive cells [22,23]. In addition, immortal cell lines derived from ALT cell lines can maintain telomeres in the absence of telomerase expression and key markers of ALT phenotype [24]. Finally, one should remember that the proteins/enzymes involved in the ALT pathway are also probably widespread players in many physiological processes.

Molecules that target the DNA substrate (the single-stranded 3'-telomeric overhang) were initially considered as telomerase inhibitors [25–27]. As we will discuss later in this review, we believe that quadruplex ligands should be considered as a completely independent class of telomere-interacting molecules. The rationale for the development of telomere-interacting agents is not as clear for development of classical inhibitors. As normal cells also have telomeres, this target cannot be considered cancer-specific. Nevertheless, it may be argued that telomeres from normal and cancer cells exhibit differences in structure or accessibility and that a telomere ligand could exhibit selective toxicity. Alterations of the telomere structure may be responsible for the genomic instability associated with the tumoral transformation.

The objective of this review is to present the latest view on the mechanism(s) of action of telomerase inhibitors, with an emphasis on a specific class of telomere ligands called Gquadruplex ligands, and to discuss their potential use in oncology. Due to space limitations, we will not consider the use of telomerase as a cancer marker or a prognosis factor (for recent reviews, see [28,29]), and will restrict our discussion to therapeutic target aspects. Other reviews [30–38] cover in greater detail telomerase promoter-mediated suicide gene therapy, telomeric PARP/tankyrases as targets for cancer therapy [39], and telomerase a candidate 'universal cancer vaccine' [40] currently being tested in clinical trials [41–44]. Finally, one should note that telomerase may be involved in other aspects of human health [45] such as aging [46] and genetic diseases, including *Dyskeratosis congenita* [47–49] and adult-onset pulmonary fibrosis [50].

2. Actors in telomere maintenance

2.1. The telomerase complex

In addition to hTR and hTERT, more than 30 proteins have been proposed to be associated with the enzymatic telomerase complex (see Table S1 in [51]). Reddel and colleagues demonstrated that the active complex is composed of only three different components, hTERT, hTR, and dyskerin, each in two copies; each HEK-293 cell has only 20–50 molecules of telomerase [51]. Other factors may dissociate from the complex before it reaches its substrate or may dissociate when the enzyme is activated (for a review on the biogenesis of telomerase, see [52]).

The telomeric function of dyskerin may explain the symptoms of the human disease Dyskeratosis congenita (DC), a rare bone marrow failure syndrome: The physiopathology of DC predominantly relates to defective telomere maintenance (for a recent review, see [53]). In fact, all three components of the active complex may be defective in various forms of DC [54], showing that hTERT is not the limiting factor for telomerase activity in vivo [55]. The symptoms of this pathology could be predictive of the side effects of a long anti-telomerase treatment. DC patients are generally asymptomatic during their first decade of life, the first symptoms correspond to changes in skin, nails, and mucosa; usually bone marrow failure leads to death in the mid-teens. This indicates that a long-term antitelomerase treatment is not a viable strategy for anticancer prevention, but that this treatment might be tolerated for a short period, provided that the initial length of telomeres is sufficient to delay the initiation of collateral effects.

The regulation of the relative expression levels of hTR, hTERT and dyskerin is poorly understood. The transcriptional control of the hTERT gene seems to play a key role in the regulation of telomerase. The repression of hTERT expression in normal cells may be related to the methylation of the promoter and 5' exons [56]. A recent study presented evidence for a molecular link between cholesterol-activated receptor Ck and hTERT transcription [57]. The transcriptional regulation of the RNA component is only partially understood. The core hTR promoter is activated by Sp1 and is repressed by Sp3 [58,59]; JNK represses hTR promoter activity and expression, apparently by enhancing repression through Sp3 [60].

2.2. The shelterin complex and beyond

The proteins that protect telomere extremities were identified during the last decade and make up a complex called the telosome [61] or shelterin [62]. This complex is composed of six proteins. Three of these bind directly to the telomeric repeats: TRF1, TRF2, and POT1 (one should note that there are two Pot1 genes in rodents [63]) (Fig. 1). TRF1 and TRF2 have Myb-type DNA binding domains [64], whereas POT1 has two oligonucleotide/oligosaccharide binding (OB) domains and displays a strong preference for the single-stranded telomeric sequence relative to double-stranded DNA [65]. The three other proteins are TIN2 (binds TRF1 and TRF2), TPP1 (previously called TINT1, PTOP or PIP1, binds TIN2 and POT1), and Rap1 (binds TRF2) [66]. Thus, shelterin appears to make the connection between the duplex telomeric DNA and the 3'-G-strand overhang.

This complex is proposed to exist in two states: the "closed" or "capped" state in which the 3′ end is not accessible to telomerase but also protected from any degradation or inappropriate repair mechanism, and an "open" state, in which all the shelterin proteins are present but leave the 3′ end accessible to telomerase (Fig. 1). This later state is proposed to occur during telomere elongation/replication. The nature of this "open" complex in ALT cells remains unknown. A third state of the telomere could also be proposed in which the shelterin complex is altered and thus can generate a DNA damage response; this would correspond to the "dysfunctional telomere" state that will be described later.

Of the proteins in the sheltering complex, TRF2, which is involved in strand invasion and T-loop formation [67,68], has been most strongly implicated in carcinogenesis. TRF2 is up-regulated in some human tumors and, in combination with telomerase deficiency, acts as a very potent oncogene *in vivo* [69]. This suggests that (i) telomerase inhibition might be ineffective on TRF2-overexpressing tumors and that (ii) TRF2 inhibition could have a beneficial effect. This hypothesis has been verified in melanoma cells [70]. In contrast, in checkpoint-compromised telomerase-positive human fibroblasts, an episode of TRF2 inhibition promotes heritable changes that *increase* the ability to grow in soft agar. Overexpression of the telomere-binding protein TRF2 also reduces telomeric, but not genomic, single-strand break repair [71]. It remains to be confirmed that TRF2 protein favors the activation of alternative telomere maintenance mechanisms, perhaps as a result of its effects on DNA topology [72].

Recently, TPP1 and POT1 form a complex with telomeric DNA that increases the activity and processivity of the human telomerase core enzyme [73,74]. This stimulation of telomerase could happen through a direct interaction between TPP1 OB fold domain and telomerase, as shown by co-immunoprecipitation of TPP1 and telomerase. These data suggest that TPP1 could recruit telomerase and be the shelterin protein by which telomere can switch from a "closed" state to an "open" or extendible state.

Shelterin partners also associate with Apollo, also known as hSnm1B, a novel component of the human telomeric complex, that, with TRF2, appears to protect chromosome termini from being recognized and processed as DNA damage [75–77]. These findings unveil a previously undescribed telomere-protection mechanism involving a DNA 5'-to-3' exonuclease. Other proteins that interact with shelterin are involved in recombinational repair [78]. The Rad9/Hus1/Rad1 (911) complex, known to function in DNA metabolism and DNA damage responses, is constitutively associated with telomeres and plays an important role in their maintenance [79,80]. In yeast, proteins belonging to the KEOPS complex also participate in telomere uncapping regulation [81]. Cdk1, which is required



Fig. 1. The shelterin/telosome complex. Top: The "open" state of the telomere with associated proteins (TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, TPP1, and POT1). Telomerase binds to the 3' end of an "open" telomere and can elongate the G-strand. Bottom: The "closed" or " capped" state of the telomere with associated proteins [62]. Two of such complexes have been proposed, one involving T-loop formation (left) and the other based on a "linear" telomere (right) in which the 3' end is capped either by POT1 or by an unknown protein. In both cases, the 3' end is not accessible to the telomerase and cannot be elongated. Note that proteins known to interact with TRF1 and TRF2, such as ERCC1, XPF, BLM, WRN TANK1/2, PINX1, and Ku 70/80, are not represented.

for an early step in telomere addition, also regulates the length of the G-overhang [82,83]. Thus, in addition to the major partners of the shelterin complex, a number of other factors transiently or lastingly interact with telomeric DNA, either in the double- or single-stranded region. Some proteins have been found to bind *in vitro* to the telomeric C-rich strand [84], but their functions in telomere maintenance remain to be demonstrated.

When either TRF2 or POT1 are inactivated [85,86], the overall amount of the single-stranded G-overhang varies, aberrant homologous recombination occurs [87], and a specific DNA damage response is induced at most telomere ends [88]. After TRF2, TIN2, or POT1 inactivation or when telomeres become critically short, 53BP1, γ -H2AX, the Mre11 complex and phosphorylated ATM accumulate at chromosome ends [85,89,90]. The structures formed by these DNA damage factors are referred to as *telomere-dysfunction induced foci* (TIFs) [91]. These studies are consistent with the view that telomere ends are engaged in a peculiar structure in order to protect their integrity. The protein complex shelterin is able to actively change telomere architecture and to control the detection of DNA ends by DNA damage factors.

Mammalian telomeres are enriched in epigenetic marks that are characteristic of heterochromatin (for a recent review, see [92]). The abrogation of master epigenetic regulators, such as histone methyltransferases and DNA methyltransferases, correlates with loss of telomere-length control. In mice, shorter telomeres lead to a change in the architecture of telomeric and subtelomeric chromatin leading to a more 'open' chromatin state [93]. Mouse embryonic stem (ES) cells genetically deficient in DNA methyltransferases (DNMT1, or both DNMT3a and DNMT3b) have dramatically elongated telomeres compared with wild-type controls [94].

2.3. Proteins involved in the ALT pathway

Because of the close linkage between ALT-mediated telomere maintenance and the ability to form APBs, the identification by RNA interference of proteins essential for APB formation was undertaken. PML, telomeric proteins (such as TRF1, TRF2, TIN2, and RAP1), DNA repair proteins (the MRN complex that includes MRE11, RAD50, and NBS1) were found essential, whereas Sp100 and 53BP1 were not [95,96]. This leads to the hypothesis that extrachromosomal telomeric circles (t-circles) that may be specific markers of the ALT phenotype, remain bound to proteins of the shelterin complex, which need to interact with the MRN complex to translocate to PML bodies [96]. The siRNA depletion of these factors does not affect the cell viability in the short term. Ku70 repressed exchanges between sister telomeres, a form of homologous recombination implicated in ALT [97]. Rad 54 is dispensable for the ALT pathway [98]. Deletion of the basic domain of TRF2 (TRF2^{ΔB}) resulted in stochastic deletions of telomeric DNA in telomerase positive cells and generation of t-loop-sized telomeric circles; formation of circles is dependent on XRCC3 and NBS1 [99,100]. However, these cells

continue to proliferate in the absence of t-circles, suggesting that they are not required for the survival of ALT cells.

Topoisomerase III is involved in telomere-telomere recombination [21]. The recovery of telomere recombination-dependent survivors in a telomerase-minus yeast strain was dependent on Top3p catalytic activity [21]. Human Topo III α colocalizes with telomeric proteins APBs in ALT cells. Topo IIIa immunoprecipitated with TRF2 and BLM and is associated with telomeric DNA by chromatin immunoprecipitation (ChIP) suggesting that these proteins form a complex at telomeres or t-circles in ALT. Inactivation of Topo IIIa by RNA interference induces a strong defect in ALT cell line survival associated with telomere dysfunction (anaphase bridges and G-overhang shortening) and depletion of TRF2 and BLM, suggesting that Topo IIIa is an essential factor for telomere integrity and maintenance in ALT cells (Wenner et al., manuscript in preparation). A possible explanation of the role of Topo III α may reside in its ability to resolve four-stranded structures and Holliday junctions during telomere recombination or to topologically modulate strand invasion during t-loop formation/resolution.

3. "Classical" telomerase inhibitors

3.1. Oligonucleotides targeting the RNA component (hTR)

The RNA component of telomerase, hTR, is necessary for telomerase reverse transcription and is therefore a natural target for anti-telomerase agents. As hTR is a nucleic acid, it is a good target for oligonucleotide inhibitors. These oligonucleotides should be considered as "template agonists" rather than true antisense agents, as their targets are reverse transcribed rather than translated into peptides. hTR is not translated; it provides a template (5'-CUAACCCUAAC-3') for reverse transcription that is expected to be highly accessible. Different strategies and chemical modifications have successfully been developed to target hTR, starting with traditional DNA-based antisense oligomers. Chemically unmodified DNA is readily degraded by nucleases and is therefore too unstable to be considered for in vivo applications, explaining why different groups have tried several modifications to enhance uptake and/or stability.

Peptide nucleic acids (PNAs) directed against the template region of hTR were among the first oligomers tested that efficiently inhibit telomerase [101]. Using a scanning approach, the binding determinants within hTR needed for the potent inhibition of telomerase by PNAs were delineated [102]. 2'-O-Methyl (2'-O-Me) and 2'-O-(2-methoxyethyl) (2'-MOE) modified RNAs directed against the template region of hTR possess favorable pharmacokinetic properties and inhibit human telomerase with IC₅₀ values in the nanomolar range [103,104]. 2',5'-Oligoadenylate antisense oligomers directed against hTR also efficiently inhibit telomerase [105] as well as the growth of xenografted tumors [106,107].

The most promising analogs may be thiophosphoramidates [108]. Two such oligomers called GRN163 and GRN163L

(a lipid palmidate conjugated to GRN163) are active in vivo against a large number of xenografted tumors with short telomeres [109-112]. In vivo treatment with GRN163L is also effective in preventing lung metastases in xenograft animal models [113]. GRN163L increases radiation sensitivity in breast cancer cells [114] and breast cancer cells treated with GRN163L prior to plating in invasion chambers exhibit significantly diminished invasive potential [115]. GRN163L is superior to the nonlipidated parent compound, GRN163 [116,117] as it does not require a lipid carrier to facilitate cellular uptake. Phase I/II clinical trials using GRN163L in treatment of chronic lymphocytic leukemia recently began. Recent results suggest that this molecule could also act via a non-hTR-dependent pathway [118]. The effect of this oligonucleotide on some cells is dependent on the molecular properties of the lipid moiety, the phosphorothioate backbone, and the presence of triplet-G sequences, but independent of its anti-telomerase activity. Thus, the potent antimetastatic effects of GRN163L could be related, in part, to the anti-adhesive effects of this oligonucleotide and these effects appear to be independent of binding to hTR.

3.2. Nucleoside analogs

Nucleoside analogues, like azidothymidine (AZT), act as chain-terminating inhibitors of reverse transcriptases and were among the first drugs to be tested for their ability to inhibit telomerase [119,120] (for a recent review on nucleoside reverse transcriptase inhibitors, see [121]). Enduring AZT treatment results in inhibition of telomerase activity, progressive telomere shortening, and increased p14(ARF) expression [122]. A recent report suggested that AZT may be used as a radiosensitizer in cancer radiotherapy [123]. AZT also induces apoptosis and inhibits cell growth of human parathyroid cancer cells [124]. In combination with 5-fluorouracil (5-FU), AZT increased 5-FU cytotoxicity, suggesting that these two drugs are synergistic [125]. A very potent and specific nucleoside telomerase inhibitor, 6-thio-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (TDG-TP; $IC_{50} = 0.06 \mu M$), has also been described [126]. However, despite these promising results, no clinical trials are, to our knowledge, scheduled for nucleoside telomerase inhibitors. More surprisingly, very little data concerning this class of inhibitors is found in the recent literature, suggesting that the current interest fielding these compounds as telomerase inhibitors is relatively limited.

3.3. Non-nucleoside inhibitors

A variety of non-nucleoside drugs have also been shown to inhibit telomerase. Examples are epicatechin derivatives like EGCG and MST312 that strongly and directly inhibit telomerase [127–130]. The screening of chemical libraries allowed the identification of two molecules that are potent inhibitors of telomerase called DPNS and TNQX [131–133]. Bisindole derivatives with IC₅₀ values in the submicromolar range have also been described [134]. Finally, BIBR1532, a mixed-type non-competitive inhibitor [135], is one of the most potent inhibitors of telomerase (IC50 of 93 nM) known [136]. Treatment of cancer cells with this compound led to progressive telomere shortening and, after a characteristic lag, to a proliferation block displaying hallmarks of senescence [136]. In a mouse xenograft model, pretreatment of tumor cells with BIBR1532 led to telomerase inhibition, telomere shortening, and to a marked reduction in tumorigenic potential. At higher concentrations, this class of telomerase inhibitor exerts a direct cytotoxic effect on malignant cells of the hematopoietic system, which appears to derive from direct damage of the structure of individual telomeres and is not related to overall telomere shortening [137]. Pharmacological telomerase inhibition by BIBR1532 can sensitize drug-resistant and drug-sensitive cells to chemotherapeutic treatment [138]. This is an important observation, as BIBR alone has a relatively weak in vivo antitumor activity.

3.4. Miscellaneous inhibitors

A number of compounds, such as those discussed above and helenalin [139], chrolactomycin, UCS1025A, and radicicol, have a direct effect on telomerase [140]. On the other hand, a number of molecules, including candidate or validated anticancer drugs, have an effect on telomerase via an indirect mechanism. Telomerase regulation is complex, and a number of pathways may act on telomerase. Heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors that specifically interact with Hsp90, cause inactivation, destabilization, and eventual degradation of Hsp90 target proteins, one of which is the telomerase catalytic subunit. This molecular chaperone is required for stability and function of multiple proteins that promote cancer cell growth (for a review, see [141]). Hsp90 facilitates the assembly of telomerase and remains associated with the functional complex. It is therefore not surprising that Hsp90 inhibitors such as novobiocin and radicicol reduced telomerase activity [142,143].

Other chaperones, such as p23 (Sba1p) from yeast, bind to telomerase DNA in a cell-cycle dependent manner [144]. Telomerase expression has also been reported to be upregulated by protein kinase C (PKC). A PKC inhibitor, bisindolylmaleimide I, inhibits telomerase activity, but has no effect on the expression of telomerase core subunits [142]. Imatinib mesylate (Gleevec), a tyrosine kinase inhibitor, also causes a dose-dependent inhibition of telomerase activity in c-kit-expressing cells. The inhibition of proliferation is associated with a decrease in the S-phase of the cell cycle and an accumulation of cells in the G2/M phase [145]. Other pathways, such as those involving phospholipase C and interferon γ , regulate telomere function, explaining why inhibitors of these pathways also act on telomerase [146-148]. Pharmacological agents that act on hormonal pathways may interfere with telomerase expression. Estrogens regulate telomerase [149,150] and tamoxifen negatively controls telomerase activity [151]. Telomerase has also been proposed as a target for retinoid therapy [152–155]. Combination treatments of 9cUAB30 (a novel synthetic retinoid X receptor-selective retinoic acid that decreases DNA methyltransferase and telomerase expression) and all-trans retinoic acid proved to be synergistically

more effective than either retinoic acid alone, further suggesting a possible general epigenetic mechanism that contributes to the anti-telomerase activity of the retinoids [156].

This list is not exhaustive. Other types of molecules have an effect on telomeres and telomerase, such as histone deacetylase (HDAC) inhibitors [157-159], COX-2 inhibitors [160], and tyrosine kinase inhibitors [161]. Agents that affect the expression level of key oncogenes may also have an indirect effect on telomerase. c-Myc seems to regulate the expression level of the catalytic subunit [162]. It is therefore not surprising to observe that molecules that inhibit this oncogene also inhibit telomerase [163–165]. Finally, a number of compounds from various sources have an inhibitory effect on telomerase as well as on a number of cellular processes (for recent examples, see [166-169]). These include nonsteroidal anti-inflammatory drugs such as aspirin and anti-oxidants such as vitamin E [170,171]. These molecules cannot be considered as telomerase inhibitors as they also target a number of other components; it remains to be established if telomerase inhibition is a cause or a consequence of these pleiotropic effects. For example, treatment with thapsigargin, which increases intracellular calcium concentrations, inhibited telomerase [172].

Complicating the dissection of the mechanisms of inhibitors is the increasing evidence that suggests that the role of telomerase is not restricted to a simple lengthening of telomeres. This enzyme, or some of its subunits, could be involved in cell signaling and cell proliferation (the so-called "telomerase extracurricular activities"). Ectopically expressed hTERT enables p16(INK4A)(-) human mammary epithelial cells to proliferate in the absence of growth factors, a finding that has led to the hypothesis that hTERT has growth regulatory properties independent of its role in telomere maintenance. Telomerase controls the glycolytic pathway in melanoma cells, potentially altering the energy state of tumor cells and thereby modulating tyrosinase activity and melanin production [173]. However, recent evidence showed that telomerase can alter the growth properties of cells indirectly through its role in telomere maintenance, without altering growth stimulatory pathways [174].

hTERT seems to be involved in mitochondrial apoptosis [175,176]. Mitochondrial production of reactive oxygen species (ROS) may be seen as one of the causes of replicative senescence [177,178]. hTERT depletion facilitated the induction of apoptotic cell death by cisplatin, etoposide, mitomycin C, and reactive oxygen species and facilitated the conformational activation of Bax induced by genotoxic agents [176]. Therefore, telomerase inhibition could be a promising approach in association with drugs promoting mitochondrial apoptosis. However, some authors believe that tumor-cell apoptosis after cisplatin treatment is not telomere dependent [179]. hTERT also exerts extra-telomeric effects on the cell cycle and on its own regulatory proteins (p53 and p21), thereby regulating its own expression [180].

4. Telomere ligands and telomere mimics

Guanines and cytosines in telomeric repeats are asymmetrically distributed along two different DNA strands; this is

compatible with guanine quadruplex (G4) formation on the G-strand. The 3'-terminal region of the G-rich strand of human telomeres is single-stranded and may adopt particular conformations such as T-loops or G-quadruplexes. There are several independent possible approaches that take advantage of these unusual conformations.

4.1. Telomere mimics

Eleven- to 22-nucleotide long unmodified DNA oligonucleotides homologous to the telomere 3' overhang (T-oligos) can induce apoptosis, senescence, autophagy and/or differentiation of several types of malignant cells [181–188]. Systematic mutational analysis of these oligonucleotides suggests that the antiproliferative activity depends on G-quadruplex conformation [189]. An alternative strategy is to design PNA or oligonucleotides complementary to the G-rich overhang; a PNA inhibited cell growth and induced apoptosis of human immortal cells [190]. Conjugates containing quadruplex-stabilizing acridines may be linked to oligonucleotides that are complementary to the G-rich human telomere sequence in order to direct them to the telomere [191].

It remains to be established whether telomere mimics are simply a sub-class of G-rich oligonucleotides (GRO [192]) that probably act on nucleolin [193,194] or if they have telomere-specific effects. Nucleolin is a multi-functional protein involved in RNA processing that interacts with G-quadruplex DNA via conserved RRM/RBD domains and via RGG motifs. A number of potential G-quadruplex sequences (PQS) are present in the rDNA locus and a possible action of G-quadruplex ligands is disruption of the quadruplex—nucleolin complexes within the nucleolus; this is the mechanism of G-rich oligonucleotides such as AGRO100 (also known as AS1411) that forms a stable G-quadruplex and competes for the cellular binding sites of nucleolin and NEMO [195].

4.2. Telomeres and quadruplexes

G-quadruplexes are a family of nucleic acid secondary structures stabilized by G-quartets that form in the presence of cations. The level of interest in these structures has recently increased due to the hypotheses that G-quadruplex structures play roles in key biological processes. Each quartet is composed of four guanines, held together by a cyclic arrangement of 8 hydrogen bonds (Fig. 2A). The presence of a central cation (typically potassium) helps to maintain the stability of the structure, which may be very stable under physiological conditions. Different G-quadruplex structures exist, depending on the orientation of the DNA strands and the synlanti conformation of the guanines. The human telomeric G-overhang can fold into several different intramolecular quadruplex structures that differ by the position of the adjacent loop regions (Fig. 2A, right). Recent data suggest a predominant conformation under physiological conditions [196–198]. Quadruplexes have now been studied in organisms from E. coli [199] to humans. The existence of G-quadruplexes in vivo was initially established in ciliates using specific antibodies [200,201].



Fig. 2. Chemical formulas of some telomere ligands. (A) Left: structure of a G-quartet involving four coplanar guanines. Right: possible conformations of the intramolecular G-quadruplex formed by human telomeric DNA [196,197,277–279]. (B) Chemical formulas of some G-quadruplex ligands.

The *in vivo* existence of G-quadruplexes has been proposed for oncogene promoters and telomeres through the use of specific ligands (see below) [202,203].

Optimal telomerase activity requires an unfolded singlestranded substrate, because G-quadruplex formation directly inhibits telomerase elongation *in vitro* [204]. Therefore, ligands that selectively bind to and stabilize G-quadruplex structures may interfere with telomere conformation and telomere elongation. The number of known G-quadruplex ligands has grown rapidly over the past few years. A range of G-quadruplex ligands have been shown to bind quadruplexes *in vitro* (see Table 1 and Fig. 2B). Features shared by many of these ligands include a large flat aromatic surface, presence of cationic charges, and ability to adopt a terminal stacking mode. Natural compounds also recognize quadruplex DNA and are active in the telomere repeat amplification protocol (TRAP) assay (for

Table	1

Quadruplex ligands tested for telomerase inhibition

Compound	Method	IC ₅₀ (µM)	Year	Reference
BSU 1051 (2.6-diamido dianthraquinone)	Direct (biotin primer)	23	1997	[25]
Pervlene diimide (PIPER)	Direct (biotin primer)	$\sim 50^{\rm a}$	1998	[281]
TMPyP4	Direct	6.5	1998	[282]
1.4- and 2.6-amidoanthracene-9.10-dione	TRAP	4.5 ^b	1998	[283]
1,5-, 1,8- and 2,7-amidoanthracene-9,10-dione	TRAP (gel)	1.3 ^b	1998	[284]
BSU 1051	Direct	1-15	1999	[285]
3.6-Disubstituted acridines	TRAP	1.35 ^b	1999	[286]
2.7-Diamido fluorenones	TRAP (gel)	8 ^b	1999	[287]
Tetracyclic compounds	TRAP (gel)	5.4 ^b	1999	[288]
Amidoanthracenes and acridines	TRAP (gel)	1.8 ^b	1999	[289]
Indolo quinoline	TRAP (gel)	16	2000	[290]
Various (review)	TRAP (gel)	1.3 ^b	2000	[291]
Various (review)	Direct	1.0	2000	[292]
3 6 9-Trisubstituted acridines	TRAP (gel)	0.06^{b}	2000	[293]
Telomestatin	TRAP	0.005	2001	[294]
Porphyring (TMPvP4)	Direct	63-10	2001	[295]
Fluoroquinophenoxazines	Direct	$\sim 50^{a}$	2001	[296]
Carbocavnines (DODC)	Direct	$\sim 50^{\rm b}$	2001	[297]
Pentacyclic actidine RHPS4	TRAP (gel)	0.33	2001	[227]
Acridine dimer	TRAP (gel)	0.55	2001	[208]
Dibenzonbenanthrolines	TRAE (gel)	0.75	2001	[290]
Ethidium derivatives	TRAF (gel)	0.028	2001	[299]
Dentequalia activities DUDS4	TRAF (gel)	0.018	2001	[300]
2.6.0 Trigophoticity and a societies (DBACO 10)	TRAP (gel)	0.23	2002	[301]
Developed disside (DIDED)	TRAP (gel)	0.12	2002	[224]
Anther series and	TRAP (gel)	10-20	2002	[302]
Anthraquinones	TRAP (gel)	$\approx 10^{-5}$	2002	[303]
	IRAP-G4	0.0	2002	[304]
		0.041	2002	[217]
Benzoindoloquinolines		0.5	2002	[305]
Trisubstituted acridines	TRAP (gel, filter)	0.02 cb	2003	[306]
Porphyrine-aminoquinoline		5-	2003	[307]
Pentacyclic acridine RHPS4	TRAP	0.33	2003	[308]
Biarylpyrimidines	?	>10	2003	[309]
Ethidium derivatives	TRAP-G4	0.10	2003	[310]
Bisquinacridine (BOQ)	TRAP (gel)	0.13	2003	[311]
Cryptolepine	TRAP (gel)	9.4	2003	[312]
Zn finger protein	TRAP-EZE	0.074	2004	[313]
Indolo quinolines	TRAP	6.3°	2004	[314]
Disubstituted acridines	TRAP	0.08	2004	[315]
Disubstituted acridones	TRAP	0.25	2004	[316]
BMVC	TRAP	0.05	2004	[317]
Quindoline derivatives	TRAP (gel, filter)	0.55	2005	[318]
Porphyrin derivatives	TRAP (gel)	50	2005	[319]
Amido and amino anthraquin	TRAP-G4	0.25	2005	[320]
Perylene derivatives	TRAP-G4	$\sim 10^{a,b}$	2005	[321]
Pyridine dicarboxamide	TRAP (gel)	0.225	2005	[226]
Ascididemin	TRAP (gel)	11	2005	[322]
Quindoline derivatives	TRAP (gel, filter)	0.44 ^b	2006	[323]
Berberine derivatives	TRAP-G4	$\sim 50^{a}$	2006	[324]
Nickel salphen complexes	TRAP (gel)	0.12	2006	[325]
Phenol porphyrin	TRAP (gel)	1.2	2006	[326]
Neomycin derivatives	TRAP (gel)	0.2 ^b	2006	[327]
Bistriazoles derivatives	TRAP (gel)	13 ^b	2006	[328]
Bisquinolinium derivative	TRAP (gel)	0.016 ^b	2007	[216]
Amidoanthraquinones	TRAP-G4	0.1 ^b	2007	[329]
Perylene derivatives	TRAP	5	2007	[330]
Coronene derivatives	TRAP (gel)	$\sim 10^{\rm a,b}$	2007	[331]
Porphyrine derivatives	TRAP (gel)	0.58	2007	[332]
Trisubstituted acridines	TRAP (gel)	0.03 ^b	2007	[333]
Perylene analogs	_	-	2007	[334]
Zinc phthalocyanine	_	-	2007	[335]
Steroid derivatives	_	-	2007	[336]
Metal terpyridine complexes	_	-	2007	[337]

^a Estimated. ^b For the most active molecule from the series.

a review, see [205]; the principle of this assay is presented in Fig. 3). The chemical structures of some of the ligands active in the TRAP assay are presented in Fig. 2. Some of these molecules have also been shown to induce telomere shortening and/ or telomere instability, triggering apoptosis and/or senescence programs, in various cell lines (see below).

The demonstration that telomeres are a significant target for these ligands was provided by a study using a radiolabeled Gquadruplex ligand. The localization of the chromosomal binding sites of the tritiated pyridine dicarboxamide derivative was performed in metaphase spreads from cell lines with different telomere lengths. The result showed that the radiolabeled molecule preferentially binds to the terminal parts of chromosomes [203]. Binding sites in internal chromosomal regions were also observed but in significantly fewer numbers than those at the end of chromosomes.

4.3. Other types of telomere ligands

Minor groove binders may be used to target doublestranded telomeric repeats [206]. A hairpin polyamide-cyclopropanepyrroloindole (CPI) conjugate alkylates its target adenine in the telomere repeats, 5'-CCCTAA-3', and inhibits the growth of a variety of cancer cell lines [207]. The anticancer drug cisplatin may recognize G-quadruplexes (see above) and also duplex telomeric DNA [208–211], as these long tandem repeats are potential targets for cisplatin and other platinum-containing compounds. Derivatives, including 2,3dibromosuccinato (2-(methylaminomethyl)pyridine)platinum (II) [212] and *cis*-dichloropyridine-5-isoquinolinesulfonic acid Pt(II) [213], are strong telomerase inhibitors, with IC₅₀s in the μ M range. Finally, one may also envision that molecules that specifically bind to the telomeric overhang in a non-quadruplex conformation (such as naphthyridine tetramers [214]) could also have interesting biological effects.

4.4. Are telomere ligands 'simple' telomerase inhibitors?

There are fundamental differences between the targeting of the telomeric G-overhangs using specific ligands and the inhibition of the catalytic activity of telomerase. Telomeres exist in the absence of telomerase and G-quadruplex ligands are expected to have an effect against ALT cells and also on normal cells. In contrast, due to the very low level of telomerase expression in normal cells, catalytic inhibitors should not dramatically affect normal cell growth or ALT cell growth.

G-quadruplex ligands were first evaluated as telomerase inhibitors and induce telomere shortening and replicative senescence [20]. However, the TRAP assay (Fig. 3) is inappropriate for the determination of telomerase inhibition by quadruplex ligands (De Cian *et al.*, submitted for publication). As previously noted [215,216], these ligands interfere with the PCR of a G-quadruplex sequence while leaving the internal



Fig. 3. Principle of the TRAP assay. (A) The TRAP assay is a two step protocol for the detection of telomerase activity in whole CHAPS cell extracts [9]. Step 1 corresponds to the elongation of the substrate (TS, 5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3') by the telomerase present in the cell extract (for 15 min at 30 °C for instance). Then, the telomeric elongation products and a non-telomeric 36-base internal control (TSNT, 5'-AAT CCG TCG AGC AGA GTT AAA AGG CCG AGA AGC GAT-3') are amplified by PCR during step 2, using respectively primers TS, ACX (5'-GCG CGG CTT ACC CTT ACC CTT ACC CTA ACC-3') and TN (5'-ATC GCT TCT CGG CCT TTT-3'). (B) Example of a TRAP experiment in presence of various quantities (3-fold dilutions) of a CHAPS cell extract (lanes 1-3) or in the absence of any telomerase activity (lane 4). PCR and elongation products are resolved by 7.5% denaturating PAGE (1× TBE, 7 M urea), and detected by incorporation of ${}^{32}P-\alpha$ -dCTP.

control (ITAS) unaffected. As a consequence, the inhibitory effect of many quadruplex ligands is overestimated and the use of a direct assay is required to measure telomerase inhibition.

In agreement with the initial paradigm for telomerase inhibitors, long-term treatment of the human cancer cells with subtoxic doses of disubstituted triazines or telomestatin induces progressive telomere shortening that correlates with the induction of senescence [217-220]. Note that telomestatin not only binds to the human telomere motif, but also to plant telomeric repeat sequence, and inhibits telomerase activity in suspension-cultured cells of Arabidopsis thaliana and Oryza sativa (rice) in a dose-dependent manner [221]. The addition of telomestatin resulted in rapid shortening of telomeres and the induction of cell death by an apoptosis-like mechanism in Arabidopsis cells. This telomere shortening could be the result of telomerase inhibition and/or telomere replication inhibition. A similar phenomenon was noticed in human cells treated with telomestatin, BRACO19 and a new steroid derivative [222, 223,336]. It could be the result of telomerase inhibition, but as we will discuss later in this paper, such a short-term loss could also be the result of telomere replication inhibition and/or telomere dysfunction.

In some cases, no shortening was observed with G-quadruplex ligands [217,224–226]. Interestingly, some of these ligands were able to downregulate telomerase expression in treated cells [217,218,224,227]; the effect may be related to c-myc repression [228,229] or to a modification of hTERT splicing [230]. For one ligand in this class, BRACO19, a decrease in the nuclear hTERT, together with the formation of cytoplasmic hTERT bound to ubiquitin, may explain the downregulation of telomerase [223]. In RHPS4-treated tumor xenograft tissues, it appeared that nucleolar hTERT was lost [231]; however, the hTERT antibody used (NCL-L-hTERT) was recently shown to recognize nucleolin [232], a major component of the nucleoli.

4.5. Direct effects of G-quadruplex ligands on telomeres: induction of telomere dysfunction

In early studies, it was observed that G-quadruplex ligands induced a short-term response (apoptosis) that cannot be explained solely by telomerase inhibition [217,218,226]. Subtoxic concentrations of the acridine G-quadruplex ligands RHPS4 or BRACO19 trigger growth arrest in tumor cells after just 15 days of exposure, before any detectable telomere shortening [224,227]. Short-term and massive apoptosis was also observed after interference with the telomere capping function of telomerase when either hTERT or hTR are modified by mutations. The observation that BRACO19 causes chromosome end-to-end fusion associated with the appearance of p16-associated senescence led to the proposal that G-quadruplex ligands primarily act to disrupt the telomere structure [233]. Such telomeric dysfunction was also observed in cell lines treated with other quadruplex ligands and in cell lines resistant to a triazine derivative with typical images of telophase bridges [219,225,226]. These studies suggest that the direct target of these ligands is the telomere rather than telomerase. The evidence that the

antiproliferative effect of G-quadruplex ligands is independent of the presence of telomerase also comes from a series of observations:

- (i) Overexpression of hTERT or a dominant negative of hTERT in a telomerase positive cell line does not modify the antiproliferative effect of the triazine derivative 12459 (formula shown in Fig. 2) [234].
- (ii) All described G-quadruplex ligands block the proliferation of ALT cell lines [217,227,233].
- (iii) The reintroduction of hTERT in ALT cell lines produces only partial protection from the antiproliferative effects of telomestatin and 307A. Therefore, we propose that hTERT acts to protect the integrity of telomeres.

4.6. Isolation of resistant clones

The biological effect of G-quadruplex ligands can be overcome by the appearance of acquired resistance phenotypes. Cell lines with resistance to a triazine derivative 12459 have been selected from parental A549 cells by either progressive adaptation or by EMS mutagenesis [219,234] and experiments with these cells demonstrate interesting differences between the short- and long-term effects of the triazine. Important alterations of hTERT splicing were observed in some of these resistant cells; this may help overcome a down-regulation of hTERT transcription induced by the quadruplex ligand [230]. An increased telomerase expression appears to be not sufficient per se to confer a resistance phenotype [234]. Since these resistant cell lines displayed an increased number of mitotic alterations (such as anaphase bridges) that induced important telomere capping alterations, we propose that hTERT overexpression may serve to stabilize or protect the telomere extremities.

For most of the G4 ligands studied so far, treatment induced apoptotic cell death after several cell cycles in tumor-derived cell lines. The triazine ligand activates the mitochondrial cell death pathway through an alteration of the Bax/Bcl-2 balance, which leads to caspase 3 activation. In the short-term, apoptosis predominates over the appearance of senescent cells in the presence of this ligand [235]. Some of the clones selected for resistance overexpressed the Bcl-2 protein. In addition, A549 cells transfected by Bcl-2 display a resistance to the apoptotic action of 12459 [235]. However, Bcl-2 overexpression is not sufficient to confer resistance to 12459 after long-term treatment. Thus, 12459-directed senescence is uncoupled from apoptosis, a result that fits well with the differences observed between clones in long-term and short-term resistance studies [219,234].

4.7. DNA damage pathways induced by G-quadruplex ligands

Telomeres prevent the recognition of natural chromosome ends as double-stranded breaks (DSBs). Telomere shortening or the loss of protective factors such as TRF2, TIN2, and POT1 activate a DNA damage response mediated in part by the ATM kinase [236]. This response is characterized by the appearance of telomere-induced foci (TIF) when DNA damage response factors, such as 53BP1, γ -H2AX, Rad17, p-ATM, and Mre11 are activated [89,91]. DNA damage signaling is associated with telomere erosion and G-overhang shortening and differs for telomestatin and the triazine derivative 12459 as shown in Fig. 4.

Tauchi *et al.* demonstrated that in BCR-ABL positive human leukemia cells, OM9:22, a DNA damage pathway is initiated after telomestatin treatment that is characterized by the phosphorylation of ATM and Chk2 [218]. Although OM9:22 cells do not contain functional P53, telomestatin significantly increases the number of G1-arrested cells, associated with the expression of the cyclin dependant kinase inhibitors p21^{CIPi} and p27^{KIP1}. Telomestatin also provokes a DNA damage response in HT1080-treated cells as evidenced by the formation of γ H2AX foci that partially co-localize at the telomere, thus suggesting that this ligand provokes a telomeric dysfunction [222]. A similar γ H2AX response in the nucleus of UXF1138L uterus carcinoma cells has been reported upon treatment with RHPS4 [231].

The triazine derivative 12459 has been shown to induce either senescence or apoptosis in the human A549 pulmonary carcinoma cell line, depending on concentration and exposure time [217,235]. Different DNA damage responses were associated with senescence and apoptosis (Douarre et al., manuscript in preparation). In senescence conditions, 12459 provokes a DNA damage response as evidenced by the appearance of yH2AX foci at telomere, phosphorylation of Chk1 kinase, and p53 activation by phosphorylation at Ser 15, all characteristic of the replicative damage pathway (ATR). In apoptotic conditions, 12459 triggers the mitochondrial apoptotic pathway and induces an unusual p53 activation in which phosphorylation only takes place at Ser 392 and yH2AX foci at telomeres are absent. Furthermore after 12459 treatment, neither of the DNA damage checkpoint proteins Chk1 nor Chk2 was observed and no phosphorylation was observed at p53 Ser residues, usually phosphorylated when ATM or ATR pathways are activated. Interestingly, a transient dephosphorylation of Chk1 was observed at an early time point after 12459 treatment that was associated with overexpression of PPM1D (protein phosphatase magnesium dependent 1). This protein is a phosphatase responsible for the reversion of DNA damage signaling pathways that was previously reported to be activated



Fig. 4. DNA damage pathways induced by G-quadruplex ligands at telomeres. DNA damage signaling is associated with telomere erosion and G-overhang shortening and differs for telomestatin and the triazine derivative 12459.

by UV and oxidative stress. In cells treated with 12459, inhibition of PPM1D expression by siRNA restores Chk1 activation and γ H2AX foci at telomeres, demonstrating that 12459 induces a replicative damage pathway mediated by ATR (Douarre *et al.*, in preparation).

4.8. Consequences of telomere targeting: the G-overhang is inaccessible, altered and/or degraded

Telomestatin induces an important telomere degradation in some cell lines that arises earlier than would be expected as a result of telomerase inhibition [218,234]. These data, together with reports that G-quadruplex ligands impair the growth of ALT cell lines lacking telomerase, have suggested that additional mechanisms may explain the biological activity of the ligands in tumor cell lines.

The G-rich 3' extension (or G-overhang) can form a T-loop structure that protects chromosome ends from fusion. The degradation of the G-overhang is associated with the onset of the replicative senescence and with inactivation of proteins from the shelterin complex and thus telomere deprotection [62] (Figs. 1 and 5). The hypothesis that G-quadruplex ligands preferentially act to modify the G-overhang conformation or induce its degradation has been experimentally evaluated by using two techniques, T-OLA [237] and a hybridization assay [234,237]. In vitro experiments on extracts of cells treated with G-quadruplex ligands showed that telomestatin remains tightly and specifically attached to the G-overhang and prevents hybridization of an oligonucleotide probe [238]. These observations, together with in vivo DMS protection experiments, provide good evidence for the existence of G-quadruplexes at the telomeric G-overhang in the presence of G-quadruplex ligand. Further experiments established that a real (but partial) degradation of the G-overhang occurred after a long telomestatin treatment in A549 cells (8-12 days); it was associated with the growth arrest of the cells. Interestingly, in other cell lines (EcR293 and HT1080), telomestatin induces at 48-72 h a degradation of the G-overhang, suggesting that an active nucleolytic process is triggered by the ligand. Compound 12459 has the same effect in A549 cells [226,235]. Ligands 307A and 360A cause only limited degradation of the G-overhang in A549 and T98G cells [226]. This suggests that the cellular response to the G-quadruplex stabilization at the telomeric G-overhang varies depending on the nature of the ligands and the cell line, possibly through differential activation of the DNA damage machinery.

The T-OLA assay has been developed to determine the length of the telomeric G-overhang and have allowed a measure of the mean length at all chromosome ends in a cell population, provided that hybridization of a 21–24 base long probe is possible. Although a relationship has been proposed between the G-overhang signal/length and senescence induction of cell populations [239], the disappearance of the G-overhang signal observed under G-quadruplex treatment may instead correspond to increased fusions between chromosome ends as a result of telomere instability or a tight binding

of the molecule to the overhang that precludes probe hybridization even after genomic DNA preparation.

A clear relationship between the initial length of the Goverhang and the senescence growth arrest has been reported for telomestatin and a steroid derivative. The overexpression of GFP-POT1 or Δ OB-POT1 induced telomere and G-overhang extension in EcR293 and HT1080 cells. These cells presented a resistance to the ligand induced-senescence associated with a shorter mean G-overhang length. This suggests that G-overhang length and POT1 levels are important factors that modulate the effect of G-quadruplex ligands.

The recent use of a PCR-ligation assay using a primer designed to hybridize in the sub-telomeric region of chromosome XpYp has allowed determination of the telomere length at a single chromosome (the technique is called single telomere length analysis, STELA) [240]. A modification of this assay allowed the last base at the 3' end of the G-strand (G-STELA) and at the 5' end of the C-strand (C-STELA) to be determined [241]. Results from the C-STELA indicated that there is a strong sequence preference for ATC-5' (observed at 80%) of the chromosome ends, Fig. 6), supporting the premise that a process generates precise terminal nucleotides at the C-strand. Inactivation of POT1 results in the loss of the base preference at the C-strand, suggesting that POT1 participates in control or recruitment of the endonuclease that generates the 5' end of the C-strand [85]. Apollo, an Artemis related 5'-exonuclease that interacts with TRF2, is a potential candidate for this function [75]. In contrast, G-STELA indicated that there is only a slight sequence preference at the termini of the G-strand. In the absence of telomerase, a bias towards TAG-3', TTA-3', and GTT-3' was found for 70% of chromosome ends. This appears to exclude generation of the end of the G-strand through a specific cleavage. In the presence of telomerase, an enrichment of the TAG-3' was found (50% of chromosome ends). This sequence is complementary to the last bases of the RNA template region of telomerase (5'-CCCAAUCCCAAUC-3'); telomerase is thought to dissociate from telomere at the end of the template region, to translocate along the G-overhang, and then initiate a new round of repeat synthesis.

Interestingly, the structure and the stability of the telomeric repeat greatly differ as a function of the telomere repeat length and the concentrations of Na⁺ and K⁺. The DNA oligonucleotide 5'-AGGG(TTAGGG)₃-3' forms a single-basket type, unimolecular G-quadruplex in the presence of Na⁺ and a mixture of conformations in K^+ . The same sequence with a 3' extension of two thymines forms a stable, hybrid parallel/antiparallel folded topology in K⁺, but a single stable topology is not observed in Na⁺. The hybrid-type telomeric G-quadruplex structure can be readily folded and stacked end-to-end to form a compact-stacked structure. Since less that 5% of the terminal bases of actual telomeres correspond to GGG-3', telomeres may adopt the hybrid-type parallel/antiparallel folding. It would be of utmost interest to determine whether G-quadruplex ligands stabilize the hybrid-type parallel/antiparallel or another type of G-quadruplex folding. It is possible that the modification of the G-quadruplex topology at the G-overhang



Fig. 5. G-quadruplex ligands induce telomere dysfunction. Model explaining the differential effects of G-quadruplex ligands that induce G-overhang degradation and/or TRF loss in normal and tumor cells. G-quadruplex stabilization using a ligand is expected to alter the closed state of the shelterin complex. This might alter the 3' overhang structure and release some of the shelterin proteins. This is expected to induce G-overhang degradation through a DNA damage repair pathway. G4 resolvase might modulate the effect of the ligand by either displacing the ligand and re-enable the formation of a closed or open shelterin complex, or by helping the action of the nuclease proposed to process the overhang. As a consequence, G-overhang degradation also induces the release of POT1 from telomeres (immortalized cells). In tumor cells, G-overhang degradation induces a further t-loop instability followed by anaphase bridges and TRF loss associated with the release of TRF2 from telomeres. In ALT cells, the consequences of the G-overhang degradation are unknown.

will disrupt the compact secondary structure and cause formation of another structure without physiological relevance or one that trigger a cellular response (Fig. 7). Evaluation of the sequences at the end of telomeres from cells treated with G-quadruplex ligands would give some answers to these questions, although artifacts might be observed during PCR due to the presence of quadruplex ligands.

4.9. Telomere binding proteins are deregulated

Interestingly, the inactivation of TRF2 and POT1 may cause cellular effects analogous to those reported with Gquadruplex ligands, such as chromosomal instability and loss of the telomeric G-overhang, followed by the appearance of apoptotic and/or senescent cells. But this observation has been challenged for POT1 by Price and co-workers in *Tetrahymena*. This ciliate has two POT1 genes, POT1a and POT1b [242]. Instead of being required for G-overhang protection, POT1a suppresses a telomeric DNA damage response and regulates telomere length. Two POT1 genes, with distinct functions, have been also described in mouse. POT1a, but not POT1b, represses a DNA damage signal at telomeres. Conversely, POT1b, but not POT1a, has the ability to regulate the amount of single-stranded DNA at the telomere terminus [63,87]. In human, TPP1, found in the shelterin complex, has homology to TEBP- β from ciliates and a predicted OB domain that appears to be essential for POT1-mediated telomere



Fig. 6. Last base preferences in human telomere strands. The terminal nucleotides for G- and C-strands of the human telomeres (a) in the absence of telomerase activity, (b) in the presence of telomerase activity, and (c) after inactivation of POT1 by RNA interference. No preference was found for the C-strand after inactivation of POT1.

length control. TPP1 and POT1 form a complex with telomeric DNA that increases the activity and processivity of the human telomerase core enzyme. A model has been proposed in which both proteins protect telomere ends in a Yin–Yang fashion by

positively or negatively regulating telomerase access to telomeres [73,74].

The effect of G-quadruplex ligands on the binding of POT1 to the telomeric G-overhang in vitro and in human cells has been investigated using a GFP-POT1 fusion protein. Telomestatin inhibits the binding of POT1 to the telomeric G-overhang in vitro [243]. In human cells (EcR293 and HT1080), Goverhang degradation correlates with a dramatic and rapid delocalization of GFP-POT1 from its telomere sites. Interestingly, telomestatin also displaces the telomere localization of TRF2 in tumor cell lines (including HT1080), but not in normal or immortalized cell lines (including EcR293) [243,244]. An extensive telomeric repeat fragment (TRF) decrease is also observed in telomestatin-treated tumor cells, explaining the TRF2 decrease at telomeric ends. A DNA damage response is also observed at the telomere, but an important DNA damage response is also observed in non-telomere regions, suggesting additional DNA damage sites that remain to be identified. These results indicate that either telomere structure is different between these two cellular models and/or that different DNA damage processes are associated with the response to the ligand in normal and tumor cells. Telomestatin was also shown to induce a DNA damage response and apoptosis in newly generated neurons (which have low levels of TRF2 and telomerase), whereas embryonic cortical neural progenitors (which have high levels of telomerase) or mature neurons (which have high levels of TRF2) are resistant to DNA damage [245]. Further evaluation in additional cell lines and with several ligands might help explain the differences in cytotoxicity between normal and tumor cells reported earlier.



Fig. 7. Possible effect of G4-ligand on the overhang structure. Starting from the hypothesis that the "up up down up" structure (in which three strands point in one direction while the last one points in the opposite direction) of a single G-quadruplex allows a compact stacked secondary structure for the overhang (top), one might propose that a G4-ligand, depending on its G-quadruplex fold preference, could induce a loose (middle left) or more compact (bottom left) state of the overhang. One could also propose a partial opening of the telomeric duplex region by the G4-ligands resulting in a loose (middle right) or a more compact (bottom right) state with a dangling 5′ C-strand. One has to keep in mind that this proposed "compact stacked" secondary structure can also accommodate proteins either in a linear telomere capped state or in a G4-friendly t-loop [198,280].

4.10. Helicases as components of telomere replication and recombination

Several helicases are associated with telomeres from ALT cells and unwind G-quadruplex substrates, including members of the RecQ helicase family, Sgs1p from yeast, and Bloom's syndrome (BLM) [246,247] and Werner's syndrome (WRN) DNA helicases [248]. These helicases have been shown to unwind intra- and inter-molecular G-quadruplexes formed by telomeric sequences or other G-rich sequences. These helicases present a conserved association with type IA topoisomerases (*i.e.*, the interaction between BLM and topo III α in humans is used to solve recombination intermediates (for a review, see [249])) and stabilize telomeres in ALT (see below). Telomere dysfunction is actually a cause of genomic instability in Werner Syndrome (WS) [250]; much of the physiopathology associated with WS, including the rapid onset of cellular senescence, early cancer onset and premature aging, can be attributed to a defect in telomere maintenance (for a review, see [251]). In mouse, Rtel helicase has been shown to control telomere length and genomic stability [252]. This putative helicase has a limited homology with the DOG-1 helicase from C. elegans, which is involved in the stability of G-rich regions [253]. In DOG-1 null mutants, HR genes are involved in the deletion mechanism, suggesting a stalling of replication forks at G/C rich tracts [254]. WRN and BLM helicases also cooperate with POT1 in vitro to unwind telomere structures [255]. Therefore, quadruplex ligands may interfere with these helicases during telomere replication. This mechanism has been shown in vitro with ligands from the trisubstituted acridine series. These ligands inhibit the unwinding of Gquadruplex sequences by the RecO, BLM, and WRN helicases, but the mechanism remains to be validated in a cellular context [256].

5. Concluding remarks

For in vivo assays and clinical trials, some authors have proposed that telomerase inhibitors should only be used to complement (or in combination with) a direct cytotoxic agent. According to the initial paradigm for telomerase inhibitors [257], a long delay is expected between the start of the treatment and proliferation arrest, making these agents alone inefficient. This drawback has been verified for some inhibitors such as BIBR1532 [136]. However, this limitation has been challenged by the observation that telomerase also plays an important role in cell survival, making it possible that telomerase inhibitors will have immediate effects, even if the initial telomere length is long. Pharmacological strategies that aim at inhibition of telomerase in cancer cells should take into account that not only do these ligands induce overall telomere shortening, but also rapidly induce a high level of telomere dysfunction [258]. Another current field of interest is in relation to the possible existence of cancer stem cells. At least in breast cancer, these stem cells are telomerase positive [259]; telomerase inhibitors could well target these rare cells (for a review, see [260]).

Some of the experimental observations described in this review argue for better analytical tools for telomere and telomerase analysis. Currently available anti-telomerase antibodies are relatively unsatisfactory (and one of them does not target telomerase; it actually recognizes nucleolin! [232]). As the length of individual telomeres (especially the shortest ones) may be more relevant than the average telomere size, methods to assess single telomeres are required. Current protocols are relatively cumbersome; fortunately a high-throughput telomere length quantification by FISH was recently introduced [261]. Other problems have been identified. Most of the "best" inhibitors have not been made commercially available, preventing research groups from comparing various classes of inhibitors in the same biological system. The TRAP assay itself is prone to artifacts, especially for quadruplex ligands, as discussed above. Unfortunately, the direct assay is relatively insensitive (i.e., it requires a lot of radioactivity and a larger amount of extracts (100-1000-fold) which may lead to artefacts). This problem has been addressed elsewhere in this issue. Recent reports that transient transfection of hTR and hTERT lead to a large increase in telomerase activity may help to improve the sensitivity of this assay [262].

Several therapeutic strategies involving telomerase have been tested or will be tested soon in clinical trials. The telomerase immunization approach is by far the most advanced, since phase III trials started in 2006. In this strategy, patients are immunized with RNA encoding the telomerase protein subunit; the telomerase-specific cytotoxic T-lymphocytes generated should specifically destroy cancerous cells that express telomerase. In order to design effective therapies with G-quadruplex ligands, the goals must be to achieve antitumor activity and to keep the toxicity low. The first criterion was recently obtained for BRACO19; this compound had antitumor activity as a single agent in human xenografts [223]. Unfortunately, BRAC019 has very poor cell permeability [263]. Further applications will require a suitable formulation to warrant adequate delivery across cellular barriers. Telomestatin has antitumor activity against the leukemia U937 in a mouse xenograft model without any signs of toxicity [264]. Since several other G-quadruplex ligands have selectivity for tumor cell lines over normal progenitors, primary astrocytes, or normal cell lines in culture [218,233], the criterion of a therapeutic index seems possible.

The human telomeric quadruplex is, as stated above, polymorphic, especially under near-physiological conditions. This represents an obstacle for the design of specific ligands; we do not know exactly which topology should be targeted. In addition, ligands could well induce a conformational change of the quadruplex structure that could lead in turn to a change in overall quadruplex higher-order organization, as a result of a preference for an alternative quadruplex fold (Fig. 7). The consequences of this hypothetical change are unknown. Furthermore, quadruplex ligands may also act at non-telomeric sites, due to the presence of G-quadruplexes in other parts of the genome, including oncogenic promoters. A strategy is being pursued to develop G4 promoter ligands [229,265,266]. The best example is a ligand called CX-3543 (Cylene Pharmaceuticals) that is now in Phase II clinical trial. It is yet not clear what is the most promising target for G4 ligands: the telomeres, the promoters of key oncogenes, or other sites such as ribosomal DNA. To answer this question, one would ideally need to compare molecules that bind only to one class of quadruplexes. Unfortunately, the specificity is not yet perfect, although some ligands display interesting *in vitro* selectivity for the mixed parallel/antiparallel G-quadruplex structure adopted by the *c-myc* G-quadruplex relative to the telomeric G-quadruplex [267].

What is best: targeting telomeres or telomerase? Our opinion is that a G4 telomeric ligand is neither something MORE nor something LESS than a telomerase inhibitor, but something else. Despite an abundant bibliography on telomerase inhibitors and quadruplex ligands, we failed to find any article that compares the effects of both type of molecules in the same system (cell culture or in vivo). Based on a review of the existing literature, Boukamp et al. reached the conclusion that telomeres may be the better targets for cancer therapeutics [268]. Burger defined three emerging strategies that show promise for prevention of tumorigenesis: attacking cancer cell immortality by targeting the telomere/telomerase complex is one of them [269]. Other authors have predicted or demonstrated that the inhibition or alteration of telomerase is effective against cancer as a polytherapy in the adjuvant setting [270-272]. The relations between telomeres and tumorigenesis are multiple and complex. Recent results demonstrate that short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence in a p53 dependent manner [273]. What happens with telomerase inhibitors in p53 inactivated tumors? Experiments performed over the next few years will be critical for validation of these targets in the clinic and should provide answers to this and other questions. Should we look for molecules that induce apoptosis rather than senescence? The observation that telomere-based senescence approaches exert powerful anticancer effects [273] (for a review, see [274,275]) makes the answer not straightforward [276]. Currently, no telomere ligand or telomerase inhibitor has currently obtained approval. Independent of the outcomes of these trials, the extreme ends of chromosomes represent a fascinating field of investigation for cell biologists, biochemists, structural biologists, and oncologists.

Acknowledgments

We wish to thank all the members of our laboratories for fruitful discussions which aided in shaping this paper. We thank E. Mandine, P. Mailliet, F. Boussin, A. Londono-Vallejo, K. Shin-ya, M.P. Teulade-Fichou, M.F. O'Donohue for scientific collaborations. This work was supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer grants (#3365 to J.L.M. and 3644 to J.F.R.), by an European Union FP6 grant MolCancerMed (LSHC-CT-2004-502943 to J.L.M) and by the Ligue Nationale Contre le Cancer, Equipe labellisée 2006 (to J.F.R.).

References

- [1] R.K. Moyzis, J.M. Buckingham, L.S. Cram, M. Dani, L.L. Deaven, M.D. Jones, J. Meyne, R.L. Ratliff, J.R. Wu, A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)n, present at the telomeres of human chromosomes, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85 (1988) 6622–6626.
- [2] V.L. Makarov, Y. Hirose, J.P. Langmore, Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening, Cell 88 (1997) 657–666.
- [3] R. McElligott, R.J. Wellinger, The terminal DNA structure of mammalian chromosomes, EMBO Journal 16 (1997) 3705–3714.
- [4] W.E. Wright, V.M. Tesmer, K.E. Huffman, S.D. Levene, J.W. Shay, Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end, Genes and Development 11 (1997) 2801–2809.
- [5] W. Chai, Q. Du, J.W. Shay, W.E. Wright, Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands, Molecular Cell 21 (2006) 427–435.
- [6] C.B. Harley, A.B. Futcher, C.W. Greider, Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts, Nature 345 (1990) 458–460.
- [7] C.W. Greider, E.H. Blackburn, Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts, Cell 43 (1985) 405–413.
- [8] G.B. Morin, The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats, Cell 59 (1989) 521–529.
- [9] N.W. Kim, M.A. Piatyszek, K.R. Prowse, C.B. Harley, M.D. West, P.L.C. Ho, G.M. Coviello, W.E. Wright, S.L. Weinrich, J.W. Shay, Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer, Science 266 (1994) 2011–2015.
- [10] E. Hiyama, K. Hiyama, Telomere and telomerase in stem cells, British Journal of Cancer 96 (2007) 1020–1024.
- [11] C. Autexier, N.F. Lue, The structure and function of telomerase reverse transcriptase, Annual Review of Biochemistry 75 (2006) 493–517.
- [12] C.A. Theimer, J. Feigon, Structure and function of telomerase RNA, Current Opinion in Structural Biology 16 (2006) 307–318.
- [13] K. Masutomi, E.Y. Yu, S. Khurts, I. BenPorath, J.L. Currier, G.B. Metz, M.W. Brooks, S. Kaneko, S. Murakami, J.A. DeCaprio, R.A. Weinberg, S.A. Stewart, W.C. Hahn, Telomerase maintains telomere structure in normal human cells, Cell 114 (2003) 241–253.
- [14] K. Masutomi, R. Possemato, J.M.Y. Wong, J.L. Currier, Z. Tothova, J.B. Manola, S. Ganesan, P.M. Lansdorp, K. Collins, W.C. Hahn, The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (2005) 8222–8227.
- [15] T.M. Bryan, A. Englezou, J. Gupta, S. Bacchetti, R.R. Reddel, Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity, EMBO Journal 14 (1995) 4240–4248.
- [16] S.F. Hoare, L.A. Bryce, G.B.A. Wisman, S. Burns, J.J. Going, A.G.J. van der Zee, W.N. Keith, Lack of telomerase RNA gene hTERC expression in alternative lengthening of telomeres cells is associated with methylation of the hTERC promoter, Cancer Research 61 (2001) 27–32.
- [17] S.P. Atkinson, S.F. Hoare, R.M. Glasspool, W.N. Keith, Lack of telomerase gene expression in alternative lengthening of telomere cells is associated with chromatin remodeling of the hTR and hTERT gene promoters, Cancer Research 65 (2005) 7585–7590.
- [18] D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer, Cell 100 (2000) 57–70.
- [19] M. Bisoffi, C.M. Heaphy, J.K. Griffith, Telomeres: prognostic markers for solid tumors, International Journal of Cancer 119 (2006) 2255–2260.
- [20] W.C. Hahn, S.A. Stewart, M.W. Brooks, S.G. York, E. Eaton, A. Kurachi, R.L. Beijersbergen, J.H.M. Knoll, M. Meyerson, R.A. Weinberg, Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells, Nature Medicine 5 (1999) 1164–1170.
- [21] H.J. Tsai, W.H. Huang, T.K. Li, Y.L. Tsai, K.J. Wu, S.F. Tseng, S.C. Teng, Involvement of topoisomerase III in telomere-telomere recombination, Journal of Biological Chemistry 281 (2006) 13717–13723.

- [22] M.A. Cerone, J.A. Londono-Vallejo, S. Bacchetti, Telomere maintenance by telomerase and by recombination can coexist in human cells, Human Molecular Genetics 10 (2001) 1945–1952.
- [23] K. Perrem, L.M. Colgin, A.A. Neumann, T.R. Yeager, R.R. Reddel, Coexistence of alternative lengthening of telomeres and telomerase in hTERT-transfected GM847 cells, Molecular and Cellular Biology 21 (2001) 3862–3875.
- [24] M.A. Cerone, C. Autexier, J.A. Londono-Vallejo, S. Bacchetti, A human cell line that maintains telomeres in the absence of telomerase and of key markers of ALT, Oncogene 24 (2005) 7893–7901.
- [25] D. Sun, B. Thompson, B.E. Cathers, M. Salazar, S.M. Kerwin, J.O. Trent, T.C. Jenkins, S. Neidle, L.H. Hurley, Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound, Journal of Medicinal Chemistry 40 (1997) 2113–2116.
- [26] J.L. Mergny, C. Hélène, D.N.A. G-quadruplex, a target for drug design, Nature Medicine 4 (1998) 1366–1367.
- [27] J.L. Mergny, P. Mailliet, F. Lavelle, J.F. Riou, A. Laoui, C. Hélène, The development of Telomerase inhibitors: the G-quartet approach, Anti Cancer Drug Design 14 (1999) 327–339.
- [28] J.M. Weise, C. Gunes, Telomeres and telomerase. A survey about methods and recent advances in cancer diagnostic and therapy, Histology and Histopathology 21 (2006) 1249–1261.
- [29] G.A. Ulaner, Telomere maintenance in clinical medicine, American Journal of Medicine 117 (2004) 262–269.
- [30] J.L. Mergny, J.F. Riou, P. Mailliet, M.P. Teulade-Fichou, E. Gilson, Natural and Pharmacological regulation of telomerase, Nucleic Acids Research 30 (2002) 839–865.
- [31] L. Guittat, P. Alberti, D. Gomez, A. De Cian, G. Pennarun, T. Lemarteleur, C. Belmokhtar, R. Paterski, H. Morjani, C. Trentesaux, E. Mandine, F. Boussin, P. Mailliet, L. Lacroix, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, Targeting human telomerase for cancer therapeutics, Cytotechnology 45 (2004) 75–90.
- [32] J.W. Shay, W.E. Wright, Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions, Nature Reviews Drug Discovery 5 (2006) 577–584.
- [33] K.A. Olaussen, K. Dubrana, J. Domont, J.P. Spano, L. Sabatier, J.C. Soria, Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development, Critical Reviews in Oncology/Hematology 57 (2006) 191–214.
- [34] F. Pendino, I. Tarkanyi, C. Dudognon, J. Hillion, M. Lanotte, J. Aradi, E. Segal-Bendirdjian, Telomeres, telomerase: pharmacological targets for new anticancer strategies? Current Cancer Drug Targets 6 (2006) 147–180.
- [35] L.F. Huo, J.W. Tang, J.J. Huang, P.T. Huang, C.F. Huang, H.F. Kung, M.C. Lin, Cancer immunotherapy targeting the telomerase reverse transcriptase, Cellular and Molecular Immunology 3 (2006) 1–11.
- [36] L.R. Kelland, Overcoming the immortality of tumour cells by telomere and telomerase based cancer therapeutics – current status and future prospects, European Journal of Cancer 41 (2005) 971–979.
- [37] L. Oganesian, T.M. Bryan, Physiological relevance of telomeric Gquadruplex formation: a potential drug target, Bioessays 29 (2007) 155–165.
- [38] L. Deville, J. Hillion, M. Lanotte, P. Rousselot, E. Segal-Bendirdjian, Diagnostics, prognostic and therapeutic exploitation of telomeres and telomerase in leukemias, Current Pharmaceutical Biotechnology 7 (2006) 171–183.
- [39] H. Seimiya, The telomeric PARP, tankyrases, as targets for cancer therapy, British Journal of Cancer 94 (2006) 341–345.
- [40] M. Gozlan, Telomerase reverse transcriptase: candidate for "universal cancer vaccine"? Lancet 355 (2000) 1337.
- [41] S.L. Bernhardt, M.K. Gjertsen, S. Trachsel, M. Moller, J.A. Eriksen, M. Meo, T. Buanes, G. Gaudernack, Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: a dose escalating phase I/II study, British Journal of Cancer 95 (2006) 1474–1482.
- [42] P.F. Brunsvig, S. Aamdal, M.K. Gjertsen, G. Kvalheim, C.J. Markowski-Grimsrud, I. Sve, M. Dyrhaug, S. Trachsel, M. Moller, J.A. Eriksen, G. Gaudernack, Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer, Cancer Immunology Immunotherapy 55 (2006) 1553–1564.

- [43] X. Cortez-Gonzalez, M. Zanetti, Telomerase immunity from bench to bedside: round one, Journal of Translational Medicine 5 (2007) 12.
- [44] E.L. Carpenter, R.H. Vonderheide, Telomerase-based immunotherapy of cancer, Expert Opinion on Biological Therapy 6 (2006) 1031–1039.
- [45] M.A. Blasco, Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond, Nature Reviews 6 (2005) 611–622.
- [46] T. von Zglinicki, C.M. Martin-Ruiz, Telomeres as biomarkers for ageing and age-related diseases, Current Molecular Medicine 5 (2005) 197–203.
- [47] J.R. Mitchell, E. Wood, K. Collins, A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita, Nature 402 (1999) 551–555.
- [48] A. Marrone, A. Walne, I. Dokal, Dyskeratosis congenita: telomerase, telomeres and anticipation, Current Opinion in Gentic and Development 15 (2005) 249–257.
- [49] F. Goldman, R. Bouarich, S. Kulkarni, S. Freeman, H.Y. Du, L. Harrington, P.J. Mason, A. Londono-Vallejo, M. Bessler, The effect of TERC haploinsufficiency on the inheritance of telomere length, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102 (2005) 17119–17124.
- [50] K.D. Tsakiri, J.T. Cronkhite, P.J. Kuan, C. Xing, G. Raghu, J.C. Weissler, R.L. Rosenblatt, J.W. Shay, C.K. Garcia, Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104 (2007) 7552–7557.
- [51] S.B. Cohen, M.E. Graham, G.O. Lovrecz, N. Bache, P.J. Robinson, R.R. Reddel, Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells, Science 315 (2007) 1850–1853.
- [52] K. Collins, The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes, Nature Reviews Molecular Cell Biology 7 (2006) 484–494.
- [53] T. Vulliamy, I. Dokal, Dyskeratosis congenita, Seminars in Hematology 43 (2006) 157–166.
- [54] Z.T. Xin, A.D. Beauchamp, R.T. Calado, J.W. Bradford, J.A. Regal, A. Shenoy, Y. Liang, P.M. Lansdorp, N.S. Young, H. Ly, Functional characterization of natural telomerase mutations found in patients with hematologic disorders, Blood 109 (2007) 524–532.
- [55] C.W. Greider, Telomerase RNA levels limit the telomere length equilibrium, Cold Spring Harbor Symposium on Quantitive Biology 71 (2006) 225–229.
- [56] S. Renaud, D. Loukinov, Z. Abdullaev, I. Guilleret, F.T. Bosman, V. Lobanenkov, J. Benhattar, Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene, Nucleic Acids Research 35 (2007) 1245–1256.
- [57] K. Sikand, D. Kaul, N. Varma, Receptor Ck-dependent signaling regulates hTERT gene transcription, BMC Cell Biology 7 (2006) 2.
- [58] J.Q. Zhao, A. Bilsland, S.F. Hoare, W.N. Keith, Involvement of NF-Y and Sp1 binding sequences in basal transcription of the human telomerase RNA gene, FEBS Letters 536 (2003) 111–119.
- [59] A.E. Bilsland, K. Stevenson, S. Atkinson, W. Kolch, W.N. Keith, Transcriptional repression of telomerase RNA gene expression by c-Jun-NH2-kinase and Sp1/Sp3, Cancer Research 66 (2006) 1363–1370.
- [60] B. Burnworth, S. Arendt, S. Muffler, V. Steinkraus, E.B. Brocker, C. Birek, W. Hartschuh, A. Jauch, P. Boukamp, The multi-step process of human skin carcinogenesis: a role for p53, cyclin D1, hTERT, p16, and TSP-1, European Journal of Cell Biology (2006) (PMID: 17198740; epub ahead of print).
- [61] D. Liu, M.S. O'Connor, J. Qin, Z. Songyang, Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins, Journal of Biological Chemistry 279 (2004) 51338–51342.
- [62] T. de Lange, Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres, Genes and Development 19 (2005) 2100–2110.
- [63] D. Hockemeyer, J.P. Daniels, H. Takai, T. de Lange, Recent expansion of the telomeric complex in rodents: two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres, Cell 126 (2006) 63–77.
- [64] R. Court, L. Chapman, L. Fairall, D. Rhodes, How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: a view from highresolution crystal structures, EMBO Reports 6 (2005) 39–45.

- [65] M. Lei, E.R. Podell, T.R. Cech, Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection, Nature Structural and Molecular Biology 11 (2004) 1223–1229.
- [66] M.S. O'Connor, A. Safari, H. Xin, D. Liu, Z. Songyang, A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103 (2006) 11874–11879.
- [67] J.D. Griffith, L. Comeau, S. Rosenfield, R.M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss, T. de Lange, Mammalian telomeres end in a large duplex loop, Cell 97 (1999) 503–514.
- [68] R.M. Stansel, T. de Lange, J.D. Griffith, T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang, EMBO Journal 20 (2001) 5532–5540.
- [69] R. Blanco, P. Munoz, J.M. Flores, P. Klatt, M.A. Blasco, Telomerase abrogation dramatically accelerates TRF2-induced epithelial carcinogenesis, Genes and Development 21 (2007) 206–220.
- [70] A. Biroccio, A. Rizzo, R. Elli, C.E. Koering, A. Belleville, B. Benassi, C. Leonetti, M.F. Stevens, M. D'Incalci, G. Zupi, E. Gilson, TRF2 inhibition triggers apoptosis and reduces tumourigenicity of human melanoma cells, European Journal of Cancer 42 (2006) 1881–1888.
- [71] T. Richter, G. Saretzki, G. Nelson, M. Melcher, S. Olijslagers, T. von Zglinicki, TRF2 overexpression diminishes repair of telomeric singlestrand breaks and accelerates telomere shortening in human fibroblasts, Mechanisms of Ageing and Development 128 (2007) 340–345.
- [72] S. Amiard, M. Doudeau, S. Pinte, A. Poulet, C. Lenain, C. Faivre-Moskalenko, D. Angelov, N. Hug, A. Vindigni, P. Bouvet, J. Paoletti, E. Gilson, M.J. Giraud-Panis, A topological mechanism for TRF2enhanced strand invasion, Nature Structural and Molecular Biology 14 (2007) 147–154.
- [73] H. Xin, D. Liu, M. Wan, A. Safari, H. Kim, W. Sun, M.S. O'Connor, Z. Songyang, TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase, Nature 445 (2007) 559–562.
- [74] F. Wang, E.R. Podell, A.J. Zaug, Y. Yang, P. Baciu, T.R. Cech, M. Lei, The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor, Nature 445 (2007) 506–510.
- [75] C. Lenain, S. Bauwens, S. Amiard, M. Brunori, M.J. Giraud-Panis, E. Gilson, The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair, Current Biology 16 (2006) 1303–1310.
- [76] M. van Overbeek, T. de Lange, Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase, Current Biology 16 (2006) 1295–1302.
- [77] B.D. Freibaum, C.M. Counter, hSnm1B is a novel telomere-associated protein, Journal of Biological Chemistry 281 (2006) 15033–15036.
- [78] W.H. Chai, A.J. Sfeir, H. Hoshiyama, J.W. Shay, W.E. Wright, The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres, EMBO Reports 7 (2006) 225–230.
- [79] S. Francia, R.S. Weiss, F. d'Adda di Fagagna, Need telomere maintenance?, Call 911, Cell Division 2 (2007) 3.
- [80] S. Francia, R.S. Weiss, M.P. Hande, R. Freire, F. d'Adda di Fagagna, Telomere and telomerase modulation by the mammalian Rad9/Rad1/ Hus1 DNA-damage-checkpoint complex, Current Biology 16 (2006) 1551–1558.
- [81] M. Downey, R. Houlsworth, L. Maringele, A. Rollie, M. Brehme, S. Galicia, S. Guillard, M. Partington, M.K. Zubko, N.J. Krogan, A. Emili, J.F. Greenblatt, L. Harrington, D. Lydall, D. Durocher, A genome-wide screen identifies the evolutionarily conserved KEOPS complex as a telomere regulator, Cell 124 (2006) 1155–1168.
- [82] C.J. Frank, M. Hyde, C.W. Greider, Regulation of telomere elongation by the cyclin-dependent kinase CDK1, Molecular Cell 24 (2006) 423–432.
- [83] M.D. Vodenicharov, R.J. Wellinger, DNA degradation at unprotected telomeres in yeast is regulated by the CDK1 (Cdc28/Clb) cell-cycle kinase, Molecular Cell 24 (2006) 127–137.
- [84] L. Lacroix, H. Liénard, E. Labourier, M. Djavaheri, J. Lacoste, J. Tazi, C. Hélène, J.L. Mergny, Identification of two HeLa nuclear proteins that recognize the cytosine-rich strand of human telomeres *in vitro*, Nucleic Acids Research 28 (2000) 1564–1575.

- [85] D. Hockemeyer, A.J. Sfeir, J.W. Shay, W.E. Wright, T. deLange, POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end, EMBO Journal 24 (2005) 2667–2678.
- [86] X.D. Zhu, L. Niedernhofer, B. Kuster, M. Mann, J.H.J. Hoeijmakers, T. de Lange, ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes, Molecular Cell 12 (2003) 1489–1498.
- [87] H. He, A.S. Multani, W. Cosme-Blanco, H. Tahara, J. Ma, S. Pathak, Y. Deng, S. Chang, POT1b protects telomeres from end-to-end chromosomal fusions and aberrant homologous recombination, EMBO Journal 25 (2006) 5180–5190.
- [88] G.B. Celli, T. deLange, DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion, Nature Cell Biology 7 (2005) 712–718.
- [89] H. Takai, A. Smogorzewska, T. de Lange, DNA damage foci at dysfunctional telomeres, Current Biology 13 (2003) 1549–1556.
- [90] S. Kim, C. Beausejour, A.R. Davalos, P. Kaminker, S.J. Heo, J. Campisi, TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres, Journal of Biological Chemistry 279 (2004) 43799–43804.
- [91] F. d'Adda di Fagagna, P.M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N.P. Carter, S.P. Jackson, A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence, Nature 426 (2003) 194–198.
- [92] M.A. Blasco, The epigenetic regulation of mammalian telomeres, Nature Reviews 8 (2007) 299–309.
- [93] R. Benetti, M. Garcia-Cao, M.A. Blasco, Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres, Nature Genetics 39 (2007) 243–250.
- [94] S. Gonzalo, I. Jaco, M.F. Fraga, T. Chen, E. Li, M. Esteller, M.A. Blasco, DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells, Nature Cell Biology 8 (2006) 416–424.
- [95] G.K. Wu, X.Z. Jiang, W.H. Lee, P.L. Chen, Assembly of functional ALT-associated promyelocytic leukemia bodies requires Nijmegen breakage syndrome 1, Cancer Research 63 (2003) 2589–2595.
- [96] W.Q. Jiang, Z.H. Zhong, J.D. Henson, R.R. Reddel, Identification of candidate alternative lengthening of telomeres genes by methionine restriction and RNA interference, Oncogene 26 (2007) 4635–4647.
- [97] G.B. Celli, E.L. Denchi, T. de Lange, Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination, Nature Cell Biology 8 (2006) 885–890.
- [98] K. Akiyama, K. Yusa, H. Hashimoto, A. Poonepalli, M.P. Hande, N. Kakazu, J. Takeda, M. Tachibana, Y. Shinkai, Rad54 is dispensable for the ALT pathway, Genes to Cells 11 (2006) 1305– 1315.
- [99] R.C. Wang, A. Smogorzewska, T. de Lange, Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres, Cell 119 (2004) 355–368.
- [100] S.A. Compton, J.H. Choi, A.J. Cesare, S. Ozgur, J.D. Griffith, Xrcc3 and Nbs1 are required for the production of extrachromosomal telomeric circles in human alternative lengthening of telomere cells, Cancer Research 67 (2007) 1513–1519.
- [101] J.C. Norton, M.A. Piatyszek, W.E. Wright, J.W. Shay, D.R. Corey, Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids, Nature Biotechnology 14 (1996) 615–619.
- [102] S.E. Hamilton, A.E. Pitts, R.R. Katipally, X.Y. Jia, J.P. Rutter, B.A. Davies, J.W. Shay, W.E. Wright, D.R. Corey, Identification of determinants for inhibitor binding within the RNA active site of human telomerase using PNA scanning, Biochemistry 36 (1997) 11873–11880.
- [103] A.E. Pitts, D.R. Corey, Inhibition of human telomerase by 2'-O-methyl-RNA, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95 (1998) 11549–11554.
- [104] A.N. Elayadi, A. Demieville, E.V. Wancewicz, B.P. Monia, D.R. Corey, Inhibition of telomerase by 2'-O-(2-methoxyethyl) RNA oligomers: effect of length, phosphorothioate substitution and time inside cells, Nucleic Acids Research 29 (2001) 1683–1689.

- [105] S. Kondo, Y. Kondo, G. Li, R.H. Silverman, J.K. Cowell, Targeted therapy of human malignant glioma in a mouse model by 2-5A antisense directed against telomerase RNA, Oncogene 16 (1998) 3323–3330.
- [106] S. Mukai, Y. Kondo, S. Koga, T. Komata, B.P. Barna, S. Kondo, 2-5A antisense telomerase RNA therapy for intracranial malignant gliomas, Cancer Research 60 (2000) 4461–4467.
- [107] S. Koga, Y. Kondo, T. Komata, S. Kondo, Treatment of bladder cancer cells in vitro and in vivo with 2-5A antisense telomerase RNA, Gene Therapy 8 (2001) 654–658.
- [108] R. Pruzan, K. Pongracz, K. Gietzen, G. Wallweber, S. Gryaznov, Allosteric inhibitors of telomerase: oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates, Nucleic Acids Research 30 (2002) 559–568.
- [109] M. Akiyama, T. Hideshima, M.A. Shammas, T. Hayashi, M. Hamasaki, Y.T. Tai, P. Richardson, S. Gryaznov, N.C. Munshi, K.C. Anderson, Effects of oligonucleotide N3'→P5' thio-phosphoramidate (GRN163) targeting telomerase RNA in human multiple myeloma cells, Cancer Research 63 (2003) 6187–6194.
- [110] A. Asai, Y. Oshima, Y. Yamamoto, T. Uochi, H. Kusaka, S. Akinaga, Y. Yamashita, K. Pongracz, R. Pruzan, E. Wunder, M. Piatyszek, S.H. Li, A.C. Chin, C.B. Harley, S. Gryaznov, A novel telomerase template antagonist (GRN163) as a potential anticancer agent, Cancer Research 63 (2003) 3931–3939.
- [111] E.S. Wang, K.D. Wu, A.C. Chin, S. ChenKiang, K. Pongracz, S. Gryaznov, M.A.S. Moore, Telomerase inhibition with an oligonucleotide telomerase template antagonist: in vitro and in vivo studies in multiple myeloma and lymphoma, Blood 103 (2004) 258–266.
- [112] A.E. Hochreiter, H. Xiao, E.M. Goldblatt, S.M. Gryaznov, K.D. Miller, S. Badve, G.W. Sledge, B.S. Herbert, Telomerase template antagonist GRN163L disrupts telomere maintenance, tumor growth, and metastasis of breast cancer, Clinical Cancer Research 12 (2006) 3184–3192.
- [113] Z.G. Dikmen, G.C. Gellert, S. Jackson, S. Gryaznov, R. Tressler, P. Dogan, W.E. Wright, J.W. Shay, In vivo inhibition of lung cancer by GRN163L: A novel human telomerase inhibitor, Cancer Research 65 (2005) 7866–7873.
- [114] J. Gomez-Millan, E.M. Goldblatt, S.M. Gryaznov, M.S. Mendonca, B.S. Herbert, Specific telomere dysfunction induced by GRN163L increases radiation sensitivity in breast cancer cells, International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics 67 (2007) 897–905.
- [115] G.C. Gellert, Z.G. Dikmen, W.E. Wright, S. Gryaznov, J.W. Shay, Effects of a novel telomerase inhibitor, GRN163L, in human breast cancer, Breast Cancer Research and Treatment 96 (2006) 73–81.
- [116] B.S. Herbert, G.C. Gellert, A. Hochreiter, K. Pongracz, W.E. Wright, D. Zielinska, A.C. Chin, C.B. Harley, J.W. Shay, S.M. Gryaznov, Lipid modification of GRN163, an N3'→P5' thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition, Oncogene 24 (2005) 5262–5268.
- [117] M.W. Djojosubroto, A.C. Chin, N. Go, S. Schaetzlein, M.P. Manns, S. Gryaznov, C.B. Harley, K.L. Rudolph, Telomerase antagonists GRN163 and GRN163L inhibit tumor growth and increase chemosensitivity of human hepatoma, Hepatology 42 (2005) 1127–1136.
- [118] S.R. Jackson, C.H. Zhu, V. Paulson, L. Watkins, Z.G. Dikmen, S.M. Gryaznov, W.E. Wright, J.W. Shay, Antiadhesive effects of GRN163L – an oligonucleotide N3'→P5' thio-phosphoramidate targeting telomerase, Cancer Research 67 (2007) 1121–1129.
- [119] C. Strahl, E.H. Blackburn, The effects of nucleoside analogs on telomerase and telomeres in tetrahymena, Nucleic Acids Research 22 (1994) 893–900.
- [120] C. Strahl, E.H. Blackburn, Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines, Molecular and Cellular Biology 16 (1996) 53–65.
- [121] O.A. Olivero, Mechanisms of genotoxicity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors, Environmental and Molecular Mutagenesis 48 (2007) 215–223.
- [122] A. Datta, M. Bellon, U. Sinha-Datta, A. Bazarbachi, Y. Lepelletier, D. Canioni, T.A. Waldmann, O. Hermine, C. Nicot, Persistent inhibition of telomerase reprograms adult T-cell leukemia to p53-dependent senescence, Blood 108 (2006) 1021–1029.

- [123] F.X. Zhou, Z.K. Liao, J. Dai, J. Xiong, C.H. Xie, Z.G. Luo, S.Q. Liu, Y.F. Zhou, Radiosensitization effect of zidovudine on human malignant glioma cells, Biochemical and Biophysical Research Communications 354 (2007) 351–356.
- [124] A. Falchetti, A. Franchi, C. Bordi, C. Mavilia, L. Masi, F. Cioppi, R. Recenti, L. Picariello, F. Marini, F. DelMonte, V. Ghinoi, V. Martineti, A. Tanini, M.L. Brandi, Azidothymidine induces apoptosis and inhibits cell growth and telomerase activity of human parathyroid cancer cells in culture, Journal of Bone and Mineral Research 20 (2005) 410–418.
- [125] T. Brown, E. Sigurdson, A. Rogatko, D. Broccoli, Telomerase inhibition using azidothymidine in the HT-29 colon cancer cell line, Annals of Surgical Oncology10 (2003) 910–915.
- [126] T.M. Fletcher, B.E. Cathers, K.S. Ravikumar, B.M. Mamiya, S.M. Kerwin, Inhibition of human telomerase by 7-deaza-2'-deoxyguanosine nucleoside triphosphate analogs: potent inhibition by 6-thio-7deaza-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate, Bioorganic Chemistry29 (2001) 36-55.
- [127] I. Naasani, H. Seimiya, T. Tsuruo, Telomerase inhibition, telomere shortening and senescence of cancer cells by tea catechins, Biochemical and Biophysical Research Communications 249 (1998) 391–396.
- [128] H. Seimiya, T. Ohhara, T. Suzuki, I. Naasani, T. Shimazaki, K. Tsuchiya, T. Tsuruo, Telomere shortening and growth inhibition of human cancer cells by novel synthetic telomerase inhibitors MST-312, MST-295, and MST-199, Molecular Cancer Therapeutics 1 (2002) 657–665.
- [129] I. Naasani, F. Ohhashi, T. Ohhara, W.Y. Feng, J. Johnston, K. Chan, T. Tsuruo, Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells in vitro and in vivo, Cancer Research 63 (2003) 824–830.
- [130] M. Yokoyama, M. Noguchi, Y. Nakao, A. Pater, T. Iwasaka, The tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate effects on growth, apoptosis, and telomerase activity in cervical cell lines, Gynecologic Oncology 92 (2004) 197–204.
- [131] J.H. Kim, G.E. Lee, J.E. Lee, I.K. Chung, Potent inhibition of human telomerase by nitrostyrene derivatives, Molecular Pharmacology 63 (2003) 1117–1124.
- [132] J.H. Kim, G.E. Lee, S.W. Kim, I.K. Chung, Identification of a quinoxaline derivative that is a potent telomerase inhibitor leading to cellular senescence of human cancer cells, The Biochemical Journal 373 (2003) 523–529.
- [133] N. Hayakawa, K. Nozawa, A. Ogawa, N. Kato, K. Yoshida, K. Akamatsu, M. Tsuchiya, A. Nagasaka, S. Yoshida, Isothiazolone derivatives selectively inhibit telomerase from human and rat cancer cells in vitro, Biochemistry 38 (1999) 11501–11507.
- [134] S. Sasaki, T. Ehara, I. Sakata, Y. Fujino, N. Harada, J. Kimura, H. Nakamura, M. Maeda, Development of novel telomerase inhibitors based on a bisindole unit, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 11 (2001) 583–585.
- [135] E. Pascolo, C. Wenz, J. Lingner, N. Hauel, H. Priepke, I. Kauffmann, P. GarinChesa, W.J. Rettig, K. Damm, A. Schnapp, Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate, Journal of Biological Chemistry 277 (2002) 15566–15572.
- [136] K. Damm, U. Hemmann, P. Garin-Chesa, N. Hauel, I. Kauffmann, H. Priepke, C. Niestroj, C. Daiber, B. Enenkel, B. Guilliard, I. Lauritsch, E. Müller, E. Pascolo, G. Sauter, M. Pantic, U.M. Martens, C. Wenz, J. Lingner, N. Kraut, W.J. Rettig, A. Schnapp, A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation, EMBO Journal 20 (2001) 6958–6968.
- [137] H. El Daly, M. Kull, S. Zimmermann, M. Pantic, C.F. Waller, U.M. Martens, Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR1532, Blood 105 (2005) 1742–1749.
- [138] R.J. Ward, C. Autexier, Pharmacological telomerase inhibition can sensitize drug-resistant and drug-sensitive cells to chemotherapeutic treatment, Molecular Pharmacology 68 (2005) 779–786.
- [139] P.R. Huang, Y.M. Yeh, T.C.V. Wang, Potent inhibition of human telomerase by helenalin, Cancer Letters 227 (2005) 169–174.
- [140] R. Nakai, H. Ishida, A. Asai, H. Ogawa, Y. Yamamoto, H. Kawasaki, S. Akinaga, T. Mizukami, Y. Yamashita, Telomerase inhibitors identified by a forward chemical genetics approach using a yeast strain with shortened telomere length, Chemistry & Biology 13 (2006) 183–190.
- [141] L. Neckers, Using natural product inhibitors to validate hsp90 as a molecular target in cancer, Current Topics in Medicinal Chemistry 6 (2006) 1163–1171.
- [142] J.T. Chang, Y.C. Lu, Y.J. Chen, C.P. Tseng, Y.L. Chen, C.W. Fang, A.J. Cheng, hTERT phosphorylation by PKC is essential for telomerase holoprotein integrity and enzyme activity in head neck cancer cells, British Journal of Cancer 94 (2006) 870–878.
- [143] S.A. Compton, L.W. Elmore, K. Haydu, C.K. Jackson-Cook, S.E. Holt, Induction of nitric oxide synthase-dependent telomere shortening after functional inhibition of Hsp90 in human tumor cells, Molecular and Cellular Biology 26 (2006) 1452–1462.
- [144] O.A. Toogun, W. Zeiger, B.C. Freeman, The p23 molecular chaperone promotes functional telomerase complexes through DNA dissociation, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104 (2007) 5765–5770.
- [145] O. Uziel, E. Fenig, J. Nordenberg, E. Beery, H. Reshef, J. Sandbank, M. Birenbaum, M. Bakhanashvili, R. Yerushalmi, D. Luria, M. Lahav, Imatinib mesylate (Gleevec) downregulates telomerase activity and inhibits proliferation in telomerase-expressing cell lines, British Journal of Cancer 92 (2005) 1881–1891.
- [146] Y.J. Chen, W.Y. Sheng, P.R. Huang, T.C. Wang, Potent inhibition of human telomerase by U-73122, Journal of Biomedical Science 13 (2006) 667–674.
- [147] A. Lindkvist, K. Ivarsson, H. Jernberg-Wiklund, Y. Paulsson-Karlsson, Interferon-induced sensitization to apoptosis is associated with repressed transcriptional activity of the hTERT promoter in multiple myeloma, Biochemical and Biophysical Research Communications 341 (2006) 1141–1148.
- [148] S.H. Lee, J.W. Kim, S.H. Oh, Y.J. Kim, S.B. Rho, K. Park, K.L. Park, J.H. Lee, IFN-gamma/IRF-1-induced p27kip1 down-regulates telomerase activity and human telomerase reverse transcriptase expression in human cervical cancer, FEBS Letters 579 (2005) 1027–1033.
- [149] S. Kyo, M. Takakura, T. Kanaya, W. Zhuo, K. Fujimoto, Y. Nishio, A. Orimo, M. Inoue, Estrogen activates telomerase, Cancer Research 59 (1999) 5917–5921.
- [150] S. Misiti, S. Nanni, G. Fontemaggi, Y.S. Cong, J.P. Wen, H.W. Hirte, G. Piaggio, A. Sacchi, A. Pontecorvi, S. Bacchetti, A. Farsetti, Induction of hTERT expression and telomerase activity by estrogens in human ovary epithelium cells, Molecular and Cellular Biology 20 (2000) 3764–3771.
- [151] S. Nanni, M. Narducci, L. DellaPietra, F. Moretti, A. Grasselli, P. DeCarli, A. Sacchi, A. Pontecorvi, A. Farsetti, Signaling through estrogen receptors modulates telomerase activity in human prostate cancer, Journal of Clinical Investigation 110 (2002) 219–227.
- [152] F. Pendino, C. Dudognon, F. Delhommeau, T. Sahraoui, M. Flexor, A. Bennaceur-Griscelli, M. Lanotte, E. Segal-Bendirdjian, Retinoic acid receptor alpha and retinoid-X receptor-specific agonists synergistically target telomerase expression and induce tumor cell death, Oncogene 22 (2003) 9142–9150.
- [153] F. Pendino, M. Flexor, F. Delhommeau, D. Buet, M. Lanotte, E. Segal-Bendirdjian, Retinoids down-regulate telomerase and telomere length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98 (2001) 6662–6667.
- [154] F. Pendino, T. Sahraoui, M. Lanotte, E. Segal-Bendirdjian, A novel mechanism of retinoic acid resistance in acute promyelocytic leukemia cells through a defective pathway in telomerase regulation, Leukemia 16 (2002) 826–832.
- [155] F. Pendino, J. Hillion, C. Dudognon, J. Delaunay, S. Mourah, M.P. Podgorniak, I. Lafon, C. Chomienne, M. Lanotte, H. Dombret, P. Rousselot, E. Segal-Bendirdjian, Telomerase targeting by retinoids in cells from patients with myeloid leukemias of various subtypes, not only APL, Leukemia 20 (2006) 599–603.

- [156] N.J. Hansen, R.C. Wylie, S.M. Phipps, W.K. Love, L.G. Andrews, T.O. Tollefsbol, The low-toxicity 9-cis UAB30 novel retinoid down-regulates the DNA methyltransferases and has anti-telomerase activity in human breast cancer cells, International Journal of Oncology 30 (2007) 641–650.
- [157] P. Wu, L. Meng, H. Wang, J.F. Zhou, G. Xu, S.X. Wang, L. Xi, G. Chen, B.B. Wang, T. Zhu, Y.P. Lu, D. Ma, Role of hTERT in apoptosis of cervical cancer induced by histone deacetylase inhibitor, Biochemical and Biophysical Research Communications 335 (2005) 36–44.
- [158] H.J. Woo, S.J. Lee, B.T. Choi, Y.M. Park, Y.H. Choi, Induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity by trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, in human leukemic U937 cells, Experimental and Molecular Pathology 82 (2007) 77–84.
- [159] Y.H. Choi, Apoptosis of U937 human leukemic cells by sodium butyrate is associated with inhibition of telomerase activity, International Journal of Oncology 29 (2006) 1207–1213.
- [160] K. Hasegawa, Y. Ohashi, K. Ishikawa, A. Yasue, R. Kato, Y. Achiwa, E. Nishio, Y. Udagawa, Expression of cyclooxygenase-2 in uterine endometrial cancer and anti-tumor effects of a selective COX-2 inhibitor, International Journal of Oncology 26 (2005) 1419–1428.
- [161] H. Ouchi, H. Ishiguro, N. Ikeda, M. Hori, Y. Kubota, H. Uemura, Genistein induces cell growth inhibition in prostate cancer through the suppression of telomerase activity, International Journal of Urology 12 (2005) 73–80.
- [162] I. Flores, G. Evan, M.A. Blasco, Genetic analysis of myc and telomerase interactions in vivo, Molecular and Cellular Biology 26 (2006) 6130–6138.
- [163] Q.L. Guo, S.S. Lin, Q.D. You, J. Yu, L. Zhao, Q. Qi, F. Liang, Z. Tan, X.T. Wang, Inhibition of human telomerase reverse transcriptase gene expression by gambogic acid in human hepatoma SMMC-7721 cells, Life Sciences 78 (2006) 1238–1245.
- [164] C.P. Lin, J.D. Liu, J.M. Chow, C.R. Liu, H.E. Liu, Small-molecule c-Myc inhibitor, 10058-F4, inhibits proliferation, downregulates human telomerase reverse transcriptase and enhances chemosensitivity in human hepatocellular carcinoma cells, Anti-Cancer Drugs 18 (2007) 161–170.
- [165] S. Pizzimenti, F. Briatore, S. Laurora, C. Toaldo, M. Maggio, M. De Grandi, L. Meaglia, E. Menegatti, B. Giglioni, M.U. Dianzani, G. Barrera, 4-Hydroxynonenal inhibits telomerase activity and hTERT expression in human leukemic cell lines, Free Radical Biology and Medicine 40 (2006) 1578–1591.
- [166] C. Park, G.Y. Kim, W.I. Kim, S.H. Hong, D.I. Park, N.D. Kim, S.J. Bae, J.H. Jung, Y.H. Choi, Induction of apoptosis by (Z)-stellettic acid C, an acetylenic acid from the sponge Stelletta sp., is associated with inhibition of telomerase activity in human leukemic U937 cells, Chemotherapy 53 (2007) 160–168.
- [167] B. Zhu, L.H. Zhang, Y.M. Zhao, J.R. Cui, S.J. Strada, 8-chloroadenosine induced HL-60 cell growth inhibition, differentiation, and G(0)/ G(1) arrest involves attenuated cyclin D1 and telomerase and up-regulated p21(WAF1/CIP1), Journal of Cellular Biochemistry 97 (2006) 166–177.
- [168] L. Dalle Carbonare, M.T. Valenti, F. Bertoldo, A. Fracalossi, E. Balducci, G. Azzarello, O. Vinante, V. Lo Cascio, Amino-bisphosphonates decrease hTERT gene expression in breast cancer in vitro, Aging Clinical and Experimental Research 19 (2007) 91–96.
- [169] C.M. Wang, Z.J. Jia, R.L. Zheng, The effect of 17 sesquiterpenes on cell viability and telomerase activity in the human ovarian cancer cell line HO-8910, Planta Medica 73 (2007) 180–184.
- [170] H. He, H.H.X. Xia, J. DeWang, Q. Gu, M.C.M. Lin, B. Zou, S.K. Lam, A.O.O. Chan, M.F. Yuen, H.F. Kung, B.C.Y. Wong, Inhibition of human telomerase reverse transcriptase by nonsteroidal anti inflammatory drugs in colon carcinoma, Cancer 106 (2006) 1243–1249.
- [171] Y. Bermudez, S. Ahmadi, N.E. Lowell, P.A. Kruk, Vitamin E suppresses telomerase activity in ovarian cancer cells, Cancer Detection and Prevention 31 (2007) 119–128.
- [172] S. Rosenberger, I.S. Thorey, S. Werner, P. Boukamp, A novel regulator of telomerase. S100A8 mediates differentiation-dependent and calciuminduced inhibition of telomerase activity in the human epidermal

keratinocyte line HaCaT, Journal of Biological Chemistry 282 (2007) 6126–6135.

- [173] S. Bagheri, M. Nosrati, S. Li, S. Fong, S. Torabian, J. Rangel, D.H. Moore, S. Federman, R.R. Laposa, F.L. Baehner, R.W. Sagebiel, J.E. Cleaver, C. Haqq, R.J. Debs, E.H. Blackburn, M. Kashani-Sabet, Genes and pathways downstream of telomerase in melanoma metastasis, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103 (2006) 11306–11311.
- [174] A. Beliveau, E. Bassett, A.T. Lo, J. Garbe, M.A. Rubio, M.J. Bissell, J. Campisi, P. Yaswen, p53-dependent integration of telomere and growth factor deprivation signals, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104 (2007) 4431–4436.
- [175] D. Del Bufalo, A. Rizzo, D. Trisciuoglio, G. Cardinali, M.R. Torrisi, U. Zangemeister-Wittke, G. Zupi, A. Biroccio, Involvement of hTERT in apoptosis induced by interference with Bcl-2 expression and function, Cell Death and Differentiation 12 (2005) 1429–1438.
- [176] C. Massard, Y. Zermati, A.L. Pauleau, N. Larochette, D. Metivier, L. Sabatier, G. Kroemer, J.C. Soria, hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway, Oncogene 25 (2006) 4505-4514.
- [177] J.F. Passos, T. von Zglinicki, Mitochondria, telomeres and cell senescence, Experimental Gerontology 40 (2005) 466–472.
- [178] J.F. Passos, G. Saretzki, S. Ahmed, G. Nelson, T. Richter, H. Peters, I. Wappler, M.J. Birket, G. Harold, K. Schaeuble, M.A. Birch-Machin, T.B. Kirkwood, T. von Zglinicki, Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence, PLoS Biology 5 (2007) e110.
- [179] J.C. Jeyapalan, G. Saretzki, A. Leake, M.J. Tilby, T. von Zglinicki, Tumour-cell apoptosis after cisplatin treatment is not telomere dependent, International Journal of Cancer 118 (2006) 2727–2734.
- [180] S.R. Lai, A.P. Cunningham, V.Q. Huynh, L.G. Andrews, T.O. Tollefsbol, Evidence of extra-telomeric effects of hTERT and its regulation involving a feedback loop, Experimental Cell Research 313 (2007) 322–330.
- [181] M.S. Eller, N. Puri, I.M. Hadshiew, S.S. Venna, B.A. Gilchrest, Induction of apoptosis by telomere 3 ' overhang-specific DNA, Experimental Cell Research 276 (2002) 185–193.
- [182] M.S. Eller, G.Z. Li, R. Firoozabadi, N. Puri, B.A. Gilchrest, Induction of a p95/Nbs1-mediated S phase checkpoint by telomere 3' overhang specific DNA, FASEB Journal 17 (2003) 152–162.
- [183] G.Z. Li, M.S. Eller, R. Firoozabadi, B.A. Gilchrest, Evidence that exposure of the telomere 3 ' overhang sequence induces senescence, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100 (2003) 527–531.
- [184] G.Z. Li, M.S. Eller, K. Hanna, B.A. Gilchrest, Signaling pathway requirements for induction of senescence by telomere homolog oligonucleotides, Experimental Cell Research 301 (2004) 189–200.
- [185] N. Ohashi, M. Yaar, M.S. Eller, F. Truzzi, B.A. Gilchrest, Features that determine telomere homolog oligonucleotide-induced therapeutic DNA damage-like responses in cancer cells, Journal of Cellular Physiology 210 (2007) 582–595.
- [186] S. Arad, N. Konnikov, D.A. Goukassian, B.A. Gilchrest, T-oligos augment UV-induced protective responses in human skin, FASEB Journal 20 (2006) 1895–1897.
- [187] M.S. Eller, X. Liao, S. Liu, K. Hanna, H. Backvall, P.L. Opresko, V.A. Bohr, B.A. Gilchrest, A role for WRN in telomere-based DNA damage responses, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103 (2006) 15073–15078.
- [188] Aoki, H., Iwado, E., Eller, M.S., Kondo, Y., Fujiwara, K., Li, G.Z., Hess, K.R., Siwak, D.R., Sawaya, R., Mills, G.B., Gilchrest, B.A., Kondo, S., Telomere 3' overhang-specific DNA oligonucleotides induce autophagy in malignant glioma cells, FASEB Journal (2007) (in press; doi:10.1096/fj.1006-6941com).
- [189] H. Qi, C.P. Lin, X. Fu, L.M. Wood, A.A. Liu, Y.C. Tsai, Y. Chen, C.M. Barbieri, D.S. Pilch, L.F. Liu, G-quadruplexes induce apoptosis in tumor cells, Cancer Research 66 (2006) 11808–11816.
- [190] M. Shammas, X. Liu, G. Gavory, K. Raney, S. Balasubramanian, R. Shmookler-Reis, Targeting the single-strand G-rich overhang of

telomeres with PNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human immortal cells, Experimental Cell Research 295 (2004) 204–214.

- [191] J. Casals, L. Debethune, K. Alvarez, A. Risitano, K.R. Fox, A. Grandas, E. Pedroso, Directing quadruplex-stabilizing drugs to the telomere: synthesis and properties of acridine-oligonucleotide conjugates, Bioconjugate Chemistry17 (2006) 1351–1359.
- [192] V. Dapic, P.J. Bates, J.O. Trent, A. Rodger, S.D. Thomas, D.M. Miller, Antiproliferative activity of G-quartet-forming oligonucleotides with backbone and sugar modifications, Biochemistry 41 (2002) 3676–3685.
- [193] P.J. Bates, J.B. Kahlon, S.D. Thomas, J.O. Trent, D.M. Miller, Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding, Journal of Biological Chemistry 274 (1999) 26369–26377.
- [194] V. Dapic, V. Abdomerovic, R. Marrington, J. Peberdy, A. Rodger, J.O. Trent, P.J. Bates, Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides, Nucleic Acids Research 31 (2003) 2097–2107.
- [195] A.C. Girvan, Y. Teng, L.K. Casson, S.D. Thomas, S. Juliger, M.W. Ball, J.B. Klein, W.M. Pierce Jr., S.S. Barve, P.J. Bates, AGRO100 inhibits activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) by forming a complex with NF-kappaB essential modulator (NEMO) and nucleolin, Molecular Cancer Therapeutics 5 (2006) 1790–1799.
- [196] A. Ambrus, D. Chen, J. Dai, T. Bialis, R.A. Jones, D. Yang, Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution, Nucleic Acids Research 34 (2006) 2723–2735.
- [197] K.N. Luu, A.T. Phan, V. Kuryavyi, L. Lacroix, D.J. Patel, Structure of the human telomere in K⁺ solution: an intramolecular (3 + 1) G-quadruplex scaffold, Journal of the American Chemical Society 128 (2006) 9963–9970.
- [198] Y. Xu, Y. Noguchi, H. Sugiyama, The new models of the human telomere d[AGGG(TTAGGG)3] in K⁺ solution, Bioorganic and Medicinal Chemistry 14 (2006) 5584–5591.
- [199] M.L. Duquette, P. Handa, J.A. Vincent, A.F. Taylor, N. Maizels, Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA, Genes and Development 18 (2004) 1618–1629.
- [200] C. Schaffitzel, I. Berger, J. Postberg, J. Hanes, H.J. Lipps, A. Plückthun, In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine quadruplex DNA react with *Stylonychia lemnae* macronuclei, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98 (2001) 8572–8577.
- [201] K. Paeschke, T. Simonsson, J. Postberg, D. Rhodes, H. Lipps, Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo, Nature Structural and Molecular Biology 12 (2005) 847– 854.
- [202] C.C. Chang, I.C. Kuo, I.F. Ling, C.T. Chen, H.C. Chen, P.J. Lou, J.J. Lin, T.C. Chang, Detection of quadruplex DNA structures in human telomeres by a fluorescent carbazole derivative, Analytical Chemistry 76 (2004) 4490–4494.
- [203] C. Granotier, G. Pennarun, L. Riou, F. Hoffschir, L.R. Gauthier, A. DeCian, D. Gomez, E. Mandine, J.F. Riou, J.L. Mergny, P. Mailliet, B. Dutrillaux, F.D. Boussin, Preferential binding of a Gquadruplex ligand to human chromosome ends, Nucleic Acid Research 33 (2005) 4182–4190.
- [204] A.M. Zahler, J.R. Williamson, T.R. Cech, D.M. Prescott, Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures, Nature 350 (1991) 718–720.
- [205] J. Cuesta, M. Read, S. Neidle, The design of G-quadruplex ligands as telomerase inhibitors, Mini Reviews in Medicinal Chemistry 3 (2003) 11–21.
- [206] K. Maeshima, S. Janssen, U.K. Laemmli, Specific targeting of insect and vertebrate telomeres with pyrrole and imidazole polyamides, EMBO Journal 20 (2001) 3218–3228.
- [207] R. Takahashi, T. Bando, H. Sugiyama, Specific alkylation of human telomere repeats by hairpin pyrrole-imidazole polyamide, Bioorganic & Medicinal Chemistry 11 (2003) 2503–2509.
- [208] S. Redon, S. Bombard, M.A. Elizondo-Riojas, J.C. Chottard, Platination of the (T2G4)4 telomeric sequence: a structural and crosslinking story, Biochemistry 40 (2001) 8463–8470.

- [209] S. Redon, S. Bombard, M.A. Elizondo-Riojas, J.C. Chottard, Platinum cross-linking of adenines and guanines on the quadruplex structures of the AG(3)(T(2)AG(3))(3) and (T(2)AG(3))(4) human telomere sequences in Na⁺ and K⁺ solutions, Nucleic Acids Research 31 (2003) 1605–1613.
- [210] I. Ourliac-Garnier, M.A. Elizondo-Riojas, S. Redon, N.P. Farrell, S. Bombard, Cross-links of quadruplex structures from human telomeric DNA by dinuclear platinum complexes show the flexibility of both structures, Biochemistry 44 (2005) 10620–10634.
- [211] I. Ourliac Garnier, S. Bombard, GG sequence of DNA and the human telomeric sequence react with cis-diammine-diaquaplatinum at comparable rates, Journal of Inorganic Biochemistry 101 (2007) 514–524.
- [212] M. Furuta, K. Nozawa, M. Takemura, S. Izuta, T. Murate, M. Tsuchiya, K. Yoshida, N. Taka, Y. Nimura, S. Yoshida, A novel platinum compound inhibits telomerase activity in vitro and reduces telomere length in a human hepatoma cell line, International Journal of Cancer 104 (2003) 709–715.
- [213] D. Colangelo, A.L. Ghiglia, I. Viano, G. Cavigiolio, D. Osella, Cis-[Pt(Cl)(2)(Pyridine)(5-SO3H-isoquinoline)] complex, a selective inhibitor of telomerase enzyme, Biometals 16 (2003) 553–560.
- [214] Y. Goto, S. Hagihara, M. Hagihara, K. Nakatani, Small-molecule binding to the nonquadruplex form of the human telomeric sequence, Chembiochem 8 (2007) 723–726.
- [215] T. Lemarteleur, D. Gomez, R. Paterski, E. Mandine, P. Mailliet, J.-F. Riou, Stabilization of the c-myc gene promoter quadruplex by specific ligands inhibitors of telomerase, Biochemical and Biophysical Research Communications 323 (2004) 802–808.
- [216] A. De Cian, E. DeLemos, J.L. Mergny, M.P. Teulade-Fichou, D. Monchaud, Highly efficient G-Quadruplex recognition by bisquinolinium compounds, Journal of the American Chemical Society 129 (2007) 1856–1857.
- [217] J.F. Riou, L. Guittat, P. Mailliet, A. Laoui, O. Petigenet, F. Megnin-Chanet, C. Hélène, J.L. Mergny, Cell senescence and telomere shortening induced by a new series of specific G-quadruplex DNA ligands, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99 (2002) 2672–2677.
- [218] T. Tauchi, K. Shinya, G. Sashida, M. Sumi, A. Nakajima, T. Shimamoto, J.H. Ohyashiki, K. Ohyashiki, Activity of a novel Gquadruplex-interactive telomerase inhibitor, telomestatin (SOT-095), against human leukemia cells: involvement of ATM-dependent DNA damage response pathways, Oncogene 22 (2003) 5338–5347.
- [219] D. Gomez, N. Aouali, A. Renaud, C. Douarre, K. Shinya, J. Tazi, S. Martinez, C. Trentesaux, H. Morjani, J.F. Riou, Resistance to senescence induction and telomere shortening by a G-quadruplex ligand inhibitor of telomerase, Cancer Research 63 (2003) 6149–6153.
- [220] M.A. Shammas, R.J.S. Reis, M. Akiyama, H. Koley, D. Chauhan, T. Hideshima, R.K. Goyal, L.H. Hurley, K.C. Anderson, N.C. Munshi, Telomerase inhibition and cell growth arrest by G-quadruplex interactive agent in multiple myeloma, Molecular Cancer Therapeutics 2 (2003) 825–833.
- [221] L.L. Zhang, K. Tamura, K. Shinya, H. Takahashi, The telomerase inhibitor telomestatin induces telomere shortening and cell death in Arabidopsis, Biochimica et Biophysica Acta Molecular and Cellular Research 1763 (2006) 39–44.
- [222] D. Gomez, T. Wenner, B. Brassart, C. Douarre, M.F. O'Donohue, V. El Khoury, K. Shin-Ya, H. Morjani, C. Trentesaux, J.F. Riou, Telomestatin-induced telomere uncapping is modulated by POT1 through G-overhang extension in HT1080 human tumor cells, Journal of Biological Chemistry 281 (2006) 38721–38729.
- [223] A.M. Burger, F.P. Dai, C.M. Schultes, A.P. Reszka, M.J. Moore, J.A. Double, S. Neidle, The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function, Cancer Research 65 (2005) 1489–1496.
- [224] S.M. Gowan, J.R. Harrison, L. Patterson, M. Valenti, M.A. Read, S. Neidle, L.R. Kelland, A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity, Molecular Pharmacology 61 (2002) 1154–1162.

- [225] C. Leonetti, S. Amodei, C. DAngelo, A. Rizzo, B. Benassi, A. Antonelli, R. Elli, M.F.G. Stevens, M. DIncalci, G. Zupi, A. Biroccio, Biological activity of the G-quadruplex ligand RHPS4 (3,11-difluoro-6,8,13-trimethyl-8H-quino[4,3,2-kl]acridinium methosulfate) is associated with telomere capping alteration, Molecular Pharmacology 66 (2004) 1138–1146.
- [226] G. Pennarun, C. Granotier, L.R. Gauthier, D. Gomez, F. Hoffschir, E. Mandine, J.F. Riou, J.L. Mergny, P. Mailliet, F.D. Boussin, Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands, Oncogene 24 (2005) 2917–2928.
- [227] S. Gowan, R. Heald, M. Stevens, L. Kelland, Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes, Molecular Pharmacology 60 (2001) 981–988.
- [228] E. Izbicka, R.T. Wheelhouse, E. Raymond, K.K. Davidson, R.A. Lawrence, D.Y. Sun, B.E. Windle, L.H. Hurley, D.D. VonHoff, Effects of cationic porphyrins as G-quadruplex interactive agents in human tumor cells, Cancer Research 59 (1999) 639–644.
- [229] A. Rangan, O.Y. Fedoroff, L.H. Hurley, Induction of duplex to G-quadruplex transition in the c-myc promoter region by a small molecule, Journal of Biological Chemistry 276 (2001) 4640–4646.
- [230] D. Gomez, T. Lemarteleur, L. Lacroix, P. Mailliet, J.L. Mergny, J.F. Riou, Telomerase down regulation induced by the G-quadruplex ligand 12459 in A549 cells is mediated by hTERT RNA alternative splicing, Nucleic Acids Research 32 (2004) 371–379.
- [231] P. Phatak, J.C. Cookson, F. Dai, V. Smith, R.B. Gartenhaus, M.F. Stevens, A.M. Burger, 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, British Journal of Cancer 96 (2007) 1223–1233.
- [232] Y.L. Wu, C. Dudognon, E. Nguyen, J. Hillion, F. Pendino, I. Tarkanyi, J. Aradi, M. Lanotte, J.H. Tong, G.Q. Chen, E. Segal-Bendirdjian, Immunodetection of human telomerase reverse-transcriptase (hTERT) reappraised: nucleolin and telomerase cross paths, Journal of Cell Science 119 (2006) 2797–2806.
- [233] C.M. Incles, C.M. Schultes, H. Kempski, H. Koehler, L.R. Kelland, S. Neidle, A G-quadruplex telomere targeting agent produces p16-associated senescence and chromosomal fusions in human prostate cancer cells, Molecular Cancer Therapeutics 3 (2004) 1201–1206.
- [234] D. Gomez, N. Aouali, A. Londono-Vallejo, L. Lacroix, F. Megnin-Chanet, T. Lemarteleur, C. Douarre, K. Shinya, P. Mailliet, C. Trentesaux, H. Morjani, J.L. Mergny, J.F. Riou, Resistance to the short term antiproliferative activity of the G-quadruplex ligand 12459 is associated with telomerase overexpression and telomere capping alteration, Journal of Biological Chemistry 278 (2003) 50554–50562.
- [235] C. Douarre, D. Gomez, H. Morjani, J.M. Zahm, M.F. O'Donohue, L. Eddabra, P. Mailliet, J.F. Riou, C. Trentesaux, 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 Research 33 (2005) 2192–2203.
- [236] J. Karlseder, D. Broccoli, Y.M. Dai, S. Hardy, T. de Lange, p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2, Science 283 (1999) 1321–1325.
- [237] G. Cimino-Reale, E. Pascale, E. Battiloro, G. Starace, R. Verna, E. D'Ambrosio, The length of telomeric G-rich strand 3'-overhang measured by oligonucleotide ligation assay, Nucleic Acids Research 29 (2001) E35.
- [238] D. Gomez, R. Paterski, T. Lemarteleur, K. Shinya, J.L. Mergny, J.F. Riou, Interaction of telomestatin with the telomeric singlestrand overhang, Journal of Biological Chemistry 279 (2004) 41487–41494.
- [239] S.A. Stewart, I. BenPorath, V.J. Carey, B.F. OConnor, W.C. Hahn, R.A. Weinberg, Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence, Nature Genetics 33 (2003) 492–496.
- [240] D.M. Baird, J. Rowson, D. Wynford-Thomas, D. Kipling, Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells, Nature Genetics 33 (2003) 203–207.

- [241] A.J. Sfeir, W.H. Chai, J.W. Shay, W.E. Wright, Telomere-end processing: The terminal nucleotides of human chromosomes, Molecular Cell 18 (2005) 131–138.
- [242] N.K. Jacob, R. Lescasse, B.R. Linger, C.M. Price, Tetrahymena POT1a regulates telomere length and prevents activation of a cell cycle checkpoint, Molecular and Cellular Biology 27 (2007) 1592–1601.
- [243] D. Gomez, M.F. O'Donohue, T. Wenner, C. Douarre, J. Macadre, P. Koebel, M.J. Giraud-Panis, H. Kaplan, A. Kolkes, K. Shin-ya, J.F. Riou, The G-quadruplex ligand telomestatin inhibits POT1 binding to telomeric sequences in vitro and induces GFP-POT1 dissociation from telomeres in human cells, Cancer Research 66 (2006) 6908–6912.
- [244] H. Tahara, K. Shinya, H. Seimiya, H. Yamada, T. Tsuruo, T. Ide, Gquadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells, Oncogene 25 (2006) 1955–1966.
- [245] A. Cheng, K. Shin-ya, R. Wan, S.C. Tang, T. Miura, H. Tang, R. Khatri, M. Gleichman, X. Ouyang, D. Liu, H.R. Park, J.Y. Chiang, M.P. Mattson, Telomere protection mechanisms change during neurogenesis and neuronal maturation: newly generated neurons are hypersensitive to telomere and DNA damage, Journal of Neuroscience 27 (2007) 3722–3733.
- [246] H. Sun, J.K. Karow, I.D. Hickson, N. Maizels, The Bloom's syndrome helicase unwinds G4 DNA, Journal of Biological Chemistry 273 (1998) 27587–27592.
- [247] P. Mohaghegh, J.K. Karow, R.M. Brosh Jr., V.A. Bohr, I.D. Hickson, The Bloom's and Werner's syndrome proteins are DNA structure-specific helicases, Nucleic Acids Research 29 (2001) 2843–2849.
- [248] M. Fry, L.A. Loeb, Human Werner syndrome DNA helicase unwinds tetrahelical structures of the fragile X syndrome repeat sequence d(CGG)n, Journal of Biological Chemistry 274 (1999) 12797–12802.
- [249] L. Wu, I.D. Hickson, DNA helicases required for homologous recombination and repair of damaged replication forks, Annual Review of Genetics 40 (2006) 279–306.
- [250] L. Crabbe, A. Jauch, C.M. Naeger, H. Holtgreve-Grez, J. Karlseder, Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104 (2007) 2205–2210.
- [251] A.S. Multani, S. Chang, WRN at telomeres: implications for aging and cancer, Journal of Cell Science 120 (2007) 713–721.
- [252] H. Ding, M. Schertzer, X.L. Wu, M. Gertsenstein, S. Selig, M. Kammori, R. Pourvali, S. Poon, I. Vulto, E. Chavez, P.P.L. Tam, A. Nagy, P.M. Lansdorp, Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein, Cell 117 (2004) 873–886.
- [253] I. Cheung, M. Schertzer, A. Rose, P.M. Lansdorp, Disruption of dog-1 in *Caenorhabditis elegans* triggers deletions upstream of guanine-rich DNA, Nature Genetics 31 (2002) 405–409.
- [254] J.L. Youds, N.J. O'Neil, A.M. Rose, Homologous recombination is required for genome stability in the absence of DOG-1 in *Caenorhabditis elegans*, Genetics 173 (2006) 697–708.
- [255] P.L. Opresko, P.A. Mason, E.R. Podell, M. Lei, I.D. Hickson, T.R. Cech, V.A. Bohr, POT1 stimulates RecQ helicases WRN and BLM to unwind telomeric DNA substrates, Journal of Biological Chemistry 280 (2005) 32069–32080.
- [256] J.-L. Li, R.J. Harrison, A.P. Reszka, R.M. Brosh Jr., V.A. Bohr, S. Neidle, I.D. Hickson, Inhibition of the Bloom's and Werner's Syndrome helicases by G-quadruplex interacting ligands, Biochemistry 40 (2001) 15194–15202.
- [257] B.S. Herbert, A.E. Pitts, S.I. Baker, S.E. Hamilton, W.E. Wright, J.W. Shay, D.R. Corey, Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96 (1999) 14276–14281.
- [258] M. Pantic, S. Zimmerman, C.F. Waller, U.M. Martens, The level of telomere dysfunction determines the efficacy of telomerase-based therapeutics in a lung cancer cell line, International Journal of Oncology 26 (2005) 1227–1232.

- [259] D. Ponti, A. Costa, N. Zaffaroni, G. Pratesi, G. Petrangolini, D. Coradini, S. Pilotti, M.A. Pierotti, M.G. Daidone, Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties, Cancer Research 65 (2005) 5506–5511.
- [260] Z. Ju, K.L. Rudolph, Telomeres and telomerase in cancer stem cells, European Journal of Cancer 42 (2006) 1197–1203.
- [261] A. Canela, E. Vera, P. Klatt, M.A. Blasco, High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104 (2007) 5300–5305.
- [262] G. Cristofari, J. Lingner, Telomere length homeostasis requires that telomerase levels are limiting, EMBO Journal 25 (2006) 565–574.
- [263] S. Taetz, C. Baldes, T.E. Murdter, E. Kleideiter, K. Piotrowska, U. Bock, E. Haltner-Ukomadu, J. Mueller, H. Huwer, U.F. Schaefer, U. Klotz, C.M. Lehr, Biopharmaceutical characterization of the telomerase inhibitor BRACO19, Pharmaceutical Research 23 (2006) 1031–1037.
- [264] T. Tauchi, K. Shin-ya, G. Sashida, M. Sumi, S. Okabe, J.H. Ohyashiki, K. Ohyashiki, Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: in vitro and in vivo studies in acute leukemia, Oncogene 25 (2006) 5719–5725.
- [265] A. Siddiqui-Jain, C.L. Grand, D.J. Bearss, L.H. Hurley, Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99 (2002) 11593–11598.
- [266] D.Y. Sun, K.X. Guo, J.J. Rusche, L.H. Hurley, Facilitation of a structural transition in the polypurine/polypyrimidine tract within the proximal promoter region of the human VEGF gene by the presence of potassium and G-quadruplex-interactive agents, Nucleic Acids Research 33 (2005) 6070–6080.
- [267] E.M. Rezler, J. Seenisamy, S. Bashyam, M.Y. Kim, E. White, W.D. Wilson, L.H. Hurley, Telomestatin and diseleno sapphyrin bind selectively to two different forms of the human telomeric G-quadruplex structure, Journal of the American Chemical Society 127 (2005) 9439– 9447.
- [268] P. Boukamp, N. Mirancea, Telomeres rather than telomerase a key target for anti-cancer therapy? Experimental Dermatology 16 (2007) 71–79.
- [269] A.M. Burger, Highlights in experimental therapeutics, Cancer Letters 245 (2007) 11–21.
- [270] M.A. Cerone, J.A. Londono-Vallejo, C. Autexier, Mutated telomeres sensitize tumor cells to anticancer drugs independently of telomere shortening and mechanisms of telomere maintenance, Oncogene 25 (2006) 7411–7420.
- [271] L.W. Elmore, S.E. Holt, Telomerase inhibition as an adjuvant anticancer therapy: it is more than just a waiting game, Expert Opinion on Therapeutic Targets 11 (2007) 427–430.
- [272] M.A. Cerone, J.A. Londono-Vallejo, C. Autexier, Telomerase inhibition enhances the response to anticancer drug treatment in human breast cancer cells, Molecular Cancer Therapeutics 5 (2006) 1669–1675.
- [273] D.M. Feldser, C.W. Greider, Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence, Cancer Cell 11 (2007) 461–469.
- [274] H. Zhang, Molecular signaling and genetic pathways of senescence: its role in tumorigenesis and aging, Journal of Cellular Physiology 210 (2007) 567–574.
- [275] J.M. Sedivy, Telomeres limit cancer growth by inducing senescence: long-sought in vivo evidence obtained, Cancer Cell 11 (2007) 389–391.
- [276] P.J. Hornsby, Senescence as an anticancer mechanism, Journal of Clinical Oncology 25 (2007) 1852–1857.
- [277] Y. Wang, D.J. Patel, Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex, Structure 1 (1993) 263–282.
- [278] G.N. Parkinson, M.P.H. Lee, S. Neidle, Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA, Nature 417 (2002) 876– 880.
- [279] A.T. Phan, K.N. Luu, D.J. Patel, Different loop arrangements of intramolecular human telomeric (3 + 1) G-quadruplexes in K⁺ solution, Nucleic Acids Research 34 (2006) 5715–5719.

- [280] N. Zhang, A.T. Phan, D.J. Patel, 3 + 1) assembly of three human telomeric repeats into an asymmetric dimeric G-quadruplex, Journal of the American Chemical Society 127 (2005) 17277–17285.
- [281] O.Y. Fedoroff, M. Salazar, H. Han, V.V. Chemeris, S.M. Kerwin, L.H. Hurley, NMR-based model of a telomerase inhibiting compound bound to G-quadruplex DNA, Biochemistry 37 (1998) 12367–12374.
- [282] R.T. Wheelhouse, D. Sun, H. Han, F.X. Han, L.H. Hurley, Cationic porphyrins as telomerase inhibitors: the interaction of tetra (N-methyl-4pyridyl) porphyrin with quadruplex DNA, Journal of the American Chemical Society 120 (1998) 3261–3262.
- [283] P.J. Perry, S.M. Gowan, A.P. Reszka, P. Polucci, T.C. Jenkins, L.R. Kelland, S. Neidle, 1,4- and 2,6-disubstituted amidoanthracene-9,10-dione derivatives as inhibitors of human telomerase, Journal of Medicinal Chemistry 41 (1998) 3253–3260.
- [284] P.J. Perry, A.P. Reszka, A.A. Wood, M.A. Read, S.M. Gowan, H.S. Dosanjh, J.O. Trent, T.C. Jenkins, L.R. Kelland, S. Neidle, Human telomerase inhibition by regioisomeric disubstituted amidoanthracene-9,10-diones, Journal of Medicinal Chemistry 41 (1998) 4873–4884.
- [285] B.E. Cathers, D. Sun, L.H. Hurley, Accurate determination of quadruplex binding affinity and potency of G-quadruplex-interactive telomerase inhibitors by use of a telomerase extension assay requires varying the primer concentration, Anti Cancer Drug Design 14 (1999) 367–372.
- [286] R.J. Harrison, S.M. Gowan, L.R. Kelland, S. Neidle, Human telomerase inhibition by substituted acridine derivatives, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 9 (1999) 2463–2468.
- [287] P.J. Perry, M.A. Read, R.T. Davies, S.M. Gowan, A.P. Reszka, A.A. Wood, L.R. Kelland, S. Neidle, 2,7-disubstituted amidofluorenone derivatives as inhibitors of human telomerase, Journal of Medicinal Chemistry 42 (1999) 2679–2684.
- [288] P.J. Perry, S.M. Gowan, M.A. Read, L.R. Kelland, S. Neidle, Design, synthesis and evaluation of human telomerase inhibitors based upon a tetracyclic structural motif, Anti Cancer Drug Design 14 (1999) 373–382.
- [289] M.A. Read, A.A. Wood, J.R. Harrison, S.M. Gowan, L.R. Kelland, H.S. Dosanjh, S. Neidle, Molecular modeling studies on G-quadruplex complexes of telomerase inhibitors: structure-activity relationships, Journal of Medicinal Chemistry 42 (1999) 4538–4546.
- [290] V. Caprio, B. Guyen, Y. Opoku-Boahen, J. Mann, S.M. Gowan, L.M. Kelland, M.A. Read, S. Neidle, A novel inhibitor of human telomerase derived from 10H-indolo[3,2-b]quinoline, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 10 (2000) 2063–2066.
- [291] S. Neidle, R.J. Harrison, A.P. Reszka, M.A. Read, Structure-activity relationships among guanine-quadruplex telomerase inhibitors, Pharmacology and Therapeutics 85 (2000) 133–139.
- [292] L.H. Hurley, R.T. Wheelhouse, D. Sun, S.M. Kerwin, M. Salazar, O.Y. Fedoroff, F.X. Han, H.Y. Han, E. Izbicka, D.D. VonHoff, G-quadruplexes as targets for drug design, Pharmacology and Therapeutics 85 (2000) 141–158.
- [293] M. Read, R.J. Harrison, B. Romagnoli, F.A. Tanious, S.H. Gowan, A.P. Reszka, W.D. Wilson, L.R. Kelland, S. Neidle, Structure-based design of selective and potent G quadruplex-mediated telomerase inhibitors, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98 (2001) 4844–4849.
- [294] K. Shin-ya, K. Wierzba, K. Matsuo, T. Ohtani, Y. Yamada, K. Furihata, Y. Hayakawa, H. Seto, Telomestatin, a novel telomerase inhibitor from Streptomyces anulatus, Journal of the American Chemical Society 123 (2001) 1262–1263.
- [295] D.F. Shi, R.T. Wheelhouse, D.Y. Sun, L.H. Hurley, Quadruplex-interactive agents as telomerase inhibitors: synthesis of porphyrins and structure-activity relationship for the inhibition of telomerase, Journal of Medicinal Chemistry 44 (2001) 4509–4523.
- [296] W.H. Duan, A. Rangan, H. Vankayalapati, M.Y. Kim, Q.P. Zeng, D.K. Sun, H.Y. Han, O.Y. Fedoroff, D. Nishioka, S.Y. Rha, E. Izbicka, D.D. VonHoff, L.H. Hurley, Design and synthesis of fluoroquinophenoxazines that interact with human telomeric G-quadruplexes and their biological effects, Molecular Cancer Therapeutics 1 (2001) 103–120.

- [297] S.M. Kerwin, D. Sun, J.T. Kern, A. Rangan, P.W. Thomas, G-quadruplex DNA binding by a series of carbocyanine dyes, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 11 (2001) 2411–2414.
- [298] P. Alberti, J. Ren, M.P. Teulade-Fichou, L. Guittat, J.F. Riou, J.B. Chaires, C. Hélène, J.P. Vigneron, J.M. Lehn, J.L. Mergny, Interaction of an acridine dimer with DNA quadruplex structures, Journal of Biomolecular Structure & Dynamics 19 (2001) 505–513.
- [299] J.L. Mergny, L. Lacroix, M.P. Teulade-Fichou, C. Hounsou, L. Guittat, M. Hoarau, P.B. Arimondo, J.P. Vigneron, J.M. Lehn, J.F. Riou, T. Garestier, C. Hélène, Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescent assay, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98 (2001) 3062–3067.
- [300] F. Koeppel, J.F. Riou, A. Laoui, P. Mailliet, P.B. Arimondo, D. Labit, O. Petigenet, C. Hélène, J.L. Mergny, Ethidium derivatives bind to Gquartets, inhibit telomerase and act as fluorescent probes for quadruplexes, Nucleic Acids Research 29 (2001) 1087–1096.
- [301] R.A. Heald, C. Modi, J.C. Cookson, I. Hutchinson, C.A. Laughton, S.M. Gowan, L.R. Kelland, M.F.G. Stevens, Antitumor polycyclic acridines. 8. Synthesis and telomerase-inhibitory activity of methylated pentacyclic acridinium salts, Journal of Medicinal Chemistry 45 (2002) 590–597.
- [302] L. Rossetti, M. Franceschin, A. Bianco, G. Ortaggi, M. Savino, Perylene diimides with different side chains are selective in inducing different G-quadruplex DNA structures and in inhibiting telomerase, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 12 (2002) 2527–2533.
- [303] D. Cairns, E. Michalitsi, T.C. Jenkins, S.P. Mackay, Molecular modelling and cytotoxicity of substituted anthraquinones as inhibitors of human telomerase, Bioorganic & Medicinal Chemistry 10 (2002) 803–807.
- [304] D. Gomez, J.L. Mergny, J.F. Riou, Detection of telomerase inhibitors based on G-Quadruplex ligands by a modified telomeric repeat amplification protocol assay, Cancer Research 62 (2002) 3365–3368.
- [305] P. Alberti, P. Schmidt, C.H. Nguyen, M. Hoarau, D. Grierson, J.L. Mergny, Benzoindoloquinolines interact with DNA quadruplexes and inhibit telomerase, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 12 (2002) 1071–7074.
- [306] R.J. Harrison, J. Cuesta, G. Chessari, M.A. Read, S.K. Basra, A.P. Reszka, J. Morrell, S.M. Gowan, C.M. Incles, F.A. Tanious, W.D. Wilson, L.R. Kelland, S. Neidle, Trisubstituted acridine derivatives as potent and selective telomerase inhibitors, Journal of Medicinal Chemistry 46 (2003) 4463–4476.
- [307] A. Maraval, S. Franco, C. Vialas, G. Pratviel, M.A. Blasco, B. Meunier, Porphyrin-aminoquinoline conjugates as telomerase inhibitors, Organic & Biomolecular Chemistry 1 (2003) 921–927.
- [308] R.A. Heald, M.F.G. Stevens, Antitumour polycyclic acridines. Palladium(0) mediated syntheses of quino[4,3,2-kl]acridines bearing peripheral substituents as potential telomere maintenance inhibitors, Organic & Biomolecular Chemistry 1 (2003) 3377–3389.
- [309] P.M. Murphy, V.A. Phillips, S.A. Jennings, N.C. Garbett, J.B. Chaires, T.C. Jenkins, R.T. Wheelhouse, Biarylpyrimidines: a new class of ligand for high-order DNA recognition, Chemical Communications (Cambridge, England) (2003) 1160–1161.
- [310] F. Rosu, E.D. Pauw, L. Guittat, P. Alberti, L. Lacroix, P. Mailliet, J.-F. Riou, J.-L. Mergny, Selective interaction of ethidium derivatives with quadruplexes: an equilibrium dialysis and electrospray ionization mass spectrometry analysis, Biochemistry 42 (2003) 10361–10371.
- [311] M.P. Teulade-Fichou, C. Carrasco, L. Guittat, C. Bailly, P. Alberti, J.L. Mergny, A. David, J.M. Lehn, W.D. Wilson, Selective recognition of G-quadruplex telomeric DNA by a bis(quinacridine) macrocycle, Journal of the American Chemical Society 125 (2003) 4732–4740.
- [312] L. Guittat, P. Alberti, F. Rosu, S. Van Miert, E. Thetiot, L. Pieters, V. Gabelica, E. De Pauw, A. Ottaviani, J.F. Riou, J.-L. Mergny, Interactions of cryptolepine and neocryptolepine with unusual DNA structures, Biochimie 85 (2003) 535–547.
- [313] S.D. Patel, M. Isalan, G. Gavory, S. Ladame, Y. Choo, S. Balasubramanian, Inhibition of human telomerase activity by an engineered zinc finger protein that binds G-quadruplexes, Biochemistry 43 (2004) 13452–13458.

- [314] B. Guyen, C.M. Schultes, P. Hazel, J. Mann, S. Neidle, Synthesis and evaluation of analogues of 10H-indolo[3,2-b]-quinoline as G-quadruplex stabilising ligands and potential inhibitors of the enzyme telomerase, Organic & Biomolecular Chemistry 2 (2004) 981–988.
- [315] C.M. Schultes, W. Guyen, J. Cuesta, S. Neidle, Synthesis, biophysical and biological evaluation of 3,6-bis-amidoacridines with extended 9-anilino substituents as potent G-quadruplex-binding telomerase inhibitors, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14 (2004) 4347–4351.
- [316] R.J. Harrison, A.P. Reszka, S.M. Haider, B. Romagnoli, J. Morrell, M.A. Read, S.M. Gowan, C.M. Incles, L.R. Kelland, S. Neidle, Evaluation of by disubstituted acridone derivatives as telomerase inhibitors: the importance of G-quadruplex binding, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14 (2004) 5845–5849.
- [317] C.C. Chang, I.C. Kuo, J.J. Lin, Y.C. Lu, C.T. Chen, H.T. Back, P.J. Lou, T.C. Chang, A novel carbazole derivative, BMVC: a potential antitumor agent and fluorescence marker of cancer cells, Chemistry and Biodiversity 1 (2004) 1377–1384.
- [318] J.L. Zhou, Y.J. Lu, T.M. Ou, J.M. Zhou, Z.S. Huang, X.F. Zhu, C.J. Du, X.Z. Bu, L. Ma, L.Q. Gu, Y.M. Li, A.S.C. Chan, Synthesis and evaluation of quindoline derivatives as G-quadruplex inducing and stabilizing ligands and potential inhibitors of telomerase, Journal of Medicinal Chemistry 48 (2005) 7315–7321.
- [319] I.M. Dixon, F. Lopez, J.P. Esteve, A.M. Tejera, M.A. Blasco, G. Pratviel, B. Meunier, Porphyrin derivatives for telomere binding and telomerase inhibition, Chembiochem 6 (2005) 123–132.
- [320] H.S. Huang, C.L. Chou, C.L. Guo, C.L. Yuan, Y.C. Lu, F.Y. Shieh, J.J. Lin, Human telomerase inhibition and cytotoxicity of regioisomeric disubstituted amidoanthraquinones and aminoanthraquinones, Bioorganic & Medicinal Chemistry 13 (2005) 1435–1444.
- [321] L. Rossetti, M. Franceschin, S. Schirripa, A. Bianco, G. Ortaggi, M. Savino, Selective interactions of perylene derivatives having different side chains with inter- and intramolecular G-quadruplex DNA structures. A correlation with telomerase inhibition, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 15 (2005) 413–420.
- [322] L. Guittat, A. DeCian, F. Rosu, V. Gabelica, E. DePauw, E. Delfourne, J.L. Mergny, Ascididemin and meridine stabilise G-quadruplexes and inhibit telomerase in vitro, Biochimica et Biophysica Acta General Subjects 1724 (2005) 375–384.
- [323] J.M. Zhou, X.F. Zhu, Y.J. Lu, R. Deng, Z.S. Huang, Y.P. Mei, Y. Wang, W.L. Huang, Z.C. Liu, L.Q. Gu, Y.X. Zeng, Senescence and telomere shortening induced by novel potent G-quadruplex interactive agents, quindoline derivatives, in human cancer cell lines, Oncogene 25 (2006) 503–511.
- [324] M. Franceschin, L. Rossetti, A. Dambrosio, S. Schirripa, A. Bianco, G. Ortaggi, M. Savino, C. Schultes, S. Neidle, Natural and synthetic G-quadruplex interactive berberine derivatives, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 16 (2006) 1707–1711.
- [325] J.E. Reed, A.A. Arnal, S. Neidle, R. Vilar, Stabilization of G-quadruplex DNA and inhibition of telomerase activity by square-planar nickel(II) complexes, Journal of the American Chemical Society 128 (2006) 5992–5993.

- [326] P. Wang, L. Ren, H. He, F. Liang, X. Zhou, Z. Tan, A phenol quaternary ammonium porphyrin as a potent telomerase inhibitor by selective interaction with quadruplex DNA, Chembiochem 7 (2006) 1155–1159.
- [327] M. Kaiser, A. De Cian, M. Sainlos, C. Renner, J.L. Mergny, M.P. Teulade-Fichou, Neomycin-capped aromatic platforms: quadruplex DNA recognition and telomerase inhibition, Organic & Biomolecular Chemistry 4 (2006) 1049–1057.
- [328] A.D. Moorhouse, A.M. Santos, M. Gunaratnam, M. Moore, S. Neidle, J.E. Moses, Stabilization of G-quadruplex DNA by highly selective ligands via click chemistry, Journal of the American Chemical Society 128 (2006) 15972–15973.
- [329] H.S. Huang, I.B. Chen, K.F. Huang, W.C. Lu, F.Y. Shieh, Y.Y. Huang, F.C. Huang, J.J. Lin, Synthesis and human telomerase inhibition of a series of regioisomeric disubstituted amidoanthraquinones, Chemistry and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo) 55 (2007) 284–292.
- [330] M. Franceschin, E. Pascucci, A. Alvino, D. D'Ambrosio, A. Bianco, G. Ortaggi, M. Savino, New highly hydrosoluble and not selfaggregated perylene derivatives with three and four polar side-chains as G-quadruplex telomere targeting agents and telomerase inhibitors, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 17 (2007) 2515–2522.
- [331] M. Franceschin, A. Alvino, V. Casagrande, C. Mauriello, E. Pascucci, M. Savino, G. Ortaggi, A. Bianco, Specific interactions with intraand intermolecular G-quadruplex DNA structures by hydrosoluble coronene derivatives: a new class of telomerase inhibitors, Bioorganic and Medicinal Chemistry 15 (2007) 1848–1858.
- [332] I.M. Dixon, F. Lopez, A.M. Tejera, J.P. Esteve, M.A. Blasco, G. Pratviel, B. Meunier, A G-Quadruplex ligand with 10000-fold selectivity over duplex DNA, Journal of the American Chemical Society 129 (2007) 1502–1503.
- [333] C. Martins, M. Gunaratnam, J. Stuart, V. Makwana, O. Greciano, A.P. Reszka, L.R. Kelland, S. Neidle, Structure-based design of benzylamino-acridine compounds as G-quadruplex DNA telomere targeting agents, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 17 (2007) 2293– 2298.
- [334] C. Sissi, L. Lucatello, A. Paul Krapcho, D.J. Maloney, M.B. Boxer, M.V. Camarasa, G. Pezzoni, E. Menta, M. Palumbo, Tri-, tetra- and heptacyclic perylene analogues as new potential antineoplastic agents based on DNA telomerase inhibition, Bioorganic and Medicinal Chemistry 15 (2007) 555–562.
- [335] L. Ren, A. Zhang, J. Huang, P. Wang, X. Weng, L. Zhang, F. Liang, Z. Tan, X. Zhou, Quaternary ammonium zinc phthalocyanine: inhibiting telomerase by stabilizing G quadruplexes and inducing G-quadruplex structure transition and formation, Chembiochem 8 (2007) 775–780.
- [336] Brassart, B., Gomez, D., De Cian, A., Paterski, R., Montagnac, A., Qui, K.H., Temime-Smaali, N., Trentesaux, C., Mergny, J.L., Gueritte, F., Riou, J.F., A new steroid derivative stabilizes G-quadruplexes and induces telomere uncapping in human tumor cells, Molecular Pharmacology (2007) (in press; doi:10.1124/mol.1107.036574).
- [337] H. Bertrand, D. Monchaud, A. De Cian, R. Guillot, J.L. Mergny, M.P. Teulade-Fichou, The importance of metal geometry in the recognition of G-quadruplex DNA by metal-terpyridine complexes, Organic & Biomolecular Chemistry 5 (2007) 2555–2559.

<u>Résumé</u>

Chez l'homme, la TopoIII α et l'hélicase BLM sont associées génétiquement et fonctionnellement, et sont impliqués dans la résolution des intermédiaires spécifiques produits au cours de la recombinaison homologue. Il a été proposé que BLM joue un rôle important dans le mécanisme ALT (Alternative Lengthening of Telomere) qui permet l'élongation des télomères en absence de la télomérase. Nous montrons que la TopoIII α colocalise avec les protéines télomériques dans les APBs (ALT-associated PML bodies) des lignées ALT. Dans ces cellules, la TopoIII α immunoprécipite avec TRF2 et BLM, et est associée avec l'ADN télomérique. Ces résultats suggèrent que Topo III α /BLM/TRF2 forment un complexe au niveau des séquences télomériques. La déplétion de la TopoIII α par siRNA altère la croissance cellulaire des lignées ALT mais pas des lignées télomérase positives. De plus, la diminution de l'expression de la TopoIII α réduit le niveau protéique de BLM et TRF2, et provoque une forte augmentation de la formation de ponts anaphasiques, une dégradation du simple-brin télomérique. Nous concluons que la TopoIII α est un facteur important associé aux télomères, essentiel pour la maintenance des télomères et de la stabilité chromosomique des cellules ALT.

Le simple-brin télomérique peut adopter une structure à quatre brins appelée G-quadruplexe. Les ligands qui stabilisent les structures G-quadruplexes bloquent l'activité télomérase et la réplication des télomères et sont considérés comme des agents antitumoraux potentiels. Nous montrons que la liaison de la TopoIIIa au simplebrin télomérique est inhibée par la télomestatine, un ligand spécifique des G-quadruplexes. Dans les cellules ALT, la télomestatine provoque la déplétion du complexe TopoIIIa/BLM/TRF2 et la désorganisation des APBs conduisant à la ségrégation des PML, des composants du shelterin et de la TopoIIIa. De plus, une réponse aux dommages de l'ADN a été observée au niveau des télomères et est associée avec une altération du simple-brin télomérique.

Ces données montrent l'importance de la stabilisation des G-quadruplexes dans la maintenance des télomères des cellules ALTs.

Mots clés : télomère, topoisomérase IIIa, ALT, G-quadruplexe, ligands des G-quadruplexes.

<u>Abstract</u>

TopoIII α and BLM hélicase are genetically and functionally associated and play a role to solve specific structures generated during homologous recombination. BLM has been proposed to play an important role in the Alternative Lengthening of Telomeres (ALT) pathway, which allowed telomere recombination in the absence of telomerase. We show here that human Topo III α colocalizes with telomeric proteins at APBs in ALT cells. In these cells, TopoIII α co-immunoprecipitated with TRF2 and BLM and interacts with telomeric DNA. These results suggest that Topo III α /BLM/TRF2 form a complex at telomeres. TopoIII α depletion by siRNA reduced ALT cell growth, but did not affect telomerase-positive cell lines. Moreover, repression of TopoIII α expression in ALT cells reduced levels of TRF2 and BLM proteins, provoked a strong increase in the formation of anaphase bridges, induced the degradation of the G-overhang signal and induced a DNA damage response at telomeres that corresponds to a telomeric dysfunction. We conclude that TopoIII α is an important telomeric-associated factor, essential for telomere maintenance and chromosome stability in ALT cells.

Telomeric G-overhang may adopt a four-stranded DNA structure called G-quadruplex. Ligands that stabilize G-quadruplex can be considered as potentials antitumor agents that block telomerase activity and telomere replication in tumor cells. We show here that the binding of TopoIII α onto telomeric G-overhang is modulated by telomestatin, a potent and specific G-quadruplex ligand. In ALT cells, telomestatin provokes the depletion of the TopoIII α /BLM/TRF2 complex and the disruption of APBs leading to the segregation of PML, shelterin components and TopoIII α . Furthermore telomestatin provokes a rapid degradation of the telomeric G-overhang. Interestingly, a DNA damage response is observed at telomeres and is associated with an alteration of single-stranded telomeric overhang.

All together, these data pointed the important effects of G-quadruplex stabilization during telomere maintenance in ALT.

Keywords: telomere, topoisomérase IIIa, ALT, G-quadruplexs, G-quadruplex ligands.