



Implication des mécanismes de la réparation de l'ADN dans la maintenance des télomères et l'instabilité chromosomique dans les cellules humaines

Ali Ayouaz

► **To cite this version:**

Ali Ayouaz. Implication des mécanismes de la réparation de l'ADN dans la maintenance des télomères et l'instabilité chromosomique dans les cellules humaines. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. <tel-00410383>

HAL Id: tel-00410383

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00410383>

Submitted on 20 Aug 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD
ÉCOLE DOCTORALE de CANCÉROLOGIE

ANNÉE : 2008

n°

THÈSE

Présentée

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 11

Discipline : Cancerologie

Par

AYOUAZ Ali

**Implication des mécanismes de la réparation de l'ADN dans la
maintenance des télomères et l'instabilité chromosomique dans les
cellules humaines**

Soutenue le : 01 Février 2008

JURY : Pr. Dietrich Averbeck, Président
Dr. Maria Gallego, Rapporteur
Dr. Evelyne Segal-Bendirdjian, Rapporteur
Pr. Jean-Francois Riou, Examineur
Dr. Laure Sabatier, Directeur de Thèse

Et voici venu le temps des remerciements...

Je remercie Mon directeur de thèse, **Dr. Laure SABATIER**, qui m'a chaleureusement accueilli dans son groupe, qui m'a guidé tout au long de la réalisation de cette thèse avec ses conseils et ses directives qui m'ont énormément aidé dans l'orientation de mes objectifs et l'accomplissement de mes travaux. Je te remercie de m'avoir donné l'opportunité de développer ce sujet de façon relativement autonome. Ce contexte m'a permis de beaucoup apprendre quant au métier de chercheur.

Je souhaite remercier chaleureusement les **Dr. Maria GALLEGO** et **Evelyne SEGAL-BENDIRDJIAN**, **Professeur Jean-François RIOU**, ainsi que le **Professeur Dietrich AVERBECK**, qui me font l'honneur d'être les membres de mon jury. Je remercie le Commissariat à l'Energie Atomique et la Communauté Européenne pour avoir contribué au financement de ce travail.

J'adresse mes remerciements aux membres de l'équipe du LRO qui ont été toujours présents quand j'en avais besoin que ce soit pour leurs conseils scientifiques avisés ou leur gout prononcé pour les petites fêtes.

Je pense particulièrement à *Géraldine* et *Michèle* qui ont largement contribué à ce travail et qui ont tenté vainement de m'initier aux plaisirs de la cytogénétique. Je remercie également *Annie* pour sa bonne humeur, son aide dans toutes les tâches administratives souvent obscures pour moi. Je remercie chaleureusement mes deux colocataires *Luc* et *Christophe*, capable du pire comme du meilleur, en tout cas merci pour ces véritables instants de détente (et de m'avoir initié à la philosophie BFM). Spéciale dédicace aux sœurs Jumelles, *Marine* et *Déborah*, merci pour votre indéfectible soutien durant toutes ces années, votre bonne humeur, souvent contagieuse, m'a mis du baume au cœur.

Un petit clin d'œil à *Gaëlle* (lapin DURACELL.....), merci pour ton énergie communicative, ta bonne humeur et tous ces moments de franche rigolade aux quatre coins de l'Europe.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à *Denis* pour l'intérêt porté à mon travail. Sans cette précieuse collaboration, cette thèse n'aurait pas pu voir le jour. Tous ces conseils auront été très formateurs. Merci pour tout le temps consacré à m'initier aux plaisirs de la recherche.

Une mention spéciale à Jozo Delic, le chef emblématique du LOH, merci pour toutes ces discussions (que d'anecdotes !!!!!!!) et ton précieux soutien durant toutes ces années.

Une petite pensée pour mon ancien acolyte lusitanien, supporteur du PSG, Luis. Je regretterai nos discussions (pas forcément scientifique) et ta bonne humeur merci pour tous ces moments passés (la liste est longue.....).

Un énorme merci à Chantal pour toute son aide si précieuse surtout pendant la rédaction du mémoire. Tes précieux conseils m'ont permis d'avancer sur un chemin parsemé d'embûches.

Merci Florence pour ton soutien inconditionnel qui m'a permis de me relever pendant les moments difficiles et de toujours croire en ma « petite étoile ». Tout ce temps passé n'aura pas été inutile.

Un immense Merci à tous les autres membres du département DRR maintenant IRCM que j'ai côtoyé durant ce parcours initiatique notamment au LOH (Thibault, Nathalie, Odile), LGR (Jaime, Laurent, Emilie, Oscar, Germain, Philippe), LTR (Stéphane, Emmanuelle, Sabrina, Vincent), LRD (Adda, Tomio, Patricia, Claudine), au LRP (François, Gaëlle, Laurent, Christine), LMR (Corentin, Pascal, Gaëlle, David, Yannick), au LRIG (Pablo, Monique, Rachel, Aurelie), Hervé, Jérôme, Alexandra, Jacqueline, Etienne, Sandra, Sylviane, Sylvie, pardon à ceux que j'ai oublié de citer.

Je tiens à faire un petit coucou et remercier les membres de l'UMR 2027 de l'institut Curie Orsay et plus particulièrement Simone, Anne, Mary, Christophe, Camille, Benoît pour m'avoir accueilli aussi chaleureusement.

Un énorme merci à Ceux avec qui j'ai partagé la difficile mais inoubliable période de la thèse : Romain (alias Romi) et Julien (Boubou) mes fidèles sparring partners, toujours prêts pour une mission sportive. Benjamin (Beni Will), mon alter ego télomérique, supporteur de l'OM et amateur de grands voyages africain (Gardes moi une place bien au chaud à Séville). A Claude, digne représentant de la dynastie des Nguyen.

Un immense clin d'oeil à mes amis qui m'ont supporté pendant tous ce temps et plus particulièrement la fidèle équipe Dia, Adel, Malik, Dany-Dan, Lolo, Yuyu, Jul et spéciale dédicace à Jean Sébastien (Pr.Charles...).

Enfin je voudrais remercier ma famille pour leur inconditionnel, indéfectible soutien durant toutes ces années, je voudrais vous associer à cette réussite car c'est avant tout la vôtre.

A Mon Cher Frère Tarek

SOMMAIRE

SOMMAIRE	4
TABLE DES ILLUSTRATIONS	7
Abbréviations	8
Synthèse bibliographique	14
Chapitre I. Télomères et généralités.....	14
Télomères: Généralités.....	14
II. Structure des télomères : ADN télomérique.....	15
1. ADN Télomérique.....	15
2. Réplication des télomères.....	16
3. Perte des télomères : hypothèse réplivative.....	19
4. Configuration des télomères.....	20
III. Facteur protéique des télomères	22
1. TRF1.....	23
2. Protéines interagissant avec TRF1	24
3. TRF2.....	25
4. Rap1	26
5. POT1	27
6. TPP1	28
7. Apollo.....	28
IV. Fonction des télomères	29
1. Protection du génome.....	29
2. Effet de position des télomères dans la transcription.....	30
3. Rôle des télomères comme horloge biologique	31
V. Sénescence et immortalisation cellulaire	31
1. Sénescence	31
2. Immortalisation cellulaire.....	33
Chapitre II. Maintien des télomères par la télomérase, la recombinaison et le Shelterin	36
I. La télomérase : le maintien des télomères et ses autres fonctions	36
1. Structure	36
2. Fonctions de la télomérase associées aux télomères	38
3. Fonctions télomérase non associée aux télomères	40
4. Régulation de l'activité télomérase	42
II. Maintien des télomères par la recombinaison	44
1. Généralités.....	44
2. Distribution des télomères dans les cellules ALT	44
3. APBs.....	45
4. La génétique de ALT et sa répression.....	47
5. Mécanismes moléculaires	49
6. Existe-t-il un ou plusieurs mécanismes ALT	53
III. TERRA : Nouvelle voie dans le maintien des télomères	53
IV. Maintien des télomères par le Shelterin	55
1. Contrôle de la taille par les éléments du Shelterin	56

2.	Maintien de la stabilité des télomères	58
Chapitre III.	Mécanismes de réparation	68
I.	Différents systèmes de réparations des dommages de l'ADN	68
II.	Les cassures double brins de l'ADN : production, signalisation et réparation	69
1.	Nature des CDBs	69
2.	Voies activées par les CDB	69
III.	Réparation des cassures double brins (CDBs) par NHEJ.....	70
1.	Description du NHEJ : Mécanismes moléculaires de la recombinaison non homologue : 70	
2.	Les voies alternatives du NHEJ.....	71
IV.	Réparation de CDBs par la Recombinaison homologue :	72
3.	Les différents modèles de recombinaison homologue	72
4.	Mécanismes moléculaires de la recombinaison homologue	74
Chapitre IV.	Télomères et réparation.....	76
I.	Interaction Télomères et protéines de la réparation	76
1.	Télomères et signalisation des cassures doubles brins.....	76
2.	Télomères et NHEJ.	82
3.	Télomères et HR.....	87
4.	Autres éléments de la réparation et télomères.....	89
II.	Protection contre la réponse aux dommages de l'ADN au niveau des télomères.....	92
1.	Réponse des dommages aux télomères déprotégés.....	92
2.	Mécanismes de répression de la réponse aux dommages télomériques.....	94
3.	Réponse à l'érosion télomérique.....	Erreur ! Signet non défini.
III.	Réparation dans les séquences télomériques.....	95
1.	Réparation des dommages télomériques.....	95
2.	Conséquences sur la maintenance des télomères	96
Objectifs de la thèse :	108
Résultats		110
Chapitre I :	Contribution de P53 via sa fonction dans la recombinaison dans la maintenance des télomères.	110
2.	Transfection stable et Sélection des clones.	119
b.	Mesure de la recombinaison homologue <i>in vivo</i>	121
Chapitre II :	Implication du NHEJ et de la RH dans la maintenance des télomères.....	125
1.	Inhibition des voies du NHEJ et HR et conséquences sur la radiosensibilité.....	125
2.	NHEJ <i>in vitro</i>	126
3.	L'effet à court terme de l'inhibition de RH et NHEJ sur la maintenance des télomères 127	
4.	L'effet de l'inhibition prolongée des protéines de RH et NHEJ sur la maintenance des télomères	131
5.	Résultats complémentaires : L'invalidation des protéines du B-NHEJ (ligase III) et de la recombinaison RAD52.....	133
Chapitre III :	Le complexe MRN, son rôle dans la réparation des cassures doubles brins et le maintien de stabilité chromosomique et des télomères.	141
1.	Les vecteurs pEBV-siRNA permettent d'obtenir une réduction spécifique, importante et à long terme de l'expression du complexe MRN.....	141

2. La réduction de l'expression des gènes MRE11 et NBS1 par des vecteurs pEBV-siRNA permet d'établir un phénotype similaire à celui des cellules ATLD et NBS dans la lignée HeLa	143
3. Le NHEJ in vitro est altéré dans les cellules NBS KD.	143
4. À court terme, la réduction d'expression du gène NBS1 induit une instabilité télomérique.....	145
5. À long terme, la réduction d'expression du RAD50 induit une instabilité télomérique 145	
6. La réduction prolongée de l'expression des gènes MRE11 et NBS1 mène à une augmentation de la taille des télomères.....	146
7. La nature de l'augmentation de la taille dans les clones MRE11KD et NBS1KD	147
DISCUSSION GENERALE	151
Choix des différents modèles utilisés.....	151
Rôle de la réparation dans le maintien des télomères	157
1. Rôle du NHEJ dans la maintenance des télomères	157
2. Rôle de la recombinaison dans la maintenance des télomères.....	164
3. Rôle distincts de la RH et du NHEJ dans l'homéostasie télomérique	167
Complexe MRN	169
1. Modèle syngénique MRN : radiosensibilité et réparation.....	169
2. le Complexe MRN et les télomères.....	171
Conclusions - Perspectives :.....	178
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	180
ANNEXES	214

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Réplication télomérique.....	18
Figure 2 : Représentation schématique des quadruplexes de Guanines :.....	21
Figure 3 : Représentation schématique de la structure télomérique en boucle T.....	22
Figure 4 : Représentation schématique de la structure de TRF1, TRF2 et Rap1 chez la levure <i>S.Cerevisiae</i> (ScRap1) et chez l'homme (hRap1).....	27
Figure 5 : Représentation linéaire du complexe Shelterin sous une forme linéaire.....	29
Figure 6 : Hypothèse télomérique:.....	34
Figure 7 : Représentation de l'holoenzyme de la télomérase composée de la dyskerine, la sous unité catalytique hTERT et de la protéine.....	36
Figure 8 : Mécanismes moléculaires d'élongation des télomères dans les cellules ALT.....	51
Figure 9 : Récapitulatif des fonctions télomériques et les intervenants protéiques impliquées dans l'établissement de ces fonctions.....	55
Figure 10 : Schéma récapitulatif présentant les différents types de fusions.....	61
Figure 11: Fusions par NHEJ des telomeres endommagés.....	63
Figure 12: Mécanisme de recombinaison aux télomères dans une cellule exprimant la télomérase.....	66
Figure 13 : Signalisation des dommages de l'ADN.....	70
Figure 14:Description des mécanismes de la réparation des cassures doubles brins.....	71
Figure 15: Mécanismes de conversion génique.....	73
Figure 16 : Modèles de réparation des cassures doubles brins par RH.....	74
Figure 17: La réponse cellulaire consécutive aux disfonctionnements télomériques :.....	93
Figure 18: Modèle pour la répression de signalement des dommages aux télomères.....	95
Figure 19 : Tableau Récapitulatif de la contribution des protéines télomériques et de la recombinaison.....	107
Figure 20: Modèle décrivant la contribution de la RH dans la réplication télomérique.....	167
Figure 21 : Tableau récapitulatif de la contribution des protéines télomériques et de la recombinaison.....	177
Figure 22: Contribution du NHEJ et de la RH dans la maintenance des télomères conditionées par la phase du cycle.....	179

Abbréviations

9.1.1: Complexe Rad9/Rad1/Hus1

A : adénine

Aa : acides aminés

ACD dysplasie adenocortical

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ALT: alternative lengthening of telomeres

ANK: ANKyrin

APB: Alternative PML Bodies

ARN : pol II polymérase à ARN de type II

ARN: acide ribonucléique

ARNi : interférence ARN

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

AT : syndrome d'ataxia telangiectasia

ATLD : Ataxia-Telangiectasia Like Disorder

ATM : Ataxia telangiectasia mutated

ATR : ATM Rad3-related protein

b : base

BER : réparation par excision de bases

BET : bromure d'éthidium

BFB : Bridges/Fusions/Breakage

BLM : Bloom syndrome

B-NHEJ :backup NHEJ

BRCA1/2 : breast cancer associated protein 1/2

BRCT: BRCA1-Carboxyl Terminal

BrdU : 5' Bromo-2-deoxyuridine

C : cytosine

CDBs : Cassures doubles brins

CDK :Kinase dépendante des cyclines

CDK1 :Cyclin Dependant Kinase 1

CHAPS : 3-[3-(Cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate

ChIP : Chromatine ImmunoPrecipitation

Chk: checkpoint kinase

CHO : chinese hamster ovary

CMV: cytomégalovirus

c-myc : myelocytomastosis

CoFISH (Chromosome Orientation FISH)

CSBs : Cassures simples brins

DKC1 Dyskeratosis Congenita gene 1

D-loop : displacement loop

DMSO : diméthylsulfoxyde

DNA-PK : DNA-dependent protein kinase

DNA-PKcs : sous-unité catalytique de la DNA-PK

D-NHEJ : DNA-PK-dependent NHEJ
DNMT1 : DNA methyltransfèrease 1
dNTP : désoxyNucléotides TriPhosphates
DSB : cassure double-brin de l'ADN
E6 :Human Papillomavirus type 16, E6 protein
EBV : virus d'Epstein-Barr
ECTR : extrachromosomal telomeric repeat
EDTA : acide éthylènediamine tétra-acétique
ELISA :Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
EPT : Effet de Position Télomérique
ERCC : Excision repair cross-complementing
FEN-1 : Flap endonuclease 1
FISH : Fluorescence In Situ Hybridization
G : guanine
G6:6ème génération
GGR : Réparation globale du génome
HAT ; Histones AcétylTransférases
HDAC Histones déacétylases
hEST1A : human Ever Shorter Telomere 1, A
hnRNPA1 : Heterogenous nuclear Ribonucleoprotein A1
HSP90 Heat-Shock 90 kDa
hTERT : human Telomerase REverse Transcriptase
hTR : human Telomerase RNA component
HU : Hydroxyurée
kb : Kilobase
KD :knock-down
kDa : Kilo Dalton
KO : knock-out
kpb kilo paires de bases
LigIII : Ligase III
LigIV : Ligase IV
M1 (Mortality Stage 1)
MAD : MAX Dimerization Protein
MDC1 : Mediator of DNA damage checkpoint 1
MEF : fibroblastes embryonnaires de souris
miRNA : micro RNA
MMEJ : microhomology-mediated end joining
MMR: réparation des mésappariements
MNase :Micrococcus Nuclease
MRE11A : Meiotic Recombinaison 11, S. cerevisia, homolog of.
MRN : complexe MRE11/RAD50/Nbs1
NER : réparation par excision de nucléotides
NHEJ : Non Homologous End-Joining
NLS :Nuclear Localization Sequence
NOLA : Nucleolar Protein Family A
P53 : Tumor Protein 53 kDa
PARP : poly(ADP-ribose) polymérase

PARP: PolyAdenosine-diphosphate-Ribose Polymerase
Pb: paire de bases
PCC (premature condensation of chromosomes)
PCNA: proliferating cell nuclear antigen
PCR: Polymerase Chain Reaction
PD : doublement de population
pEBV vecteurs dérivés du virus d'Epstein-Barr
PI-3 kinase: phosphatidylinositol 3' kinase
PINX1: PIN2-Interacting Protein 1
PIP1: POT1 interacting protein 1
PKA: Protein Kinase A
PKB: Protein Kinase B
PKC: Protein Kinase C
PML: Promyelocytic Leukemia
PNA: Peptide Nucléic Acid
PNK: polynucleotide kinase
Pol: polymérase à ADN
POT1: Protection of telomeres 1
PrB: Protéine du Rétinoblastome
RAD50: RAD50, *S. cerevisiae*, homolog of
RAD51:RAD51, *S. cerevisiae*, homolog of
RAD52:RAD52, *S. cerevisiae*, homolog of
RAD54:RAD54, *S. cerevisiae*, homolog of
RH : recombinaison homologue
RI : radiations ionisantes
ROS : espèces actives de l'oxygène
RPA : replication protein A
RS-SCID radiosensitive SCID
RT : reverse transcriptase
RT-PCR Reverse Transcription-PCR
SCE: Sister Chromatides Exchanges
SCID: Severe Combine Immunodeficiency
shRNA: short hairpin RNA
siRNA: small interfering RNA
SMC: Structure Maintenance of Chromosomes
SMDG: Suppressors with Morphogenetic Defects in Genitalia
SP1: Transcription Factor Sp1
SSA: single-strand annealing
SSB : cassure simple-brin de l'ADN
SV40: Simian Virus 40
SVF: sérum de veau foetal
T : thymine
TANK : tankyrase
TBE : Tris/Borate/EDTA
TCR: réparation couplée à la transcription
TdT: déoxynucléotidyltransférase terminale
TID: Telomerase Inhibitory Domain

TIF2: Transcriptional Intermediary Factor
TIFs: Telomere dysfunction Induced Foci
TIN2 TRF1-Interacting Nuclear factor 2
T-loop : telomeric loop
TLS : synthèse trans-lésionnelle
Topo II: topoisomérase de type II
TP53BP1: tumor protein 53 binding protein 1
TRAP: Telomeric Repeat Amplification Protocol
TRD: Telomere Rapid délétion
TRF1: Telomeric Repeat-Binding Factor 1
TRF2: Telomeric Repeat-Binding Factor 2
TRFH: TRF homology domain
Tris-HCl : hydrochlorure de Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
TSA:Trichostatine A
T-SCE : Telomere-SCE
TTD : trichothiodystrophie
UV : ultraviolet
UV : ultraviolet
WRN: hélicase Werner
WRN: Werner syndrome gene
WS : syndrome de Werner
XP : xeroderma pigmentosum
XP-F : groupes de complémentation de XP F
XRCC: X-ray cross complementing
 β -gal: β -galactosidase
 γ -H2AX: forme phosphorylée de l'histone H2AX

Préambule

L'ADN constitue le support de l'information génétique qui doit être transmis intact aux cellules filles. Le maintien de l'intégrité génomique est basé sur l'organisation spatiale ordonnée et compacte de l'ADN présent dans le noyau sous une forme particulière, les chromosomes, qui protège l'ADN contre les dommages. En effet, au cours de la vie cellulaire, l'ADN va être la cible d'attaques diverses (endogène, exogène) qui entraînent une grande variété de modifications. Dans le cas où des altérations persistent, les cellules somatiques en repos ou en prolifération accumuleront des dommages qui peuvent conduire à la perte de certaines fonctions. Des lésions de l'ADN peu fréquentes sont majoritairement responsables de la létalité des cellules. D'autres dommages peuvent aussi favoriser l'apparition de mutations qui à long terme peuvent participer à l'émergence d'un processus de cancérogenèse. Les chromosomes présentent, au niveau de leurs extrémités, des structures particulières qui permettent de distinguer les extrémités naturelles des cassures chromosomiques. Ces structures particulières participent au maintien de l'intégrité du génome en limitant d'éventuelles dégradations ou fusions chromosomiques.

L'incapacité des cellules à synthétiser les extrémités des chromosomes entraîne la perte progressive de leurs séquences terminales au fil des cycles de réplication cellulaire. Le raccourcissement des chromosomes dans la plupart des cellules somatiques jouerait un rôle déterminant dans la sénescence cellulaire. Après avoir atteint une taille critique, les cellules arrêtent de proliférer pour entrer dans un état distinct de la quiescence cellulaire. Cet arrêt cellulaire peut être contourné par l'inactivation de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Ainsi, les cellules poursuivent leur prolifération et la taille des télomères continue de décroître. Cette période est marquée par une instabilité croissante des chromosomes, qui est inversement proportionnelle à la taille des télomères. Cette instabilité est exacerbée lorsque les télomères atteignent leur taille minimale, après un certain nombre de divisions cellulaires au delà desquelles les cellules commencent à entrer en « crise ». Toutes les cellules qui échappent spontanément à la crise sont celles qui ont stabilisé leurs télomères, par un processus qui fait intervenir soit une réactivation de la télomérase, soit un mécanisme appelé ALT.

Les cellules, qui maintiennent la taille de leurs télomères, ont acquis la potentialité de proliférer, on parle alors de cellules immortelles. Néanmoins, ces cellules ne sont pas cancéreuses. En effet, les cellules cancéreuses sont non seulement immortelles (ou en tout cas capables de croissance à

long terme *in vitro*), mais elles présentent aussi deux autres caractéristiques propres au phénotype de transformation cellulaire : (1) une prolifération continue exacerbée même en l'absence de facteurs de croissance ; et (2) une perte de la propriété d'inhibition de contact et une capacité de former des colonies en l'absence de support. Les télomères constituent en ce sens un acteur majeur dans l'immortalisation cellulaire, prélude d'un processus de cancérogenèse. Ainsi, le maintien des télomères apparaît décisif dans la mise en place d'un processus de cancérogenèse.

De récentes études abordent la notion d'organisation fonctionnelle des télomères laissant entendre que le statut télomérique d'une cellule doit être appréhendé au-delà des simples paramètres de la taille des télomères ou de l'activité de la télomérase.

Une exploration des télomères en biologie clinique devrait également inclure une étude de l'expression de l'ensemble des protéines impliquées dans la structure et la fonction des télomères basée sur des mesures de l'instabilité télomérique (ponts anaphasiques, cassures chromosomiques, fusions télomériques, colocalisation des foyers de réparation et des télomères...). Ces analyses pourraient améliorer le diagnostic, le pronostic des cancers, tout en prédisant une éventuelle réactivité des cancers vis-à-vis de thérapies anti-télomérase, voire anti-télomère.

Compte tenu de leurs structures, dans certaines conditions, les télomères peuvent être assimilables en certains points à des cassures chromosomiques. Dans cette optique, notre étude vise à déterminer dans quelles circonstances les télomères peuvent être pris pour cibles par les mécanismes de réparation de l'ADN. Plus précisément, ce travail nous a conduit à aborder la contribution respective de deux des mécanismes de la réparation, les mécanismes de recombinaison NHEJ et RH dans le maintien de l'intégrité des télomères. Durant ce manuscrit, nous détaillerons l'étendue des connaissances relatives à l'interaction entre des extrémités chromosomiques et les mécanismes de réparation. Puis, nous définirons le comportement de ces mécanismes vis-à-vis des télomères. Ensuite, nous démontrerons qu'en absence des mécanismes de la recombinaison, l'intégrité des télomères est affectée. Enfin, nous tâcherons de déterminer leurs contributions respectives dans l'homéostasie télomérique.

Synthèse bibliographique

Chapitre I. Télomères et généralités

Télomères: Généralités

Les Télomères ou les extrémités des chromosomes linéaires eucaryotes ont été décrits pour la première fois il y a 80 ans par Muller et McClintock respectivement chez la drosophile et le maïs. Muller a montré que les extrémités des chromosomes interagissent rarement avec les extrémités de cassures radio induites. Ainsi, il proposa que les extrémités des chromosomes possèdent une structure particulière appelé télomères du grec *telos* (fin) et *mere* (segment). Ce concept ne désignait pas seulement l'extrémité physique des télomères mais plutôt « *un gène terminal avec une fonction particulière qui est ancré à l'extrémité* ». Dans un même temps, B. McClintock étudiant les cassures radio induites démontre que les chromosomes cassés fusionnent régulièrement au niveau des extrémités avec les chromatides sœurs, menant à des cycles de cassures /fusions/ ponts presque toujours associés à des pertes de séquences télomériques au niveau des points de jonction. Ainsi, elle distingue les chromosomes altérés des chromosomes normaux selon l'existence ou non de cycles d'instabilité. A l'image des séquences génomiques, les séquences télomériques peuvent être remaniées spontanément (très rarement) ou bien suite à un stress environnemental. Ces remaniements sont divers mais font suite à une altération de la structure des télomères, occasionnant divers remaniements parmi lesquels on retrouve des fusions ou associations selon les cas, des pertes ou gains de télomères et des échanges réciproques ou non entre ces séquences.

A eux deux, Muller et Mc.Clinctock démontrent que les chromosomes présentent des cassures aux extrémités qui conduisent à des cycles d'instabilité remaniant considérablement le génome. Ainsi, dès le début du siècle, les extrémités des chromosomes sont jugées indispensables au maintien de l'intégrité des chromosomes.

Depuis les années 90, la notion de « télomère capping » a été avancée. Ainsi, l'organisation fonctionnelle des télomères assurerait une protection contre des événements de recombinaison inappropriés ou d'éventuelles dégradations.

II. Structure des télomères : ADN télomérique

1. ADN Télomérique

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques particulières, localisées à l'extrémité de chromosomes linéaires, indispensables au bon fonctionnement de la cellule. Les télomères permettent de distinguer les extrémités naturelles de l'ADN lésé empêchant ainsi l'activation des points de contrôle ou « checkpoints » consécutifs à la détection des cassures de l'ADN. Les télomères participent à de nombreux événements cellulaires tels que le maintien de l'intégrité génétique, l'organisation du noyau, la ségrégation des chromosomes.

La séquence des télomères varie selon les espèces. La première séquence télomérique fut décrite chez le protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila* (Blackburn E. H. et al., 1978). Ses télomères sont constitués de séquences TTGGGG répétée de 50 à 70 fois. Les séquences télomériques correspondent à une succession de motifs nucléotidiques répétés en tandems. Le nombre de ces répétitions varie selon les espèces, les individus voire les chromosomes. Tout d'abord, la taille des motifs répétés varie selon les espèces. Des motifs peuvent atteindre jusqu'à 22 paires de bases notamment chez la levure bourgeonnante *Candida Albicans*. Certaines espèces présentent d'autres types de motifs avec notamment des éléments transposables. Ainsi, chez la drosophile, les télomères sont constitués de 2 éléments transposables HetA et TART (Biessmann et al., 1990). Par ailleurs, il existe d'autres insectes notamment diptériens qui présentent une organisation mixte où les séquences répétées coexistent avec les éléments transposables non-LTR.

Chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae*, les répétitions télomériques terminales sont hétérogènes et respectent le motif 5'-TG₂₋₃(TG)₁₋₆-3' (plus communément dénommé TG1-3) (Walmsley et al., 1983); (Shampay et al., 1984); (Wang and Zakian, 1990).

La diversité des séquences télomériques chez *S.Cerevisiae* s'explique par les divers positionnements de la matrice RNA de la télomérase au niveau de l'extrémité 3' télomérique. Chez les mammifères, les télomères sont constitués de motifs répétés en tandem TTAGGG dont le nombre varie selon les organismes. Ces séquences présentent une taille allant de 5 à 15 kb chez l'homme jusqu'à 80kb dans certaines souches de souris (Morin, 1989; Moyzis et al., 1988; Zijlmans et al., 1997).

L'ADN télomérique est généralement bicaténaire excepté à l'extrémité terminale 3'OH, plus longue, et donc sous forme simple brin. La longueur de cette extrémité simple brin varie aussi selon les espèces. Chez *Tetrahymena thermophila*, elle varie de 14 à 21 nucléotides et demeure inchangée pour tous les chromosomes. Chez *S.Cerevisiae*, la taille de l'extension simple brin varie de 12 à 15 nucléotides atteignant 30 durant la phase S. Chez l'homme, l'extension simple brin présente une taille oscillant entre 150 et 400pb (Makarov et al., 1997); (McElligott and Wellinger, 1997); (Wright et al., 1997). Les séquences subtélomériques plus proximales sont constituées de motifs répétés plus variés. A la différence des séquences télomériques, ces séquences sont peu conservées durant l'évolution. Ainsi chez *S.Cerevisiae*, les séquences subtélomériques sont composées de répétitions dispersées appelées X et Y' qui contiennent des séquences consensus ARS (Autonomously Replicating Sequences) constituant des origines de réplication pour le télomère (Chan and Tye, 1983; Wright et al., 1992). Chez l'homme, les séquences subtélomériques doubles brins sont constituées de 2 parties, distale et proximale par rapport aux centromères. Les séquences subtélomériques possèdent la même orientation de séquences que celle des télomères. De plus, la conservation des séquences suit un gradient décroissant du télomère vers le centromère (Ellis et al., 1989). Adjacents aux télomères se trouvent des séquences courtes séquences dégénérées très polymorphes, constituant un lieu d'échanges entre les chromosomes homologues. Plus loin des télomères se trouvent des séquences moyennement répétitives, hypervariables, constituant des points chauds de recombinaison lors de la méiose (Allshire et al., 1989). Les séquences subtélomériques pourraient provenir à l'origine de glissements lors de la réplication et d'échanges intra et interchromosomiques inégaux.

2. Réplication des télomères

La réplication des télomères semble différer selon les espèces. Dans les cellules Indian montjuac, le temps de réplication est propre à chaque télomère durant la phase S (Zou et al., 2004a). La réplication des bras courts et des bras longs d'un chromosomes seraient coordonnées mais asynchrones contrairement à la levure (Zou et al., 2004a). Par contre, l'ADN télomérique est répliqué durant la phase S dans les cellules humaines (Wright et al., 1999), (Hultdin et al., 2001). Les régions subtélomériques se répliqueraient plus tardivement (en fin de phase S) (Ofir et al., 1999). L'équipe de Karlseder a proposé un modèle selon lequel la réplication se répartissait en

deux phases : une première phase (I) durant la phase S et une autre en G2-M. L'achèvement de la réplication se produirait en fin de phase S voire début de phase G2 expliquant la réplication tardive des extrémités télomériques (Figure 1B) (Verdun et al., 2005).

Jusqu'à très récemment, aucune origine de réplication n'avait été encore observée au niveau des télomères humains. Ainsi, les régions subtélomériques supposaient constituer le point de démarrage de la réplication des extrémités chromosomiques. Pourtant de récents travaux ont permis d'identifier des complexes protéiques chargés de la reconnaissance des origines de réplication (ORC) au niveau des télomères (Deng et al., 2007). Parmi ces complexes, la protéine ORC2 a été décrite comme interagissant avec TRF2 et les séquences télomériques. Il semble que ce complexe, probablement recruté par la protéine TRF2, faciliterait la réplication des télomères préservant l'intégrité des séquences télomériques (Deng et al., 2007).

Selon le modèle de réplication discontinue, la synthèse des extrémités des télomères est asymétrique formant deux structures distinctes. La réplication du brin (CCCTAA) «directeur» (riche en C) est continue, copiant le brin jusqu'à l'extrémité des télomères pour générer des extrémités télomériques franches. Par contre, le mode de synthèse discontinue (réplication du brin riche en guanine dit « retardataire ») va produire une extension sortante suite au positionnement et à la dégradation de l'amorce d'Okazaki la plus distale (Figure 1A). La taille peut varier de quelques paires de bases (pb) (16pb taille de l'amorce) à quelques centaines de pb selon le positionnement de l'amorce.

La formation des extrémités 3' nécessiterait le passage de la fourche de réplication au niveau des télomères en fin de phase S pendant la réplication des chromosomes. La taille de ces extensions serait transitoirement plus grande que durant le reste du cycle chez la levure (Larrivee et al., 2004; Wellinger et al., 1993).

Après la réplication, le brin fils du brin « directeur » va être dégradé suivant l'orientation 5'-3' conduisant à la formation de l'extension simple brin en 3'-OH. Bien que le brin « retardataire » présente une extrémité 3'OH, les extensions simples brins ne sont achevées qu'après dégradation du brin riche en C. La réplication conventionnelle de molécules linéaires issues de la synthèse du brin «retardataire» génère spontanément des extensions simples brins. Les molécules filles issues du brin « retardataire » sont aussi resséquées par une nucléase formant une extension simple brin plus longue, indispensable à la formation d'une structure tridimensionnelle. Chez l'homme, en absence de télomérase, les extensions 3' des molécules issues du brin « retardataire » sont plus longues que celles issues du brin « directeur » (Chai et al., 2006). La résection des brins selon

l'orientation 5' serait indispensable à la formation de l'extension 3' télomérique simple brin. Alors que chez la levure cette étape serait prise en charge par le complexe MRE11/RAD50/Xrs2 (Larrivee et al., 2004), la nucléase à l'origine de la résection des brins 5' riche en C n'est pas connu à ce jour dans les cellules humaines. Toutefois, aux vues de leurs activités d'exonucléases le complexe MRE11/RAD50/Nbs1 et la protéine Apollo constituent de sérieux candidats à la résection des télomères (Verdun et al., 2005), (Lenain et al., 2006; van Overbeek and de Lange, 2006). Il a été proposé qu'après la réplication, les télomères soient au préalable reconnus en tant que dommages de l'ADN pour recruter la machinerie nécessaire à la formation d'une structure fonctionnelle des télomères (Verdun et al., 2005) (Figure 1).

La présence de structures télomériques secondaires de type G-quadruplexes complique la progression de la fourche de réplication. Dans les cellules humaines, ces structures seraient éliminées par la protéine WRN, et son absence se traduirait par une perte des télomères issues de la synthèse discontinue (Crabbe et al., 2004).

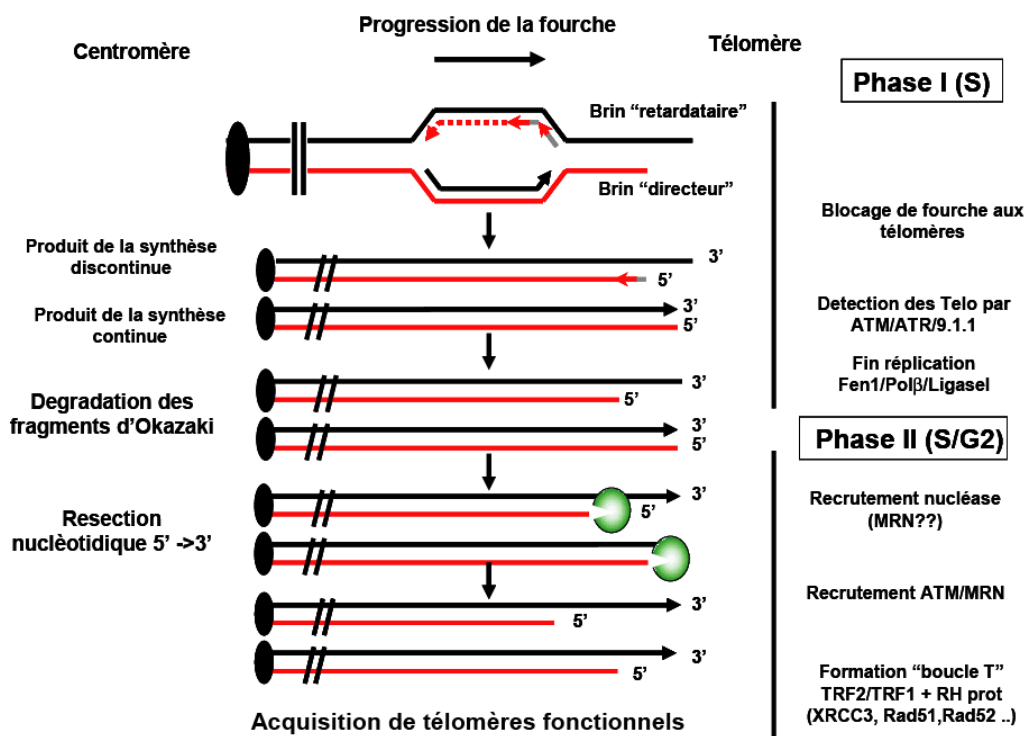


Figure 1: Réplication télomérique

Modèle élémentaire de la réplication des extrémités chromosomiques: Les extensions simples brins 3' sont générées par une activité nucléolytique; le modèle semi-conservatif des télomères génère un télomère «sens» à extrémité franche et télomère «non sens» avec une petite queue riche en 3' G; la digestion nucléolytique va permettre de générer des extrémités simple brins assez longues pour favoriser la formation de la structure des télomères fonctionnelles

Modèle prédictif de la réplication des télomères :

Phase I: La réplication progresse jusqu'aux télomères, où elle se retrouve bloquée. La phase I correspond au redémarrage de la réplication au niveau des télomères. La fourche de réplication, reconnue comme lésion de l'ADN, recrute le reste de la machinerie répliquative afin de former une molécule avec des extrémités télomériques franches et l'autre avec une courte extrémité 3' simple brin. La phase II correspond à la reconnaissance des télomères fonctionnels comme cassure afin de recruter la machinerie nécessaire pour former une boucle T (D'après Verdun 2005).

3. Perte des télomères : hypothèse répliquative

Compte tenu de leur position distale, les télomères sont exposés à un raccourcissement lors de la réplication des chromosomes. James D. Watson décrit ce qu'il appelait le problème de la réplication terminale (the end replication problem). « Pendant la réplication, l'ADN polymérase ne réplique pas complètement l'extrémité 5' terminale des chromosomes, ce qui entraîne la perte d'une petite partie du télomère » (Watson, 1972). Cette prédiction allait susciter un certain intérêt qui n'aura été réellement être démontrée que quelques dizaines d'années plus tard. Par la suite, Olovnikov formule une théorie présentant le problème de la réplication selon laquelle la perte progressive des télomères constituerait une horloge biologique qui déterminerait le vieillissement cellulaire. Ce modèle assigne aux télomères une fonction vitale expliquant que la durée de vie cellulaire est limitée. Le raccourcissement des chromosomes conduirait à l'élimination de gènes essentiels, ce qui diminuerait la vitalité des cellules jetant les prémices de la théorie du rôle des télomères dans le vieillissement cellulaire (Olovnikov, 1973).

Selon ce modèle, la réplication incomplète des extrémités serait à l'origine du raccourcissement se produisant après chaque division cellulaire. Cette réplication incomplète s'explique par l'incapacité des ADN polymérases à synthétiser l'ADN aux extrémités. En effet, les ADN polymérases conventionnelles ne peuvent synthétiser que des extrémités selon la polarité 5'→3'. Ainsi l'extrémité 5' du « brin retardataire » sera plus courte après l'élimination des amorces d'Okazaki. Néanmoins, les pertes induites par la réplication incomplète ne permettent pas d'expliquer pour autant la totalité des pertes télomériques observées après chaque cycle. Cette perte progressive et non compensée des télomères tend à déstabiliser le chromosome, les cellules arrêtent la profération cellulaire lorsque les télomères atteignent une taille critique. On parle alors de sénescence.

4. Configuration des télomères

a) Structures des télomères *in vitro* en quadruplex G

La structure des télomères est primordiale pour les interactions télomériques, l'activité télomérase et les événements de recombinaison aux télomères. De par leurs séquences, les télomères peuvent adopter plusieurs conformations en fonction de leur taille et de leur environnement. L'extension télomérique simple brin en 3', riche en guanine, forme une structure secondaire stabilisée par les interactions entre guanine. Ce simple brin va se replier sur lui-même en une structure à quatre brins maintenue par des tétrades coplanaires de guanines (ou "G-quartet"), d'où son nom de "quadruplexes" de guanines dont l'existence a été démontré *in vitro*. Observés dans les macronoyaux des ciliées, *Stylonychia lemnae*, les G-quadruplexes sont très différents de la structure classique en double hélice (Schaffitzel et al., 2001). Ces structures sont formées par des interactions hydrogènes de type Hogsteen-Green entre quatre guanines et un cation (Henderson et al., 1987; Henderson et al., 1990) chélaté (Na⁺, K⁺), formés par l'association de brins parallèles ou anti-parallèles (Figure 2).

Chez *Oxytricha Nova*, la stabilisation de ces structures (par des ions K⁺) semble ralentir *in vitro* l'élongation des télomères par la télomérase (Zahler et al., 1991). La structure cristalline d'un G-quadruplexe a été décrite pour les séquences télomériques humaines (Parkinson et al., 2002). La mise en évidence de ligands radiomarqués stabilisant les G-quadruplexes aux extrémités des chromosomes humains a permis d'envisager l'existence *in vivo* de ces structures au sein des télomères (Granotier et al., 2005). Selon les modèles établis, cette configuration joue plusieurs rôles dans l'homéostasie des télomères. Les structures dites intramoléculaires assureraient la protection et la régulation de la taille des télomères, en séquestrant l'extension télomérique simple brin et limitent l'accès de la télomérase. De plus, il a été proposé que ces structures intramoléculaires (anti-parallèle /parallèle) facilitent la compaction des télomères et plus particulièrement celle de l'extension télomérique simple brin (Ambrus et al., 2006), (Parkinson et al., 2002).

Face à ces structures secondaires, la télomérase ne peut allonger efficacement les télomères (Sun et al., 1997). Compte tenu de ces propriétés, des stratégies anti-tumorales basées sur l'exploitation de ces ligands stabilisant les G-quadruplexes, ont été développées. Ainsi, des ligands stabilisant ces structures vont empêcher l'extension des télomères perturbant la protection

des télomères aussi bien dans les cellules exprimant la télomérase que dans celles maintenant leurs télomères par la voie ALT (Pennarun et al., 2005).

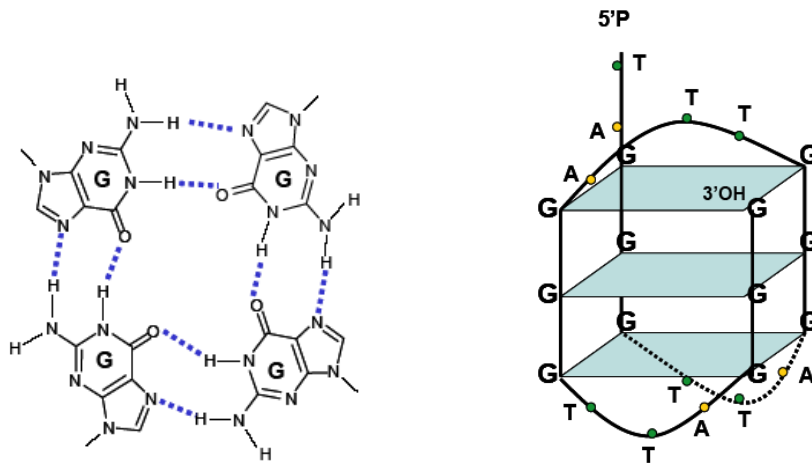


Figure 2 : Représentation schématique des quadruplexes de Guanines :

A gauche, représentation d'une structure coplanaire de 4 guanines appariées par des liaisons de type Hoogsteen-Green. A droite, une représentation tridimensionnelle d'un quadruplexe de Guanines formé au sein d'une même molécule : complexe G-quadruplexes unimoléculaire.

b) Structures des télomères *in vitro* en boucle T

Il a été mis en évidence une structure sous forme de boucle à l'extrémité des télomères (Griffith et al., 1999). Ces boucles T, observées chez la souris, homme ou protozoaire semblent être une structure très conservée durant l'évolution (Griffith et al., 1999) (Munoz-Jordan et al., 2001). Chez l'homme et la souris, la taille de cette boucle varie selon la taille des télomères allant de 3kb (pour des télomères de 8kb) dans les cellules lymphocytaires humaines à environ 18kb dans des cellules murines (pour des télomères de 40kb). Cette boucle T provient de la séquestration de l'extension riche en G prévenant une éventuelle signalisation des télomères comme cassures (Figure 3).

De telles structures ont été mises en évidence en microscopie électronique en présence d'ADN télomérique nu ou associé à des protéines télomériques (Griffith et al., 1999). La boucle T se formerait à la suite de l'invasion spécifique de l'extrémité 3' simple brin des télomères dans la partie double brin. Une telle structure serait favorisée par des protéines spécifiques des télomères tels que TRF1 et TRF2 qui se fixent directement sur l'ADN télomérique (Bianchi et al., 1997; van Steensel et al., 1998). La protéine TRF2 favoriserait l'invasion de l'extrémité simple brin dans une région double brin plus en amont donnant lieu à une structure sous forme de boucle T

(Amiard et al., 2007). Ainsi, l'extrémité 3' ne serait pas reconnue par les mécanismes de surveillance des dommages de l'ADN et de la machinerie de recombinaison.

L'accès de l'extrémité télomérique 3' à l'ARN matrice de la télomérase est restreint par cette configuration des télomères. Selon le cycle cellulaire, les boucles T régularaient l'activité de la télomérase aux télomères.

Ces séquences sont associées à des protéines spécifiques regroupées sous le nom générique de « Shelterin » (de Lange, 2005).

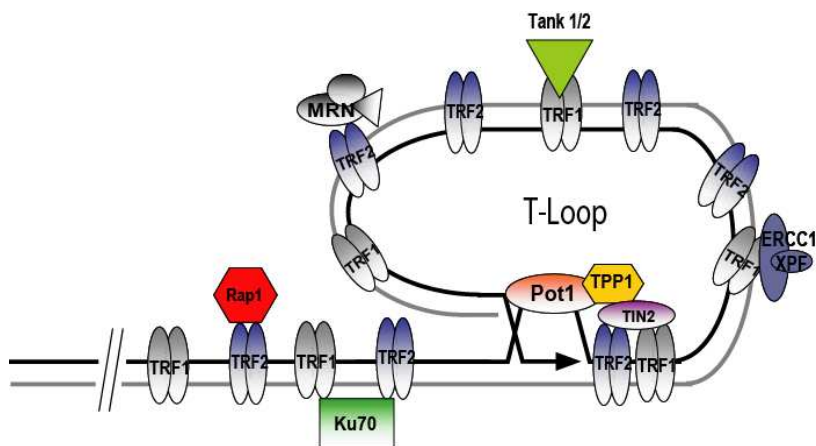


Figure 3 : Représentation schématique de la structure télomérique en boucle T
Les télomères sont dessinés sous leurs conformations protectrices en présence des différents partenaires télomériques participant à leurs maintiens.

III. Facteur protéique des télomères

Les télomères sont organisés sous forme de complexe nucléoprotéique formé de 6 protéines associées plus ou directement à l'ADN télomérique. Par analogie avec d'autres complexes impliqués dans la maintenance des chromosomes comme cohésine ou condensine, on parle dans ce cas de « Shelterin » pour qualifier l'ensemble du complexe télomérique comprenant : trois éléments (TRF1, TRF2, POT1) interagissant directement avec les séquences télomériques et trois autres (RAP1, TIN2, TPP1) formant un complexe permettant de distinguer les télomères de l'ADN endommagé. Ce complexe protéique est impliqué dans la formation de la boucle T qui régule l'accès de la télomérase aux télomères. Il est exprimé de manière ubiquitaire et abondante aux télomères, certaines estimations déterminent sa présence à une centaine de copies tout le long

du télomère. En absence de cette protection, les télomères sont reconnus comme des cassures et sont réparés de manière inappropriée. Ce complexe agirait de concert avec les différentes protéines de la réparation de l'ADN pour ainsi remodeler la structure de l'ADN télomérique et protéger les extrémités des chromosomes. Le Shelterin façonne la structure tridimensionnelle des extrémités des chromosomes. Chacune de ces composantes remplit des rôles bien distincts :

- Les protéines TRF1 et TRF2 se lient à l'ADN télomérique double brin et régulent la taille ainsi que la stabilité des télomères.
- TIN2 partenaire de TRF1 et TRF2 régule l'accès de la télomérase et par conséquent la taille des télomères.
- RAP1 partenaire de TRF2 régule la taille des télomères ainsi que la stabilité des télomères
- POT1 protège l'extension simple brin compte tenu de son affinité pour le simple brin
- TPP1 partenaire de TRF2/POT1/TIN2 module la présence de POT1 aux télomères

1. TRF1

TRF1 (Telomere Repeat binding Factor 1) a été identifié par 2 approches indépendantes, l'une basée sur la recherche de facteurs capables de se fixer sur l'ADN télomérique par analogie avec la protéine Rap1p chez *S.Cerevisiae* (Zhong et al., 1992) et l'autre basée sur la recherche de protéines présentant des domaines susceptibles de reconnaître des séquences télomériques. Cette protéine de 439 aa possède 3 domaines un domaine riche en acides aminés acides, un domaine de dimerisation TRFH propre à la famille des TRF (Telomere Repeat binding Factor) (ex : TRF2), et un domaine Myb responsable de son affinité avec l'ADN (Figure 4).

Chez l'homme, deux formes distinctes de 20 aa sont formées suite à un épissage alternatif (Shen et al., 1997; van Steensel and de Lange, 1997). Ces 2 formes ont des fonctions identiques. Chez la souris, une seule forme est exprimée (Broccoli et al., 1997). Sous forme d'homodimère, TRF1 se lie spécifiquement aux séquences de motifs TTAGGGTTA double brin linéaire ou circulaire par le biais de son domaine Myb (Bianchi et al., 1997; Chong et al., 1995). En effet, sa dimérisation décuple son affinité pour l'ADN télomérique. *In vivo*, TRF1 se lie à des motifs TTAGGG quelque soit leur localisation sur le chromosome (séquences télomériques interstitielles ou terminales) (Krutilina et al., 2001; Smogorzewska et al., 2000). Par ailleurs, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine ont montré que la quantité de protéine TRF1 associée à l'ADN télomérique était proportionnelle à la taille des télomères (Loayza and De Lange, 2003). Par ces différents aspects, TRF1 présente plusieurs similitudes avec Rap1p. TRF1

est associé spécifiquement aux télomères humains et murins dans les cellules mitotiques et méiotiques quelque soit la phase du cycle (Broccoli et al., 1997; Chong et al., 1995; van Steensel and de Lange, 1997). L'analyse double hybride a permis d'isoler les partenaires directes de TRF1: TIN2 et la Tankyrase. Parmi les autres partenaires, nous retrouvons l'hétérodimère Ku70/80 et BLM (Hsu et al., 2000; Opresko et al., 2002). A cela s'ajoute ATM, capable de phosphoryler TRF1 et de modifier son affinité avec l'ADN télomérique (Kishi et al., 2001). TRF1 joue un rôle majeur dans le contrôle de la taille des télomères en régulant négativement leur longueur.

2. Protéines interagissant avec TRF1

Pour réguler l'accès aux télomères et contrôler la taille des télomères, TRF1 interagit avec des protéines télomériques formant un complexe efficace contre une élongation effectuée par la télomérase. Parmi ces éléments, nous retrouvons tout d'abord TIN2.

a) TIN2

Identifié par double hybride avec TRF1, TIN2 (TRF1-Interacting Nuclear protein 2) est une petite protéine possédant un domaine d'interaction avec TRF1 en C-terminal (Kim et al., 1999). TIN2 est constitué d'un domaine N-terminal basique, un domaine central acide et un domaine de liaison à TRF1. Avec son domaine N-terminal, TIN2 interagit avec TPP1 et TRF2. *In vivo*, TIN2 colocalise avec TRF1, TRF2 et TPP1 aux niveau des télomères (Kim et al., 1999; Loayza and De Lange, 2003). Son association avec les 3 partenaires capables de se lier aux séquences télomériques (TRF1, TRF2 et POT1 par le biais de TPP1), font de TIN2 un membre très influent du Shelterin. TIN2 peut se lier simultanément à TRF1 et TRF2 permettant d'augmenter leurs affinités pour l'ADN télomérique (Kim et al., 2004),(Ye et al., 2004a). L'invalidation de TIN2 conduit à une létalité précoce chez la souris confirmant que son rôle stabilisateur au sein du complexe télomérique est indispensable à la survie cellulaire (Karlseder et al., 2003); (Chiang et al., 2004); (Iwano et al., 2004).

Avec la Tankyrase et TRF1, TIN2 forme un complexe ternaire dans lequel il stabilise l'interaction TRF1-Tankyrase (Ye et al., 2004a).

b) Tankyrase 1 et 2

Cloné par double hybride avec TRF1 la tankyrase1 et 2 (TRF1-interacting ankyrin-related (ADP-ribose) polymerase) codent pour des protéines ubiquitaires qui colocalisent avec TRF1 au niveau

des télomères (Smith et al., 1998a); (Kaminker et al., 2001) ; (Sbodio et al., 2002). Tankyrase 1 et 2 sont décrites au départ comme des protéines synthétisant des résidus poly(ADP) sur la protéine TRF1 (Cook et al., 2002; Smith et al., 1998b). La régulation de TRF1 est orchestrée par les Tankyrase 1 et 2. La fonction de la Tankyrase ne se résume pas seulement à ses interactions télomériques (Sbodio et al., 2002; Smith and de Lange, 2000) (Chi and Lodish, 2000). Elle est aussi présente au niveau de l'appareil de Golgi et des pores nucléaires ou des centrosomes. Il a été montré *in vitro* que la Tankyrase catalyse la poly(ADP)ribosylation de TRF1, modifiant son affinité pour l'ADN télomérique (Smith et al., 1998b).

c) PINX1

Par une approche double hybride, PINX1 a été isolé comme interagissant avec TRF1 (Zhou and Lu, 2001). PINX1 est exprimé de manière ubiquitaire et colocalise avec TRF1 au niveau du nucléole. Dans sa partie C-terminal, PINX dispose d'un domaine d'interaction avec la télomérase appelé TID (Telomerase Inhibitory Domain). Son action régule l'activité de la télomérase par l'intermédiaire de TRF1.

3. TRF2

TRF2 (Telomere Repeat binding Factor 2) a été identifié sur la base de recherches d'homologie de séquences avec le domaine Myb de TRF1 ainsi que de l'identification des facteurs capables de se fixer sur de l'ADN télomérique (Bilaud et al., 1997; Broccoli et al., 1997). Le clonage du cDNA révèle une protéine de 500 acides aminés avec un domaine de dimérisation TRFH, un domaine de liaison à l'ADN Myb ainsi qu'une séquence NLS (Nuclear Localisation Sequence) en position N-terminal riche en d'acides aminés basiques riche en arginine (Figure 4). TRF1 et TRF2 diffèrent par leur domaine N-terminal qui est riche en acides aminés acides pour TRF1 et basiques pour TRF2. *In vitro*, TRF2 est capable de se lier aux séquences TTAGGG.

Les structures TRFH des protéines TRF1 et TRF2 sont très proches, mais un encombrement stérique empêche l'hétérodimerisation TRF1 et TRF2 garantissant des interactions distinctes avec d'éventuels partenaires. TRF1 et TRF2 partagent la même configuration spatiale mais TRF2 forme plus facilement des oligomères ordonnées (Stansel et al., 2001).

TRF1 interagit avec 2 autres éléments du Shelterin TIN2 et RAP1 (Li et al., 2000); (Houghtaling et al., 2004),(Ye et al., 2004a). Par ailleurs, des interactions avec les protéines POT1 (Yang et al., 2005), ATM, hélicases RecQ (BLM, WRN) (Opresko et al., 2002), et Ku70/80 (Song et al.,

2000) ont été décrites. A l'image de TRF1, TRF2 est un gène essentiel. Son abolition, chez la souris TRF2^{-/-}, conduit à une létalité embryonnaire précoce (Celli and de Lange, 2005). L'étude de ses fonctions n'est rendue possible que par l'utilisation d'un dominant négatif TRF2 Δ B Δ M ou d'un allèle codant pour une délétion conditionnelle.

4. Rap1

Identifié d'abord chez la levure, RAP1 (Repressor Activator Protein1) est essentiel à la viabilité cellulaire. Chez la levure, il est impliqué dans la régulation de la taille des télomères. Cette protéine se fixe aux télomères à l'aide de 2 domaines Myb. Chez l'homme, hRap1 a été identifié comme partenaire de TRF2 par un crible double hybride (Li et al., 2000); (Zhou and Lu, 2001). Cette protéine de 399 aa dispose de 3 domaines : un domaine N-terminal BRCT (motif d'interaction protéine-protéine), un domaine central MYB (hélice-tour-hélice), un domaine RCT (homologie à RAP1p C terminus), un domaine COIL, et en position C-terminal un domaine NLS (Nuclear Localisation Signal) (Figure 4). Le domaine RCT régule aussi bien les interactions homotypiques que celle avec TRF2.

hRAP1 a été localisé au niveau des télomères par immunofluorescence mais contrairement à son orthologue chez la levure Rap1p, il n'interagit pas directement avec les séquences télomériques humaines ainsi que l'attestent les expériences de retard sur gel (Li et al., 2000). Contrairement aux deux autres facteurs télomériques TRF1 et TRF2, hRAP1 n'agit pas sous forme d'homodimère. La charge globale d'un seul domaine Myb ne lui suffit pas à interagir directement avec l'ADN télomérique (Hanaoka et al., 2001). Il serait recruté aux télomères par l'intermédiaire de TRF2. A cet égard, hRAP1 apparaît plus proche de son orthologue chez *S. Pombe* qui est lui aussi recruté aux télomères par l'intermédiaire de Taz1 (homologue de TRF2) (Chikashige and Hiraoka, 2001), (Kano and Ishikawa, 2001). Des études de spectrométrie de masse indiquent que RAP1 interagit avec des éléments de la réparation tels que le complexe MRE11/RAD50/NBS1 et PARP (O'Connor et al., 2004). RAP1 a pour fonction de réguler la taille et l'hétérogénéité de télomères. Toutefois, la létalité des souris KO RAP1^{-/-} suggère que cette protéine peut être cruciale pour la protection des télomères de mammifères.

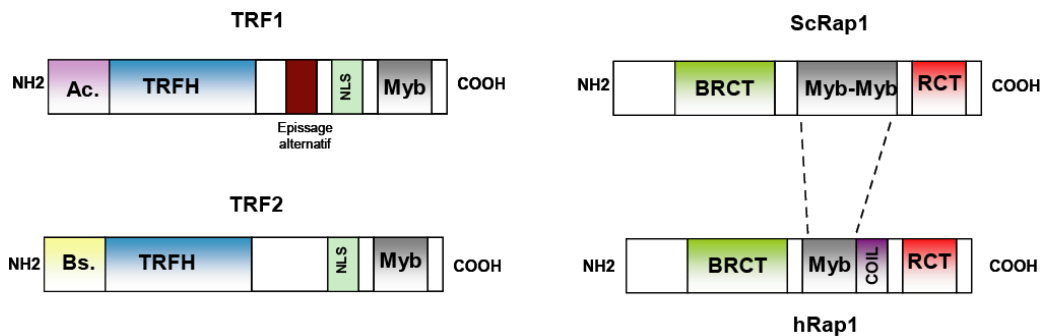


Figure 4 : Représentation schématique de la structure de TRF1, TRF2 et Rap1 chez la levure *S.Cerevisiae* (ScRap1) et chez l'homme (hRap1)

Les domaines N-terminal des protéines TRF1 et TRF2 se distinguent par leur composition en acides aminés (respectivement riches en acides aminés dits acides (Ac) et basiques (Bs)). Durant l'évolution, un domaine Myb a été perdu au niveau de hRap1, empêchant toute interaction directe et stable entre Rap1 et les séquences télomériques humaines

5. POT1

Le gène POT1 (Protection of telomeres 1) a été identifié sur la base de recherches d'homologies de séquences avec le domaine de fixation à l'ADN de TEBP α , protéine télomérique chez le cilié ainsi que son homologue chez *S.Pombe* (Baumann and Cech, 2001). Le gène hPOT1 comporte 22 exons codant pour cinq protéines hPOT1 distinctes, produits d'un épissage alternatif, chacune pouvant ainsi avoir un rôle différent dans la régulation des télomères (Baumann et al., 2002). POT1 possède un domaine N-terminal capable uniquement de fixer l'ADN télomérique simple brin (riche en G) à l'aide de 2 domaines oligonucléotide /oligo-saccharides binding (OB) (Lei et al., 2004). L'analyse cristallographique de POT1 révèle une association préférentielle pour les séquences TAG de l'extrémité 3' libre (Lei et al., 2004; Liu et al., 2004). *In vivo*, la présence de POT1 aux télomères est conditionnée par domaines OB et de son interaction avec la protéine TPP1 (Liu et al., 2004); (Ye et al., 2004b).

Les cellules humaines expriment 2 formes de POT1 provenant de transcrits alternatifs : l'une code une protéine complète, l'autre code une forme tronquée POT1-55 (perte d'un domaine OB) (Loayza et al., 2004), (Hockemeyer et al., 2005). Cette forme, moins abondante, conserve son interaction avec TPP1 mais se révèle incapable de fixer l'ADN télomérique simple brin. La fonction de cette forme tronquée demeure inconnue dans les cellules humaines.

Le génome de la souris code deux protéines distinctes de POT1 référencée sous le nom POT1a et POT1b capables tout deux de se lier à l'ADN télomérique (Hockemeyer et al., 2006); (Wu et al., 2006). Malgré une forte similitude, leurs fonctions ne semblent pas redondantes. Il apparaît surprenant que le gène POT1 se duplique chez la souris et diverge aussi rapidement dans

l'évolution produisant deux protéines distinctes avec des fonctions différentes en dépit de la faible plasticité du génome de mammifères.

POT1 joue un rôle crucial dans la régulation de la taille des télomère et constitue le dernier maillon de la cascade de régulation de la longueur dépendante du Shelterin en facilitant ou non l'accès à la télomérase (Liu et al., 2004; Loayza et al., 2004; Ye et al., 2004b). Toutefois, il intervient dans d'autres étapes essentielles à la fonction télomérique (fera l'objet d'un paragraphe ultérieurement) (Hockemeyer et al., 2005), (Yang et al., 2005), (Veldman et al., 2004).

6. TPP1

Mis en évidence par spectrométrie de masse et par des approches doubles hybrides, comme partenaire de TRF1 et TIN2, TPP1 interagit à la fois avec TIN2 et POT1 (Houghtaling et al., 2004) (Liu et al., 2004; Loayza et al., 2004; Ye et al., 2004b). Le domaine C-terminal interagit avec le domaine N-terminal de TIN2 et son domaine central interagit avec le domaine C-terminal de POT1. TPP1 ou PTOP joue un rôle important dans le recrutement de POT1 aux télomères. L'inhibition de la fonction TPP1 conduit à une élongation inappropriée compromettant l'association de POT1 aux télomères (Liu et al., 2004; Ye et al., 2004b). Un défaut d'épissage de TPP1 a été identifiée chez des patients atteints de dysplasie adrencortical (ACD) défaut de l'appareil urogénital confirmant l'importance des protéines du Shelterin dans le développement embryonnaire (Keegan et al., 2005).

7. Apollo

Apollo a été identifié sur la base de cribles doubles hybrides réalisés avec le domaine N-terminal TRF2 (Lenain et al., 2006) et d'études de spectrométrie de masse en tant que partenaire de hRAP1 (van Overbeek and de Lange, 2006). Cette protéine, originellement appelée hSNM1B, puis Apollo en référence à sa forte homologie avec Artémis, fait partie des 3 gènes chez le mammifère codant pour les protéines de la famille des metallo- β -lactamases à domaines B-CASP (Callebaut et al., 2002). Ainsi, SNM1A et B ont d'abord été mis en évidence pour leur participation dans la réparation des pontages inter brins (Richie et al., 2002) alors que SNM1C (Artémis) intervient dans la recombinaison V(D)J ainsi que la réparation des cassures doubles brins. Le domaine C-terminal d'Apollo interagit avec le domaine TRFH de TRF2 (Freibaum and

jusqu'à ce qu'elle acquiert de nouveaux télomères après avoir capturé des séquences sur un autre chromosome par un échange non réciproque, ou fusionné avec sa chromatide sœur démarrant à nouveau un cycle BFB (Bridge/Fusions/Breakage).

Par conséquent, les télomères permettent aux cellules de conserver leurs chromosomes intacts. Leurs structures permettent à la cellule de distinguer un chromosome intact d'une lésion chromosomique.

2. Effet de position des télomères dans la transcription

Chez *S.Cerevisiae*, les marqueurs insérés à proximité des télomères sont fréquemment réprimés mais répliqués en phase S. Ce phénomène est référencé « TPE » ou Telomere Position Effect. Cet état « silencieux » des télomères est un processus dynamique qui répond à divers *stimuli* tels que les lésions de l'ADN ou le raccourcissement des télomères. Lors du raccourcissement des télomères, les répresseurs seraient libérés dans le noyau modifiant l'expression des gènes sur des sites non télomériques (Dubrana et al., 2001). En 1992, Wright propose que les changements progressifs observés dans les cellules présénescences s'expliqueraient par une réorganisation de la chromatine télomérique, à l'origine de la répression de certains gènes en position subtélomérique (ie télomère court, gène réprimé). (Wright and Shay, 1992). Pourtant, le TPE est encore peu décrit chez l'homme. Certaines études montrent toutefois que certains gènes sont faiblement réprimés aux abords des télomères (Kilburn et al., 2001). Par la suite, Baur et ses collègues ont mis en évidence une répression transcriptionnelle à proximité des télomères humains (Baur et al., 2001). En plaçant le gène rapporteur de luciférase à proximité des séquences interstitielles ou télomériques, ils démontraient qu'en position télomérique l'expression du gène est fortement réduite. Dans le même temps, la surexpression de la télomérase (élongation des télomères) réprime l'expression du gène de la luciférase indiquant un lien entre la taille des télomères et le TPE, bien que ce lien soit inverse de celui proposé par Wright et Shay. A l'opposé, la surexpression de TRF1, induisant un raccourcissement des télomères, lève la répression confirmant le lien entre le raccourcissement des télomères et les changements d'expression génique (Koering et al., 2002). Pourtant, des travaux réalisés au sein du laboratoire montrent que l'expression d'un marqueur intégré en position télomérique n'est pas influencée par la longueur des télomères réfutant le lien entre le TPE et la taille des télomères (Sprung et al., 1996). Par ailleurs, il a été suggéré que le remodelage de la chromatine et notamment l'hyoacétylation des histones des séquences télomériques pouvait moduler la TPE. En effet,

l'inhibition de la desacétylation par la TSA (Trichostatine A) augmente l'expression aux abords des séquences télomériques. (Baur et al., 2001; Koering et al., 2002). Un lien entre la taille des télomères et le statut épigénétique des télomères a été proposé. Ainsi, le raccourcissement des télomères remodelerait la chromatine télomérique et subtélomérique. En résumé, le raccourcissement induit une hyperacétylation des histones qui lève la répression de certains gènes à proximité des télomères pouvant expliquer les variations d'expression lors de la sénescence (Benetti et al., 2007a; Blasco, 2007; Gonzalo and Blasco, 2005; Gonzalo et al., 2005). Nous pouvons alors nous interroger sur l'influence du TPE sur le vieillissement.

Ainsi, il a été montré chez la souris qu'un transgène B-globin /LacZ est réprimé progressivement avec l'âge (Robertson et al., 1996) laissant entendre que le raccourcissement des télomères était responsable de cette modification d'expression.

3. Rôle des télomères comme horloge biologique

Le raccourcissement progressif des séquences télomériques, observé *in vitro* au cours des divisions mitotiques ou *in vivo* en fonction de l'âge, constituerait une horloge biologique (Olovnikov, 1973), (Allsopp et al., 1992; Hande et al., 1999; Harley et al., 1990; Hastie et al., 1990; Vaziri et al., 1994). La taille des télomères permet d'établir l'historique répliquative de la cellule en déterminant le nombre de divisions cellulaires déjà réalisées et de prédire le nombre de divisions qui restent à effectuer. Ce décompte à chaque division cellulaire, constitue alors une horloge mitotique.

Le nombre de divisions réalisées par une cellule humaine serait corrélée à la longueur des télomères (Bodnar et al., 1998b). L'érosion télomérique, jugée responsable de la diminution des capacités prolifératives, a été mise en évidence dans les cellules présentant une activité mitotique mais pas dans les cellules post mitotiques (Allsopp et al., 1992; Hande et al., 1999; Harley et al., 1990; Hastie et al., 1990; Lansdorp, 1995; Vaziri et al., 1994). Ainsi, la sénescence répliquative fait référence à un nombre cumulé de divisions cellulaires et non à un temps préalablement défini.

V. Sénescence et immortalisation cellulaire

1. Sénescence

La réplication d'un chromosome s'accompagne d'un raccourcissement progressif des répétitions télomériques en l'absence de mécanisme spécifique de compensation. Le raccourcissement des télomères au-dessous d'une taille critique dans les cellules humaines primaires cultivées *in vitro*

conduit à la sénescence. Cette notion de taille critique est en effet discutée dans la littérature. Des travaux réalisés au sein du laboratoire montrent que la taille moyenne des télomères responsable de l'entrée en crise est différente d'une lignée à l'autre. Il n'est pas exclu qu'un faible nombre de télomères, ayant atteint une taille critique (10% de télomères courts selon Shay), (Zou et al., 2004b) soit suffisant pour induire l'entrée en crise (Ducray et al., 1999). La sénescence a été mise en évidence dans des fibroblastes humains en culture qui, après un nombre limité de divisions cellulaires, arrêtaient de proliférer (Hayflick, 1965). On parle de sénescence cellulaire. La sénescence se distingue de la quiescence par son aspect irréversible. En effet, la sénescence constituerait un arrêt définitif de la croissance cellulaire après que les cellules aient réalisé un nombre précis de divisions cellulaires. Delà est née la notion de limite d'Hayflick. Elle caractérise le nombre moyen de division au delà duquel les cellules ne peuvent plus se diviser et entrent dans un état dit de sénescence réplivative. La limite d'Hayflick varie selon deux paramètres : la taille initiale et le taux de raccourcissement des télomères déterminé mathématiquement par la théorie d'Olovnikov (Figure 6). Toutefois, dans certaines conditions, une reprise de la prolifération cellulaire est possible. En effet, l'inhibition d' ATM, CHK1 ou CHK2 autorise une reprise de la prolifération cellulaire des cellules sénescents (d'Adda di Fagagna et al., 2004).

Bien que métaboliquement actives, les cellules sénescents se distinguent par leur incapacité à répliquer l'ADN. La transition qui s'effectue lors de ce processus s'apparente à la différenciation cellulaire puisqu'elle est irréversible et qu'elle s'accompagne de changements morphologiques et d'expression génique (Dimri et al., 1995). La sénescence est généralement accompagnée d'un élargissement et d'un aplatissement des cellules avec un cytoplasme plus grand et plus granulaire. Parmi ces changements d'expression génique, certains contribuent à l'émergence de la sénescence alors que d'autres en sont la conséquence. Le premier groupe correspond aux gènes codant pour des facteurs déclenchent la sénescence tels que p21WAF1 et p16INK4a (Alcorta et al., 1996; Noda et al., 1994) ou des inhibiteurs de la prolifération cellulaire. Le second groupe fait référence aux gènes du métabolisme dont l'expression est modifiée suite à l'activation de la sénescence. Nous retrouvons le gène codant pour la SA- β -galactosidase (SA pour senescence-associated), biomarqueur de la sénescence (Dimri et al., 1995).

Le signal d'entrée en sénescence serait émis une fois la taille critique des télomères atteinte. Seuls quelques télomères courts suffisent à déclencher cette entrée (Hemann et al., 2001). Par exemple chez la levure, la perte d'un seul télomère suffit à déclencher un signal antiprolifératif

(Sandell and Zakian, 1993). La perte d'un télomère pourrait être à l'origine d'une instabilité chromosomique au moment de l'anaphase, provoquant l'activation des mécanismes de veille de l'ADN (principalement P53) qui constituerait le signal de sénescence. Ainsi, la seule perte d'un télomère pourrait suffire à déclencher l'arrêt du cycle cellulaire alors que la majorité des séquences télomériques demeurent intactes.

2. Immortalisation cellulaire

L'immortalisation est un événement rare qui résulte de la perte du programme de sénescence, suivie de l'activation des mécanismes de maintien des télomères. Les cellules nécessitent l'inactivation conjuguée de P53 et PRB ainsi que l'activation des mécanismes d'élongation des télomères. La première étape permet aux cellules de 'affranchir de la sénescence, pour ensuite activer les oncogènes.

Cette barrière proliférative M1 (Mortality Stage 1) peut être levée en inactivant les protéines responsables du cycle cellulaire (Shay et al., 1991). Ainsi, l'inactivation de p53 et pRb permet aux cellules d'échapper à la sénescence et de continuer de se diviser. Cette voie de contournement de la sénescence aboutit à l'acquisition d'un nouveau potentiel de divisions cellulaires avec une perte supplémentaire des télomères. Les divisions forcées de ces cellules provoquent la diminution de la taille de leurs télomères ce qui accroît l'instabilité génétique (Counter et al., 1992; Ducray et al., 1999).

Toutefois, la prolifération de ces cellules est limitée par une deuxième barrière proliférative, la crise ou une catastrophe génétique, caractérisée par une forte instabilité chromosomique et une mort cellulaire massive. De nouvelles anomalies génétiques sont à l'origine d'un phénomène très rare d'adaptation et de transformation cellulaire. Cette période débute dès la sénescence se poursuivant pendant plusieurs divisions cellulaires, jusqu'à la restauration de la fonction télomérique. La stabilisation, voire l'allongement de la longueur des télomères est requis pour le processus de cancérogenèse après la crise. Lorsque le gène codant pour hTERT (sous-unité catalytique de la télomérase) est introduit dans des cellules primaires en culture, l'activité télomérase est reconstituée, la longueur des télomères est maintenue et les cellules échappent au contrôle normal de la sénescence: ces cellules deviennent immortelles (Bodnar et al., 1998a).

Certaines cellules, ayant surmonté la crise, peuvent maintenir la taille des télomères indépendamment de la télomérase. Les télomères les plus courts peuvent être allongés par des

mécanismes d'élongation comparable à ceux de la recombinaison homologue on parle alors de mécanisme alternative de maintien des télomères (ALT).

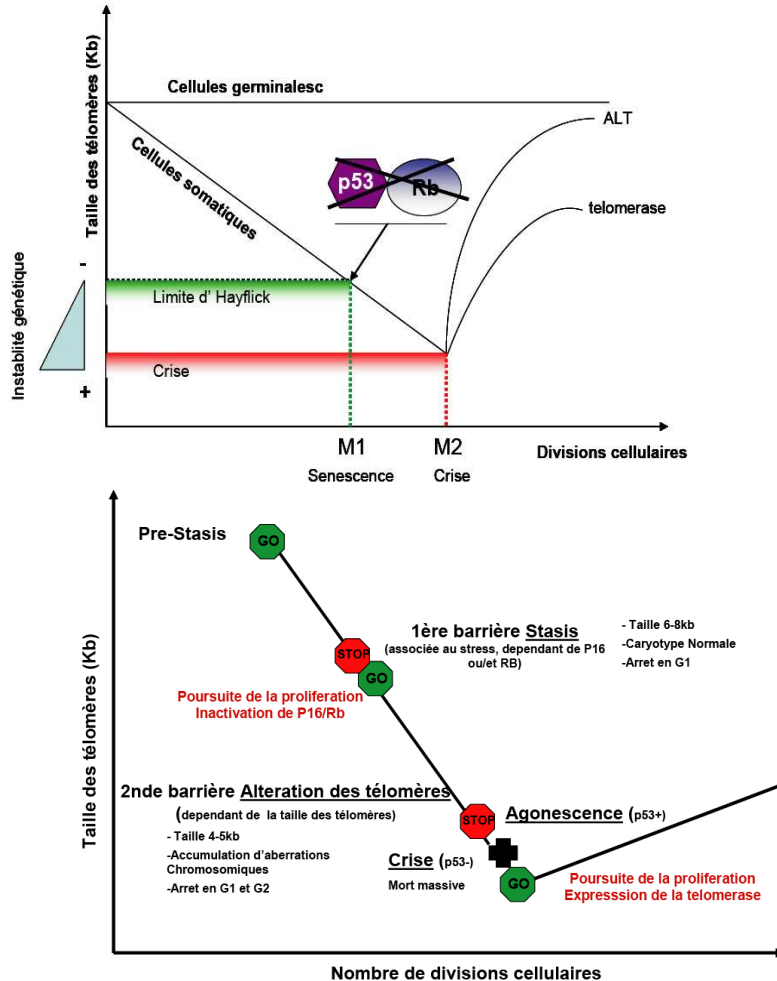


Figure 6 : Hypothèse télomérique:

La taille des télomères raccourcit progressivement après chaque division cellulaire conduisant à terme à un arrêt de croissance dépendant de p53 et Rb. L'inactivation de p53 et Rb permet la poursuite des divisions cellulaires pour entraîner à terme un raccourcissement important des télomères. L'érosion des télomères a lieu jusqu'à ce que ceux-ci soient incapables de protéger leurs extrémités conduisant à la crise, à des remaniements chromosomiques voire à la mort cellulaire. De rares clones émergent de la population en crise. Ces clones maintiennent leurs télomères par 2 mécanismes distincts : l'activation de la télomérase ou l'activation du mécanisme ALT (inspiré de Steward 2003).

Modèle moléculaire définissant des barrières de sénescence pour des cellules épithéliales. Ce modèle postule l'existence de 2 barrières de prolifération. L'une non télomérique dépendante de P16/Rb on parle de Stasis. Cette barrière peut être franchie suite à l'inactivation de la voie PRB/P16. La deuxième barrière est dépendante de la taille des télomères. Selon le statut de p53, on parle d'Agonescence ou de Crise. D'après (Garbe et al., 2007).

Le modèle décrivant la vie répliquative des cellules épithéliales diffère en plusieurs points de celui présenté ci-dessus (Figure 6). Ce modèle postule deux barrières prolifératives. L'une dépendante des conditions environnementales (stress) l'autre prenant compte de l'érosion des télomères. La

première est nommée « Stasis » (Drayton and Peters, 2002), (auparavant « selection » (Hammond et al., 1984). A ce stade, ces cellules sont bloquées en phase G1 et sont caractérisées par un caryotype normal, certains marqueurs métaboliques ou morphologiques (SA galactosidase, vacuole) commun aux cellules sénescents (Hammond et al., 1984; Romanov et al., 2001; Stampfer, 1982; Stampfer et al., 2003). Dans certaines conditions de stress, une population cellulaire émerge et prolifère (Hammond et al., 1984; Holst et al., 2003). Ces cellules accumulent de multiples altérations (mutation de PRB ou P16, méthylation du promoteur de P16 et surexpression de la cycline CDK4) (Brenner et al., 1998; Romanov et al., 2001) leur permettant de s'affranchir du blocage pour proliférer jusqu'à atteindre la seconde barrière proliférative : « l'Agonescence » (Romanov et al., 2001). Cet état se caractérise par un arrêt à chaque phase du cycle. Ces cellules possèdent des télomères extrêmement courts entraînant une forte instabilité chromosomique. Contrairement à la crise, où une forte mortalité cellulaire est observée, ces cellules agonescentes sont viables. Cette distinction ne s'arrête pas là puisque la protéine P53 est fonctionnelle dans les cellules agonescentes alors qu'elle est inactivée dans les cellules en crise (Garbe et al., 2007). Il apparaissait nécessaire de poursuivre l'identification des barrières prolifératives propres aux différents types cellulaires afin de mieux appréhender les mécanismes de la cancérogenèse chez l'homme. Toutefois ces barrières sont souvent déterminées *in vitro*, en particulier pour les cellules épithéliales et reflèteraient plutôt des conditions de cultures peu ou mal adaptées.

Chapitre II. Maintien des télomères par la télomérase, la recombinaison et le Shelterin

I. La télomérase : le maintien des télomères et ses autres fonctions

1. Structure

La télomérase est une enzyme très conservée qui fut décrite la première fois chez le cilié *T. Tetrahymena* en 1985. Cette enzyme est constituée d'un complexe ribonucléoprotéique avec une composante ARN (hTR) et une composante catalytique (hTERT) (Figure 7).

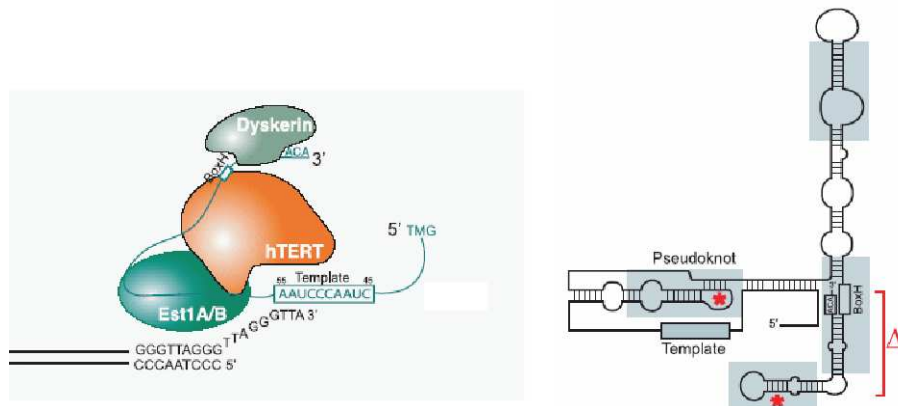


Figure 7 : Représentation de l'holoenzyme de la télomérase composée de la dyskerine, la sous unité catalytique hTERT et de la protéine

A-Est1A associée à la matrice ARN hTR.

B- Structure secondaire de l'ARN matrice hTR avec 4 domaines majeurs dont le domaine Pseudoknot qui possède notamment la séquence matrice complémentaire des télomères (D'après Smogoreswka 2003).

a) hTR

La matrice ARN hTR a été identifiée et clonée chez l'homme en 1995 (Feng et al., 1995). Produite par l'ARN polymérase II, elle est composée de 451 nucléotides et renferme une séquence nucléotidique (5'- CUAACCCUAAC 3') complémentaire de l'extrémité simple brin des télomères. Cet ARN sert de matrice pour la synthèse des répétitions nucléotidiques. Il est exprimé de manière ubiquitaire dans la plupart des tissus mais sa présence ne corrèle pas forcément avec l'activité télomérase (Avilion et al., 1996). La structure secondaire de cet ARN comporte un domaine de type H/ACA à son extrémité 3' (Mitchell et al., 1999) et d'autres

domaines conservés chez les vertébrés impliqués dans diverses fonctions de hTR. hTR est capable de réguler les étapes d'alignements et d'élongation, de contrôler l'assemblage fonctionnel de la télomérase, de moduler son interaction avec hTERT (Chen et al., 2000).

b) hTERT

La sous unité hTERT, composée de 1132 acides aminés, a été clonée en 1997 sur la base de son homologie de séquence avec les protéines EST2p de la levure *Saccharomyces Cerevisiae* et P123 de l'organisme cilié *Euplotes aediculatus* (Kilian et al., 1997); (Meyerson et al., 1997); (Nakamura et al., 1997). La protéine hTERT est une ADN polymérase appartenant à la famille des transcriptases inverses, responsable de l'activité catalytique de l'enzyme. La protéine hTERT est constituée de plusieurs domaines encadrés par les domaines N- et C-terminal : un motif T comprenant le site spécifique de la télomérase, le domaine RT, responsable de son activité catalytique très conservée dans les différents organismes (Bachand and Autexier, 2001). Le domaine N-terminal et le NLS contrôlent la localisation nucléolaire de la télomérase (Yang et al., 2002). L'extrémité C-terminal est impliquée dans la processivité de l'enzyme.

c) Autres partenaires de la télomérase

Bien que l'expression de hTERT et hTR soit suffisante pour reconstituer l'activité catalytique de la télomérase *in vitro* (Beattie et al., 2001; Weinrich et al., 1997), des études biochimiques et génétiques suggèrent que d'autres éléments protéiques complètent hTERT pour former le complexe télomérase. Plusieurs protéines, interagissant avec hTERT et hTR sont nécessaires pour l'assemblage, la conformation et la localisation nucléaire de la télomérase.

Ainsi, il a été démontré que hTERT interagit avec les protéines chaperonnes HSP90, P23 et HSP70 impliquées dans l'assemblage du complexe télomérase, nécessaires à l'activité télomérase *in vitro* et *in vivo* (Forsythe et al., 2001); (Holt et al., 1999). Par ailleurs, EST1a, homologue de Est1 chez la levure, interagirait avec hTERT dans les cellules humaines (Reichenbach et al., 2003). Son rôle demeure méconnu mais la surexpression des formes tronquées de EST1a conduit à des fusions télomériques ainsi qu'à un arrêt du cycle cellulaire. Il semblerait qu'elle soit impliquée dans la protection des télomères (Reichenbach et al., 2003).

hTR est quant à lui associé à des petites protéines nucléolaires comme la dyskerine (Mitchell et al., 1999), NOLA1,2,3 (Dragon et al., 2000) ou encore les ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes hnRNP (Heterogenous Nuclear Ribonucleoprotein) A1, C1/C2 et D.

A ce jour, seule l'implication de la dyskerine dans la régulation *in vivo* de l'activité télomérase a été avérée. En effet, les défauts consécutifs à des mutations du gène DKC1 se caractérisent par une altération de l'activité télomérase. Ces mutations ont été décrites chez des patients atteints du syndrome de dyskeratose congénitale, pathologie qui altère la régénération de tissu à renouvellement rapide chez l'adulte. En fait, il existe une forme de la maladie récessive liée à l'X, due à des mutations dans le gène DKC1 et une forme autosomique dominante, résultant de mutations dans le gène hTR (Vulliamy et al., 2001). Les patients atteints présentent une taille des télomères plus courte et une activité télomérase considérablement réduite suggérant que DKC est nécessaire à la fonction télomérase (Mitchell et al., 1999). De plus, de récents travaux suggèrent que le coeur catalytique existerait sous forme de dimère coopératifs (Beattie et al., 2001), (Wenz et al., 2001). En effet, les deux composantes inactives s'associeraient pour reconstituer l'activité télomérase *in vivo*. Des analyses de spectrographie de masse réalisées à partir de cellules humaines indiquent que le complexe (650kD) serait un dimère de deux entités constituées chacune de hTERT, hTR et de dyskerine (Cohen et al., 2007).

2. Fonctions de la télomérase associées aux télomères

a) Élongation des télomères

La télomérase est une enzyme processive (Greider, 1991) qui synthétise des séquences TTAGGG au niveau de l'extrémité 3' terminale des télomères. Son activité d'élongation est restreinte à la phase S après que les télomères se soient répliqués. En effet, l'expression d'un hTERT marquée (GFP-hTERT) a permis de localiser hTERT dans le nucléole pendant la phase G1/début S et dans le nucleoplasme en fin S/ début G2 (Wong et al., 2002). Elle procède selon plusieurs étapes. Tout d'abord, le complexe va se positionner sur l'extrémité simple brin par le biais de sa matrice hTR. Une fois associée à l'ADN télomérique, la sous unité catalytique amorce l'ajout des séquences télomériques. *In vitro*, il a été montré que la synthèse se poursuit sur plusieurs dizaines de nucléotides alors qu'*in vivo* l'enzyme semble moins processive. Cette différence peut s'expliquer par la présence de facteurs télomériques qui régulent négativement son accès. Enfin, le complexe est déplacé une fois la synthèse achevée. Cette étape ferait appel à une hélicase PIF1 qui dissocierait l'hybride ADN télomérique-ARN matrice (hTR) (Boule et al., 2005; Mateyak and Zakian, 2006; Snow et al., 2007). Par conséquent, PIF1 interagirait avec la sous unité hTERT afin

de limiter sa processivité. Ce mécanisme a été largement décrit chez la levure, mais peu relaté chez les mammifères. Toutefois, il semble que hPIF1 interagisse avec hTERT et que son activité soit régulée selon le cycle afin de moduler l'activité télomérase aux télomères (Mateyak and Zakian, 2006). L'action de la télomérase nécessite une taille minimale pour la matrice ARN mais ne requiert pas une séquence stricte des séquences non matricielles. Dans ce cas, la télomérase continue d'agir mais la modification de ces séquences peut altérer la synthèse ou l'association avec d'autres partenaires comme la dyskerine. Enfin, son action aux télomères est régulée par les protéines spécifiques des télomères qui définissent l'accès aux télomères.

b) Rôle de la télomérase dans la protection des télomères

Le rôle de la télomérase dans le maintien des télomères a souvent été évoqué. En effet, indépendamment de sa fonction d'élongation, hTERT protégerait les télomères d'éventuelles fusions (Blackburn, 2001; Zhu et al., 1999), (Melek and Shippen, 1996). Les cellules immortelles exprimant de manière ectopique hTERT, continuent de proliférer malgré une taille inférieure à celle des cellules sénescents. Ces résultats suggèrent ainsi que l'expression ectopique de la télomérase protégerait les télomères courts (Zhu et al., 1999). Selon ce modèle, la télomérase exercerait une protection physique contre toute dégradation en se fixant sur les télomères. Dans les cellules fibroblastiques humaines immortalisées, 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 supposaient que la télomérase agissait de préférence sur les télomères les plus courts pour les protéger et alimenter un peu plus la théorie d'un rôle protecteur de la télomérase présentée par Zhu (Ducray et al., 1999).

En fait, il a été montré par la suite que la télomérase allongeait préférentiellement les télomères les plus courts afin de limiter les signaux responsables de l'arrêt du cycle cellulaire (der-Sarkissian et al., 2004).

Par ailleurs, l'expression de la télomérase a été mise en évidence dans les cellules fibroblastiques normales en phase S (Masutomi et al., 2003). Malgré cette expression, les télomères continuent de raccourcir après chaque division cellulaire suggérant que sa présence ne soit pas suffisante pour enrayer l'érosion des télomères. De plus, l'inhibition de la télomérase dans les cellules normales ou présénescents provoquerait une diminution drastique de la taille de l'extension simple brin accélérant leur entrée dans la sénescence. Ces données supposent que la télomérase

soit nécessaire au maintien de l'ADN télomérique simple brin préservant la fonction télomérique. Ces données demeurent toutefois discutées car à aucun autre moment la présence d'une éventuelle activité télomérasique n'a pu être décrite dans des cellules normales. Ainsi, son implication directe dans la protection des télomères demeure une énigme.

c) Rôle tumorigène de la télomérase.

Au delà de son rôle dans le maintien de la taille des télomères, il semble que la télomérase possède d'autres fonctions qui contribueraient à la transformation maligne.

Dans un premier temps, il a été montré que l'expression de la télomérase dépourvue de sa fonction catalytique suffit à restaurer un pouvoir tumorigène à partir de cellules ALT. Les cellules ALT qui maintiennent pourtant leur taille des télomères, ne peuvent induire de tumeurs dans les souris « nude ». Ces résultats laissent entendre que la télomérase contribue à la tumorigenèse indépendamment de sa fonction d'élongation (Stewart et al., 2002).

De plus, chez la souris KO pour la télomérase, la surexpression de la télomérase sous le contrôle d'un promoteur actif dans les kératinocytes K5-mTERT favorise la formation de tumeurs hyperplasiques spontanées ou induites par des substances cancérigènes (Gonzalez-Suarez et al., 2001). Toutes ces données démontrent que la surexpression de K5-mTERT favorise la tumorigenèse dans un contexte où la fonction de maintien des télomères n'est pas requise. La télomérase apparaît comme un élément clef de la tumorigenèse chez les mammifères

3. Fonctions télomérase non associée aux télomères

a) Rôle anti-apoptotique

Au-delà sa capacité à faciliter la prolifération, la télomérase favorise la croissance cellulaire en protégeant les cellules de la mort cellulaire. Il a été démontré que l'inhibition de hTERT déclencherait une mort cellulaire rapide. La croissance cellulaire est affectée suite à l'expression d'oligonucléotides antisens de hTERT. Ce ralentissement s'accompagne d'une augmentation de la fragmentation de l'ADN, marqueur de l'apoptose (Folini et al., 2005). L'étude de la taille des télomères ne révèle aucune modification après 72H suggérant que ce phénomène de mort rapide est indépendant du maintien de la taille des télomères. Au contraire, la surexpression de hTERT dans les cellules lymphocytaires issues de patients leucémiques aiguës promyélocytaire induit une résistance à la mort cellulaire induite par TRAIL (Dudognon et al., 2004). De plus, la

surexpression de la télomérase dans les cellules Hela favorise la résistance à la staurosporine, défini comme agent apoptotique (Zhang et al., 2003). De même, la déplétion de la télomérase sensibilise les cellules Hela à l'apoptose induite par le cisplatine suggérant que la télomérase constitue un inhibiteur endogène de l'apoptose mitochondriale (Massard et al., 2006). Des études plus approfondies ont permis de constater que la télomérase inhiberait précocement la voie apoptotique. Elle précéderait effectivement l'activation de la caspase 3, et l'action de Bcl2 (Fu et al., 1999), (Luiten et al., 2003). Ainsi, cette fonction suscite un intérêt certain dans le traitement des cancers. En effet, l'inhibition de la télomérase pourrait permettre à la fois de réduire la durée de vie des cellules tumorales et de les sensibiliser à la chimiothérapie en venant à bout de sa fonction anti-apoptotique.

Son rôle dans l'apoptose a été aussi évoqué pour les cellules neuronales. La télomérase favoriserait la survie des neurones lors du développement du cerveau. La suppression de hTERT accélère la mort neuronale alors que sa surexpression empêche la mort par apoptose en inhibant la mort cellulaire au niveau premitochondrial.

b) Rôle dans la réparation des dommages de l'ADN

Plusieurs faits attestent de l'implication de la télomérase dans la réparation de l'ADN. L'expression ectopique de la télomérase dans les fibroblastes primaires confère une résistance aux radiations ionisantes et aux agents génotoxiques (radiations ionisantes, étoposide). Elle contribue à une cinétique de réparation plus rapide et à une élimination des dommages résiduels. Cependant, aucun effet sur la réparation des cassures doubles brins n'a été décelé que ce soit *in vitro*, au niveau de la jonction des extrémités d'un plasmide ou *in vivo* (Sharma et al., 2003). Par ailleurs, la surexpression de la télomérase modifie significativement l'expression transcriptionnelle de plusieurs gènes participant au remodelage de la chromatine et à la réparation de l'ADN (Smith et al., 2003), (Sharma et al., 2003). Après l'exposition aux rayons gamma, les cellules fibroblastiques surexprimant la télomérase présentent des caryotypes très peu remaniés (Pirzio et al., 2004) suggérant que la télomérase exerce un rôle de protection vis-à-vis des dommages de l'ADN.

Une autre approche complémentaire à celle décrit précédemment détermine l'effet de l'inhibition de la télomérase sur la réponse aux dommages. L'inhibition de la télomérase par ARN interférence altère la réponse aux traitements génotoxiques utilisées en chimiothérapie. En effet,

après une exposition à l'étoposide ou l'irinotecan, l'activation de ATM, BRCA1 et P53 est abolie en absence de hTERT. De plus, l'expression de mutants hTERT (incapables d'allonger les télomères) restaure la réponse aux dommages sans modifier la taille des télomères. Dans ce cas, sa fonction dans la réparation de l'ADN serait indépendante de son rôle dans l'élongation des télomères (Masutomi et al., 2005). Par ailleurs, il a été démontré que l'absence de hTERT interférait dans la modification de la chromatine consécutive à la réponse aux dommages de l'ADN (inhibition de la désacétylation des histones). Par conséquent, la télomérase interviendrait au niveau du remodelage de la chromatine afin de faciliter l'accès de la machinerie de réparation aux sites de cassures (Masutomi et al., 2005).

4. Régulation de l'activité télomérase

Dans la plupart des cellules somatiques humaines, l'activité télomérase est limitée uniquement aux tissus embryonnaires ou aux cellules à fort potentiel prolifératif chez l'adulte (cellules germinales, cellules souches en division, lymphocytes activés). Récemment, l'activité télomérase a été mise en évidence à un très faible niveau dans des cellules fibroblastiques normales, synchronisées en phase S (Masutomi et al., 2003). En revanche, elle est exprimée dans 85% des tumeurs suggérant un rôle important de la télomérase dans le processus d'immortalisation et de tumorigenèse (Kim et al., 1994). La réactivation de la télomérase peut être associée à des modifications transcriptionnelles. Ainsi l'amplification génique (Zhang et al., 2000) ou la dérégulation de la répression du promoteur de hTERT sont autant de mécanismes pouvant expliquer l'expression de la télomérase.

a) Activateurs/répresseurs de la transcription de hTERT

La régulation de l'activité télomérase se fait à différents niveaux. Le premier volet de cette régulation consiste à réguler la transcription du gène hTERT. L'expression du gène hTERT est soumise au contrôle d'effecteurs (activateurs ou répresseurs) capables de se fixer sur les régions promotrices afin de moduler la transcription de hTERT. Parmi ces effecteurs, le couple c-MYC et son antagoniste Mad1 sont le plus souvent décrits. En effet, c-MYC activerait la transcription de hTERT dans les cellules proliférantes alors que Mad1 réprime celle-ci dans les cellules différenciées (Xu et al., 2001); (Kyo and Inoue, 2001)

Par ailleurs, certaines molécules rétinoïdes impliquées dans la différenciation cellulaire sont aussi capables de réprimer l'expression de hTERT. L'interaction entre l'acide rétinoïque (ATRA) et ses récepteurs RAR et RXR permettrait la formation d'un hétérodimère capable de réprimer la transcription du gène hTERT (Pendino et al., 2003; Pendino et al., 2001).

b) Régulation épigénétiques

Le système effecteur / promoteur n'apparaît pas être le seul outil pour réguler l'expression génique. En ce sens, la régulation de l'expression repose aussi sur le remodelage de la chromatine en amont du gène hTERT. Parmi ces modifications, la méthylation apparaît comme l'une des modifications chromatinienne majeure mises en jeu lors de la régulation épigénétique de hTERT. Les îlots CpG, abondants dans des séquences promotrices, sont la cible privilégiée de la méthylation. Ainsi, l'expression de la télomérase peut être directement réprimé par la méthylation de ces régions (Horikawa et al., 1999), (Lopatina et al., 2003).

Par ailleurs, l'acétylation/desacétylation des histones est largement associée à une modulation de la transcription de hTERT. L'acétylation des histones H3 et H4 favorise l'activation de la transcription du gène hTERT (Hou et al., 2002), (Hou et al., 2002), (Xu et al., 2001).

c) Modifications post traductionnelles

L'épissage alternatif peut aussi moduler l'activité télomérase. Bien que la fonction des variants tronqués ne soit clairement établie, ils pourraient agir en tant que dominant négatif en interférant avec la télomérase fonctionnelle (Ulaner et al., 1998; Ulaner et al., 2000).

La modification de l'activité télomérase peut toutefois intervenir au niveau même de la protéine. Ainsi, la phosphorylation de hTERT par les kinases PKC et AKT activerait l'activité télomérase (Kang et al., 1999); (Yu et al., 2001); (Lin et al., 1998). De même, la relocalisation de hTERT dans le noyau ou sein de structures subnucléaires contribue à l'activation de la télomérase (Cristofari et al., 2007) (Jady et al., 2006). En effet, sa translocation vers le noyau notamment dans les corps de Cajal apparaît essentiel à l'assemblage du complexe lors de l'allongement des télomères (Li et al., 1998) (Wong et al., 2002).

II. Maintien des télomères par la recombinaison

1. Généralités

Les mutants pour la sous unité ARN ou pour la protéine télomérase de *S.Cerevisae* peuvent très rarement activer spontanément une voie de recombinaison permettant de restaurer la taille des séquences télomériques (Lundblad and Blackburn, 1993). Le mécanisme non télomérasique du rallongement fait intervenir la voie de recombinaison dépendante de RAD52. La mutation du gène Rad52 est létale pour les cellules ayant recours à la recombinaison homologue pour maintenir la taille des télomères (McEachern and Blackburn, 1996). Deux types de survivants ont été décrits. On distingue les mutants survivants de type I et II. Les survivants de type I maintiennent leurs télomères en allongeant les séquences subtélomériques. Ces mutants conservent ainsi des séquences télomériques courtes. Les survivants de type II amplifient strictement les séquences télomériques et possèdent des télomères longs mais hétérogènes (Teng and Zakian, 1999).

Chez l'homme, un mécanisme comparable a été observé dans les cellules immortelles dépourvues d'activité télomérase. On parle alors de mécanisme alternatif de maintien de la taille des télomères. En effet, la réactivation de la télomérase n'est pas observée dans toutes les lignées cellulaires immortalisées ou cellules cancéreuses. Le mécanisme ALT pourrait constituer une seconde voie de maintenance des télomères permettant la prolifération indéfinie des cellules. 10 % de cancers ne présentent pas d'activité télomérase et 25% des lignées cellulaires d'origine variées (fibroblastiques, épithéliale mésothéliale) immortalisées par des virus oncogènes (SV40, HPV) présentent le phénotype ALT. Par ailleurs, ce phénotype survient spontanément chez des patients atteints d'un syndrome de Li-Fraumeni, (mutation germinale de p53). Ainsi, le mécanisme ALT se définit chez l'homme en tant qu'une élongation de type II selon la nomenclature présentée chez la levure.

2. Distribution des télomères dans les cellules ALT

A cette date, l'analyse des lignées et tumeurs ALT indique que la taille des télomères s'étend de 3 à 50 kb avec une taille moyenne de 20kb (Murnane et al., 1994), (Bryan et al., 1997; Bryan et al., 1995) (Grobelny et al., 2001; Opitz et al., 2001). Cette hétérogénéité se définit par la

coexistence de télomères longs et télomères courts au sein d'une même cellule (Lansdorp, 1997; Perrem et al., 2001). La distribution de la taille des télomères est dynamique, fluctuant très rapidement pendant la prolifération cellulaire. Pour une même lignée cellulaire, la fréquence de fluctuation des télomères varie selon les sous clones (Murnane et al., 1994). Le rapport entre la taille des télomères du bras p et ceux du bras q d'un même chromosome varie d'un facteur 100 pour les populations ALT alors que celui-ci atteint seulement un facteur 2 pour une lignée télomérase (Perrem et al., 2001).

3. APBs

a) Caractéristiques des APBs

Les cellules ALT se caractérisent par la présence d'une structure subnucléaire référencée APBs (Associated ALT PML bodies). Les APBs sont enrichis en une protéine PML associée à de l'ADN télomérique sous forme linéaire ou circulaire, à des protéines télomériques telles que TRF1, TRF2, hRap1, TIN2 et des protéines impliquées dans la réparation ou recombinaison (RAD51, Rad52, RPA, RAD51D, BRCA1, MRE11/RAD50/NBS, ERCC1, WRN, BLM, hRad9/hRad1/Hus1 ou 53BP1) (Dantzer et al., 2004; Nabetani et al., 2004; Tarsounas et al., 2004; Wu et al., 2003; Wu et al., 2000; Yeager et al., 1999; Zhu et al., 2003).

Ces corps diffèrent des corps PMLs, présent dans le noyau de nombreuses cellules cancéreuses. Les corps PMLs sont constitués de nombreuses protéines impliquées dans diverses fonctions telles que la régulation du cycle cellulaire, la sénescence ou l'apoptose.

Ces corps APBs sont spécifiques du phénotype ALT et n'apparaissent dans aucune cellules normales ou exprimant la télomérase (Yeager et al., 1999).

Les APBs sont peu abondants dans une population de cellules ALT asynchrones. Seul 5% des cellules ALT asynchrones présentent ces structures subnucléaires (Yeager et al., 1999). Par contre, un enrichissement de ces corps a été observé dans les cellules bloquées en phase G2/M ou Go/G1 G1 après déplétion de méthionine laissant entendre que les corps APBs sont régulés selon le cycle cellulaire (Jiang et al., 2007); (Grobelny et al., 2001; Henson et al., 2002). Des études récentes démontrent que l'hétérogénéité de la taille des télomères est corrélée à la fréquence des corps APBs dans les tumeurs humaines. Ainsi, ces foci constituent des marqueurs des tumeurs ALT (Henson et al., 2005). Dans ces corps APBs, l'ADN télomérique se présente

sous une forme circulaire, ou linéaire. Des analyses de microscopie en temps réel ont permis de mettre en évidence une association ou dissociation entre l'ADN télomérique et les foci APBs (Molenaar et al., 2003).

Le rôle précis des corps APBs n'est pas encore établi mais ces structures constitueraient une plateforme où l'ADN télomérique et les protéines nécessaires au mécanisme ALT seraient concentrés ou/et modifiés. De plus, l'exposition des cellules ALT à des agents génotoxiques favoriserait l'apparition de corps APBs et la séquestration d'ADN télomérique linéaire dans ces mêmes corps (Fasching et al., 2007). Dans ce cas, les APBs constitueraient une structure où l'ADN télomérique, assimilé à une lésion de l'ADN ou un intermédiaire de recombinaison, puisse être réparé.

b) Facteurs impliqués dans la formation des APBs

i. MRN

Il est concevable mais pas encore prouvé que plusieurs protéines localisées dans les APBs puissent participer au mécanisme ALT. La plupart d'entre eux (RAD51, Rad52, RPA, MRN ou les hélicases WRN/BLM) sont des effecteurs de la recombinaison homologue qui pourraient intervenir dans la mise en place du mécanisme ALT. Parmi ces membres, le complexe MRN constitue un acteur majeur dans la mise en place de ALT. L'inhibition prolongée des protéines du complexe MRN conduit à la réduction de la taille des télomères et du nombre de foci APBs dans les cellules ALT (Zhong et al., 2007). Auparavant, il a été démontré que la fonction de NBS1 était nécessaire à la genèse des corps APBs. Toutefois sa présence était conditionnée par la protéine Sp100, membres des foci PMLs, qui séquestre le complexe MRN et par conséquent réprime la formation des corps APBs (Jiang et al., 2005). Cette répression conduit à un raccourcissement progressif des télomères abolissant la fluctuation rapide de la taille et aboutissant à la disparition des corps APBs. Tous ces résultats concourent à dire que le complexe MRN prend activement part au mécanisme ALT.

ii. SMC5/6

Enfin très récemment, le complexe SMC5/6 (Structure Maintenance of Chromosomes) a été retrouvé dans les corps APBs (Potts and Yu, 2005). Ce complexe, appartenant à la famille des protéines SMC (Structure Maintenance of Chromosomes), joue un rôle majeur dans l'organisation et le maintien des chromosomes. En présence de MMS1, cet hétérodimère promeut les échanges de chromatides sœurs (Potts and Yu, 2005). L'inhibition de SMC5/6 conduit à une

réduction des échanges télomériques, une disparition des foci APBs ainsi qu'à un raccourcissement progressif des télomères. Avec l'aide de la protéine MMS1, dotée d'une activité de sumoylisation, ce complexe modifie les protéines télomériques présentes dans les corps APBs (TRF1, TRF2, TIN2, Rap1) nécessaires à leurs formations. Il a été proposé que ce complexe favorise l'élongation et les échanges télomériques en modifiant les protéines télomériques de manière à former les corps APBs (Potts and Yu, 2007).

iii. RAD51D

Un autre membre de la recombinaison, RAD51D, paralogue de RAD51, semble être impliqué dans l'homéostasie des télomères dans les cellules ALT. En effet, l'inhibition de RAD51D par siRNA induit une réduction massive de la longueur des télomères provoquant leur mort après 7 jours d'inhibition (Tarsounas et al., 2004). Ces résultats suggèrent que RAD51D serait donc impliqué directement ou non dans le maintien des télomères par le mécanisme ALT.

iv. BLM

A cela, il faut ajouter la présence de BLM au niveau des télomères dans les cellules ALT. Son orthologue chez la levure, SGS, est impliqué dans la mise en place du mécanisme ALT de type II, caractérisé par l'amplification stricte des séquences télomériques. BLM présent dans les corps APBs, interagit avec les télomères et les protéines TRF2 et TRF1 (Opresko et al., 2002). De par son rôle dans la recombinaison (résolution de la jonction d'Hollyday, déroulement de la boucle D), il est possible que BLM soit requis pour la mise en place du mécanisme ALT. Ainsi, la surexpression transitoire de la protéine de fusion GFP-BLM influence la synthèse d'ADN télomérique dans les cellules ALT supposant que BLM soit directement impliqué dans le mécanisme ALT (Stavropoulos et al., 2002).

4. La génétique de ALT et sa répression

a) Mise en évidence de la répression du mécanisme ALT

Contrairement à la télomérase exprimée transitoirement ou non dans certains types tissulaires, le mécanisme ALT est totalement absent des cellules normales. Plusieurs éléments suggèrent qu'il existerait des gènes capables de réprimer ce mécanisme dans des cellules normales. En effet, la fusion entre une cellule immortelle ALT et une cellule normale donne lieu à un hybride sénescence qui perd son phénotype ALT (Perrem et al., 1999; Perrem et al., 2001). De plus, des études réalisées sur des hybrides somatiques issus de fusions entre des cellules ALT et des microcellules

(avec un ou deux chromosomes) ont soulevé la question d'un éventuel contrôle génétique du mécanisme ALT. D'une part après le transfert de chromosomes, il a été montré que le chromosome 7 induit la sénescence dans des cellules immortelles « télomérase négative » abolissant le mécanisme ALT (Ogata et al., 1993), (Nakabayashi et al., 1997). Sur ce chromosome 7, il existerait alors des gènes capables de réguler le mécanisme ALT (Ogata et al., 1995). Leurs actions ne seraient pas seulement limitées aux cellules ALT puisqu'ils peuvent aussi induire la sénescence de cellules immortalisées par la télomérase.

D'autre part, une étude du polymorphisme des microsatellites révèle que la perte d'hétérozygotie d'une région du chromosome 6 et 8 est fortement corrélée à l'apparition du phénotype ALT (Shigeeda et al., 2003) (Kumata et al., 2002) De plus, la perte d'hétérozygotie d'une région du chromosome 8 a été identifiée dans des ostéosarcomes définies comme des tumeurs de type ALT. Ces résultats indiquent que des gènes impliqués dans l'activation de ALT pourraient être localisés sur les chromosomes 6 et 8.

En revanche, les régulateurs putatifs du mécanisme ALT, présents sur ces chromosomes 6, 7, 8, ne sont pas encore identifiés. L'ensemble de ces données suggère que l'activation ALT résulte d'un ou plusieurs événements mutationnels touchant les gènes répresseurs dans des cellules cancéreuses.

b) Potentiels répresseurs du mécanisme ALT

i. *WRN*

Ces études de recherche de polymorphisme montre que la perte d'hétérozygotie d'une région du 8 est fortement corrélée à l'apparition du phénotype ALT permettant d'identifier un éventuel répresseur de ALT. Ainsi le gène codant pour la protéine WRN (8p12) est proche du loci perdu préférentiellement dans les cellules ALT (Shigeeda et al., 2003) (Kumata et al., 2002). De plus, il a été décrit que l'inhibition de WRN stimule les échanges de chromatides sœurs dans les régions télomériques de souris supposant que l'absence de WRN faciliterait l'émergence du phénotype ALT (Laud et al., 2005).

ii. *P53*

Plusieurs candidats sont envisagés mais deux d'entre eux ont retenus notre attention. Parmi ces candidats, P53 pourrait constituer un répresseur direct du mécanisme de ALT. En effet, de nombreuses lignées ALT présentent la particularité d'être immortalisées par des virus oncogènes HPV et SV40 capable d'inactiver P53 et RB. Le mécanisme ALT peut être activé après la perte

spontanée de P53/P16 dans les cellules de patients atteints du syndrome de Li Fraumeni (Rogan et al., 1995); (Vogt et al., 1998) ou suite à l'expression conjuguée de la cycline D1 et d'un allèle mutant de p53 (Opitz et al., 2001). Ces modifications génétiques génèrent un environnement instable propice à l'activation des mécanismes ALT. Par ailleurs, P53 est capable d'inhiber la recombinaison homologue (Sengupta and Harris, 2005). De récents travaux démontrent que P53 peut interférer avec le mécanisme ALT par le biais de sa fonction dans la recombinaison homologue, indépendamment de sa fonction transactivatrice (Razak et al., 2004).

Tout ceci concourt à penser que P53 est bel et bien un répresseur du mécanisme ALT mais des futures investigations permettront d'éclaircir son véritable rôle dans l'émergence de ALT.

iii. MMR

Parmi les autres candidats, les gènes du MMR (MisMatch Repair) pourraient être impliqués dans la répression de ALT. Hautement conservés dans l'évolution, ces facteurs sont essentiels à la stabilité du génome. Ils permettent de réduire le taux de mutations mais aussi de réprimer la recombinaison homologue, plus particulièrement entre les séquences homologues. Chez l'homme, l'inhibition conjointe de la télomérase et des gènes du MMR génère un phénotype similaire au mécanisme ALT laissant entrevoir une répression de ALT par le système MMR (Bechter et al., 2004b).

5. Mécanismes moléculaires

a) Echanges des chromatides sœurs

Les échanges de chromatides sœurs résultent de la réparation par échanges de brins entre les chromatides sœurs des cassures synthétisées pendant la réplication. Il s'agit d'une réparation dite post-répllicative. L'analyse cytogénétique des SCE (Sister Chromatides Exchanges) ne permet de visualiser ces échanges que sur des dizaines de Mb. Il a été suggéré que ces événements soient pris en charges par la recombinaison homologue (Sonoda et al., 1999).

Ces échanges télomériques ne sont pas détectables par des analyses conventionnelles de détection (ex: analyse SCE), quantifiant seulement les échanges dits génomiques. En revanche, les échanges télomériques peuvent être visualisés par une approche plus spécifique faisant appel à une hybridation particulière appelé CO-FISH (Chromosome Orientation FISH). Cette technique permet la détection d'échanges d'ADN télomérique entre deux chromatides d'un même chromosome. Par contre, l'analyse de la recombinaison entre des chromatides provenant de deux

chromosomes différents ou avec des fragments télomériques extra chromosomiques n'est pas possible. Une analyse détaillée de plusieurs lignées cellulaires révèle que les échanges post réplicatifs entre deux télomères sont fréquents dans les cellules ALT. L'élongation des télomères consécutifs à l'expression ectopique de la télomérase ou de POT1 n'induit qu'occasionnellement ces échanges (Londono-Vallejo et al., 2004). Ainsi, les télomères longs ne suffisent pas à induire des échanges télomériques, d'autres facteurs sont requis pour générer des échanges télomériques. Pourtant, l'augmentation des échanges ne correspond pas à une dérégulation globale de la recombinaison. En effet, les cellules ALT présentent autant d'échanges de chromatides sœurs génomiques que les cellules exprimant la télomérase (Bailey et al., 2004a). De plus, le taux de recombinaison à des sites interstitiels ou subtélomériques est comparable à celui de cellules exprimant la télomérase précisant une action ciblée de la recombinaison aux télomères dans les cellules ALT (Bechter et al., 2003).

Ces échanges ne sont pas des marqueurs exclusifs du phénotype ALT. En effet, l'inhibition conjuguée de la télomérase et des gènes du système MMR induit l'émergence d'une population cellulaire similaire aux cellules ALT mais pourtant dépourvues de corps APBs, marqueur du phénotype ALT (Bechter et al., 2004b).

Récemment, un autre modèle a été proposé. Des échanges inégaux entre les séquences télomériques de chromatides soeurs provenant de chromosomes différents permettaient d'allonger les télomères de chromatides différentes sans pour autant synthétiser d'ADN. Ainsi, les échanges inégaux génèreraient des différences entre deux cellules filles proches de la sénescence provoquant l'entrée immédiate d'une cellule en sénescence (télomères raccourcis) tout en autorisant la poursuite de la prolifération de l'autre cellule fille (télomères allongés) (Bailey et al., 2004a).

b) Recombinaison inter télomérique dans les cellules ALT

La dynamique des télomères dans les cellules ALT suggère que les télomères soient maintenues par un processus de recombinaison (Murnane et al., 1994; Perrem et al., 2001). De récents travaux révèlent la présence d'événements de recombinaison inter-télomérique dans des cellules humaines ALT. Il a été montré qu'un télomère, marqué par un plasmide, servait de matrice lors de l'amplification d'un autre télomère non marqué. Il a été remarqué jusqu'à 5 télomères marqués après 63 doublement de populations; le mécanisme utilisé rappelait celui de la recombinaison. En revanche, lorsque le plasmide est intégré en position sub-télomérique ou

interstitielle, aucun événement de recombinaison inter télomérique n'a été relevé confirmant l'existence d'une élongation de type II dans les cellules ALT humaines (Dunham et al., 2000). De plus, l'étude de la jonction entre les régions subtélomériques et télomériques révèle qu'après l'activation du mécanisme ALT, des séquences télomériques ont été identifiées au sein des régions subtélomériques dégénérées. Cette insertion témoignerait de l'élongation des télomères par recombinaison dans ces régions subtélomériques (Varley et al., 2002).

Malgré une forte instabilité des régions mini-satellites dans les cellules ALT (Jeyapalan et al., 2005), aucune modification de la recombinaison n'a été observé à ces sites supposant que l'augmentation de la recombinaison homologe soit restreinte à certains locis tels les télomères.

Les résultats présentés sont ainsi en accord avec l'existence d'une réplication des télomères basée sur la recombinaison dans les cellules ALT. Ainsi, l'extrémité 3' simple brin envahirait la région double brin d'un autre télomère pour l'utiliser en tant que matrice et allonger significativement sa taille. La matrice copiée peut être linéaire, circulaire ou même télomérique par la formation de la T-loop (Figure 8).

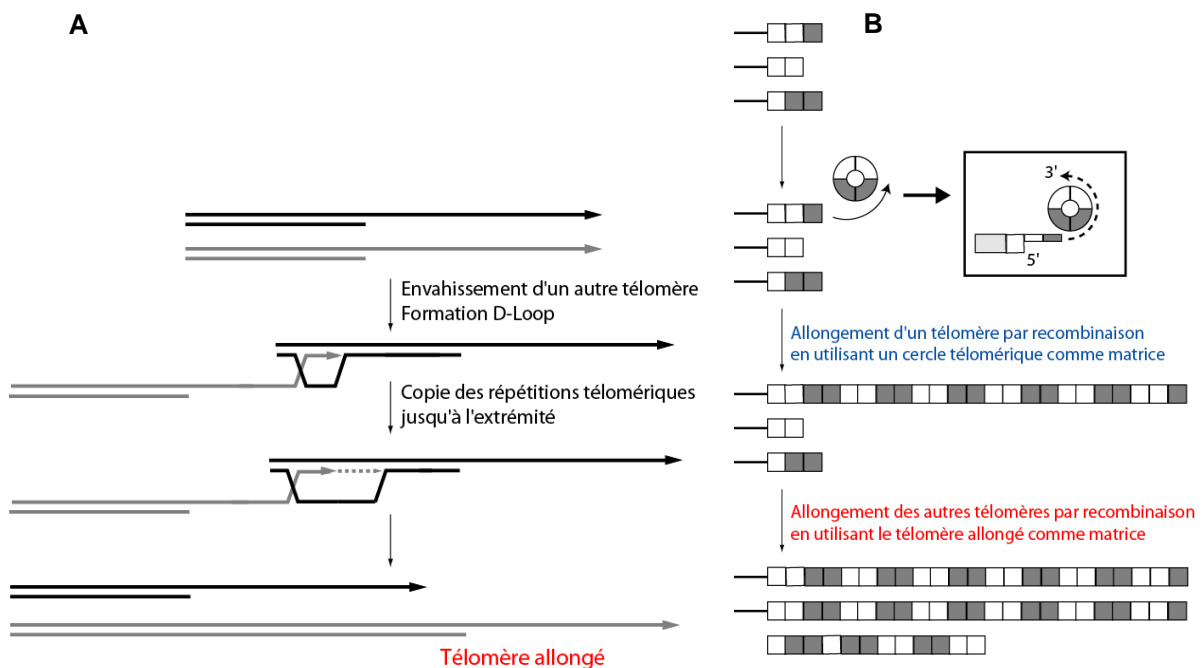


Figure 8 : Mécanismes moléculaires d'élongation des télomères dans les cellules ALT

A. Allongement des télomères par un mécanisme comparable au BIR le télomère le plus long va envahir la région double brin du télomère le plus court permettant la copie des répétitions télomériques par un mécanisme de recombinaison menant à un allongement très important et rapide (quelques générations)

B. Elongation des télomères selon le modèle des cercles roulants « Rolling circle ». Ces derniers sont assez long pour servir de matrice à l'allongement (D'après Pardo 2006).

c) « T-loop » et « Rolling circle »

i. « T-loop »

Il est possible que la « T-loop » initie l'activité ALT. L'extension simple brin pourrait préférentiellement permettre l'allongement des télomères. En effet, la boucle T contribuerait indirectement à l'élongation en favorisant l'émergence de molécules circulaire ou doubles brins consécutifs à une perte rapide des télomères. Elle permettrait la production de cercles extrachromosomiques, utilisés lors de l'amplification de télomères par « Rolling circle ». Ce modèle est largement inspiré de celui présenté chez la levure sous le terme de « Telomere Rapid délétion » (TRD) (Li and Lustig, 1996); (Bucholc et al., 2001); (Lustig, 2003). Il a été proposé que le TRD soit un mécanisme actif dans les cellules sauvages de levure assurant la régulation de la taille des télomères quand ces derniers sont anormalement longs (Li and Lustig, 1996) (Bucholc et al., 2001). Les événements de « TRD » correspondraient à des événements de recombinaison intrachromosomique où la T-Loop constituerait un intermédiaire réactionnel (Lustig, 2003).

ii. *Rolling circle*

Ce modèle prédit la formation, par recombinaison, d'un cercle d'ADN télomérique dans les cellules dépourvues de télomérase ayant survécu à la sénescence. Ce cercle, formé suite à la délétion de télomères longs, constituerait une matrice pour l'allongement d'un télomère très court par des événements de recombinaison inter télomérique de type BIR.

Les prédictions du modèle de « roll-and-spread » ont été vérifiées chez *K. lactis* et *S. Cerevisiae* (Natarajan and McEachern, 2002), (Natarajan et al., 2003), (Larrivee and Wellinger, 2006). En effet, des marqueurs présents sur des cercles d'ADN télomérique extra chromosomiques sont retrouvés à proximité des séquences télomériques. La production de ces cercles télomériques observe la même dépendance génétique que la formation des survivants de type II : elle est dépendante des gènes RAD52 et RAD50 et indépendante de RAD51 (Lin et al., 2005). Chez l'homme, ces cercles ont été identifiés par une approche bidimensionnelle (gel 2D agarose) dans les cellules ALT. L'inhibition de NBS1 ou XRCC3 dans les cellules ALT abolit la formation de ces cercles télomériques confirmant l'implication du complexe MRE11-RAD50-NBS1 dans la genèse de ces cercles (Compton et al., 2007).

6. Existe-t-il un ou plusieurs mécanismes ALT

Auparavant, toutes les cellules humaines ALT décrites possédaient une structure similaire à celle observée chez les levures dites de type II. Pourtant, une nouvelle structure inhabituelle a été observée à la fois dans les cellules murines mTERC -/- et dans des lignées télomérase négative dépourvue de WRN. En effet, des analyses de séquences télomériques des lignées mTERC-/- révèlent l'amplification des séquences non télomériques au sein des télomères (Niida et al., 2000) évoquant le type I observé chez la levure.

Cette structure s'apparente à celle caractérisée dans les levures dépourvues de télomérase (Δtlc) dites de type I dont les éléments subtélomériques sont amplifiés et disséminés dans les séquences télomériques. Dans ces levures Δtlc type I, l'élément Y' est transcrit dans des régions réprimées dans les levures normales (Yamada et al., 1998).

Chez l'homme, dans des cellules télomérase négative dépourvues de WRN (AG11395), une large succession de séquences SV40 est retrouvée au niveau des télomères (Fasching et al., 2005; Marciniak et al., 2005). Les télomères contiennent à la fois des séquences SV40 non télomériques et des séquences TTAGGG, caractéristiques de la structure de type I. La comparaison ne s'arrête pas là puisque à l'image des télomères de levures Δtlc type I, certaines séquences télomériques humaines sont transcrites dans des régions habituellement inactives. La détection des télomères par une hybridation PNA-FISH sur des métaphases de cellules AG11395, lignée WRN immortalisées par SV40, a permis de mettre en évidence un signal diffus inhabituel, sensible à la RNAase. Ce signal correspondrait en fait à de l'ARN télomérique transcrit. De plus, l'hybridation des sondes télomériques CCTGGG (sonde C) et TTAGGG (sonde G) sur l'ensemble des transcrits ARN révèlent que seule la sonde C s'hybride avec les ARN totaux suggérant que seul le brin G télomérique est transcrit (Marciniak et al., 2005). En revanche, ces cellules présentent la particularité de ne pas exprimer de corps APBs contrairement aux cellules ALT apparentés au type II (Fasching et al., 2005; Marciniak et al., 2005). Ceci laisse entendre que les mécanismes mis en jeu diffèrent selon le type d'élongation (I ou II).

III. TERRA : Nouvelle voie dans le maintien des télomères

Un nouveau mécanisme de maintenance de télomères a été mis en évidence dans les cellules de mammifères. Les télomères étaient considérés jusqu'à présent comme transcriptionnellement

inactif compte tenu de la structure de la chromatine. Toutefois très récemment, il a été montré que les télomères de mammifères pouvaient être transcrits en une séquence ARN constituée de motifs répétés télomériques. Ces molécules sont nommées TERRA (TElomeric Repeats-Containing RNA)(Azzalin et al., 2007). Elles sont de tailles très hétérogènes allant de 0,1 à 9kb et sont retrouvés dans des foci en position subtélomérique. Leur colocalisation indirecte avec la protéine Rap1 suggère que TERRA seraient associées à l'hétérochromatine télomérique. Ces molécules ont par ailleurs été clairement identifiées à l'extrémité des chromosomes après une hybridation *in situ* sur des métaphases des cellules embryonnaires de souris. Leur synthèse est régulée par des protéines de type SMG (Suppressors with Morphogenetic Defects in Genitalia) impliquées principalement dans la dégradation de transcrits altérés (avec des codons stop prématuré). L'accumulation de ces transcrits mènerait à la stabilisation des protéines tronquées, qui deviendraient, à terme, délétères pour la cellule. Parmi les membres de ce complexe, on retrouve les protéines UPF1, UPF2, UPF3 et SMG1. Ces protéines sont présentes *in vivo* aux télomères. L'inhibition de l'expression de UPF1, SMG1, EST1A et UPF2 entraîne une accumulation des molécules TERRA dans le noyau. Cette accumulation est la conséquence d'une augmentation de la synthèse et non d'un défaut dans la dégradation de ces molécules. De plus, les absences de UPF1, SMG1 et de EST1A sont associées à l'apparition de plusieurs cassures télomériques ou chromosomiques. Ainsi, le complexe SMG réprimerait l'association entre les molécules TERRA et la chromatine télomérique afin de protéger les extrémités des chromosomes d'éventuelles pertes de séquences. De nombreuses molécules TERRA sont observées dans les cellules ALT. La régulation de la transcription des télomères viserait à préserver l'intégrité du génome et plus particulièrement des extrémités des chromosomes. Le rôle de cette molécule n'est pas clairement défini mais il semble qu'il interviendrait lors de l'élongation ou de la réplication des télomères (Azzalin et al., 2007).

IV. Maintien des télomères par le Shelterin

Le complexe Shelterin exerce plusieurs fonctions pour préserver l'intégrité des télomères. Il contrôle la longueur des télomères en régulant l'accès de la télomérase, et leur assure une protection physique afin de les protéger d'événements de recombinaison inappropriée. Toutes ces fonctions nécessitent une coordination et une coopération des partenaires télomériques mais aussi non télomériques. Si ces fonctions sont conservées durant l'évolution, le nombre de partenaires varient selon l'organisme.

Il nous appartient alors de déterminer comment le complexe Shelterin participe à l'homéostasie télomérique et quelles sont les régulations mises en jeu pour assurer pleinement la fonction télomérique.

Fonctions aux télomères	S.Cerevisiae	S.Pombe	Plantes	Mammifères
Régulations de la taille	Cdc13 Rif1, Rif2 Rap1 Ku Mre11/Rad50/Xrs2	Pot1p,Taz1 Rif1p Rap1p Ku Rad32/Rad50/NBS1	AtPot1 Ku Mre11/Rad50/NBS1	TRF1,TIN2, TanK1 Rap1 Ku? + Rad54; DNAPkcs?
Contrôle de l'extension 3'	Cdc13 Ku Mre11/Rad50/Xrs2	Pot1p,Taz1 Rad32/Rad50/NBS1		Pot1,TPP1 Mre11/Rad50/NBS1
Protection des télomères	Cdc13 Tel1, Mec1 Ku	Taz1 + Rad32/Rad50/NBS1	AtPot2 Mre11/Rad50/NBS1	POT1, TRF2,TIN2, Apollo ATM, ATR Ku, DNA-PKcs NBS1 ?? + Rad54,Rad51D
Répression de la recombinaison	Cdc13 Strn/Ten1 Ku	Taz1	AtPot3 Ku	POT1, TRF2 +ERCC1 (TDM) Ku
Cdc13; Tel1, Mec1, Rap1 Répression des fusions	Cdc13 Tel1, Mec1 Rap1	Taz1		TRF2 Rap1+ERCC1/XPF
Recrutement de la télomérase	Cdc13 EST1,2,3 RPA Ku Mre11/Rad50/Xrs2	EST1p 9-1-1		Pot1 TRF1, TanK1 Mre11/Rad50/NBS1 ; ATM 9-1-1

Figure 9 : Récapitulatif des fonctions télomériques et les intervenants protéiques impliqués dans l'établissement de ces fonctions.

La régulation de la longueur des télomères, et plus particulièrement de l'extension télomérique simple brin 3', le contrôle de la recombinaison sont autant de fonctions qui assurent l'intégrité télomérique. Parmi ces acteurs on retrouve aussi bien des protéines télomériques, que des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN plus particulièrement de la recombinaison. Ce tableau présente uniquement les homologues de fonctions conservées au cours de l'évolution.

1. Contrôle de la taille par les éléments du Shelterin

L'homéostasie télomérique est un subtil équilibre entre l'élongation, le raccourcissement et le maintien de la longueur des télomères. Cet équilibre repose en partie sur le contrôle exercé par les protéines du Shelterin. Ce complexe s'accumule le long des télomères transmettant un signal capable d'estimer leurs tailles. En effet, la quantité de protéines sur les séquences télomériques est proportionnelle à leur longueur régulant ainsi l'élongation des télomères. Les membres de ce complexe constituent donc des acteurs majeurs dans le contrôle de la longueur des télomères.

Dans les cellules normales, la régulation de la taille des télomères réside d'abord dans le contrôle de l'accès de la télomérase aux télomères qui s'articule autour de l'action de TRF1 aux télomères.

Dans les cellules exprimant la télomérase, TRF1 régulerait négativement la taille des télomères. La surexpression conduit à une diminution progressive de la taille des télomères jusqu'à une stabilisation de la longueur des télomères. A l'inverse, l'expression de protéine mutante dominante négative de TRF1 conduit à l'allongement des télomères (Smogorzewska et al., 2000; van Steensel and de Lange, 1997). Ces changements s'opèrent alors qu'aucune modification de l'activité télomérase ou du taux de raccourcissement n'ait été observée. A l'aide d'autres protéines, TRF1 agirait en cis pour réprimer l'action de la télomérase (Ancelin et al., 2002; van Steensel and de Lange, 1997). Selon ce modèle, les télomères longs recruterait un grand nombre de molécules TRF1 empêchant l'ajout de motif TTAGGG par la télomérase. En revanche, les télomères courts sont très peu pourvus de TRF1 constituant un terreau favorable à l'action de la télomérase. D'autres protéines télomériques telles que TPP1, TIN2 et POT1 régulent aussi de manière négative la longueur des télomères (Houghtaling et al., 2004; Kim et al., 1999; Liu et al., 2004; Loayza et al., 2004),(Ye et al., 2004a).

Cependant, certaines voies de régulation ne requièrent pas directement la protéine TRF1. En effet, la surexpression de TRF2 mène aussi à un raccourcissement des télomères laissant entendre que TRF2 contribue aussi au contrôle de la taille des télomères (Loayza and De Lange, 2003; Smogorzewska et al., 2000). Par ailleurs, hRAP1 participerait à l'homéostasie de télomères. Alors que son rôle de régulateur négatif de la taille des télomères est avéré chez la levure, son rôle chez l'homme est moins évident. A ce jour, seule la surexpression de formes sauvages et mutantes de hRAP1 a démontré l'implication de hRAP1 dans la régulation négative de l'élongation des télomères. En revanche, son action dans les cellules humaines nécessite une interaction avec TRF2 (Li and de Lange, 2003; O'Connor et al., 2004). Il a été proposé que les

télomères existent sous deux états antagonistes propices ou non à leur élongation. L'équilibre entre ces deux états : « état ouvert » - « état fermé » dépend de la taille des télomères. Il serait régi par les interactions entre les séquences télomériques et les protéines dites télomériques: TRF1/2 et les partenaires TPP1 -TIN2- POT1.

Selon ce modèle, en présence de TRF1 et TRF2, le couple TIN2-POT1 annihilerait l'action de la télomérase. En absence de TRF1, TIN2/TPP1 resteraient associés à TRF2 mais la faible quantité de ce complexe provoquerait la diminution du pool de POT1 aux télomères levant l'inhibition exercée sur la télomérase (Houghtaling et al., 2004). En effet, l'expression d'un mutant POT1 tronqué pour son domaine de fixation à l'ADN simple brin, POT1 (Δ OB1), induit une augmentation très importante et très rapide de la taille des télomères (de 14 kb en 40 doublement) dépendante de l'expression de la télomérase. Cette élongation inappropriée n'affecte pourtant pas la fixation des autres facteurs télomériques suggérant que POT1 régulerait négativement la taille des télomères en aval de TRF1(Loayza and De Lange, 2003). POT1 convertirait alors l'information relative à la taille en un signal capable de réguler l'accès de la télomérase.

Ce modèle simpliste suggère que POT1 entre en compétition avec la télomérase pour se fixer sur l'extrémité simple brin. Cette hypothèse est étayée par des travaux *in vitro* qui démontrent que la présence de POT1 sur une extension simple brin 3' réduirait l'action de la télomérase(Kelleher et al., 2005).

Certaines protéines peuvent modifier la régulation établie par les acteurs du Shelterin. *In vivo*, la surexpression de la TANK1 induit une élongation de la taille des télomères dans les cellules humaines. Cette protéine favoriserait l'élongation des télomères en modulant l'action de TRF1. En présence de TANK1, l'affinité de TRF1 pour les séquences télomériques est altérée (Smith and de Lange, 2000). De plus, sa surexpression conduit à une réduction du nombre de POT1 aux télomères qui peut expliquer l'élongation observée en excès de TANK1 (Loayza and De Lange, 2003). Par ailleurs, sa fonction de régulation semble propre à l'homme. En effet, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, la forme murine de TRF1 n'interagit pas avec TANK1. Ainsi, aucune ribosylation de mTRF1 n'est observée *in vitro*. Toutes ces données, suggèrent que TANK1 constitue un mécanisme supplémentaire à la régulation de l'élongation par la télomérase, propre aux cellules humaines (Donigian and de Lange, 2007).

Selon ce modèle, TIN2 joue un rôle très particulier puisqu'il intervient à deux niveaux. Dans un cas, il régule la présence de POT1 aux télomères, dans l'autre cas il inhibe l'action de la TANK1.

En effet, son inactivation conduirait donc à la poly(ADP) ribosylation de TRF1 par TANK1 favorisant l'élongation des télomères (Ye and de Lange, 2004).

Plusieurs protéines non télomériques sont impliquées dans le contrôle de la taille. Les souris dépourvues de protéines appartenant à la famille Rb, régulant l'état de la chromatine télomérique, présentent des télomères inhabituellement longs (Garcia-Cao et al., 2002) Ainsi, l'état de la chromatine télomérique aurait une incidence sur la longueur des télomères.

Par ailleurs, la dérégulation de la taille des télomères apparaît aussi dans les cellules déficientes pour plusieurs protéines de la réparation telles que DNAPkcs, RAD54, RAD51D, PARP1, Ku, et leurs actions seront décrites plus largement dans la suite du manuscrit.

2. Maintien de la stabilité des télomères

La maintenance des télomères se définit par la régulation de la longueur des télomères mais aussi par la stabilité des extrémités chromosomiques. Cette protection se définit en plusieurs points. Elle se caractérise d'abord par l'acquisition d'une structure physique qui empêche toute dégradation ou événements inappropriés (fusions, recombinaison, ect...).

a) Protection physique des télomères

« T-loop » est une structure labile et dynamique mais le mécanisme moléculaire initiant cette boucle T demeure peu clair. Cette conformation permettrait d'expliquer de nombreuses propriétés des télomères et notamment la protection des télomères. Plusieurs protéines agissent de concert pour former cette « cuirasse » protégeant les extrémités des chromosomes.

TRF2 joue un rôle essentiel dans la protection des télomères. Ceci s'explique par le rôle qu'il occupe dans la mise en place de la boucle télomérique. Cette protéine a été décrite pour promouvoir *in vitro* la formation de la boucle T. En catalysant la réaction d'invasion du simple brin dans le duplex TTAGGG doubles brins, TRF2 modifierait la topologie de l'ADN télomérique (enroulement, degré de compaction), stimulant l'invasion de l'extension 3' dans une région télomérique plus proximale (Amiard et al., 2007). De même, les différentes aptitudes de TRF1 vis-à-vis de la topologie de l'ADN suggèrent que TRF1 soit impliqué aussi dans la formation de la boucle T. Cependant, TRF1 ne semble pas impliqué directement dans la protection des télomères puisque l'inhibition de TRF1 ne conduit qu'à très peu de fusions. En revanche, le rôle protecteur de TRF2 a été constaté dans les cellules de mammifères.

L'expression d'un mutant dominant négatif TRF2 (ΔBAM), dans des cellules humaines HTC75, induit de multiples fusions télomériques conduisant à la formation de « train de chromosomes » associé à un arrêt de la prolifération cellulaire (van Steensel et al., 1998). Ces fusions conservaient les séquences télomériques intactes au niveau des jonctions. Ceci suppose que les séquences télomériques ne soient pas suffisantes pour protéger les extrémités des chromosomes. Ces observations ont été corroborées chez la souris après l'inactivation conditionnelle de TRF2 qui conduit à une forte proportion de fusions (Celli and de Lange, 2005). Ainsi, TRF2 joue un rôle essentiel dans la protection des télomères. L'inhibition d'Apollo potentialise les effets délétères du dominant négatif TRF2 (ΔBAM) (fusions, TIFs, baisse de la prolifération) suggérant que Apollo est requis pour parachever la protection des télomères.

D'autres éléments du complexe Shelterin peuvent protéger l'extrémité des chromosomes. En effet, l'inhibition de hPOT1 (RNAi ou mutant de POT1) aboutit à la formation des fusions chromosomiques et de ponts anaphasiques indiquant que POT1 participe au maintien de l'intégrité des télomères (Veldman et al., 2004). Chez la souris, la délétion de POT1b favorise l'apparition de fusions télomériques (Hockemeyer et al., 2006; Wu et al., 2006). La stabilisation de l'extension simple brin permettrait de conserver une structure T-Loop intacte dressant une barrière physique au niveau des extrémités chromosomiques.

b) Maintien de l'extrémité 3' simple brin.

Le maintien de l'extrémité simple est crucial pour la fonction des télomères. La stabilité de cette extension conditionne tous les autres événements télomériques. Pour cette raison, plusieurs protéines ont pour mission de protéger cette extrémité contre d'éventuelles nucléases ou système de recombinaison.

POT1, régulateur négatif de la taille des télomères et censeur des cassures télomériques, serait aussi impliqué dans l'homéostasie de l'extrémité 3' simple brin. L'inhibition de POT1 dans les cellules BJ et BJ/hTERT provoque la perte partielle de l'extrémité simple brin suggérant que POT1 est indispensable à l'homéostasie de l'extension simple brin.

En revanche, le rôle exercé par POT1 dans l'homéostasie de l'extension 3' diffère selon l'organisme étudié. En effet, chez la souris deux approches indépendantes ont démontré que la délétion de l'un des paralogues de POT1, POT1b, induit un allongement excessif de l'extrémité 3' télomérique suggérant que POT1b joue un rôle dans la résection du brin 5' riche en C (Hockemeyer et al., 2006) (He et al., 2006; Wu et al., 2006). Ces données sont plus confuses

concernant l'autre paralogue de POT1, POT1a. En effet, selon les stratégies d'inactivation, la délétion POT1a induit une élongation de l'extension simple brin (He et al., 2006; Wu et al., 2006). Dans tous les cas, il apparaît que POT1 initierait la résection du brin 5' riche en C.

La contribution de POT1 dans la résection du brin 5' a aussi été évoquée chez l'homme. En absence de POT1, les extrémités perdent le motif 3'ATC-5' caractéristique de l'extension télomérique simple brin chez l'homme (Hockemeyer et al., 2005). Deux hypothèses sont alors avancées : la première suppose que POT1 recrute une nucléase dégradant spécifiquement le brin C, avec pour motif 3'-AATC[^]CC-5'. La perte de l'extension simple brin dans le mutant POT1 serait alors la conséquence d'un défaut de résection du brin C après la réplication. La seconde hypothèse repose sur la protection des 3 derniers nucléotides par POT1. Dans ce cas la nucléase responsable de la résection du brin C n'a pas besoin d'être spécifique. Dans ces 2 cas de Figures, POT1 initierait la résection du brin C intervenant ainsi dans la réplication des télomères humains (Hockemeyer et al., 2005) alors que chez la souris POT1 régulerait négativement cette résection (Hockemeyer et al., 2006) (He et al., 2006; Wu et al., 2006).

D'autres facteurs moins attendus contribueraient à la stabilité de l'extrémité 3' télomérique simple brin. Parmi eux, on retrouve la protéine TRF2. L'expression du dominant négatif de TRF2 conduit à une réduction du signal du brin G de l'ordre de 50% dans les cellules humaines (van Steensel et al., 1998). La dégradation de l'extrémité simple brin est dépendante de l'action de l'endonucléase ERCC1/XPF puisque l'ADN télomérique simple brin (brin G) persiste après l'inhibition de ERCC1 dans un contexte dépourvu de TRF2 fonctionnelle (Zhu et al., 2003). Ainsi chez l'homme, POT1 et TRF2 contribuent au maintien des extrémités 3'.

Le maintien de l'extrémité 3' est essentiel au métabolisme et à la fonction des télomères. Sa dégradation ou son allongement excessif sont autant de moyens pouvant initier la recombinaison télomérique (fusions, délétions ou allongement inapproprié). Sa protection se révèle être une des priorités dans le maintien des télomères. Le contrôle de la recombinaison aux télomères passe alors par une régulation de l'extrémité télomérique 3'.

c) Répression des événements NHEJ aux télomères

i. Fusions en absence télomérase

Dans les cellules sénescents, en absence de télomérase, la perte des répétitions télomériques réduit le pool de facteurs télomériques. Dans les cellules de mammifères, en absence de télomérase après plusieurs passages successifs, la cellule accumule les télomères courts, sources

d'une forte instabilité chromosomique caractérisée par de nombreuses fusions chromosomiques. Après avoir invalidé la télomérase, compte tenu de leurs tailles, plusieurs générations sont nécessaires avant d'obtenir des télomères suffisamment courts pour observer de nombreuses fusions chez la souris. Les souris mTERC^{-/-} G6 (tardives) présentent de multiples translocations non réciproques induites après de nombreux cycles d'instabilité – pont-fusion-cassure (Gonzalez-Suarez et al., 2000). Ces cycles sont initiés par des chromosomes dicentriques impliquant des télomères courts.

La nature des fusions télomères courts-télomères courts est peu relatée. Au contraire de la levure, les fusions sont formées à la suite d'une sévère érosion des télomères sans pour autant faire intervenir des événements de type NHEJ. En effet les acteurs majeurs de cette voie, DNA-PKcs et LIGIV ne seraient pas impliqués dans la formation de fusions télomériques (Maser et al., 2007). Leurs absences ne modifient pas la fréquence des chromosomes dicentriques dans ces cellules mTERC^{-/-} indiquant qu'un processus de microhomologie dit de « NHEJ non conventionnel » serait à l'origine de ces fusions. La nature des fusions permettrait de distinguer les télomères courts des télomères déprotégés (Figure 10). Une analyse des jonctions de fusions impliquant de télomères courts ou déprotégés révèle une différence de comportement. Selon certaines prédictions, les télomères courts résulteraient des événements de microhomologie alors que les télomères déprotégés impliqueraient davantage des événements de NHEJ (Capper et al., 2007).

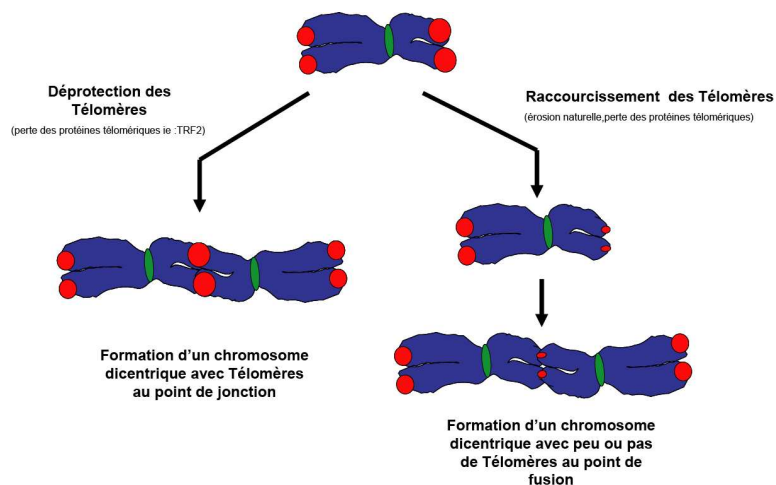


Figure 10 : Schéma récapitulatif présentant les différents types de fusions

La déprotection des télomères consécutive à une perte ou un endommagement des télomères mènerait à des fusions télomériques conservant les séquences télomériques. Les télomères érodés ou extrêmement courts peuvent aussi conduire à la formation de chromosomes dicentriques. Par contre ces fusions se distinguent des autres par l'absence de séquences télomériques au niveau de la jonction chromosomique.

ii. Fusions en absence des facteurs télomériques

Ici encore, les fonctions de protection des télomères semblent être portées par les facteurs qui leurs sont propres. L'absence de certains facteurs télomériques initie des événements NHEJ à l'origine de fusions télomériques.

TRF2 joue un rôle crucial empêchant la fusion des télomères (van Steensel et al., 1998). L'utilisation d'un allèle dominant négatif de *TRF2* déplace la protéine des télomères et provoque l'accumulation de fusions « télomère-télomère » caractérisées par des « ponts » anaphasiques visualisés par microscopie (Smogorzewska et al., 2002; van Steensel et al., 1998). Les fusions observées dans ces cellules sont produites par la voie NHEJ dépendante de la DNA LigaseIV (LIGIV) (Smogorzewska et al., 2002). Dans les cellules murines LIGIV^{-/-} ou Ku70^{-/-}, les fusions télomériques sont abolies indiquant qu'elles requièrent le NHEJ (Celli and de Lange, 2005; Celli et al., 2006; Smogorzewska et al., 2002). Ces fusions ne nécessitent pas la perte des répétitions télomériques (Smogorzewska et al., 2002). Chez la souris, la délétion conditionnelle de *TRF2* aboutit à la fusion massive des télomères par NHEJ (Celli and de Lange, 2005).

Par analogie avec la levure, il a été démontré que hRap1 empêche la formation des fusions télomères-télomères dépendante du NHEJ via son interaction avec TRF2 (Bae and Baumann, 2007). Le rôle de régulateur négatif du NHEJ de RAP1 est conservé au cours de l'évolution supposant que ce contrôle est essentiel à l'intégrité des télomères.

iii. Mécanisme moléculaire du NHEJ aux télomères

En absence de toute protection télomérique, les éléments du NHEJ vont prendre en charge les télomères déprotégés pour former des fusions. Suite à la déprotection des télomères, deux types de fusions sont possibles, l'une se produisant en G1 et l'autre juste après la réplication en G2. La taille des extrémités télomériques 3' simples brins est nettement plus importante que celle enregistrée chez la levure. Ainsi, les fusions télomériques formées en G1 requièrent des événements de NHEJ, qui nécessitent la dégradation de ces extrémités 3' (Smogorzewska et al., 2002). L'inactivation de ERCC1 dans les MEFs affecte l'aptitude des télomères à fusionner après l'introduction de *TRF2* Δ BAM (Zhu et al., 2003). De même, dans les tissus issus de patients XPF, l'extension persiste empêchant toute production de fusions télomériques. Le NHEJ promeut ainsi le recrutement de ERCC1/XPF à des sites télomériques déprotégés (Zhu et al., 2003).

Par ailleurs, l'inhibition de LIGIV dans des cellules déficientes pour TRF2 abolit l'apparition de fusions et les télomères conservent intacte leurs extrémités simples brins. Ces résultats suggèrent qu'en absence d'un NHEJ fonctionnel, ERCC1 est incapable de dégrader les extensions télomériques, étape essentielle dans la mise en place des fusions télomériques. (Zhu et al., 2003). Ainsi, en absence de protection des télomères, ERCC1 serait recruté par un partenaire du NHEJ pour finaliser les fusions (Figure 11).

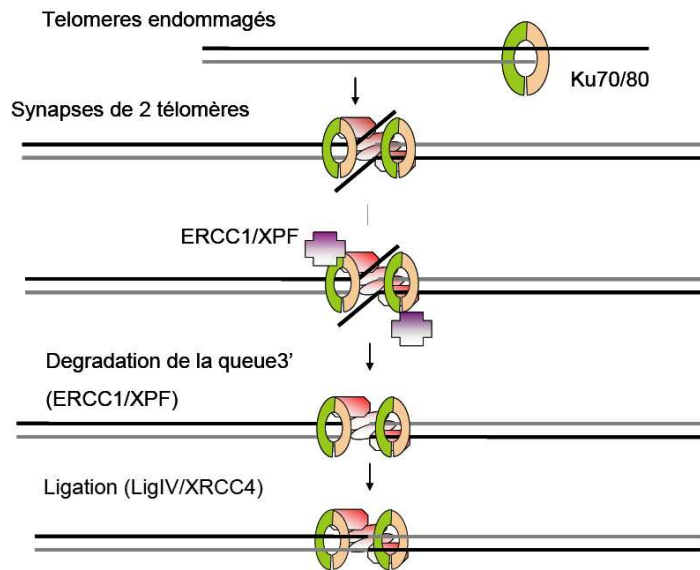


Figure 11: Fusions par NHEJ des telomeres endommagés.

Lorsque la protection des télomères est compromise, le NHEJ est responsable de la formation de fusions télomérique. ERCC1 est impliqué dans la dégradation de l'extension simple brin suggérant qu' ERCC1 soit recruté par le complexe NHEJ. En absence de la machinerie de NHEJ la queue G rich persiste. Le modèle actuel propose que la boucle T limite ces événements de fusions.

Les télomères déprotégées peuvent aussi fusionner après la réplication. Certaines fusions post-répliquatives sont caractérisées par des jonctions chromatiniennes impliquant le brin « directeur » (c'est-à-dire le brin riche en C) (Bailey et al., 2001; Jaco et al., 2003). Selon le modèle réplcatif, les molécules répliquées à partir du brin directeur posséderaient des extrémités télomériques franches, substrats privilégiés pour la machinerie NHEJ particulièrement en absence de protection (TRF2, DNA-Pkcs) (Bailey et al., 2001; Jaco et al., 2003). Au contraire, les brins synthésés par le brin « retardataire » possèdent une extrémité 3' simple brin après la dégradation de l'amorce d'Okazaki suffisant pour prévenir l'émergence de fusions de type NHEJ. Ce scénario implique que les fusions se produisent dans une fenêtre de temps très restreinte entre la fin de la

synthèse des télomères et la résection du brin 5' riche en C. Les fusions peuvent aussi avoir lieu entre un télomère dysfonctionnel et une cassure d'ADN génomique.

d) Protection contre les événements inappropriés de recombinaison homologue

i. *Recombinaison homologue entre les séquences télomériques : Echanges de chromatides sœurs aux télomères*

Comme nous l'avons décrit précédemment, les séquences télomériques s'échangeaient régulièrement dans les cellules ALT (Bailey et al., 2004a; Bechter et al., 2004a; Londono-Vallejo et al., 2004). Les échanges des chromatides sœurs ont été décrit comme dépendant directement de la recombinaison homologue (Sonoda et al., 1999), les T-SCE (Telomere-SCE) seraient la conséquence d'une dérégulation de la recombinaison télomérique dans des cellules ALT. La question relative à la régulation de la recombinaison télomérique dans les cellules normales ou exprimant la télomérase demeurerait sans réponse jusqu'à très récemment. Deux facteurs ont été décrits pour réprimer la recombinaison aux télomères : Ku70 et TRF2. L'absence de TRF2 ou de Ku70 dans les cellules exprimant la télomérase n'avait aucun effet sur le taux des T-SCE. En revanche, ces échanges étaient plus nombreux dans les souris invalidées pour ces deux protéines (Celli et al., 2006). La nature de cette répression demeure floue mais il semble que la boucle T limiterait l'invasion de l'extrémité dans une région télomérique double brin plus proximale. Le mécanisme par lequel Ku70 réprime la recombinaison télomérique n'est pas connu mais certains travaux suggèrent que Ku70 anihile l'action de la recombinaison homologue lors de la réparation de cassures doubles brins (Kooistra et al., 2004; Pierce et al., 2001). Ce modèle pourrait donc être aussi transposé aux mécanismes de répression de la recombinaison télomérique par Ku.

Un autre membre du Shelterin s'avère aussi tout aussi précieux dans le contrôle de la recombinaison télomérique : POT1. A l'image de TRF2 et de Ku, POT1 réprimerait la recombinaison télomérique. La délétion de POT1b stimule les échanges réciproques aux télomères suggérant que la répression de la recombinaison résulte de la protection de l'extrémité 3' simple brin par POT1b (He et al., 2006).

Par ailleurs, les défauts de POT1b provoquent une augmentation de la taille de l'extension 3' jugée recombinogène (He et al., 2006; Hockemeyer et al., 2006; Wu et al., 2006). Ainsi, la régulation de la taille de l'extension simple brin pourrait être liée au contrôle de la recombinaison

aux télomères. La recombinaison homologe nécessite des extrémités simples brins conséquentes (100nt chez la levure) pour former un nucléofilament RAD51 et accomplir efficacement une réaction d'échanges de brins (cf partie RH). Par analogie, des extensions 3' télomériques suffisamment longues seraient nécessaires à l'initiation de la recombinaison homologe.

ii. Déletion de la boucle T basée sur la recombinaison.

La boucle T présente quelques similitudes avec les structures formées durant le processus de recombinaison. A l'image d'une cassure double brin, l'extension télomérique 3' envahit une séquence télomérique double brin en position proximale pour former une jonction de type Holliday. La résolution de cette jonction conduit à la délétion de l'ADN télomérique en position distale du point d'envahissement du brin.

Comme nous l'avons vu ci-dessus, Ku, POT1 et TRF2 constituent les principaux candidats à la répression de ces événements de recombinaison télomérique. Une grande partie des données relative à la répression de la recombinaison télomérique provient d'observations consécutives à l'expression d'un mutant de TRF2 TRF2 Δ B (Wang et al., 2004). Ce mutant, déleté pour le domaine N-terminal, conserve son interaction avec RAP1 et TIN2, continue de réprimer le NHEJ et n'affecte pas la stabilité de l'extension 3' simple brin. Toutefois de larges segments télomériques sont rapidement observés par FISH et par une analyse bidimensionnelle (2D gel). Ce phénotype peut être aboli en absence de NBS1 ou de XRCC3, paralogue de RAD51 doté d'une activité résolvasse. Cette délétion génère des cercles d'ADN télomériques extra chromosomiques de taille comparable à celle d'une boucle T.

Dans le même temps, l'inhibition de POT1b conduit aussi à la formation de ces larges fragments circulaires confirmant que POT1b réprime la recombinaison aux télomères (He et al., 2006).

Le modèle proposé s'inspire largement de ce qui a été décrit chez la levure sous le terme de « Telomere Rapide Deletion » (TRD) (Avilion et al., 1996; Bucholc et al., 2001; Lustig, 2003) que nous avons évoqué précédemment .

iii. Recombinaison à des sites interstitiels

Chez l'homme, les séquences télomériques sont largement confinées aux extrémités des chromosomes mais chez d'autres mammifères notamment les rongeurs, des séquences télomériques sont retrouvées à des sites péricentriques. La recombinaison entre les séquences télomériques interstitielles (ITS) et les télomères mène à des remaniements chromosomiques majeures comprenant des inversions, des délétions voire des translocations. A l'image des autres

mécanismes décrits plus haut, ces événements de recombinaison sont réprimés au sein des régions télomériques.

Les chromosomes doubles minutes observés dans les cellules ERCC1^{-/-} résulteraient d'événements de recombinaison entre les télomères et les séquences ITS plus proximales (Zhu et al., 2003) sur le même chromosome (Figure 12). Selon le modèle proposé, l'endonucléase ERCC1/XPF va cliver un intermédiaire de la recombinaison pour restaurer la boucle T. En absence de ERCC1, la recombinaison génère en fonction de l'orientation des séquences TTAGGG interstitielles une inversion ou un chromosome double minute. Malgré leur faible nombre, certaines séquences ITS s'étendent sur plusieurs centaines de bases dans des régions subtélomériques humaines. Il se peut ainsi que ces ITS résultent d'une recombinaison interstitielle expliquant ainsi leur étendue (Mondello et al., 2000).

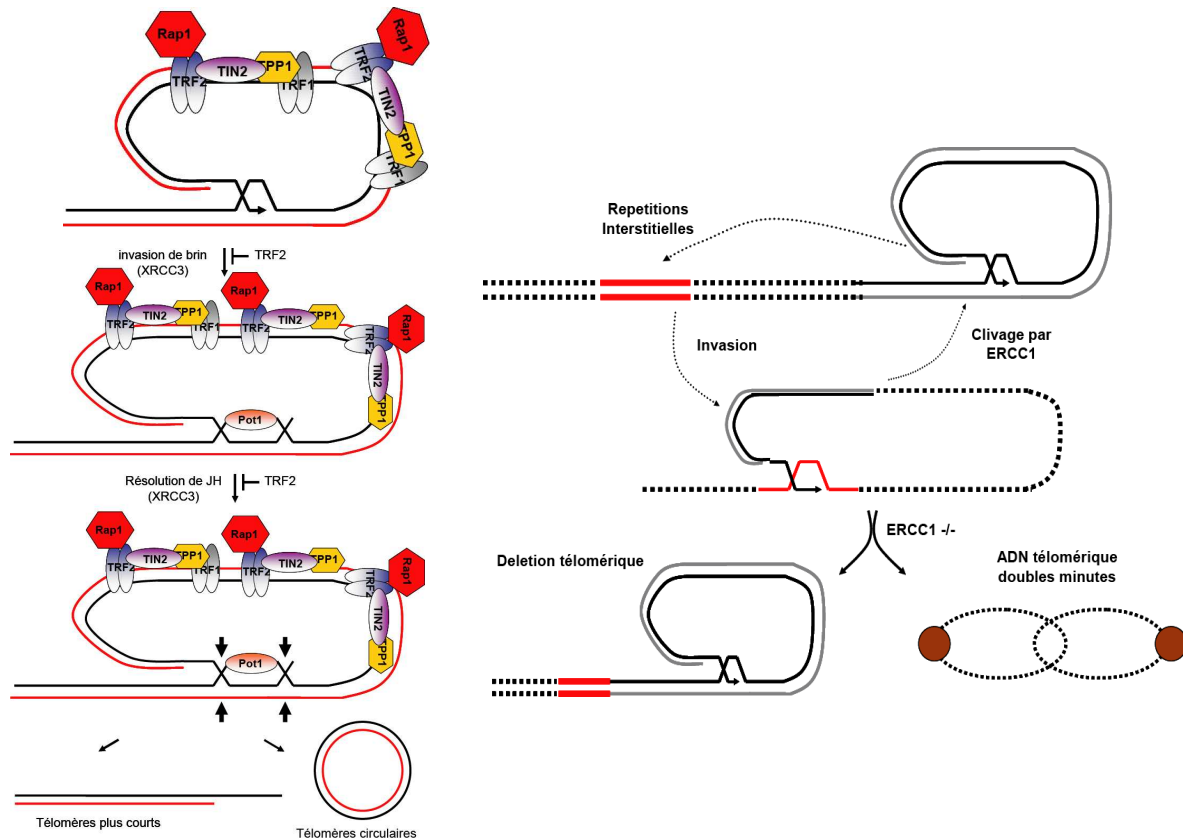


Figure 12: Mécanisme de recombinaison aux télomères dans une cellule exprimant la télomérase

Gauche : Mécanisme de répression de la délétion de la boucle T, Le domaine basique de TRF2 empêcherait l'invasion de brin au niveau de la jonction d'Holliday (D'après Wang 2004).

Droite : Modèle pour la formation de télomères doubles minutes via une recombinaison avec les télomères interstitiels (D'après Zhu 2003)

iv. Chromatine et contrôle de la recombinaison aux télomères

Le contrôle de la recombinaison télomérique s'articule sur la restriction de l'accès de la machinerie de recombinaisons aux extrémités des chromosomes. Les modifications structurales (chromatine) ou physiques (boucle T) constituent autant d'éléments susceptibles de moduler la recombinaison aux télomères. A l'instar du contrôle de la boucle T, le remodelage de la chromatine constitue une alternative pour la répression de la recombinaison aux télomères. Dans ce cas, l'accès des télomères peut être régulé par des modifications de la structure de la chromatine télomérique (méthylation des histones de l'ADN subtélomérique et télomérique, altérations des marqueurs de l'hétérochromatine). Il est possible que les altérations de la chromatine télomérique facilitent l'avènement de la recombinaison aux télomères. Chez *S. Cerevisiae*, l'inactivation de Hhop1, un connecteur d'histones, augmente la proportion de levures *tlc1* survivantes, connues pour maintenir leur télomères par le biais de la recombinaison (Downs et al., 2003)

Chez la souris, l'inhibition de *suv39h1* et *suv39h2* induit une élévation anormale de la taille des télomères comparés aux sauvages (Garcia-Cao et al., 2004). La perte de facteurs de l'hétérochromatine faciliterait l'accès de la machinerie de recombinaison aux régions télomériques. De plus, la déméthylation des télomères stimule les échanges télomériques et accroît la taille des télomères. En effet, les T-SCE sont beaucoup plus fréquents dans les cellules déficientes pour la DNA Methyltransférase (DNMT1) (Gonzalo et al., 2006).

Suv4-h20, appartenant à la famille des HMTases, gouverne la méthylation des lysines H4k20. L'absence de *Suv4-h20* se traduit par une élévation des télomères ainsi qu'une augmentation de la recombinaison télomérique (Benetti et al., 2007b). Toutes ces données suggèrent que le remodelage de la chromatine en particulier par la méthylation des histones peut moduler la recombinaison dans les régions télomériques.

Chapitre III. Mécanismes de réparation

Les travaux de Muller et McClintock ont mis en évidence une différence de comportement entre les télomères et le reste du chromosome face à l'irradiation. En fait, le télomère constitue une protection qui permet de distinguer les extrémités naturelles des chromosomes des cassures induites. Toutefois, aux vues de leurs compositions, les télomères constituent aussi une cible privilégiée pour diverses agressions (endogènes, chimiques ou radiations ionisantes). Ces atteintes peuvent moduler la durée de vie en régulant notamment la taille des télomères. Toutes ces données soulèvent la question du particularisme des télomères face à la réponse cellulaire aux lésions de l'ADN. En effet, est ce que les télomères sont réparés conformément au reste du génome ? Comment la présence de ces différents facteurs de signalisation et de la réparation des dommages à l'ADN (ATM, MRN, Ku...) aux télomères s'explique-t-elle : par la réparation des télomères ou bien par une participation au maintien des télomères ? Cette partie vise ainsi à détailler les relations qu'il existe entre les télomères et les mécanismes de réparation

I. Différents systèmes de réparations des dommages de l'ADN

Une fois la signalisation des dommages radioinduits mise en place, une partie de la réponse cellulaire aux dommages consiste à activer les systèmes de réparation des lésions de l'ADN. La signalisation et la réparation des dommages sont par ailleurs deux phénomènes très liés. Pour réparer les cassures induites, la cellule dispose de plusieurs mécanismes de réparation qui sont spécifiques des dommages. Ces systèmes sont très importants et leur dysfonctionnement entraîne un syndrome souvent caractérisé par une instabilité génétique et une prédisposition au cancer. Quatre voies de réparation de l'ADN corrigent principalement ces dommages : la réparation par excision de nucléotide (NER pour Nucléotide Excision Repair), la réparation par excision de base (BER pour Base Excision Repair), la réparation des mésappariements (MMR pour MisMatch Repair) et enfin la réparation des cassures doubles brins qui comprend la recombinaison homologue (RH pour Homologous Recombination) et la recombinaison non homologue (NHEJ pour Non Homologous End Joining)

II. Les cassures double brins de l'ADN : production, signalisation et réparation

1. Nature des CDBs

Beaucoup de lésions sont induites par le métabolisme cellulaire ou par des conditions environnementales. Plusieurs types de dommages sont recensés parmi les plus fréquents, on retrouve les dommages de bases, les cassures simple brins, les pontages de l'ADN ou les cassures double brins. Ces dernières peuvent être générées, à une faible fréquence, par le métabolisme ou suite à la réplication à proximité d'une cassure simple brin. Les cassures doubles brins de l'ADN sont les plus toxiques pour la cellule. Mal réparées ou non réparées, ces lésions peuvent entraîner la mort de la cellule par apoptose (Rich et al., 2000). Alternativement, une cassure peut engendrer des réarrangements chromosomiques, sources d'instabilité génomique (Richardson and Jasin, 2000).

2. Voies activées par les CDB

Suite à l'induction de cassures, la cellule détecte et signale les cassures double brins en mettant un jeu plusieurs mécanismes. Ces mécanismes font intervenir des protéines de détection des dommages (complexe MRE11/RAD50/NBS1, Ku), des protéines de transduction (kinases ATM, ATR et DNA-PKcs) et des protéines effectrices (protéines de la réparation, du contrôle du cycle cellulaire ou de l'apoptose) (O'Driscoll and Jeggo, 2006); (Valerie and Povirk, 2003) (Figure 13). Ces voies de signalisations coordonnent la réponse cellulaire consécutive à l'irradiation qui regroupe les points de contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation par NHEJ ou RH dans un réseau complexe. Certaines mutations de ces protéines sont à l'origine de plusieurs pathologies humaines.

Les cassures doubles brins sont réparées par deux mécanismes distincts : (i) la recombinaison homologue (RH) qui nécessite l'utilisation d'une molécule d'ADN homologue à la molécule lésée (ii) la ligature des extrémités de la cassure n'utilisant pas ou peu d'homologie de séquences (NHEJ).

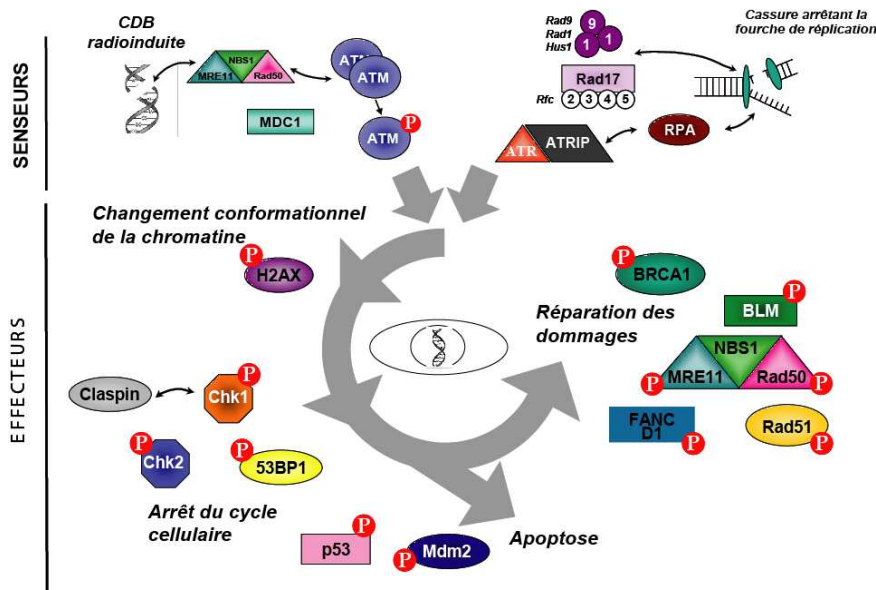


Figure 13 : Signalisation des dommages de l'ADN

L'induction d'une cassure double brin induit respectivement la reconnaissance de cassures radioinduites par ATM (CBD radioinduite), ou par ATR (pour le blocage au niveau d'une fourche de réplication). Ces deux kinases vont ensuite phosphoryler les protéines effectrices de la réponse cellulaire intervenant dans les différents modèles (Arrêt du cycle, apoptose ou réparation) (D'après Boucher D. communication personnelle).

III. Réparation des cassures double brins (CDBs) par NHEJ

1. Description du NHEJ : Mécanismes moléculaires de la recombinaison non homologue :

A l'heure actuelle, il est admis que la voie par religation non homologue (Non Homologous End Joining « NHEJ ») est prépondérante dans les cellules de mammifères. Le NHEJ est opérationnel dans toutes les phases du cycle cellulaire et il pourrait s'agir d'un mécanisme de réparation immédiat dans les cellules humaines (Rothkamm et al., 2003) (Kim et al., 2005).

Un modèle simplifié, actuellement admis, présente les premières étapes du NHEJ comme suit (Figure 14): l'hétérodimère Ku70/80 fixe les extrémités d'ADN double brin au niveau de la cassure, puis DNA-pkcs est recrutée et interagit avec l'ADN fixé à Ku pour former le complexe DNA-PK. Deux protéines DNA-PKcs, de part et d'autre de la cassure, en association avec Ku, assurent le maintien des extrémités dans une configuration permettant la maturation puis la ligation des extrémités d'ADN. Une fois activée, DNA-PKcs phosphoryle XRCC4 stimulant l'activité de ligation de XRCC4/Ligase IV (Leber et al., 1998). Le complexe XRCC4/Ligase IV associé à la protéine XLF assure l'alignement des deux extrémités d'ADN indispensable à la

poursuite de la réaction. Les extrémités sont susceptibles d'être modifiées quelques peu (remplissage par des polymérase des extrémités) pour poursuivre les étapes de ligation. Dans le cas où des cassures complexes sont générées (traitement aux rayonnements ionisants, agent génotoxiques), les CDBs peuvent adopter une conformation stable et non digérable par les enzymes de dégradation dites en épingles à cheveux (Pannicke et al., 2004). Après le recrutement du complexe DNA-PK aux sites de cassures, ces structures sont prises en charge par une exonucléase (Lobrich and Jeggo, 2005), Artémis, qui facilite l'ouverture de ces structures en épingles nécessaires à une réaction efficace de ligation (Jeggo and O'Neill, 2002)

2. Les voies alternatives du NHEJ

In vivo, l'analyse par électrophorèse en champ pulsé a montré l'existence de deux composantes de réparation des CDBs : (i) une composante rapide (30 min) majoritaire en présence de DNA-PKcs et (ii) une composante lente (12 h) qui permet de prendre en charge une proportion similaire de DSB en l'absence de DNA-PKcs (DiBiase et al., 2000). On parle ainsi de deux composantes distinctes D-NHEJ (DNA-PK-dependent-NHEJ) et B-NHEJ (Backup-NHEJ) (Wang et al., 2003). Parmi les acteurs potentiels de cette voie alternative, le complexe LigIII/XRCC1 pourrait assurer la ligation de CDBs persistantes (Wang et al., 2005), (Audebert et al., 2004).

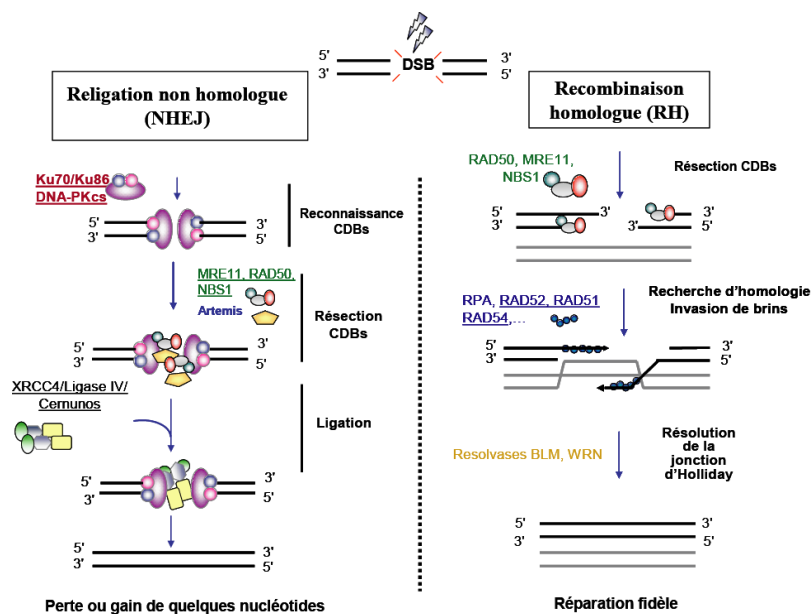


Figure 14: Description des mécanismes de la réparation des cassures doubles brins

(Gauche) Réparation par NHEJ, (droite) Réparation par recombinaison homologues

IV. Réparation de CDBs par la Recombinaison homologue :

Les cellules de mammifères ont recours moins fréquemment à la recombinaison homologue (RH) pour réparer les cassures doubles brins. Cette voie est davantage utilisée pour la réparation des cassures formées en S/G2. La RH nécessite l'appariement d'un fragment d'ADN avec une séquence homologue servant de matrice à la synthèse réparatrice.

3. Les différents modèles de recombinaison homologue

Deux grands mécanismes de recombinaison homologue sont décrits: la conversion génique (CG) et le BIR (Break-Induced Replication). Dans certains cas, une CDB peut être réparée par un troisième mécanisme, Le SSA (Single-Strand Annealing) qui peut s'apparenter à la RH. Dans cette première partie, nous détaillerons les modèles qui rendent compte de ces différents processus.

a) Conversion génique

La conversion génique est définie comme un échange d'information génétique non réciproque entre une séquence d'ADN receveuse et une séquence homologue donneuse. D'une façon générale, elle résulte du remplacement d'une portion d'ADN lésé sur une chromatide par une portion d'ADN portée par une chromatide du chromosome homologue. Le modèle de conversion génique peut parfaitement expliquer les événements de recombinaison observés en mitose. Deux modèles non exclusifs peuvent rendre compte de la conversion génique: le modèle de réparation des cassures double brin de Szostak et le modèle de Synthesis-Dependent Strand Annealing (SDSA) (Figure 15).

b) BIR

Un modèle de recombinaison associé à la présence d'une fourche de réplication a été proposé. Ce modèle permet d'expliquer des longs événements de conversion génique impliquant tous les marqueurs d'un même bras de chromosomes. On parle de réplication induite par une cassure ou BIR « Break Induced replication ». Le BIR est un mécanisme de recombinaison qui peut se substituer dans certains cas à la conversion génique (Figure 16) (Malkova et al., 1996). Ce modèle décrit chez la levure n'a pas encore été observé dans les cellules de mammifères.

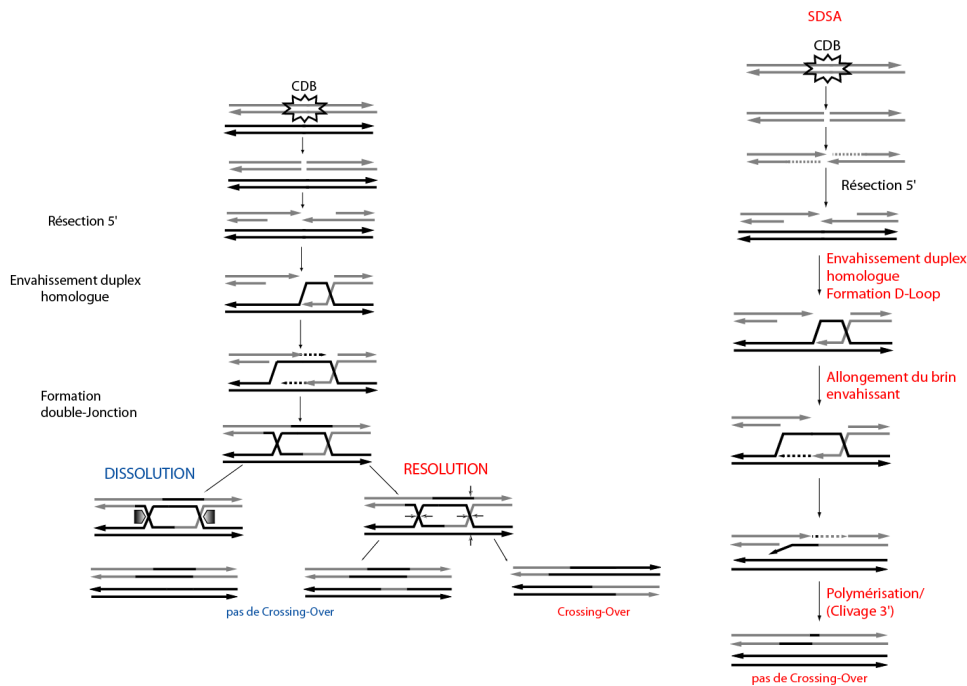


Figure 15: Mécanismes de conversion génique

(Gauche) **Modèle de Szlok** : Les extrémités 5' de la cassure sont ensuite dégradées, ce qui libère des ADN simple brin. Après recherche d'homologie, l'un des ADN simple chaîne envahit le duplex homologue, créant une structure en D-loop. L'extrémité 3'OH envahissante est alors capable d'initier la synthèse réparatrice. La synthèse entraîne la migration de la D-loop, qui peut s'apparier avec la seconde extrémité simple brin de la cassure. Cette seconde extrémité 3'-OH est alors capable d'initier une seconde synthèse. La capture des extrémités peut ensuite entraîner la formation d'une double Jonction Holliday. Si les deux jonctions sont coupées et liées symétriquement, alors la résolution n'est pas associée à un CO. Au contraire si double Jonction Holliday est coupée de façon asymétrique, alors la résolution est associée à un CO.

(Droite) **La voie de « Synthesis-Dependent Strand-Annealing » (SDSA)** permet la réparation de la CDB en déplaçant le brin envahissant en dehors du duplex et son appariement au brin 3' libre de l'autre extrémité de la CDB. Des étapes de synthèse d'ADN et de clivage des séquences non appariées peuvent être nécessaires. Cette voie de recombinaison n'implique pas d'échange réciproque de séquences d'ADN entre le substrat contenant la CDB et la matrice contenant la séquence homologue

c) SSA

Lorsqu'une cassure survient entre deux séquences répétées en orientation directe, le mécanisme de dégradation, hybridation aussi appelée SSA (single strand annealing) peut conduire à une réparation efficace. Le mécanisme de dégradation-hybridation n'implique pas de recherche d'homologie active entre un ADN simple brin et un duplexe homologue, mais une hybridation de séquences complémentaires (Figure 16).

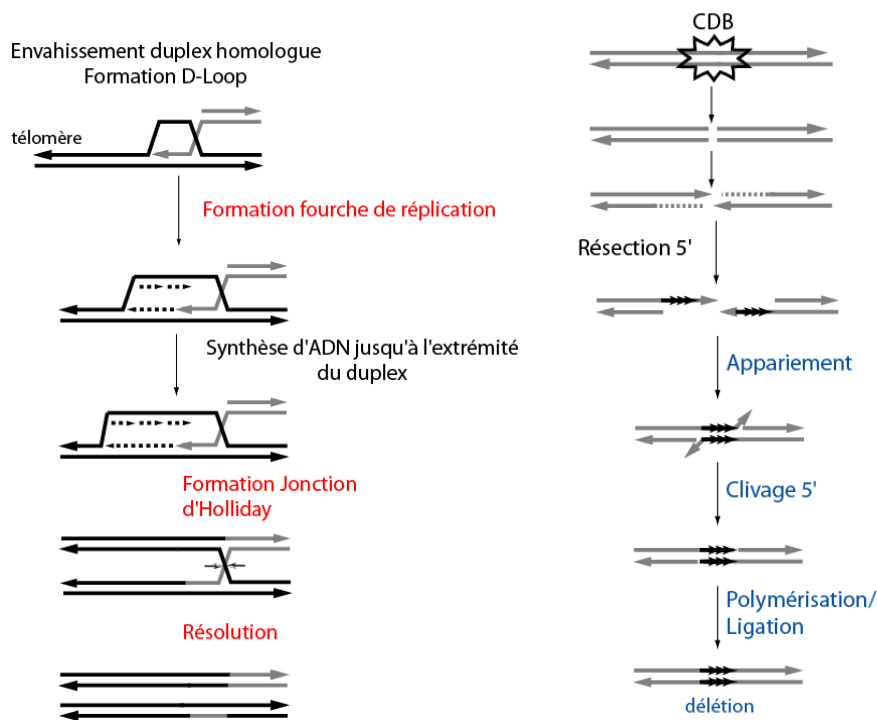


Figure 16 : Modèles de réparation des cassures doubles brins par RH

(Gauche) Mécanisme de Break Induced Repaired « BIR », (Droite) Mécanisme de Single Strand Annealing « SSA » Ce mécanisme requiert l'action des protéines Rad52 et ERCC1/XPF pour respectivement assurer l'hybridation des séquences complémentaires et l'élimination des séquences non appariées

4. Mécanismes moléculaires de la recombinaison homologue

Les cassures doubles brins ou simples brins peuvent être générés par le métabolisme cellulaire ou par des agents génotoxiques. Les cassures doubles chaînes sont prises en charge par le complexe MRE11/RAD50/NBS qui agit en tant qu'effecteur de la recombinaison réalisant la résection des extrémités des cassures doubles brins à l'aide de son activité. Les cassures sont ensuite maturées afin de générer les extrémités d'ADN simple brin qui initient les événements de recombinaison (Figure 14).

Les protéines Rad52 et RPA se fixent sur les extrémités pour faciliter le recrutement de la protéine RAD51 en éliminant les structures secondaires de l'ADN (Baumann and West, 1997; Golub et al., 1998; Kurumizaka et al., 1999). Une extrémité 3' de la molécule lésée envahit la molécule duplexe homologue et s'apparie au brin matrice. La protéine RAD51 peut alors se fixer sur les extrémités d'ADN simples brins ainsi générés.

Par la suite le processus synaptique se met en place. Elle se déroule en plusieurs étapes : (i) recherche d'homologie entre l'ADN simple brin et le duplexe (ii) l'appariement entre l'extrémité

simple brin envahissante et le duplexe de l'ADN (iii) l'échange de brins qui initie la formation de l'hétéroduplexe.

Sous le contrôle de BRCA1 et BRCA2, RAD51 recherche la séquence correspondante sur le chromosome homologue pour ensuite envahir l'autre brin. Cette invasion de brins est facilitée par la protéine Rad54 (Golub et al., 1997; Mazina and Mazin, 2004). En effet, cette protéine forme des enroulements négatifs au niveau du duplex qui facilite l'accès et l'invasion de brins.

Pour aboutir à un échange de brins complet, l'hétéroduplexe formé est étendu. L'extension de l'hétéroduplexe peut se faire de 2 façons. Soit la protéine RAD51 continue l'échange de brins avec une polarité 5' vers 3' par rapport au brin déplacé : l'échange de brins est donc unidirectionnel. Soit l'extension de l'hétéroduplexe est assurée par la migration de la jonction Holiday formé par l'initiation d'échanges de brins (Figure 15)

Chapitre IV. Télomères et réparation

I. Interaction Télomères et protéines de la réparation

En plus des protéines télomériques, les protéines de la réparation et de la signalisation des cassures doubles brins sont aussi présentes au niveau des télomères. Une vue simpliste supposerait que leurs présences pourraient compromettre la conciliation établie entre la machinerie de réparation et les extrémités des chromosomes. Aux vues des données actuelles, ces protéines sont au contraire essentielles à la mise en place de télomères fonctionnels. Il est surprenant de voir que les protéines impliquées dans la signalisation et la réponse aux télomères endommagés préservent aussi l'intégrité des télomères. Comment des fonctions apparemment opposés peuvent marcher de concert ? Comment les facteurs de la réparation peuvent différencier les télomères intacts de ceux endommagés ? Cette partie vise à décrire les faits étayant l'interconnexion entre la biologie des télomères et la réparation de l'ADN. Nous résumerons ainsi les données relatives à l'implication de la machinerie de réparation dans la maintenance des télomères et nous décrirons comment certains partenaires peuvent coopter pour une réponse adaptative face au dysfonctionnement télomérique.

1. Télomères et signalisation des cassures doubles brins

a) ATM et les télomères

ATM joue un rôle primordial dans la signalisation des cassures doubles brins, mais peut aussi garantir le maintien de l'intégrité télomérique. Sa fonction dans le métabolisme des télomères se décline en plusieurs volets : le contrôle de la taille des télomères, la protection des télomères, son implication dans la signalisation des télomères endommagés, et dans la réplication des télomères.

i. Contrôle de la taille des télomères

Les patients AT (syndrome d'Ataxie telangiectasia), pour lesquels la protéine ATM est altérée, présentent des télomères plus courts que les sujets sains du même âge (Cabuy et al., 2005; Metcalfe et al., 1996; Pandita et al., 1995). De plus, l'expression d'un dominant négatif d'ATM induit un raccourcissement prématuré de la taille des télomères, attribué à la perte des séquences lors de la dissociation des chromosomes dicentriques au cours des divisions cellulaires (Smilenov

et al., 1997). D'autres hypothèses sont avancées pour expliquer la réduction de la taille dans les cellules AT. De concert avec le complexe MRN, ATM modifierait l'association de TRF1 avec l'ADN télomérique au profit d'une élongation des télomères via la télomérase dans les cellules humaines (Zhong et al., 2007). Toutefois ces travaux vont à l'encontre des précédentes études réalisées chez la souris. En effet, il a été démontré que la protéine ATM n'est pas requise pour l'élongation des télomères courts par la télomérase. Ainsi, le recrutement de la télomérase différerait selon l'organisme étudié (en l'occurrence souris versus levure et homme) (Feldser et al., 2006) (Chang et al., 2007; Hector et al., 2007). Le rôle d'ATM dans la régulation de la taille n'est pas évident et nécessite encore quelques éclaircissements.

ii. Rôle dans la protection

A la différence des cassures, les télomères se distinguent par leur structure particulière. En absence d'ATM, des associations télomériques sont fréquemment relevées dans les cellules issues de patients AT. De plus, une analyse PCC (premature condensation of chromosomes) a permis de visualiser des chromosomes dicentriques en G1 et G2 dans les cellules exprimant une protéine ATM tronquée (Smilenov et al., 1997) suggérant que les fusions observées soient la conséquence directe de la dérégulation d'ATM aux télomères. Ces fusions persistent après l'expression de la télomérase malgré l'élongation des télomères (Wood et al., 2001). Ainsi, les fusions observées ne sont pas la conséquence d'un raccourcissement télomérique mais bien d'une altération de la protection des télomères.

A d'autres égards, ATM participe à la protection des télomères. Il a été proposé qu'à la fin de la réplication, les télomères, sous forme déprotégés, activeraient la réponse aux dommages par le biais d' ATM (Verdun et al., 2005). Après la réplication, son recrutement en phase G2 serait nécessaire à la reconstitution d'une structure fonctionnelle des télomères (Verdun et al., 2005).

iii. Rôle dans la réponse aux dommages

Lorsque les télomères sont trop courts ou déprotégés, l'activation d'ATM mène à la sénescence ou à la mort cellulaire. En effet, la perte de TRF2 génère une déprotection massive des télomères, à l'origine d'un signal apoptotique relayé par ATM (Karlseder et al., 1999; Smogorzewska and de Lange, 2002). L'activation d'ATM permet d'initier la réponse de dommages à l'ADN en recrutant des facteurs de la réparation aux sites télomériques formant des structures nommées TIFs (Telomeres dysfunction Induced Focis). Ainsi, l'inhibition d'ATM par la caféine diminue la quantité de foyers TIFs induits (Takai et al., 2003). Après l'activation d'ATM, les réponses

cellulaires induites sont inhérentes au type cellulaire. Pour les fibroblastes, l'altération des télomères favorise l'émergence de cellules sénescents alors que l'apoptose est prédominante dans les lymphocytes ou cellules épithéliales (Karlseder et al., 1999).

Dans des conditions physiologiques, la forme active d'ATM est réprimée aux télomères. Cette répression semble être orchestrée par TRF2 qui interagit avec ATM aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Karlseder et al., 2004). La surexpression de TRF2 inhibe l'autophosphorylation d'ATM en position S1981 et abolit par la même occasion sa fonction de contrôle du cycle cellulaire. Cette action a pour but de limiter la réponse aux lésions de l'ADN mais reste restreinte aux télomères compte tenu de l'abondance de TRF2 (Denchi and de Lange, 2007; Karlseder et al., 2004).

iv. Autres fonctions

Enfin, ATM joue aussi un rôle dans la structure de la chromatine télomérique. C'est ainsi que les cellules AT présente une sensibilité exacerbée à la MNase et un attachement des télomères à la matrice très conséquent (80% au lieu de 50 % dans les cellules contrôle) (Smilenov et al., 1997).

b) ATR et les télomères

ATR est un élément essentiel de la réparation de cassures UV induites. Son activation est consécutive à la formation d'une cassure simple brin. Très peu de données permettent de d'établir le rôle exact d'ATR dans la maintenance des télomères. En effet, aucune étude n'a mis en évidence un éventuel rôle d'ATR dans la régulation de la taille des télomères ou bien leurs protections. La majeure partie des faits publiés aborde sa participation dans la signalisation des dommages. En absence d'ATM, ATR peut activer la réponse de dommages suite à l'érosion ou à la déprotection des télomères (Herbig et al., 2004) A l'instar d'ATM, son inhibition abolit la formation des foci TIFs confirmant son rôle dans la signalisation des dommages télomériques. Par la suite, des travaux ont démontré que les dommages signalés par ATM diffèrent de ceux détectés par ATR (Denchi and de Lange, 2007). En effet, pendant que TRF2 réprime l'activation de ATM, ATR est inhibé par POT1. Ainsi, POT1 agirait en compétition avec RPA pour se fixer sur l'extension télomérique 3' empêchant ainsi l'activation d'ATR.

c) Le Complexe MRN

Le complexe MRN est recruté aux télomères via son association avec les protéines télomériques TRF1 et TRF2 chez les mammifères. Des analyses d'immunofluorescence ou

d'immunoprecipitation de chromatine démontrent que RAD50 et MRE11 sont associés aux télomères tout le long du cycle cellulaire alors que NBS1 est recruté transitoirement aux télomères pendant la phase S. En revanche chez la levure, l'ensemble du complexe est recruté transitoirement en phase S (Zhu et al., 2000). MRN est impliqué dans le métabolisme des télomères à plusieurs égards.

i. Contrôle de la taille

Ce complexe est essentiel à la viabilité cellulaire et à la stabilité du génome ce qui empêche toute manipulation ou invalidation de l'expression de ces gènes dans les cellules humaines compliquant l'analyse de sa fonction au sein des télomères. Cependant certaines pathologies présentent des mutations hypomorphiques des gènes codant pour le complexe MRN.

Bien qu'aucune données cliniques concernant un vieillissement prématuré n'aient été constatées, les cellules lymphocytaires de patients NBS présentent une taille de télomères réduite (Ranganathan et al., 2001). De même, les télomères raccourcissent prématurément lorsque les cellules fibroblastiques primaires issues de ces patients sont mises en culture. La réduction des télomères atteint un rythme de 200-240pb perdus /division cellulaire, comparable à celui observé dans des cellules AT (Cabuy et al., 2005).

De récents travaux précisent le rôle du complexe MRN dans la régulation de la taille des télomères. En effet, la surexpression de RAD50 aux télomères favorise une élongation des télomères. Son action serait concomitante avec la phosphorylation de TRF1 par ATM qui modifie son affinité avec les séquences télomériques (Wu et al., 2007). Il a été donc proposé que lors du recrutement de NBS1 aux télomères pendant la phase S, le complexe MRN facilite la phosphorylation de TRF1 par ATM. Sous forme phosphorylée, TRF1 ne s'associe plus à l'ADN télomérique facilitant l'accès de la télomérase aux télomères pendant la phase S. Ainsi, le complexe MRN constituerait un élément clef de l'élongation orchestrée par la télomérase (Wu et al., 2007).

Le lien entre le complexe MRN et l'action de la télomérase a déjà été évoqué. En effet, la restauration de la taille des télomères dans les cellules NBS nécessita la coexpression de la télomérase et de NBS1. A la vue de son implication dans la formation d'une extension 3' télomérique, ces données laissent entendre que NBS1 soit nécessaire à une action efficace de la télomérase (Ranganathan et al., 2001). Toutefois, aucune réduction de la taille de l'extrémité télomérique 3' n'a été observée dans les cellules NBS. Cette hypothèse est pourtant étayée par

une autre étude qui met en évidence la contribution du complexe MRN dans le maintien de l'extrémité télomérique 3' simple brin. L'inhibition transitoire du complexe MRN réduit la taille de l'extension 3' exclusivement dans des cellules humaines exprimant la télomérase. Le complexe MRN serait impliqué dans l'établissement de l'extrémité 3' facilitant ainsi le recrutement de la télomérase. Dans ce cas, le complexe assurerait la résection du brin 5' riche en C afin d'amorcer l'action de la télomérase (Chai et al., 2006).

ii. Role de protection

La protection des télomères dans les cellules NBS1 mutées semble être compromise. Des fusions chromosomiques sont observées fréquemment dans ces cellules.

En plus de ces fusions, l'inhibition de NBS1 par RNA interférence occasionne des associations télomériques dans les cellules lymphoblastiques humaines (Zhang et al., 2005). Selon Zhang et ses collaborateurs, les associations télomériques résulteraient d'événements de recombinaison entre les chromatides sœurs. Ce phénotype d'instabilité télomérique a été observé dans d'autres circonstances dans les cellules humaines. L'expression d'une forme mutante NBS1^{S278A/S343A}, non phosphorylable par ATM, mène à la perte des télomères sans pour autant modifier la quantité d'ADN télomérique dans la cellule indiquant que ces pertes résultent d'une anomalie de protection et non d'une dérégulation de la longueur des télomères (Bai and Murnane, 2003). Ainsi, la phosphorylation de NBS1 par ATM aux télomères serait indispensable à sa fonction dans la maintenance des télomères.

L'instabilité télomérique peut aussi se manifester par une plus grande accessibilité des télomères. Pendant la phase G2, la dégradation de la protéine MRE11 (adenovirus /shRNA) facilite la modification des télomères par la terminale transférase (TdT), indiquant que ce complexe limiterait l'action d'enzymes non spécifiques des extrémités chromosomiques (Verdun et al., 2005). De plus, la présence de MRE11 et des formes phosphorylées de NBS1 et ATM laisse penser que le télomère est accessible à la machinerie de réparation pendant la phase G2. Cette détection est jugée essentielle quant à la mise en place d'une protection efficace des télomères.

Par ailleurs, lors de la déstabilisation ou l'érosion des télomères, le complexe MRN, plus particulièrement MRE11 est recruté aux sites télomériques indépendamment de son interaction avec ATM ou d'autres PI3K (Takai et al., 2003).

iii. Rôle dans la réplication

Des expériences d'immunoprécipitation de chromatine dans les cellules humaines synchronisées ont permis de détecter les formes phosphorylées MRE11 et NBS1 en fin de phase S persistants jusqu'en début de mitose. Selon le modèle proposé par Karlseder de ses collaborateurs, avec ATM, le complexe MRN serait recruté après le passage de la fourche de réplication en fin de phase S/début G2 (Verdun et al., 2005; Verdun and Karlseder, 2006)

Aux vues des précédents résultats exposés, le complexe MRN jouerait un rôle dans la dynamique de l'extrémité simple brin. Compte tenu de son activité exonucléasique, il apparaît comme un candidat potentiel pour la résection du brin 5' riche en C nécessaire à la genèse d'une extension télomérique 3' après la synthèse des chromosomes (Verdun and Karlseder, 2006) mais une telle activité n'a pas encore été avérée pour les séquences télomériques.

d) Complexe 9.1.1

L'arrêt de la progression de la fourche de réplication ou l'accumulation de lésions simples brins est prise en charge par la voie AKT/Chk1. Après la fixation de RPA sur les lésions simples brins, la protéine ATR est activée pour recruter par la suite le complexe Rad9/Rad1/Hus1 appelé 9.1.1. Ce complexe est aussi bien impliqué dans la signalisation de cassures simples brins que dans le métabolisme de l'ADN. Il participe directement à divers mécanismes de la réparation (BER, TLS, RH).

Sous forme de clamp (structure comparable à celle de la protéine RPA), le complexe 9.1.1 est impliqué dans la maintenance des télomères chez des mammifères. Ce complexe est associé à l'ADN télomérique dans les cellules humaines et murines (Francia et al., 2006). Dans les cellules normales ou exprimant la télomérase, cette association implique les trois éléments du complexe. L'inhibition de Rad9 induit des fusions télomériques pendant que la réduction d'expression de Hus1 diminue sensiblement la taille des télomères dans les cellules murines évoquant une contribution de 9.1.1 dans la maintenance des télomères. Par ailleurs, l'activité télomérase diminue en absence du complexe sans pour autant affecter l'expression des éléments constitutifs du complexe télomérase présageant ainsi d'une interaction entre le complexe 9.1.1 et la télomérase (Francia et al., 2006). Ainsi, le complexe 9.1.1 améliorerait la processivité de la télomérase lors de la réplication. En effet, des extrémités 5' réséquées d'un fragment d'ADN constituent un substrat privilégié pour le complexe 9.1.1 (Ellison and Stillman, 2003); (Majka et al., 2006). Dans ce cas, *in vivo*, les télomères peuvent être la cible privilégiée de ce complexe.

Par ailleurs, ce complexe est aussi mis en évidence au sein des corps APBs, spécifique des cellules ALT. Il est possible qu'en absence de la télomérase, le complexe 9.1.1 puisse initier la recombinaison télomérique dans ces cellules (Nabetani et al., 2004).

2. Télomères et NHEJ.

a) Ku et les télomères

Initialement décrit pour son rôle dans la réparation des cassures doubles brins, Ku a été identifié à plusieurs reprises aux abords des télomères dans différentes espèces.

i. Rôle de Ku dans régulation de la taille des télomères

Suite aux travaux réalisés chez la levure, précisant le rôle primordial de Ku aux télomères (Boulton and Jackson, 1996; Gravel et al., 1998), plusieurs groupes ont constaté la présence de Ku au niveau des séquences télomériques de mammifères (d'Adda di Fagagna et al., 2001; Griffith et al., 1999; Hsu et al., 1999). Sa présence aux télomères est régie par son interaction avec les protéines TRF1 et TRF2, indépendamment de DNA-PKcs. Ku peut interagir directement ou non avec les séquences répétées télomériques TTAGGG (Hsu et al., 1999; Hsu et al., 2000). La contribution de Ku dans la régulation de la taille des télomères demeure floue. Une première étude révèle que les cellules provenant de souris invalidées Ku86^{-/-} et de cellules souches embryonnaires Ku70^{-/-} présentent une réduction de la taille des télomères de l'ordre de 40% (d'Adda di Fagagna et al., 2001). Parallèlement, une autre étude démontre que l'absence de Ku80 dans les cellules embryonnaires de souris mène à une légère élongation des télomères (Samper et al., 2000). Ces données ont été ensuite confirmées par la même équipe, assurant que cette élongation est corrélée à l'absence de Ku86 (Espejel et al., 2002a). Bien que ces deux approches aient été réalisées chez la souris, les contradictions relevées peuvent s'expliquer par la diversité des fonds génétiques utilisés.

Ku joue un rôle crucial dans la viabilité des cellules humaines. Ainsi, très peu d'analyses ont pu préciser le rôle de Ku dans la maintenance des télomères humains. Pourtant, deux études révèlent que l'absence transitoire (Jaco et al., 2004) ou la suppression d'un des allèles de Ku86 (Myung et al., 2004) mène à un raccourcissement drastique de la taille des télomères confirmant la première étude réalisée chez la souris.

ii. Rôle de Ku dans la protection des télomères

Plusieurs études réalisées chez les mammifères évoquent un rôle de Ku dans la protection des extrémités naturelles des chromosomes empêchant toutes fusions télomériques (Bailey et al., 1999; Hsu et al., 1999; Hsu et al., 2000). Néanmoins, il reste à savoir si ce rôle de protection nécessite une implication directe ou non de Ku. Les précédentes études ont permis aussi de préciser la contribution de Ku dans la stabilité télomérique.

Ainsi, l'allongement des télomères dans les souris Ku80^{-/-} s'accompagne de fusions télomériques conservant leurs séquences télomériques au niveau de ces jonctions (Samper et al., 2000).

Au contraire, le groupe de SP Jackson observe des fusions télomériques dépourvues de signaux télomériques au niveau des jonctions. Selon eux, les fusions résulteraient directement du raccourcissement des télomères. Ainsi, les télomères extrêmement courts, formés après la perte de Ku, constituent un substrat privilégié pour le NHEJ. Néanmoins, cette hypothèse repose sur l'existence d'un mécanisme NHEJ indépendant de Ku, responsable des fusions télomériques (d'Adda di Fagagna et al., 1999). Cette hypothèse séduisante a l'avantage de corroborer les faits décrits chez la levure (Baumann and Cech, 2000), (Polotnianka et al., 1998).

Pourtant, d'autres études réalisées chez l'homme suggèrent l'implication directe de Ku dans la protection des télomères. En effet, l'inhibition transitoire ou la suppression d'un des allèles de Ku86 conduit à une augmentation significative du nombre de fusions télomériques avec des séquences détectables à la jonction des fusions (Jaco et al., 2004; Myung et al., 2004). D'ailleurs des études approfondies des fusions des télomères indiquent que les télomères fusionnent, après la réplication, au niveau des chromatides issues de la réplication du « brin directeur » (brin riche en C) (Jaco et al., 2004).

La protection de télomères se définit aussi dans sa capacité à limiter les événements de recombinaison qui peuvent s'avérer létale. Comme nous l'avons exposés précédemment, en collaboration avec TRF2, Ku réprimerait les événements de recombinaison télomériques (T-SCE) dépendant directement de la RH (Celli et al., 2006).

Aux vues des différents éléments présentés, l'implication de Ku dans la protection et le contrôle de la taille ne peuvent être remise en question, toutefois son rôle dans les différentes voies de régulations télomériques reste obscure et nécessite quelques précisions.

b) DNA-PKcs et les télomères

ii. Rôle de DNA-PKcs dans la protection des télomères

A l'instar de Ku, DNA-PKcs est aussi présent aux télomères et joue un rôle dans la protection des extrémités des chromosomes (d'Adda di Fagagna et al., 2001; Gilley et al., 2001; Goytisolo et al., 2001; Hsu et al., 1999). De nombreuses analyses cytogénétiques des cellules déficientes pour DNA-PKcs indiquent une instabilité génomique caractérisée par une forte proportion de fusions télomères.

Des mutations naturelles de DNA-PKcs ont été observées dans des souris atteintes de syndrome sévère combiné d'immunodéficience (SCID). Ces mutations n'abolissent pas complètement l'activité kinase de DNA-PKcs. L'analyse de leurs caryotypes révèlent des fusions télomériques conservant des signaux télomériques (Slijepcevic et al., 1997), (Hande et al., 1999), (Goytisolo et al., 2000b), (Bailey et al., 1999). A l'instar des souris SCID, l'inactivation du gène de DNA-PKcs conduit au même phénotype d'instabilité (Taccioli et al., 1998). Ainsi, DNA-PKcs protégerait les télomères contre les événements de recombinaison inapproprié (ex : fusions). Cette protection requiert l'activité kinase de DNA-PKcs. En effet, dans les cellules humaines, l'inhibition de son activité d'autophosphorylation par un agent pharmacologique (IC86621) conduit à une augmentation significative du nombre de fusions (Bailey et al., 2004b). Cette inhibition s'est révélée plus efficace que l'inactivation du gène. Sous l'action de cet agent, la protéine DNA-PKcs inactivée serait sous une forme dominante négative, persistante aux télomères perturbant la mise en place de la boucle T (Bailey et al., 2004b). Des analyses plus approfondies démontrent que quelque soit le contexte (inhibition par shRNA ; KO, SCID, inhibiteur compétitif) les fusions se produisent après la réplication et impliquent les télomères répliquées par le brin « directeur » aussi bien chez l'homme et la souris.

ii. Rôle de DNA-PKcs dans régulation de la taille des télomères

Son rôle dans la régulation de la taille des télomères est plus ambigu. L'analyse de la taille des télomères chez les souris SCID montre une élongation anormale des télomères. En revanche, l'absence de DNA-PKcs dans les souris KO n'altère pas le profil télomérique. Ces différences semblent être corrélées à l'activité kinase de la protéine. En effet, les souris SCID génèrent une protéine tronquée mais qui préserve en partie son domaine kinase. D'ailleurs, la reconstitution de l'activité DNA-PKcs restaure la taille normale dans ces cellules (Wong and Slijepcevic, 2004)

Donc, il semblerait que l'activité kinase soit nécessaire à la régulation de la longueur télomérique.

L'analyse des souris déficientes pour la télomérase et l'activité DNA-PKcs a révélé de nouvelles fonctions de la DNA-PKcs aux télomères. La perte des séquences télomériques dans des souris télomérase^{-/-} DNA-PKcs^{-/-} est plus rapide que celle observée dans les souris télomérase^{-/-} DNA-PKcs^{+/+} (Espejel et al., 2002b). En absence de télomérase, la perte de la protéine DNA-PKcs accentuerait la dégradation des télomères mettant en évidence une interaction fonctionnelle entre DNA-PKcs et la télomérase. Cette coopération pourrait réguler la taille des télomères précisant le rôle de DNA-PKcs dans le maintien de la taille des télomères. En conclusion, il apparaît que chez les mammifères, la protéine DNA-PKcs garantit la protection des extrémités des chromosomes et contribuerait à l'homéostasie télomérique même si son rôle reste discuté.

c) DNA Ligase IV

La DNA Ligase IV (LIGIV) est souvent décrite comme un acteur potentiel de la protection des télomères. La protéine LIGIV est impliquée dans la ligation des cassures doubles brins. Essentielle pour les cellules de mammifères, sa suppression conduit à une létalité embryonnaire précoce mais qui peut être viable en absence de p53. Elle est requise pour les fusions des télomères dysfonctionnels catalysées par la recombinaison non homologue NHEJ. Son absence réduit sensiblement la proportion de fusions télomériques formées après la perte de TRF2 (Smogorzewska et al., 2002). Cette fusion dite NHEJ dépendante est d'autant plus efficace en absence de l'extension 3' simple (Cf précédent chapitre).

Néanmoins, certains travaux démontrent que les fusions entre des télomères courts ne font pas appel à des événements de religation de type NHEJ. En effet, dans les souris mTERT^{-/-}, la majeure partie des fusions impliquant des télomères courts persistent en absence de la Ligase IV indiquant que ces fusions ne nécessitent pas un NHEJ fonctionnel contrairement aux fusions de télomères déprotégés (Maser et al., 2007).

Par contre, son implication dans la régulation de la taille est sujette à controverse. En effet, des fibroblastes issus de patients atteints d'une hypersensibilité aux rayonnements ionisants, référencés 180BR, arborent une mutation naturelle de la LIGIV. Dans ces cellules, la longueur des télomères est comparable à celle de sujet sains du même âge (d'Adda di Fagagna et al., 2001). Cependant, les fibroblastes issues de 2 patients différents atteints de la même pathologie

(mutation de la LIGIV), perdent plus rapidement leurs séquences télomériques rappelant celle observée dans les patients AT (Cabuy et al., 2005).

Bien qu'aucune interaction avec les télomères n'ait été décrite LIGIV pourrait être impliqué dans le contrôle de la taille des télomères mais ne semble pas œuvrer pour préserver la structure des télomères.

d) XRCC4/XLF

Concernant XRCC4 et XLF, leur contribution au maintien des télomères n'est pas encore avérée. En effet, des analyses chez la souris révèlent que la déplétion de XRCC4 ne modifie pas la taille des télomères mais induit une forte instabilité chromosomique caractérisée par des cassures chromosomiques ainsi que des fusions télomériques conservant leurs motifs télomériques (d'Adda di Fagagna et al., 2001). A l'instar de XRCC4, les cellules déficientes pour XLF présentent en majorité des cassures chromosomiques sans pour autant arborer des fusions télomériques (Zha et al., 2007). L'absence de phénotype télomérique ne permet pas de conclure à une implication de XRCC4/XLF dans le métabolisme des télomères. Ces deux éléments apparaissent comme des éléments majeurs de la réparation des cassures doubles brins et du maintien de la stabilité génomique.

e) Artemis

Le rôle d'Artémis dans l'homéostasie des séquences télomériques n'est pas clairement établi. En effet, l'invalidation de cette protéine dans les cellules souches embryonnaires de souris provoque des fusions télomériques avec des motifs TTAGGG au niveau des points de jonctions (Rooney et al., 2003). La présence de ce type de chromosomes dicentriques atteste du rôle d'Artémis dans la protection des télomères.

Par ailleurs, une étude réalisée sur des cellules (RS-SCID), arborant un défaut de la protéine Artémis, décrit une perte rapidement leurs séquences télomériques avec un taux comparable à celui observé dans les cellules AT et NBS (120pb/division contre 40-80 pour les cellules contrôle) (Cabuy et al., 2005). Toutefois, son rôle exact dans le métabolisme des télomères reste encore à définir.

3. Télomères et HR.

a) Rad54

Chez les mammifères, la participation de la recombinaison homologue au maintien des télomères a été tout d'abord décrite chez la souris. Les cellules issues de souris Rad54^{-/-} montrent une sensibilité accrue aux radiations ionisantes et présentent des télomères plus courts que la normale (Jaco et al., 2003). De plus, des fusions télomériques ont été observées. Elles résulteraient d'un défaut de protection comme l'atteste la persistance de séquences télomériques à la jonction de ces fusions. Ces données suggèrent que Rad54 contribue aussi bien à la régulation de la longueur des télomères qu'à la protection des télomères. Cependant son rôle protecteur diffère de celui des membres du NHEJ tels que DNA-PKcs. En effet, la proportion de fusions télomériques est plus importante dans les doubles mutants Rad54^{-/-} DNA-PKcs^{-/-} indiquant que Rad54 et DNA-pkcs contribue distinctement à la protection des télomères. D'ailleurs, l'analyse de l'implication des brins par une analyse CO-FISH révèlent que les fusions observées dans les cellules dépourvues de Rad54 diffèrent de celles observés dans les cellules DNA-PKcs^{-/-}. En effet, la majeure partie des fusions, consécutives à la perte de DNA-PKcs, se produisent après la réplication (Cf partie DNA-PKcs). Ces fusions impliquent les chromatides répliquées selon le brin « directeur » synthétisé. La fréquence de ce type de fusions n'est pas modifiée dans les doubles mutants indiquant que la genèse des fusions dans les cellules Rad54^{-/-} obéit à un processus distinct de celui mis en place dans DNA-PKcs^{-/-} (Jaco et al., 2003).

Donc, contrairement à DNA-PKcs, Rad54 ne participe pas à la maturation post-répllicative des télomères. Compte tenu de la létalité qu'occasionnerait sa perte, aucune étude n'a permis d'établir la contribution de Rad54 dans le métabolisme des télomères humains.

b) RAD51D

Parmi les autres acteurs potentiels, notre attention se porte sur RAD51D paralogue de RAD51 qui forme avec RAD51B/RAD51C/XRCC2 un complexe stable se fixant sur les jonctions de Holliday. A ce jour, RAD51D constitue la seule protéine de la RH vue aux télomères par une des approches de d'immunoprécipitation ou d'immunofluorescence. En effet, RAD51D colocalise avec TRF2 dans des cellules méiotiques en prophase I. De plus, RAD51D est associé à l'ADN télomérique dans des cellules somatiques murines (Tarsounas et al., 2004). L'invalidation génétique de RAD51D s'avère être létale chez la souris, cette mort rapide est attribuée aux effets

combinées d'un défaut de la réparation et de protection des télomères. L'établissement de souris KO RAD51D -/- nécessite l'inactivation de p53 pour obtenir des lignées viables.

La longueur des télomères est considérablement réduite dans les cellules dépourvues de RAD51D. Une partie des fusions formées résulte du raccourcissement précoce des télomères. L'autre partie est occasionnée par une déstabilisation des télomères se traduisant par la présence de motifs télomériques au niveau des fusions. Ces données laissent à penser que RAD51D contrôle la longueur des télomères mais protège aussi les télomères.

Par ailleurs, l'inhibition de RAD51D est létale pour les cellules ALT confirmant que ces cellules maintiennent leurs télomères par un processus dépendant de la RH.

c) BRCA1

Les tumeurs provenant de patients porteurs de la mutation BRCA1, sont caractérisés notamment par une sévère instabilité chromosomique comprenant l'aneuploïdie, la présence de chromosomes dicentriques et de translocations non réciproques (Weaver et al., 2002), (Johnson et al., 2002), (McPherson et al., 2004). Les mécanismes à l'origine de ces remaniements ne sont pas totalement élucidés. Dans cette perspective, le rôle de BRCA1 dans le maintien de l'intégrité télomérique pourrait expliquer la forte instabilité observée dans ces tumeurs.

L'interaction de BRCA1 avec TRF1 dans les cellules exprimant la télomérase suggère la présence de BRCA1 aux télomères (French et al., 2006). De plus, BRCA1 colocalise avec TRF2 au sein des corps APBs, spécifiques des cellules ALT (Wu et al., 2003). Plusieurs travaux ont démontré que l'altération de BRCA1 interférait dans le bon fonctionnement des télomères.

Dans un premier temps, BRCA1 apparaît jouer un rôle important dans la protection des télomères. Des fusions télomériques, des ponts anaphasiques sont observés à la suite de l'expression d'un dominant négatif, de mutations ponctuelles ou après l'inactivation génétique de BRCA1 dans les cellules humaines ou murines (Al-Wahiby and Slijepcevic, 2005), (Cabuy et al., 2005), (McPherson et al., 2006), (French et al., 2006). La persistance de motifs télomériques au niveau des fusions conforte un peu plus l'hypothèse de la protection des télomères. Les anomalies relevées dans les cellules déficientes pour BRCA1 ne résulteraient pas seulement d'un défaut de réparation ou d'une altération de la stabilité génomique. L'accumulation de défauts télomériques ainsi que l'interaction avec TRF2 constituent un faisceau d'arguments en faveur de l'implication directe de BRCA1 dans la protection des télomères.

Par contre, le rôle de BRCA1 dans le contrôle de la taille reste discutable. Les télomères sont perdus rapidement lors de la délétion de BRCA1 dans les cellules embryonnaires souches (Cabuy et al., 2005). Ces résultats sont confortés par la mise en évidence de télomères courts dans les cellules lymphocytaires T de souris tBRCA1^{-/-} P53^{-/-} (McPherson et al., 2006). Cependant, l'expression du dominant négatif de BRCA1 mène à un allongement des télomères uniquement dans des cellules exprimant la télomérase contredisant les précédents travaux (French et al., 2006). Bien qu'aucune modification de l'activité télomérase n'ait été décrite, les modifications de la taille des télomères pourraient dépendre de l'activité télomérase. En effet, l'inhibition de BRCA1 par RNA interférence accroît l'activité télomérase. Dans ce cas, BRCA1 interférerait dans la régulation l'expression de la sous unité hTERT dépendante de c-MYC (Xiong et al., 2003). Ces données contradictoires ne nous permettent pas d'établir la réelle contribution de BRCA1 dans la régulation de la taille.

Au même titre que le NHEJ, la RH contribue au maintien des télomères sous diverses formes (contrôle de la taille, protection) et s'inscrit dans un schéma global où les systèmes de réparation interviennent afin de préserver l'intégrité des télomères.

4. Autres éléments de la réparation et télomères

a) PARP1 et 2

Plusieurs éléments de la famille des PAR (Poly(ADP)Ribosylation) sont associées aux télomères ou à la télomérase. Parmi ces membres, nous retrouvons PARP1 et 2.

PARP2 interagit avec le domaine de fixation à l'ADN Myb de TRF2 afin de faciliter la Poly(ADP)Ribosylation du domaine TRFH de TRF2 conditionnant sa fixation aux télomères *in vitro* (Dantzer et al., 2004). L'association de TRF2 et des domaines PAR de PARP peuvent ainsi expliquer la présence massive et ponctuelle de TRF2 aux sites de cassures induites par les rayonnements UV ou exposition prolongée au Hoechst (Bradshaw et al., 2005). Toutefois, l'invalidation de PARP2 dans les cellules murines n'altère pas la longueur des télomères. En revanche elle occasionne des fusions télomères-télomères (sans motifs TTAGGG). Ainsi, PARP2 préserverait l'intégrité des télomères (Dantzer et al., 2004).

A l'image de PARP2, PARP1 interagirait avec TRF2 modifiant son affinité *in vitro* pour l'ADN télomérique (Gomez et al., 2006). Le rôle de PARP1 dans le maintien des télomères a souvent été discuté. Une première étude avait mis en évidence une réduction de la taille associée à une

instabilité chromosomique patente dans les cellules fibroblastiques embryonnaires de souris (d'Adda di Fagagna et al., 1999). En revanche, d'autres travaux démontrent que l'absence de PARP1 n'affecte aucunement la taille des télomères ou leur stabilité (Samper et al., 2001). Ces données ont été confirmées par le même groupe démontrant que la déplétion de PARP1 dans les souris mTERC $-/-$ n'affecte ni le taux de perte des télomères ni l'instabilité (Espejel et al., 2004a). Récemment, il a été pourtant démontré que PARP1 interagissait, par le biais de TRF2, avec les séquences télomériques humaines courtes ou endommagées (Gomez et al., 2006) Ainsi, PARP1 protégerait les télomères contre le raccourcissement ou d'éventuelles attaques oxydatives. Ces résultats contradictoires soulignent la nécessité d'un modèle cellulaire unique, pour conclure à un rôle précis de PARP dans la maintenance des télomères.

b) Werner et les télomères

Grâce à son activité d'hélicase, la protéine favorise la migration des branches, comme le fait la protéine Rad54 qui fait disparaître les boucles D. Les patients atteints du syndrome de Werner souffrent d'un vieillissement précoce causé par une mutation du gène codant pour l'hélicase de type RecQ WRN (Yu et al., 1996), (Opresko et al., 2003). Des récentes données suggèrent son implication dans la maintenance des télomères.

Les cellules sénescents déficientes pour WRN présentent des télomères plus courts que la plupart des cellules sénescents du même âge. Néanmoins, le rythme de raccourcissement chez ces cellules est comparable aux cellules normales excluant la perte rapide des télomères comme facteur initiant l'arrêt de la croissance. Toutefois, la sénescence des cellules WS peut être abolie par l'expression ectopique de la télomérase démontrant que cette sénescence est dépendante des télomères (Wyllie et al., 2000). Ainsi, la présence de quelques télomères courts seraient suffisants pour limiter la survie des cellules WRN $-/-$.

La protéine WRN interagit directement avec les membres du Shelterin et d'autres partenaires présents aux télomères. En effet, WRN interagit directement avec TRF2 dans les cellules normales ou cancéreuses (télomérase/ALT) (Opresko et al., 2002). La présence de WRN aux télomères serait restreinte à la phase S du cycle (Crabbe et al., 2004; Opresko et al., 2004). Des études *in vitro* révèlent que ses activités hélicases et exonucléases 3'→5', stimulées par son interaction avec TRF2, seraient requises pour résoudre les structures secondaires télomériques type G quadruplexes facilitant ainsi la progression de la fourche de réplication au niveau des télomères (Machwe et al., 2004; Opresko et al., 2004).

En coopération avec POT1, la protéine WRN voit son activité hélicase augmentée, essentielle à la résolution des structures quadruplexes formées au niveau de l'extrémité télomérique simple brin. La prise en charge des structures quadruplexes améliore l'accès et l'ouverture de la structure bicaténaire de l'ADN télomérique lors du passage de la fourche (Opresko et al., 2005).

i. WRN et la réplication télomérique

La protéine WRN intervient aussi bien dans la réplication, la transcription, ou l'ouverture complète ou locale de la double hélice. Dans tous ces cas, la protéine supprimerait certaines interactions indésirables entre nucléotides, telles que les épingles à cheveux ou les structures quadruplexes, qui s'opposent à la progression de la fourche de réplication.

Dans les fibroblastes *WRN*^{-/-}, une proportion significative de chromosomes perdent préférentiellement un télomère porté par la chromatide issue du brin «retardataire» (Crabbe et al., 2004). En absence de WRN, les régions simples brins télomériques forment plus facilement des quadruplexes. Ces travaux suggèrent que, la progression de la fourche de réplication serait altéré et le brin retardataire serait alors dégradé expliquant la perte préférentielle du brin «retardataire» (riche en G, simple brin 3') (Crabbe et al., 2004). Son absence compromettrait la réplication des télomères favorisant une perte systématique d'un des brins menant à terme à une instabilité chromosomique voire à un arrêt du cycle.

Après la réplication, en absence de WRN, les chromosomes néo formés fusionneraient au niveau des chromatides issues du brin retardataire, initiant des cycles d'instabilité génomique après quelques cycles cellulaires (Crabbe et al., 2007). L'expression de la télomérase peut alors abolir le phénotype d'instabilité en allongeant probablement les télomères les plus courts (c'est à dire les brins retardataires) (Crabbe et al., 2007). Ces résultats expliqueraient pourquoi la télomérase a permis de restaurer une prolifération normale des cellules WS jusqu'alors sénescents.

ii. WRN et la recombinaison aux télomères

La protection des télomères se définit aussi par la capacité de la cellule à limiter la recombinaison télomérique. Ainsi que Ku70, POT1 ou TRF2, WRN supprimerait les événements de recombinaison télomériques inappropriés.

Puisqu'elle fait coulisser les branches et disparaître les boucles D, la protéine WRN contribuerait à rendre plus rares les événements de recombinaison non méiotiques, survenant entre des séquences d'ADN similaires portés par deux chromosomes différents ou par un même chromosome. Son absence conjuguée à celle de la télomérase favorise l'émergence du

mécanisme ALT de type I confirmant son rôle dans la recombinaison télomérique (décrit dans section recombinaison en absence de télomérase). La sénescence prématurée des cellules WRN -/- s'expliquerait alors par leurs incapacités à réprimer les raccourcissements soudains consécutifs à des événements de recombinaisons intra-télomérique.

Après avoir démontré à plusieurs reprises que les protéines de la réparation participaient à l'homéostasie télomérique (réplication, élongation, protection), il semble judicieux de déterminer comment les systèmes de réparation se comportent vis-à-vis des télomères endommagés et quelles sont les voies qui permettent aux télomères de prévenir leur détection en tant que cassure.

II. Protection contre la réponse aux dommages de l'ADN au niveau des télomères

Les cellules eucaryotes ont la capacité de discriminer les extrémités naturelles des chromosomes, des cassures doubles brins ou autres dommages de l'ADN. Lorsque la fonction protectrice des télomères est compromise, les extrémités télomériques perdent leur statut privilégié et les télomères déprotégés activent les systèmes canoniques de la réparation des cassures doubles brins. Après l'invalidation des fonctions de TIN2, TRF2, POT1, les télomères dysfonctionnels activeraient la réponse consécutive aux dommages de l'ADN interdisant la poursuite du cycle cellulaire. Par ailleurs, les télomères érodés peuvent être assimilés à des séquences endommagées recrutant aussi les éléments de la réparation.

1. Réponse des dommages aux télomères déprotégés

A la suite de la déstabilisation du complexe Shelterin, les télomères sont associés à des facteurs impliqués dans la réponse aux dommages comme 53BP1, MDC1, NBS1, p-ATM, et Rad17 (d'Adda di Fagagna et al., 1999), (Takai et al., 2003), (Silverman et al., 2004), (Dimitrova and de Lange, 2006) formant une structure particulière appelée TIFs (telomeres dysfunction –induced foci) (Figure 17). Ces foci présents tout le long des télomères, formeraient un « stretch » de protéines de la réparation sur une région assez étendue (Takai et al., 2003). De même, des analyses d'immunoprécipitation de chromatine sur puces (Chip on chip) réalisées sur des cellules sénescents montrent que les foci H2AX, MDC1 et 53BP1 peuvent diffuser au delà des télomères sur plusieurs centaines de kb (Meier et al., 2007), (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Ces foyers dépendent des protéines kinases PI3K, sensibles à la caféine tels que les protéines ATM et ATR (Takai et al., 2003). En effet, leurs inhibitions respectives mènent à la disparition rapide de ces foyers TIFs (Takai et al., 2003).

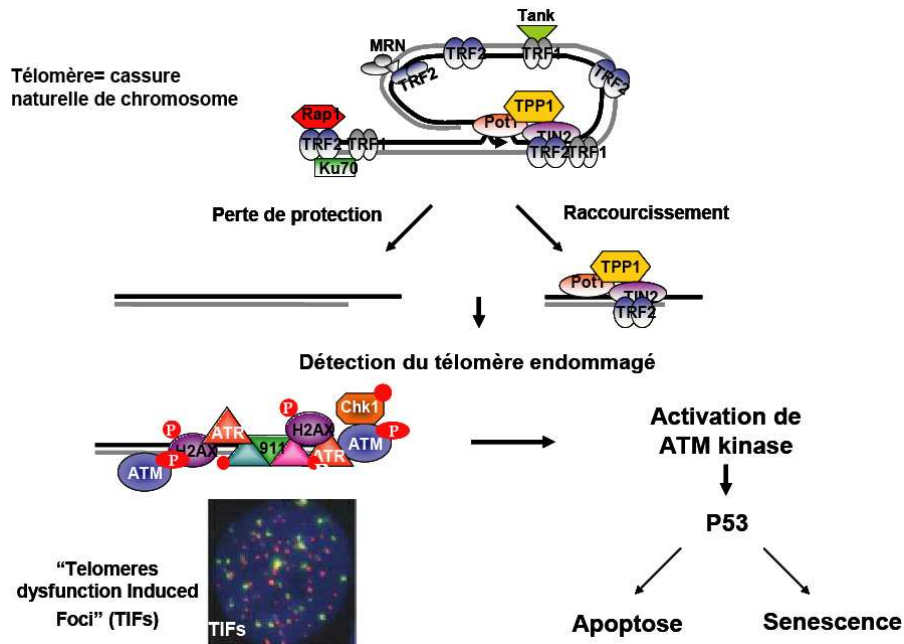


Figure 17: La réponse cellulaire consécutive aux disfonctionnements télomériques :

Le télomère constitue une cassure naturelle du chromosome protégé par le complexe protéique télomérique. Suite à une déprotection ou un raccourcissement excessif de la taille, les télomères sont assimilés à des lésions de l'ADN, prises en charge par la voie de signalisation des cassures doubles brins. Le recrutement de ces protéines aux télomères correspond à la formation d'entités TIFs, éléments de réponse face aux altérations télomériques. Selon le type cellulaire, ces altérations aboutiront à une apoptose ou à une sénescence.

En absence de TRF2, la fonction télomérique est compromise et une majorité des télomères est assimilée à des cassures chromosomiques à l'origine de l'accumulation des foci dans ces cellules (Celli and de Lange, 2005). A ce titre, TIN2 trompe les systèmes de veille de l'ADN afin de préserver l'intégrité des télomères. La surexpression du mutant de TIN2, tronqué pour le domaine d'interaction avec TRF1 et TRF2, conduit à la formation des TIFs aux télomères (Kim et al., 2004). Dans le même temps, l'inhibition de POT1 conduit aussi à l'accumulation de foyers TIFs dans les cellules humaines. Cependant, ces foci sont confinés à la phase G1 disparaissant lors de leur entrée en phase S. En revanche, les TIFs consécutifs à l'inhibition de TRF2 sont formés pendant l'interphase (Hockemeyer et al., 2005). Ainsi, les cassures télomériques induites par la perte de POT1 seraient probablement réparées en phase G1 ce qui explique l'absence d'arrêt de cycle (Hockemeyer et al., 2005). De plus, en absence d'Apollo, les protéines H2AX/53BP1 sont recrutées aux télomères suggérant qu'à l'image des autres protéines télomériques, Apollo empêche la détection de cassures CDBs aux télomères (Lenain et al., 2006; van Overbeek and de Lange, 2006). L'arrêt du cycle cellulaire constitue aussi une réponse à la survenue de dommages télomériques. Cet arrêt du cycle est majoritairement dépendant de P53 (Chin et al., 1999;

Karlseder et al., 1999; Smogorzewska and de Lange, 2002). Mais en absence de P53, l'expression de p16 agit comme un second mécanisme bloquant l'arrêt en phase S (Jacobs and de Lange, 2004) (Smogorzewska and de Lange, 2002).

2. Mécanismes de répression de la réponse aux dommages télomériques.

Le but est de comprendre comment les télomères, dommages naturels de l'ADN, peuvent être ignorés par les voies de signalisation PI3K dépendantes. Les télomères constituent une barrière physique empêchant toute reconnaissance par les systèmes de veille. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, la structure en boucle T permettrait de dissimuler et donc de protéger l'extrémité simple brin. Cette stratégie vise à faire échouer l'action des censeurs de l'ADN. De plus, il est envisagé que la boucle T possède une organisation nucléosomale comparable à des séquences interstitielles empêchant la reconnaissance de l'extrémité 3' comme structure nucléosomale altérée.

Un autre modèle faisant intervenir d'abord TRF2 puis POT1 a été évoqué. TRF2 réprimerait la signalisation des dommages aux télomères via son interaction avec ATM (Karlseder et al., 2004). En effet, TRF2 interagit avec ATM au niveau des télomères *in vivo et in vitro*. La surexpression de TRF2 réduit alors la phosphorylation d'ATM aux sites S1981 affectant sa fonction de contrôle du cycle. Ainsi, TRF2 agirait comme un répresseur de la voie de signalisation dépendante d'ATM. La différence de comportement entre POT1 et TRF2 vis à vis des dommages télomériques a été déjà évoquée au cours de notre introduction.

En absence de POT1, les télomères sont reconnus transitoirement comme lésions de l'ADN mais n'engendrent pas de fusions contrairement à TRF2, indiquant l'existence d'un mécanisme de signalisation différent de celui mis en jeu lors de la déprotection par TRF2 (Hockemeyer et al., 2005). Dans cette optique, une étude a permis d'élucider les mécanismes mis en jeu lors de la déprotection des télomères après la perte de POT1. Chez la souris, l'apparition des foci TIFs consécutifs à l'invalidation de POT1a ou POT1b requiert la présence de ATR (Denchi and de Lange, 2007). En effet, la proportion de TIFs est considérablement réduite dans les souris déficientes pour POT1a ou POT1b inhibées pour ATR. En revanche, le statut d'ATM dans les cellules déficientes pour POT1a, 1b ou TPP1 n'affecte pas la proportion des foyers TIFs aux télomères. Ainsi, TRF2 et POT1 agiraient indépendamment pour prévenir la réponse aux

dommages consécutifs à l'activation respectifs de ATM et ATR aux extrémités des télomères (Denchi and de Lange, 2007) (Figure 18).

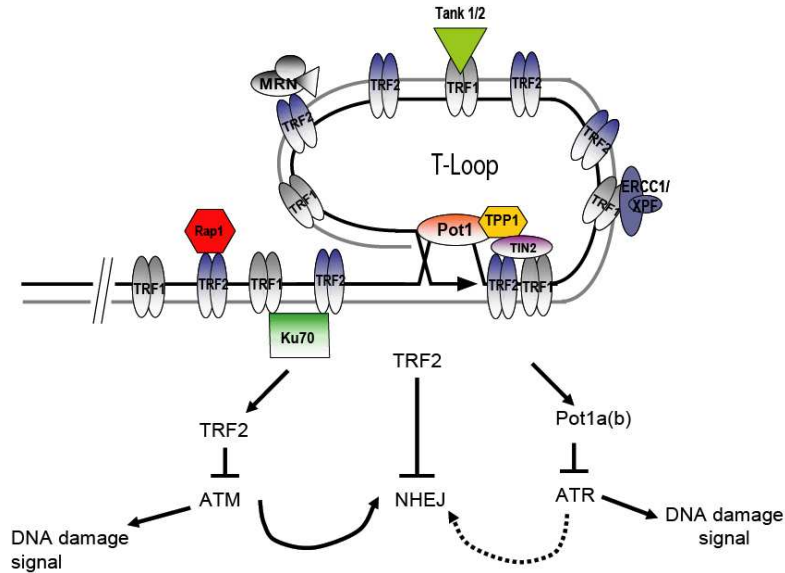


Figure 18: Modèle pour la répression de signalisation des dommages aux télomères

ATM et ATR sont réprimés indépendamment par TRF2 et POT1a (b). Le NHEJ consécutif à l'inhibition de TRF2 peut être activé par ATM ou ATR (D'après Denchi EZ 2007).

3. Réponse à l'érosion télomérique

Le raccourcissement programmé des télomères limite la prolifération des cellules humaines. Dans les cellules sénescents, des structures similaires aux TIFs sont aussi observées et référencés « Senescent Damage Foci » (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Les détails de cette réponse demeurent obscurs. En effet, la perte de quelques télomères suffisent à induire l'arrêt du cycle (Hemann et al., 2001), (Zou et al., 2004b). Donc, le télomère court pourrait être assimilé à un télomère déprotégé, cette similitude est probablement liée à la diminution du nombre de protéines télomériques au niveau des télomères courts.

III. Réparation dans les séquences télomériques

1. Réparation des dommages télomériques

Contrairement aux autres séquences répétées, les télomères se comportent différemment face aux dommages induits. De par leur composition, les télomères sont sujets à des agressions oxydatives. La succession de trois guanines constitue une cible privilégiée pour des radicaux

oxygénés conduisant à une modification des bases. Les lésions induites par le stress oxydatif génèrent des cassures simples brins (CSBs). Dans les cellules bloquées, les cassures induites par des agents alkylants tels que le MNNG (N methyl N nitro N nitrosguanidine) persistent plusieurs semaines au niveau des télomères au regard d'autres régions répétitives non transcrites (Petersen et al., 1998; Sitte et al., 1998; von Zglinicki et al., 2000). En effet, l'accumulation dans les régions télomériques, de sites sensibles à l'endonucléase S1, enzyme capable de détecter les sites abasiques, suggèrent que la réparation des cassures soit fortement compromise (Petersen et al., 1998; Sitte et al., 1998; von Zglinicki et al., 2000). Toutefois, ces lésions disparaissent une fois le blocage du cycle levé supposant qu'elles peuvent être liées au métabolisme de l'ADN (Sitte et al., 1998).

Cette inefficacité serait inhérente à la structure des télomères qui limiterait l'accès à la machinerie de réparation des lésions induites dans les séquences télomériques. En effet, la surexpression de TRF2 dans les cellules humaines augmente la proportion de cassures CSBs dans les régions télomériques sans pour autant affecter leur réparation dans le reste du génome (Richter et al., 2007). Par ailleurs, les souris surexprimant TRF2 sont hypersensibles aux radiations UV et possèdent un phénotype similaire aux souris XP (Xeroderma Pigmentosum). Cette sensibilité se manifeste notamment par une persistance des dimères de Thymine dans les cellules surxprimant TRF2 suggérant que l'excès de TRF2 interfère dans la réparation des cassures UV induites (Munoz et al., 2005) confortant l'idée d'un encombrement stérique protéique limitant l'accès aux télomères.

2. Conséquences sur la maintenance des télomères

a) Altération de la perte réplivative des télomères

L'accumulation de dommages non réparés mènerait à une réduction de la longueur des télomères. En effet, il a été démontré à plusieurs reprises et dans différentes conditions (conditions d'hyperoxie, traitement aux agents alkylants, ROS, induction de sites abasiques) que le stress oxydatif accentue le raccourcissement des télomères (Petersen et al., 1998; Richter et al., 2007; Sitte et al., 1998; von Zglinicki et al., 2000). Pour exemple, les CSBs induites par H₂O₂, persistent dans les séquences télomériques comparé au reste du génome menant à une réduction marquée des télomères (jusqu'à 200 pb/divisions cellulaires au lieu de 50 dans la lignée contrôle) (von Zglinicki et al., 2000). Par contre, en présence d'un antioxydant, ce taux diminue

et prolonge la durée de vie cellulaire établissant le lien entre le stress oxydatif et le raccourcissement des télomères.

Ainsi, la mauvaise réparation des lésions oxydatives dans les séquences télomérique pourrait expliquer la sénescence prématurée, observée dans certaines conditions de stress

Cette notion a été aussi mise en évidence dans un autre contexte. La surexpression de TRF2 dans les cellules murines conduit à une réduction de la longueur des télomères, indépendante du statut de la télomérase. En revanche, cette modification dépend de l'efficacité de réparation de lésions induites par des UV et de la prise en charge par le système NER (Munoz et al., 2005). De plus, la délétion de XPF restaure une taille normale des télomères dans les cellules surexprimant TRF2. Ainsi, l'accumulation des dommages télomériques favoriserait un raccourcissement prématuré des télomères.

La perte des télomères traduit en fait un problème apparu lors de la réplication. Les lésions persistantes bloqueraient la progression de la fourche de réplication qui se manifeste par un raccourcissement télomérique plus marqué. L'ampleur du raccourcissement varie selon la position de la lésion. Si la lésion est générée sur le brin « directeur », les pertes occasionnées seront beaucoup plus importantes. Selon le modèle proposé, l'accumulation des dommages sur le brin « directeur » est plus délétère menant à une diminution plus drastique de la longueur des télomères (von Zglinicki, 2000). Le raccourcissement des télomères résulterait d'une synergie entre la perte répliative et la perte environnementale (stress oxydatif, rayonnements ionisant, UV ect...).

b) Télomère et radiosensibilité

i. *Radiosensibilité*

La capacité de répondre aux radiations ionisantes est déterminée par de multiples facteurs comprenant notamment la capacité à réparer efficacement les cassures doubles brins. La radiosensibilité n'est pas simplement due à un défaut d'une voie en particulier mais résulte de la combinaison de plusieurs défauts moléculaires, responsables parfois de pathologies humaines caractérisées par une hypersensibilité. On retrouve ainsi des pathologies comme AT, NBS, ATLD, BLM, anémie de Fanconi dont les gènes affectés sont aussi impliqués dans la signalisation des cassures de l'ADN. Par ailleurs, certaines pathologies décrites cliniquement comme radiosensibles ne présentent qu'une hypersensibilité cellulaire modérée aux stress ionisants (ex : anémie de fanconi FA). Les divers défauts associés à la radiosensibilité rendent

difficile l'identification d'éventuelles populations à risque. Parmi les différents facteurs de prédisposition à une hypersensibilité aux radiations, se distingue le maintien des télomères. Ces extrémités peuvent être impliquées directement ou non dans la réponse aux dommages supposant que les télomères reflètent en partie l'aptitude de la cellule à faire face aux irradiations.

ii. Relations Radiosensibilité / télomères courts

▪ Cellulaire

Plusieurs pathologies humaines présentent des symptômes d'hypersensibilité aux radiations ionisantes (AT, ATLD, NBS, FA, BLM, RS-SCID, SCID). Le lien entre la radiosensibilité individuelle et la taille des télomères a été évoqué sur la base d'observations décrivant le raccourcissement précoce des télomères dans les cellules hypersensibles aux rayonnements ionisants. En effet, le taux de raccourcissement de la taille des télomères a été analysé dans 11 lignées radiosensibles provenant de patients atteints de divers syndromes (NBS/AT/ATLD/RS-SCID/XP ect.). Le taux a été déterminé en mesurant la taille par deux approches complémentaires. Les cellules radiosensibles arborent des télomères plus courts et des remaniements chromosomiques plus fréquents en comparaison avec des cellules provenant de sujets sains (Cabuy et al., 2005). Une relation entre la taille et la radiosensibilité cellulaire a été établie selon laquelle les cellules avec les télomères très courts sont plus sensibles aux radiations ionisantes (Cabuy et al., 2005). De plus, *in vitro*, il a été démontré que des fibroblastes sénescents, avec des télomères courts, étaient plus radiosensibles que les mêmes fibroblastes à des passages plus précoces et donc avec des télomères plus longs (Rubio et al., 2002). L'auteur proposa que la radiosensibilité ne soit pas simplement définie par les défauts d'expression de gènes de réparation mais aussi par une atteinte de la taille des télomères (Rubio et al., 2002). Cette corrélation est d'autant plus frappante que l'inhibition de la télomérase par un agent pharmacologique GRN163L diminue la taille des télomères et sensibilise les cellules mammaires aux divers agents génotoxiques dont les radiations ionisantes (Gomez-Millan et al., 2007). D'après toutes ces données, il apparaît que la taille des télomères constitue un facteur prédictif de la radiosensibilité cellulaire.

▪ Organisme

Nous pouvons cependant nous interroger sur la nature de cette relation quant à la radiosensibilité individuelle. Plusieurs études ont été menées afin de préciser le lien entre la radiosensibilité

individuelle et la taille des télomères. Dans un premier temps, l'étude *in vivo* de souris invalidées pour la télomérase mTR -/- évoque ce lien. En effet, les souris issues de 6 générations sans télomérase (6^{ème} générations :G6) avec des télomères très courts étaient plus sensibles aux doses ponctuelles ou fractionnées cumulées d'irradiations que des souris issues de la 2eme génération sans télomérase (G2) avec des télomères plus longs (Wong et al., 2004); (Goytisolo et al., 2000a). Cette radiosensibilité se caractérise notamment par une forte instabilité chromosomique, une cinétique de la réparation des cassures plus lente, accumulation de cassures (Wong et al., 2000). L'exposition des souris à des agents génotoxiques (doxorubicine) reproduit le même phénotype d'hypersensibilité (Lee et al., 2001). Ces effets peuvent être probablement attribués au raccourcissement des télomères plutôt qu'à l'absence de la télomérase à proprement dit.

Une étude réalisée sur 24 patients atteints de cancer du sein démontre une corrélation inverse entre la taille des télomères et la radiosensibilité des lymphocytes (McIlrath et al., 2001). Par ailleurs, il a été montré que pour des sujets sains de même âge, leur profil télomérique coïncidait avec leur statut vis à vis de l'irradiation. Ainsi, la taille des télomères d'un individu traduisait sa sensibilité aux radiations ionisantes (Castella et al., 2007).

Des analyses cytogénétiques plus pointues démontrent que les chromosomes, impliqués dans les remaniements, coïncident avec ceux qui possèdent les télomères les plus courts. Parmi ces remaniements, on retrouve des fusions télomériques mais aussi des remaniements plus complexes impliquant à la fois les extrémités chromosomiques et des cassures radioinduites. Après l'irradiation de cellules embryonnaires de souris (MEFs) mTERC+/+ avec des télomères suffisamment longs, seules les cassures radioinduites constituent un substrat pour les réarrangements chromosomiques. En revanche, dans les cellules mTERC -/- arborant des télomères plus courts, les cassures radioinduites interagissaient avec les télomères érodés pour former plusieurs types de remaniements : les associations Tel-Tel (télomère-télomère), Tel - CDB (télomère-cassure) ou CDB-CDB (cassure - cassure). Dans ce cas, l'hypersensibilité correspondrait à l'interférence des télomères courts dans la réparation des cassures radioinduites plutôt qu'à un défaut de la réparation de l'ADN(Latre et al., 2003).

iii. Radiosensibilité liée à l'altération de la structure des télomères.

La taille des télomères ne résume pas à elle seule la fonction des télomères. En effet, la protection des télomères jouent aussi un rôle important qui, au même titre que la taille, peut modifier la réponse des cellules à l'irradiation. Parmi les protecteurs des télomères, on retrouve ainsi des

protéines impliquées dans le NHEJ plus particulièrement DNA-PKcs. Son absence conduit à la formation de réarrangements types cassure-téломère (Tel –CDB) dans des cellules irradiées. La fréquence importante de ces réarrangements dans les cellules mutées (Bailey et al., 2004b) ou invalidées pour DNA-PKcs (Martin et al., 2005) indique que le dysfonctionnement des télomères contribue à la radiosensibilité cellulaire. De plus, les séquences télomériques sont conservées au niveau de la jonction Tel –CDB dans les cellules MEFs DNA-PKcs *-/-*. A l'image des télomères érodés, les télomères déprotégés peuvent aussi interagir avec des cassures radioinduites. Par ailleurs, la perte de TRF2 induit le même type d'aberrations (Bailey et al., 2004b) confirmant que ces remaniements font bien suite à la déprotection et pas simplement liée à l'absence de la télomérase.

Qu'ils soient courts ou déprotégés, les télomères sont assimilés à des cassures capables d'interagir entre elles ou avec des cassures radioinduites, augmentant la probabilité d'un réarrangement inapproprié. La radiosensibilité n'est pas uniquement le fruit d'une déficience de la réparation de l'ADN mais aussi d'une altération du métabolisme des télomères. La radiosensibilité peut constituer un processus temporel où le vieillissement et la réponse aux dommages sont coordonnés apportant une explication à la survenue tardive des cancers radioinduits longtemps après une exposition aux rayonnements ionisants.

Ainsi, la taille et/ou le statut des télomères pourraient constituer une information clinique pertinente permettant de prédire la réponse d'un patient à un traitement de radiothérapie. Dans cette optique, la compréhension des mécanismes qui régissent l'intervention des télomères dans la réponse à l'irradiation, constitue une nouvelle perspective quant à l'optimisation de la radiothérapie dans le traitement des cancers.

Souris	organisme	Lignées	Sensibilité aux RI	Instabilité chromosomique	réparation	Taille des télomères	fusions	Autre	References
TRF1	TRF1-/- Létal	-	ND	-	ND	-	-	-	Karlselder 2003
	-	TRF1-/- ES	ND	+	ND	-	+(+T)	-	Iwano 2004
TRF2	TRF2-/- conditionnelle	MEFs	ND	+++	ND	-	+++ (+T)	TIFs, Perte du 3' overhang	Celli 2005
	TRF2-/- LigIV-/- conditionnelle		ND	+	ND	-	+(+T)	TIFs	Celli 2005
		MEFs TRF2 Δ B Δ M	ND	+++	ND	-	+++ (+T)	TIFs, Perte du 3' overhang	Van steensel 1998
Pot1	Pot1a Δ		ND	+++	ND	-	++ (+T)	TIFs	Hockemeyer 2006
	Pot1b Δ		ND	+	ND	-	-	Perte 3' ;mini T-cercles	
	Pot1a Δ 1		ND	+++	ND	-	++ (+T)	TIFs,Perte 3', T cercles	Wu 2006
	Pot1b Δ 1	MEFs	ND	+++	ND	-	++ (+T)	TIFs,Perte 3', T cercles	

Souris	organisme	Lignées	Sensibilité aux RI	Instabilité chromosomique	réparation	Taille des télomères	fusions	Autre	Références
DNAPKcs									
	DNAPKcs ^{-/-} mTERC ^{-/-}	MEFs	ND	+++	ND	courts	+++ (+/-T)	-	Espejel 2002
	DNAPKcs ^{-/-} mTERC ^{+/+}	MEFs	ND	++	ND	-	++ (+T)	-	Espejel 2002
	DNAPKcs ^{-/-}	MEFs	++	++	Cinétique lente	ND	++ (+T)	Interactions avec CDBs	Martin 2005
	SCID	-	++	++	ND	courts	++ (+T)	↗ T-SCE	Al Wahiby 2005
	SCID+hRad54	-	++	++	ND	Normale	++ (+T)	T-SCE normale	
	DNAPKcs ^{-/-}	-	++	++	ND	Normale	++ (+T)	T-SCE normale	
	DNAPKcs ^{-/-} +hRad54	-	++	++	ND	Normale	++ (+T)	T-SCE normale	
	DNAPKcs ^{-/-} Balbc	-	++	++	ND	Normale	++ (+T)	Ponts anaphasiques	Goytisolo 2001
	SCID CB17	-	++	++	ND	ND	++ (+T)	↗ Fusions avec IR	Urushibara 2004
	DNAPKcs ^{-/-} CB17	MEFs	ND	++	ND	-	++ (+T)	-	Gilley 2001
	DNAPKcs ^{-/-} -CB17,C57, BalbC, C3H	MEFs	ND	++	ND	Longs	ND	-	Hande 1998
	SCID C57	MEFs	ND	++	ND	-	++ (+/-T)	-	Bailey 1999

Souris	organisme	Lignées	Sensibilité aux RI	Instabilité chromosomique	réparation	Taille des télomères	fusions	Autre	Références
Ku	Ku70-/+ TRF2-/F	MEFs	ND	+++	ND	-	+++ (+T)	TIFs, Perte du 3' overhang	Celli 2006
	Ku70-/- TRF2-/F	MEFs	ND	+++	ND	-	+ (+T)	TIFs, ↑ TSCE	
	Ku86-/-	MEFs	ND	++	ND	Longs (TERT dependant)	++ (+T)	Pas apoptose	Espejel 2002
	Ku80-/-	MEFs	ND	++	ND	ND	++ (+T)	-	Hsu 2000
	Ku80-/-	MEFs	ND	++	ND	Courts	++ (-T)	-	Adda Di Fagagna 2001
	Ku70-/-	ES	ND	++	ND	Courts	++ (-T)	-	
	Ku86-/-	MEFs	ND	++	ND	-	++ (+T)	ND	Samper 2000
	Ku70-/-	-	++	++	VDJ altéré	ND	ND	ND	Gu 1997
LigIV	LigIV-/- P53-/- TRF2-/F	MEFs	ND	+	ND	ND	+/-	-	Celli 2005
	LigIV-/- P53-/- TRF2DBDM	MEFs	++	+	ND	ND	+/-	-	Smogorewska 2002
	LigIV-/- P53-/-	MEFs	++	++	VDJ altéré	ND	ND	NRT, ↑ SCE	Fergusson 2000
	LigIV-/- P53-/- Rad54-/-	MEFs	+++	+++	VDJ altéré	ND	ND	NRT, cassures	Mills 2004

Souris	organisme	Lignées	Sensibilité aux RI	Instabilité chromosomique	réparation	Taille des télomères	fusions	Autre	Références
Rad54	Rad54 ^{-/-}	MEFs	ND	++	ND	Courts	++(+/-T)	-	Jaco 2003
	Rad54 ^{-/-} DNA-PKcs ^{-/-}	MEFs	+	+++	ND	+ Courts	+++ (+/-T)	-	
	Rad54 ^{-/-}	MEFs ES	+/-	+	Sensibilité MMC	ND	ND	Cassures	
Rad51D	Rad51D ^{-/-} p53 ^{-/-}	MEFs	ND	++	ND	Courts	++ (+/-T)	-	Tarsounas 2004
	Rad51D ^{-/-}	létal	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Tarsounas 2004
BRCA1	BRCA1 ^{-/-}	létal	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Hohenstein 2001
	BRCA1 ^{-/-} p53 ^{-/-}	LT/LB	ND	+++	ND	Courts	++ (+/-T)	Translocations	McPherson 2004
	BRCA1 ^{-/-} p53 ^{-/-}	ES	Sensibilité bleomycine	++	ND	Courts	++ (+/-T)	-	Al Wahiby 2005
MRN	Mre11 ATLD/ATLD	-	++	++	Défaut checkpoint	ND	ND	Cassure fragments	Theunissen 2003
	Rad50 S/S	-	-	-	Suractivité ATM	ND	ND	-	Bender 2005
	NBSΔB/ΔB	-	++	++	Défaut checkpoint	ND	ND	Deletions echanges	Williams 2002

Homme	organisme	Lignées	Sensibilité aux RI	Instabilité chromosomique	réparation	Taille des télomères	fusions	Autre	Références
TRF1	TRF1-DN	HCT75	ND	ND	ND	-	-	-	De Lange 1997
	TRF1-DN	HT1080	ND	ND	ND	Long	-	-	Van steensel 1997
	OE TRF1	HT1080	ND	ND	ND	Court	-	-	
TRF2	TRF2 Δ B Δ M	Hela	ND	++	ND	-	+++	(+T) Perte du 3' overhang	Karlseder 1999
		MCF7	ND	++	ND	-	+++		
		MRC5	ND	++	ND	-	+++		
		IMR90	ND	++	ND	-	+++		
		BJ	ND	++	ND	-	+++ (+T)		
	TRF2 Δ B	Hela	ND	ND	ND	Court	-	Délétions T-loop	Wang 2004
		IMR90	ND	ND	ND	Court	-		
		BJ/htert	ND	ND	ND	Court	-		
	TRF2 Δ B Δ C	JR5/M14	ND	ND	ND	-	+++ (+T)		Biroccio 2006
	siRNA	Hela	ND	ND	ND	ND	ND	Perte 3' ;TIFs	Takai 2003
Pot1	OE Pot1	HT1080	ND	ND	ND	Long	ND		Colgin 2003
	Pot1 Δ OB	HCT75	ND	ND	ND	Long	-		Loayza 2003
	Antisens Pot1	MKN28/74	ND	ND	ND	Court		Perte 3' ; Ponts anaphasiques,	Kondo 2004
	ShRNA	HCT75	ND	ND	ND	Long		telomerase activité	Ye 2004
		HT1080 Hela	ND	++	ND	Long	++ (+T)	senescence	Veldmann 2004
	RNAi	HCT75	ND	++	ND	-	++ (+T)	TIFs,Perte 3'	Hockemeyer 2005

Homme	Construction	Lignées	Sensibilité aux RI	Instabilité chromosomique	réparation	Taille des télomères	fusions	Autre	Références
NBS	SiRNA	Hela BJ/HERT IMR90	ND	ND	ND	-	-	Reduction du 3'	Chai 2006
	SiRNA (J+3)	WTK1,TK6	++	++	ND	ND	++ (+T)	Mutations	Zhang 2006
	NBS-S343A/S248A	EJ30	ND	++	ND	-	-	Perte télomère	Bai 2003
	Patients	GM07166	++	++	ND	Court	+		Ranagathan 2001
		347BR	++	++	ND	Court	-	-	Cabuy 2003
ShRNA	GM837 (ALT)	ND	ND	ND	Court (Hétérogène)	-	↘ d'apbs	Zhong 2007	
Mre11	SiRNA	Hela BJ/HERT IMR90	ND	ND	ND	-	-	Reduction du 3'	Chai 2006
	ShRNA	Hela	ND	ND	ND	-	-	Incorporation TdT	Verdun 2005
	ShRNA	GM837 (ALT)	ND	ND	ND	Court (Hétérogène)	-	↘ d'apbs	Zhong 2007
	Patients	ATLD	++	ND	ND	ND	ND		
Rad50	SiRNA	Hela BJ/HERT IMR90	ND	ND	ND	-	-	Reduction du 3'	Chai 2006
	ShRNA	GM837 (ALT)	ND	ND	ND	Court (Hétérogène)	-	↘ d'apbs	Zhong 2007
	OE RAD50-Rap1	HT1080	ND	ND	ND	Long	-		Wu 2007

Homme	Construction	Lignées	Sensibilité aux RI	Instabilité chromosomique	Réparation	Taille des télomères	fusions	Autre	Références
DNA-PKcs	shRNA (J+5)	WTK1	+	+	ND	ND	+/- (+T)	Fusions radioinduites	Zhang 2006
	siRNA (J+3)	WTK1,TK6	++ (ions lourds)	++	ND	ND	++ (+T)	Mutations	Zhang 2005
	IC86621(24h)	MEFs	ND	ND	ND	ND	++ (+T)		Bailey 2004
Ku	siRNA (J+3)	Hela, U2OS	ND	+++	ND	Court	+++ (+/-T)	Apoptose après j+5c	Jaco 2005
	Ku86+/-	HCT116	ND	+++	ND	Court	+++ (+/-T)	Élongation du 3'	Myung 2004
	Ku86+/- & Ku70+/-	HCT116	Insensible VP16	ND	ND	Long	-	ND	Uegaki 2006
	Ku86+/-	HCT116	++ VP16 sensible	ND	ND	ND	ND	ND	Li G 2006
Ligase IV	Patients	180BR 411BR	+++	ND	ND	Court	ND	ND	Cabuy 2005
		180BR	+++	ND	ND	-	ND	ND	Adda Di Fagagna 2001
Rad51D	shRNA (J+7)	VA13	ND	++	ND	Court (Hétérogène)	++ (+/-T)	Apoptose	Tarsounas 2004
BRCA1	BRCA1 DN	SVCT							
		Hela	ND	++	ND	Court	++	Ponts Anaphasiques	French 2006
	MCF7 III.7	ND	++	ND	-	++	Ponts Anaphasiques		
	BRCA1-/+	GM14090 HCC1937	ND	++	ND	-	++		Al Wahiby 2006

Figure 19 : Tableau Récapitulatif de la contribution des protéines télomériques et de la recombinaison

Tableau Récapitulatif de la contribution des protéines télomériques et de la recombinaison dans la maintenance des télomères dans les différents modèles cellulaires (murins/humains). (ND : non déterminée ; (-) pas d'effet ; (+) effet modéré, (++) augmentation significative, (+++) effet drastique ; (-T) sans séquences télomériques à la jonction, (+T) avec séquences télomériques à la jonction)

Objectifs de la thèse :

Aujourd'hui des progrès considérables ont grandement participé à l'élargissement des connaissances et à une meilleure compréhension des télomères et de leur maintenance. La plupart des mécanismes télomériques, sont conservés chez les eucaryotes supérieurs notamment chez l'homme. Parmi les fonctions exercées, les télomères développent des stratégies visant à limiter la recombinaison impropre aux télomères afin de préserver l'intégrité chromosomique. Toutefois, les mécanismes contrôlant ces événements ne sont pas totalement définis. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au rôle de P53 dans le maintien des télomères, à travers sa fonction dans la recombinaison. Bien que son rôle soit établi dans la maintenance des télomères dans les cellules ALT, sa fonction est en revanche moins bien décrite dans les cellules présentant une activité télomérase. Cependant, des cellules exprimant la télomérase et dont l'activité p53 est invalidée (par exemple par l'Antigène T SV40) conduisent très fréquemment à l'émergence de cellules maintenant leurs télomères par la voie ALT. Dans ce contexte, le premier objectif de cette thèse a été de caractériser le rôle d'une mutation de p53 reconnue pour augmenter la RH et de déterminer si sa fonction dans la RH pouvait aussi être impliquée dans l'homéostasie des télomères dans des cellules télomérase (+). Nos premiers résultats nous ont permis de démontrer la stabilité de télomères malgré la surexpression de p53 mutée et l'augmentation globale du taux de recombinaison.

Notre deuxième objectif a été de réaliser une étude comparative de la maintenance des télomères dans des lignées isogéniques invalidées pour les deux voies majeures de réparation NHEJ/HR. En effet, les télomères constituent un véritable paradoxe. Les protéines impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN sont requises pour l'acquisition d'une structure fonctionnelle des télomères. Comment des éléments impliqués dans la réparation, peuvent empêcher la détection des télomères par les systèmes de veille du génome ? Les protéines de la réparation contribuent à différents égards à la maintenance des télomères. Toutefois leurs rôles ne sont pas clairs et varient selon les modèles étudiés. Parfois, au sein d'un même organisme, selon le modèle cellulaire adopté, les conclusions divergent quant aux fonctions exercées. Cette grande diversité de réponse est illustrée dans le tableau 18. Il devient alors délicat d'essayer d'établir un schéma clair et universel résumant les fonctions télomériques ainsi que leurs intervenants.

Grâce au développement d'une nouvelle famille de vecteurs pour l'interférence RNA basée sur des plasmides EBV (Biard et al, brevet CEA N° 0501483) nous avons pu obtenir une réduction importante, spécifique et à très long terme de l'expression de gènes cibles (plus de 500 jours en culture pour les clones les plus âgés). Nous avons ainsi établi la contribution de plusieurs partenaires du NHEJ (DNA PKcs, XRCC4, LigIV, Ku70) et de la RH (Rad54, RAD51, Rad52) dans des cellules Hela. (adénocarcinome cervical).

Notre troisième objectif a été reproduire cette approche pour caractériser le rôle des membres du complexe MRN dans la maintenance des télomères.

Résultats

Chapitre I : Contribution de P53 via sa fonction dans la recombinaison dans la maintenance des télomères.

Introduction

P53 est un suppresseur de tumeurs, muté dans 50% des cancers humaines et son invalidation chez la souris conduit à une prédisposition tumorale. La protéine transactive une série de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose afin d'empêcher les cellules porteuses de dommages de proliférer. Ces nombreuses fonctions lui valent le surnom de « gardien du génome ». Il existe aussi un certain nombre de données suggérant son implication dans la réparation et notamment la recombinaison. P53 réprimerait la recombinaison indépendamment de son rôle dans la transactivation. En effet, les cellules mutées pour P53 présentent une augmentation des événements de recombinaison intra chromosomique impliquant des séquences dupliquées de l'ordre 20 à 100 fois. Des formes mutées de P53, qui n'affectent pas l'arrêt en G1/S après l'irradiation induisent une stimulation de la RH suggérant que l'effet de P53 sur la RH est indépendant de son blocage G1/S et sa fonction de transactivation. Cette répression de la recombinaison naît ainsi de l'interaction qu'il existe entre RAD51 et P53 (Linke et al., 2003). Par ailleurs, il a été démontré que la protéine P53 pouvait interagir avec les séquences télomériques mais aucune indication n'a permis d'établir le rôle de cette interaction avec les séquences télomériques (Stansel et al., 2002).

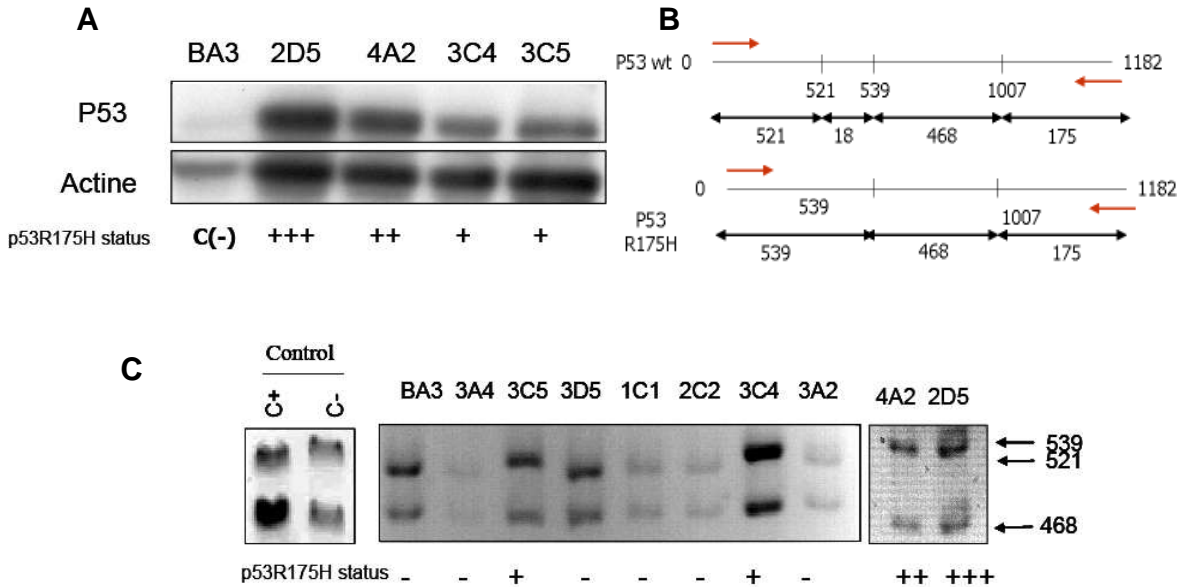
Dans le but de mieux caractériser la participation de la RH dans le maintien des télomères, nous avons modulé la recombinaison homologue dans les cellules telomérase (+). Sa présence aux télomères ainsi que sa fonction de répression de la recombinaison font de p53 un candidat potentiel pour le contrôle de la recombinaison aux télomères.

Nous avons choisi de surexprimer la mutation de P53 en His175, mutation très fréquente dans les cellules tumorales, définie en tant que effecteur de la RH dans les cellules murines (Bertrand et al., 1997).

Résultats :

Dans un premier temps, nous avons surexprimé de manière stable le transgène P53R175H. Par ce moyen, nous avons voulu déterminer si une stimulation de la RH pouvait induire une modification du profil télomérique. Le transgène P53R175H a été surexprimé dans une lignée

fibroblastique humaine immortalisée par hTERT, sous-unité catalytique de la télomérase nommée HCA17.3.



R1Fig1. Caractérisation des clones HCA17.3 P53R175H

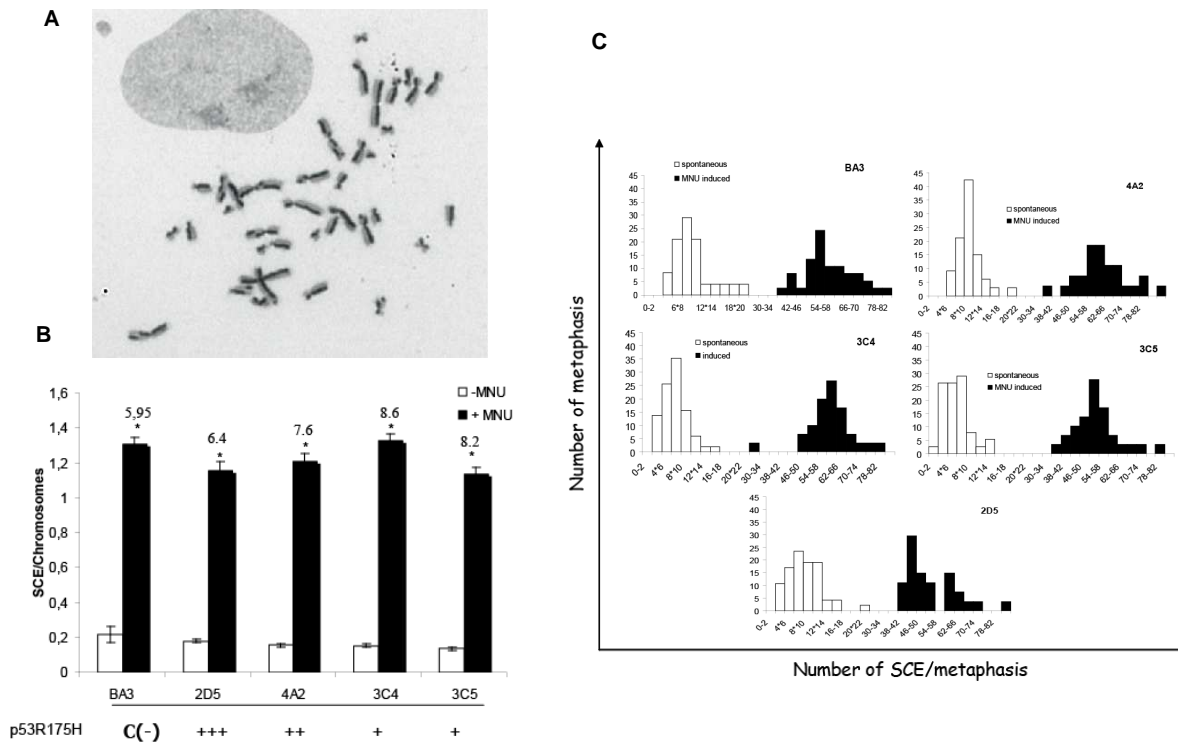
- A. Analyse de l'expression de P53 exogène par Western Blot.** Détection de la protéine P53 dans des extraits de cellules P53R175H non irradiées. La quantité d'actine correspond à la quantité de dépôt protéique de chaque extrait. Nous avons évalué le niveau de surexpression de p53 pour chaque clone: BA3 (le control vecteur vide), et les clones sélectionnés 2D5, 4A2, 3C4, 3C5. Le statut de P53 est mentionné selon cette nomenclature: (+) faible expression, (++) niveau d'expression intermédiaire, (+++) forte expression.
- B. Carte de restriction HaeII des ADNc de p53.** L'ADNc de P53 est long de 1182pb. L'ADNc de P53 endogène présente 3 sites de restrictions pour l'enzyme Hae II aux positions 521/539/1007. En revanche le cDNA du transgène P53 R175H est dépourvue du site HaeII en position 521. Il est ainsi possible de distinguer le profil de P53R175H du profil de p53 endogène
- C. Analyse du polymorphisme de restrictions par migration par électrophorèse.** Les cDNA sont digérés à raison de 1U/échantillon pendant 2H à 37°C. Les produits de digestion sont analysés sur un gel TAE1X agarose 4%. La migration révèle deux profils. Une bande commune de 468 pb est observée (elle correspond au fragment entre les sites 539 et 1007). En revanche, le pattern de digestion de l'ADNc P53R175H se distingue par un fragment plus long de 18pb c'est-à-dire 539pb au lieu de 521. Seuls les clones, exprimant le transgène, présentent ce fragment de 539 pb. Le statut de la surexpression est mentionnée par (+). Le control positif correspond au cDNA P53 R175H porté sur le plasmide à partir du PCMV-Neo-BamHI.P53R175H

Le crible des clones a été basé sur deux approches l'une permettant de mesurer le niveau global de P53 dans les cellules, l'autre discriminant les transcrits propres au transgène R175H. La première permet, par western blot, de déterminer le niveau protéique de P53 dans ces cellules. Nous n'avons pas utilisé cette seule approche pour conclure au succès de nos transfections car l'augmentation de l'expression de P53 pourrait être la conséquence d'un autre processus (stress inhérent à la surexpression).

Pour cela, nous eu recours à une approche basé sur l'étude des transcrits P53. Il s'avère que le cDNA codant pour la protéine P53 endogène présente un site de restriction supplémentaire pour l'enzyme HaeII au site 521. Donc, le profil de digestion par Hae II des cDNA p53 endogène diffère de celui de P53R175H d'1 fragment d'une taille de 18pb. Ainsi, les clones surexprimant P53R175H présentent un profil de digestion différent de la lignée contrôle confortant les résultats obtenus par western Blot. Parmi les clones sélectionnés, 4 semblent surexprimer le transgène avec des niveaux d'expression protéiques différents (R1-Fig1).

Le premier volet de cette étude a porté sur la caractérisation de l'effet de cette mutation sur la RH. Deux approches permettant de mesurer la recombinaison spontanée ou induite ont été utilisées. Tout d'abord, nous avons estimé le taux d'échanges de chromatides sœurs spontanés, évènements caractéristiques de la RH. L'exposition des cellules au MNU(N-methyl-N-nitrosurée), agent alkylant générant des cassures doubles brins, provoque une augmentation massive des échanges de chromatides sœurs (SCE) dans toutes les clones, contrôle ou surexprimant le transgène P53. Donc, contrairement à ce qui avait été observé dans des cellules murines, la surexpression de p53R175H n'induit pas de modification du taux de SCE (R1-Fig2). L'absence d'effet peut s'expliquer par un manque de sensibilité de la technique avec laquelle il est difficile de mettre en évidence des régulations fines (approche plutôt macroscopique).

Pour pallier à ce manque d'informations, nous avons utilisé une seconde technique permettant de mesurer la recombinaison *in vivo* à l'aide de vecteurs plasmidiques porteurs de copies GFP tronquées. Ainsi, la restauration de l'activité GFP se produit à chaque évènement de recombinaison. Cette analyse a révélé ainsi une augmentation de la RH dans les clones surexprimant P53R175H (R1-Fig3). Cette augmentation de la RH est accrue après un traitement de 0,2mg/ml de MNU indiquant que le taux de GFP varie selon le nombre d'évènements de recombinaison. Cependant, il n'y a pas de corrélation entre le niveau de recombinaison *in vivo* et le degré de surexpression du transgène.

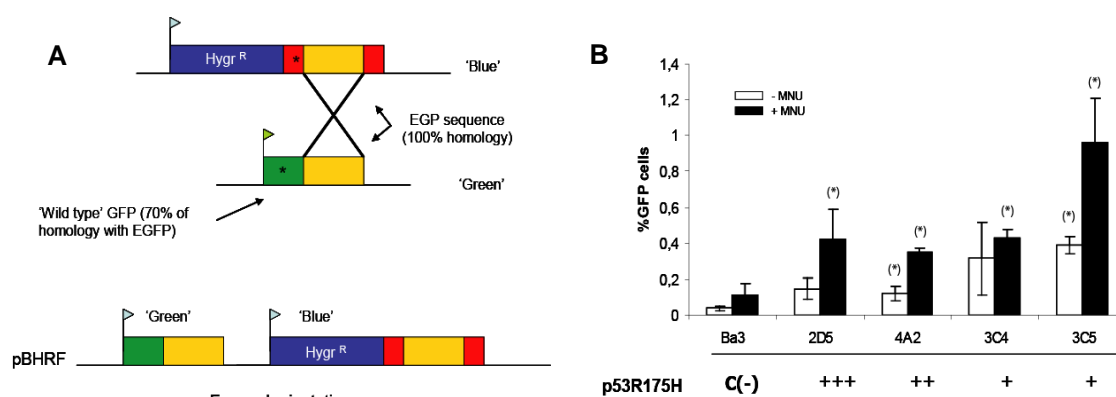


R1-Fig2 : Mesure de la recombinaison homologue par une Approche SCE

A. Échanges de chromatides soeurs révélées par FPG (Fluorescence Plus Giemsa). Incorporation de 0.3µg/ml de BrdU pendant 72h avec ou sans 0.2mg/ml of MNU dans nos clones de manière à différencier les chromatides soeurs.

B. Analyse des échanges SCE spontanées ou induites dans les clones HCA17.3 P53R175H. La fréquence de recombinaison a été établie en fonction du nombre de SCE/ chromosomes dans les différents clones traités ou non avec le MNU. 30 métaphases ont été analysées pour chaque clone. Le statut de la surexpression du transgène est mentionné selon la nomenclature établie (+) faible, (++) intermédiaire, (+++) forte. Aucune corrélation entre le statut P53R175H et la fréquence de recombinaison n'a pu être constaté. Le (*) indique le ratio entre le taux de SCE induites/taux SCE spontanées. Il permet de constater l'ampleur de l'induction des SCE après l'exposition au MNU. Les barres correspondent aux déviations standard.

C. Distribution des SCE induites ou spontanées dans les clones HCA17.3 P53R175H. Les distributions des SCE spontanées et induites sont présentées sur le même graphique. Les histogrammes blancs symbolisent les SCE spontanés et les histogrammes noirs les SCE induits après l'exposition au MNU. Ce graphique permet de mieux apprécier l'effet de la surexpression du transgène sur les échanges de chromatides soeurs. Cette représentation corrobore les résultats présentés dans la Figure B confirmant l'absence d'effet sur la recombinaison.



R1-Fig.3 Mesure des événements de RH in vivo

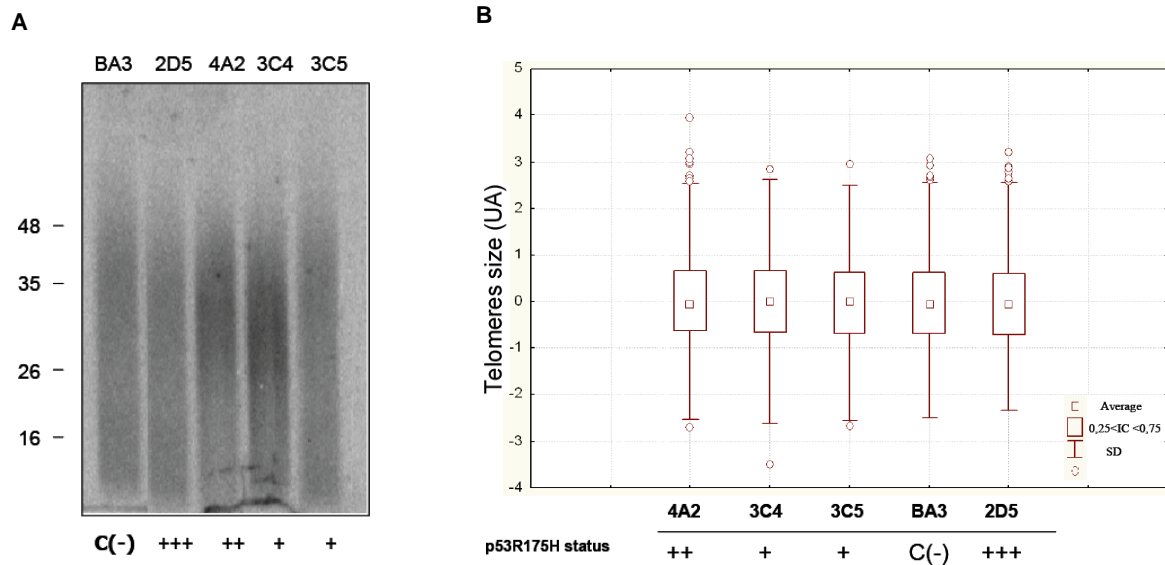
A. a. Recombinaison entre les deux séquences EGFP identiques de 300pb. La copie chimérique correspond à la séquence EBFP (qui code pour une protéine fluorescente bleue) qui diffère de l'EGFP de 1 acide aminé en position N-terminal. EBFP présente une région d'homologie de 300pb (jaune) avec la séquence EGFP. Cette région va recombiner avec la séquence codant pour une EGFP tronquée (pas de signal de fin de traduction) afin de restaurer une forme complète de l'EGFP. La région de l'EBFP, homologue à l'EGFP, est précédé en amont d'une séquence de wtGFP (*) (70% homologue de eGFP, et incapable de recombiner par RH avec EGFP) afin d'orienter la réaction de RH. Cette séquence est aussi présente en amont de la séquence codant pour GFP tronquée ("green"). La recombinaison entre ces deux régions jaunes permet la restauration de l'activité GFP.

b. Représentation schématique de la construction plasmidique pBHRF avec 2 copies inactives en orientation directe. Cette orientation permet de détecter des événements de recombinaison inter moléculaire (ie: conversion génique)

B. Surexpression de p53R175H stimule la recombinaison homologue à travers la voie RAD51. Les clones HCA17.3 sont transfectées avec le substrat pBHRF. 24h après la transfection, les cellules sont traitées ou non avec le MNU. 48h après la transfection les cellules sont récoltées et les résultats sont analysées par FACS. Ces résultats présentent le ratio de cellules exprimant la GFP indiquant la fréquence de recombinaison spontanée ou induite selon le traitement. (*) statistiquement significativement différent du contrôle BA3 avec une p value <0,05.

Par la suite, nous avons caractérisé le profil télomérique de ces lignées en fonction de la surexpression de P53R175H. Nous avons utilisé trois approches complémentaires ; Southern-Blot, de Q-FISH sur métaphases (R1-Fig4) et la quantification des T-SCE (échanges de chromatides télomériques) (R1-Fig5). L'expression de P53R175H, ne modifiait pas la longueur des télomères, n'augmente pas l'hétérogénéité de leur taille et n'induit de recombinaison télomérique (pas des échanges de chromatides soeurs télomériques). En présence de MNU, une augmentation massive des SCE avait été observée ainsi qu'une augmentation de la RH mais aucune d'induction d'évènements de recombinaison dans les télomères (T-SCE) n'a pu être décelée.

Deux résultats forts émergent de nos travaux. *1) La mutation P53R175H augmente faiblement la RH dans les cellules humaines* 2) *L'augmentation de la recombinaison, qu'elle soit spontanée ou induite ne modifie pas la longueur des télomères.*

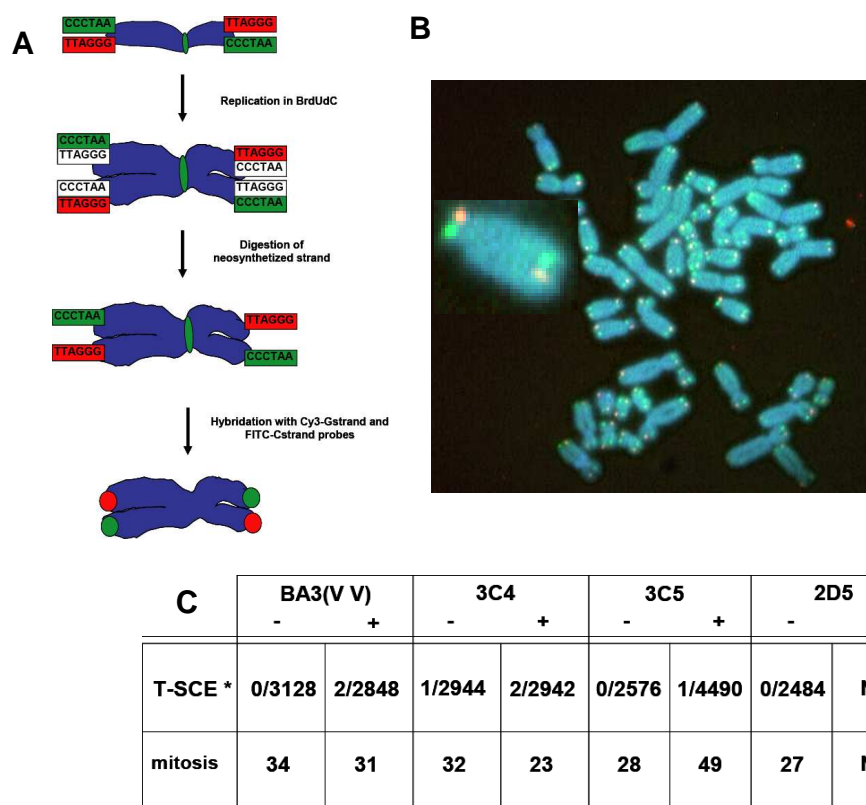


R1Fig 4. Mesure de la taille des télomères dans les clones HCA17.3 P53R175H.

A. Estimation de la taille des télomères par une analyse des TRFs fragments (Telomere restriction fragment). Les fragments sont obtenus après digestion de l'ADN télomérique par les enzymes de restrictions HinfI, RsaI (New England Biolabs). Ces fragments sont détectés par Southern Blot après l'hybridation d'une sonde télomérique (TTAGGG)₁₀ marquée au dATP-32P. La quantification de la taille des télomères est réalisée à l'aide du logiciel ImageQuant (Molecular Dynamics). Le statut de surexpression de P53R175H est mentionné avec (+).

B. Distribution de la taille des télomères dans les clones HCA17.3 P53R175H

L'analyse a porté sur l'étude de 17 métaphases par clone. La quantification de la taille des télomères est obtenue par Q-FISH. Les histogrammes représentent la dispersion et la variabilité des signaux télomériques par rapport à la moyenne établie pour l'ensemble des métaphases analysées d'un même clone. Ce diagramme présente (1) la valeur médiane calculée à partir des 17 métaphases (2) l'intervalle de confiance de 75% (boîtes) (3) la déviation standard (4) les valeurs atypiques (cercles).



R1Fig 5. Analyse de la recombinaison télomérique par CoFISH dans les clones HCA17.3 P53R175H.

A. Schéma descriptif récapitulant les principales étapes de la détection de la recombinaison télomérique par CO-FISH. L'incorporation du BrdU pendant la réplication permet de différencier le brin néosynthétisé du brin parental. La fixation du Hoescht puis l'exposition aux UV permet la dégradation des brins néosynthétisés par Exo III. L'hybridation de ces chromosomes avec les sondes télomériques C ou G-riche met en évidence la composition asymétrique des extrémités des chromosomes. La colocalisation de deux signaux télomériques sur l'une des chromatides témoigne d'un échange de chromatides sœurs. On parle de T-SCE (Telomere SCE)

B. Métaphase hybridée avec des sondes Cy3-(TTAGGG) et FITC-(CCCTAA)

C. Mesure de la fréquence de T-SCE spontanées ou induites par MNU dans les clones HCA17.3 P53R175H. Cette analyse est basée sur l'étude d'environ 30 métaphases /clone. Les événements T-SCE ont été recensés sur l'ensemble des métaphases issues des clones traités ou non avec le MNU. Les échanges télomériques sont extrêmement rares à raison de 0 à 1 échange sur 34 métaphases. Ce nombre double après l'exposition au MNU mais demeure anecdotique. (+/-) signifie avec ou sans MNU

Discussion des résultats

Nous pouvons cependant nous interroger sur la nature de l'augmentation de la RH par P53R175H et des effets qui s'en suivent sur la maintenance des télomères.

En effet, nos résultats démontrent que la surexpression du mutant P53R175H dans des cellules fibroblastiques humaines favorise davantage les événements de conversion génique survenues spontanément ou après un stress génotoxique (traitement des cellules avec le MNU). Ces résultats confortent les résultats observés chez le rongeur et les cellules humaines démontrant que certains

allèles mutants de P53 stimulent les événements de conversion génique (Bertrand et al., 1997; Saintigny et al., 1999) (Linke et al., 2003). Cependant, nous n'avons pas mis en évidence une corrélation entre le niveau de surexpression du transgène et l'ampleur de l'augmentation de la recombinaison dans les différents clones. Les allèles mutants de P53 induisent un changement conformationnel des sous unités endogènes de p53. Ainsi, les hétérotetramères mixtes affecteraient l'activité d'inhibition de la recombinaison par P53 en réduisant le niveau des homotetramères (Chan et al., 2004; Nicholls et al., 2002). Cependant, il a été démontré que cette inhibition n'est pas dose dépendante. Nous supposons que l'inhibition de la RH par P53 sauvage ne requiert pas d'interaction coopérative avec RAD51 ou un intermédiaire de la recombinaison. Dans ce cas précis, le niveau d'expression du transgène P53R175H ne permet pas de prédire l'ampleur de la stimulation des événements de conversion génique dans les cellules humaines.

Aux vues des différentes stratégies adoptées pour rendre compte de l'état de la recombinaison dans les cellules HCA17.3 P53R175H, il y a une réserve quant à l'interprétation des résultats en faveur du rôle de P53 dans la RH. La mesure des événements d'échanges de chromatides sœurs s'est avéré infructueuse, et n'a pas permis de conclure à un effet de la surexpression de p53R175H sur la RH spontanée ou induite. L'absence de résultats est probablement inhérente à cette technique qui reste peu sensible et ne permet pas de déceler des régulations plus fines. Pour compléter cette analyse, nous eu recours à un système basé sur des substrats *in vivo*. Ces vecteurs épisomaux porteurs de copies GFP tronquées restaurent l'expression de cette protéine par conversion génique (Slebos and Taylor, 2001). Cette approche nous a permis de mettre en évidence une augmentation significative des événements de recombinaison dans les cellules surexprimant le transgène P53R175H. Toutefois, cette technique comporte certaines limites. L'inconvénient majeur reste le nombre de copies transfectées par cellule. Ce problème fait intervenir plusieurs paramètres (méthode de transfection, efficacité de transfection, quantité de vecteurs transfecté) propre à cette approche. Ainsi, certaines cellules expriment plus de copies que d'autres surestimant en partie le réel effet du transgène. Un système, où nous pouvons maîtriser le nombre de copies de substrat semblerait plus adéquat à l'analyse du rôle de P53 dans la RH. De tels systèmes existent mais nécessite de nouveaux clonages ce que ne peut autoriser notre modèle cellulaire.

L'absence de phénotype télomérique dans ces clones soulève la question du rôle de la télomérase dans le contrôle de la recombinaison aux télomères. Nous supposons que la télomérase interfère avec les éléments de la recombinaison RH au niveau des télomères. En effet, les événements

d'échanges de chromatides sœurs ont lieu très rarement aux télomères dans les cellules exprimant la télomérase. Par ailleurs, plusieurs études démontrent que l'expression de la sous unité catalytique hTERT réprime le phénotype ALT, mécanisme faisant appel à la RH pour maintenir les télomères (Ford et al., 2001; Perrem et al., 1999). Par ailleurs, récemment de nouvelles fonctions de la télomérase ont été mises en évidence. Ainsi indépendamment de sa fonction d'élongation des télomères, hTERT semble impliqué dans la réparation des cassures doubles brins (Sharma et al., 2003) (Masutomi et al., 2005). Ces récentes découvertes soulèvent la question de la nature de la répression orchestrée par la télomérase, Comment la télomérase réprime la RH aux télomères ? Des travaux chez *C.Elegans* suggèrent que la répression de la RH par la télomérase ne fasse pas intervenir son activité d'élongation mais probablement une autre fonction (Mosser B unpublished data). Toutefois, la télomérase pourrait aussi exercer un contrôle indirect de la recombinaison aux télomères. La taille des télomères pourrait aussi réguler l'activité de la RH aux télomères en autorisant l'accès de la machinerie de recombinaison. Plus les télomères sont longs, plus la densité protéique est importante et plus l'accès aux télomères est limité or la lignée HCA17.3 présentent des télomères >20kb. Compte tenu de sa fonction dans l'élongation des télomères, la télomérase contribuerait ainsi à la répression de la RH aux télomères

Matériels et Méthodes

1. Lignée cellulaire :

HCA17.3 est un sous clone de la lignée HCA-1trt, lignée BJ immortalisée par la sous unité catalytique Htert (Rubio et al., 2002), ayant intégré un plasmide P_{sv}-Neo 1.6Kb TTAGGG en position télomérique. Ce plasmide possède un gène de sélection Néomycine accordant un avantage prolifération en présence de G418. Les cellules HCA17.3 sont cultivées en boîtes de 75 cm² dans du milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) / F12 +10% SVF (Sérum de Veau Fœtal), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine en présence de 200µg/ml de G418. Les cellules sont maintenues à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂. A confluence, les cellules sont rincées au PBS 1x et décollées avec de la trypsine/EDTA.

2. Transfection stable et Sélection des clones.

L'établissement des transfectants stables nécessite l'introduction des vecteurs d'expression dans les cellules de mammifères. Avant transfection les cellules sont amplifiées puis disposées dans des boîtes de diamètre 10 à 40% de confluence.

Le vecteur PCMV-Neo-BamHI contenant l'ADNc codant pour la protéine mutante P53R175H (construction réalisé par l'équipe de T.Soussi) est linéarisé en dehors des régions nécessaires à l'expression du transgène et des marqueurs de sélection eucaryotes. Le gène de résistance Neo étant déjà présent dans les cellules HCA17.3, nous avons effectué une cotransfection avec un plasmide porteur d'une autre résistance aux antibiotiques pBlasticidine.

La co-transfection est réalisée par électroporation (Pirzio et al., 2004) selon un rapport plasmide d'intérêt (P53R175H)/plasmide de sélection(pBlast) de 10 pour 1 afin que les cellules ayant intégré le vecteur de sélection, aient aussi théoriquement intégré le vecteur d'intérêt. 20µg de vecteur d'expression PCMV-Neo-BamHI-P53his175 est cotransfectée avec 2µg le vecteur blasticidine dans 5×10^6 cellules selon un programme d'électroporation adapté (310V, 1500µF). Ce précipitât est ensuite ajouté directement dans le milieu cellulaire et incubé sur les cellules pendant 16 heures. Puis les cellules sont rincées au PBS et incubées dans un milieu DMEM à 37°C. La pression de sélection est appliquée 24h après la transfection (blasticidine 15µg/ml) afin de sélectionner les clones ayant intégré les plasmides. Après environ une semaine de culture des clones résistants isolés apparaissent. Ils sont prélevés indépendamment et ensemencés dans des plaques de 96 puits.

3. Criblage des clones HCA17.3 P53R175H

a. Par Western Blot

Après récupération des cellules et lavage au PBS, les culots secs de cellules sont lysés dans une solution hypertonique (25mM Tris-HCl pH7.5, 600mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% Nonidet P40, DTT 1mM, Leupeptine 5µg/ml, Pepstatine 2µM, PMSF 1mM) pendant 40 min à 4°C puis centrifugés 30 min à 13000 rpm à 4°C. Le surnageant correspondant à la fraction protéique est récupéré. Les différents extraits protéiques obtenus sont dosés par la méthode colorimétrique de Bradford (Biorad). 20 µg d'extraits protéiques totaux de chaque échantillon sont dénaturés avec du tampon de Laemmli (SDS 2%, glycérol 10%, 60mM Tris pH6.8, Bleu de bromophénol 0,01%, 100mM DTT), puis déposés sur gel d'acrylamide à 10%. La migration

s'effectue dans du tampon de Laemmli (Tris Base 25 mM, glycine 20mM, SDS 1%, pH 8,3) à 100 V pendant 2h30.

Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Millipore) activée par des bains successifs de méthanol, d'eau, et de tampon de transfert (Tris base 25 mM, glycine 20mM, pH 8,3). La membrane est ensuite saturée toute la nuit dans un bain de TBS-Tween (Tris 10mM, NaCl 150mM, Tween 0,05%) avec 5% de lait. Les protéines d'intérêts sont ensuite marquées par des anticorps primaires spécifiques. L'anticorps monoclonal P53 DO-7 reconnaît notamment les formes p53 mutées ou sauvages et se dilue au 1/5000. La révélation est effectuée par chimioluminescence (kit de détection ECL Super Signal West Pico Chemoluminescent Substrat de Pierce). L'ensemble des techniques utilisées pour le criblage des clones cellulaires par western blot est issu de « Current Protocols in Molecular Biology ».

b. Par *Reverse Transcription Polymerase Chair Reaction (RT-PCR) et polymorphisme de restrictions*

Les ARNm sont isolés à partir de 2×10^6 cellules avec le mini kit RNAeasy. Pour éviter les contaminations avec l'ADN génomique, une étape supplémentaire d'incubation à la DNAaseI est effectuée avant l'élution de l'ARNm. La transcription inverse est ensuite réalisée sur 0,5µg d'ARN total en utilisant un oligonucléotide (dT)12-18 et la transcriptase inverse Superscript II suivant les recommandations du fabricant. Les amorces utilisées sont les suivantes :

- **P53-5: 5'ATGGTACCCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCT3'**
- **P53-6: 5'ATCTCGAGATGGAGGAGCCGCAGTCAGAT3'**
- **GAPDH primers: GAPDHF1: 5'TGGCAGGTTTTTCTAGACGGC 3'**
- **GAPDHR2 : 5'TCATCCATGACAACCTTGGTATCG 3'**

Les échantillons ont été incubés 5 minutes à 95°C puis ont subi 40 cycles de PCR (95°C 30s dénaturation, annealing à 55°C 1mn et l'élongation à 72°C 1mn).

Les produits d'amplifications sont ensuite digérés par Hae II, révélant un polymorphisme de restriction entre P53R175H et P53 endogène. Les produits de digestions sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose TBE 1X agarose 4% 10V/cm pendant 4H afin de mettre en évidence la différence de 18pb entre les fragments issus de la digestion de P53R175H et P53 endogène.

4. Mesure de la Recombinaison Homologue

a. Analyse des échanges de chromatides sœurs: FPG (Fluorescence Plus Giemsa)

Le principe de l'analyse des échanges de chromatides sœurs repose sur une coloration différentielle des deux chromatides sœurs de chaque chromosome en mitose. Pour cela un analogue de la thymidine, le BrdU est incorporé à l'ADN durant deux générations. Les cellules sont traitées de façon à créer une différence de coloration entre les deux chromatides qui n'ont pas le même taux d'incorporation de BrdU. Il est important que les cellules soient cyclantes durant toute l'expérience afin d'obtenir un taux de mitose correct. Le BrdU est ensuite ajouté à une concentration de 0.3µg/ml au milieu de culture à 37°C durant deux générations (~72h). Pour mesurer les SCE induites par le MNU, les cellules sont incubées durant la deuxième génération en présence de 0,2mg/ml de MNU.

Avant le prélèvement les cellules sont bloquées en métaphase en présence de la colchicine (10µg/ml) pendant 1h30, inhibant ainsi la mise en place du fuseau mitotique. Les cellules sont traitées par la trypsine et centrifugées à 1400rpm. Les cellules sont par la suite éclatées dans une solution hypotonique KCl 0,075M et à 37°C. Après éclatement, les cellules sont par la suite fixées dans une solution éthanol 75%, acide acétique 25% et étalées sur des lames puis congelées à -20°C. Les étalements sont incubés dans une solution de Hoechst (N° 33258) à 10µg/ml durant 20 min à l'obscurité, puis rincés à l'eau. Les métaphases sont ensuite dénaturées en exposant les lames UV, en présence de 2X SSC. Les lames sont ensuite mises au bain marie à 60°C pendant 10 min. Les étalements sont enfin colorés dans une solution de giemsa 3% et dans un tampon phosphate (KH₂PO₄) à 1.5%.

b. Mesure de la recombinaison homologue *in vivo*

Ce test repose sur la restauration de l'activité eGFP après des événements de recombinaison homologue. Deux copies tronquées altérées, codent pour une forme GFP dépourvues de d'1aa domaine N-Terminal et l'autre uniquement pour le domaine C-Terminal de la protéine eGFP. Seules, ces formes chimères ne permettent pas de restituer une activité GFP. En revanche, des événements de recombinaison entre ces deux formes génèrent une copie codant pour une protéine eGFP fonctionnelle. Ainsi, la reconstitution d'une fluorescence verte correspond à un échange homologue entre les deux copies inactives. Les mécanismes mises en place diffèrent selon l'orientation des copies tronquées : orientation directe ou orientation inversée. Dans notre cas, l'orientation des copies sera directe afin d'estimer les événements de conversion génique. Ce

test ne reflète que transitoirement l'état de la recombinaison homologue dans la cellule. 10^6 cellules sont transfectées avec $2\mu\text{g}$ de vecteur pBHRF par électroporation selon les recommandations du fournisseur (Amaya®). Les cellules sont par la suite resuspendues etensemencées dans des boites de culture 10cm de diamètre. Après 48h, ces cellules sont récoltées et fixées au PAF 2% (Paraformaldehyde). 50 à 100 10^3 cellules/ conditions sont analysées par cytométrie en flux FACS calibur (Beckmann Dickison San Jose,CA). Les efficacités de transfection sont estimées en comptant le nombre de cellules exprimant la protéine EGFP après l'expression d'un vecteur pEGFP sur le nombre total de cellules. L'efficacité de recombinaison est estimée en recensant le nombre de cellules exprimant la protéine EGFP suite à l'expression du plasmide pBHRF rapporté au nombre total de cellules analysées mais aussi pondéré par l'efficacité de transfection (Slebos and Taylor, 2001).

5. Mesure de la taille des télomères

a. Evaluation de la taille des télomères par Southern Blot

Une fois extrait, $5\mu\text{g}$ d'ADN génomique sont digérés par les enzymes RsaI/HinI ($5\text{U}/\mu\text{g}$ d'ADN). Les fragments sont séparés sur un gel d'agarose 1% 0,5X TBE selon une migration par un champ pulsé de $6\text{V}/\text{cm}$ pendant 25H. Le gel est dénaturé dans une solution de 0,4N NaOH puis transféré sur une membrane de nylon (Hybond XL, Amersham). Cette membrane est ensuite hybridée à l'aide d'une sonde télomérique (TTAGGG)₆ marquée en 5' au ^{32}P -ATP dans une solution de CHURCH à 55°C . La membrane est enfin exposée à un écran Phosphoimager et l'acquisition des profils densitométriques se fait à l'aide du Scanner Typhoon (Amersham.).

b. Evaluation de la taille des télomères par PNA-FISH

L'hybridation *in situ* s'effectue sur des cellules métaphasiques et interphasiques à l'aide d'une sonde télomérique PNA (CCCTAA)₃ marquée à la Cyanine 3 (Perceptive Biosystem). Les hybrides PNA-ADN sont très stables. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de répétitions télomériques ciblés (Lansdorp, 1996). Les étalements sont fixés à 2 reprises dans une solution de formaldéhyde 4% puis subissent une digestion à la pepsine ($1\text{mg}/\text{ml}$, $\text{ph}=2$, 10min, 37°C) afin de faciliter l'accès de la sonde aux extrémités chromosomiques. Après une série de lavages, fixation et déshydratation, les lames sont dénaturées à 80°C suivie d'une hybridation de la sonde télomérique à 37°C pendant 2h. Une fois rincées, les lames sont contrecolorées au DAPI ($1\text{ng}/\text{ml}$) et montées en lames/lamelles avec une interface PPD. Les

lames sont observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence Leica couplé à une caméra CCD. La capture et l'analyse des métaphases sont réalisées à l'aide du logiciel Aphelion. Pour chaque métaphase analysée, le signal télomérique a été quantifié après avoir extrait le bruit de fond. La quantification du signal prend en compte le temps d'intégration du signal fluorescent permettant de normaliser les résultats. Pour chaque clone, 17 métaphases ont été analysées sur une même préparation chromosomique.

6. Mesure des échanges télomériques par CO-FISH (Chromosome Orientation FISH)

a. Principe

Ces échanges télomériques ne sont pas détectables par des analyses conventionnelles de détection (ex: analyse SCE), quantifiant seulement les échanges dits génomiques. En revanche, les échanges télomériques peuvent être visualisés par une approche plus spécifique faisant appel à une hybridation particulière appelé CO-FISH (Chromosome Orientation FISH). Cette technique d'hybridation est habituellement utilisée pour déterminer l'orientation des séquences le long des chromosomes. Elle est basée sur la dégradation spécifique des brins néosynthétisés ayant incorporé un analogue de la thymidine (BrdU) lors de la réplication de l'ADN. A cause de leur composition asymétrique, chaque brin est identifié séparément sur des chromatides sœurs différentes. En revanche, si un échange post répliatif se produit, les extrémités chromatidiques présentent une co-localisation des signaux télomérique indiquant que des échanges ont eu lieu. Ces échanges ont probablement lieu entre les chromatides sœurs, uniquement au niveau télomériques (Bechter et al., 2004b; Londono-Vallejo et al., 2004).

b. Protocole

Les cellules sont cultivées en présence de 0,3µg/ml 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU): (Sigma, St.Louis, MO) pendant tout un cycle cellulaire. La récolte et l'étalement des chromosomes métaphasiques sont réalisés selon des procédures décrites précédemment. Les étalements sont ensuite traités avec la RNAase A pendant 10 min à 37°C (0.5 mg/ml) afin d'éliminer toute risque de contamination RNA. Les étalements sont incubés dans une solution de Hoechst (N° 33258) à 10µg/ml durant 20 min à l'obscurité, puis rincés à l'eau. Les métaphases sont ensuite dénaturées en exposant les lames UV (365nm). Les brins néosynthétisés, ayant incorporé le BrdU, sont digérés par l'Exonucléase III (3 units/µl; Promega, Madison, WI) dans une solution de 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl₂, et 5 mM DTT pendant 10 minutes à température ambiante. Ensuite, les séquences simples brins générées sont hybridées avec des sondes

télomériques fluorescentes selon le protocole de hybridation *in situ* des séquences télomériques (PNA-FISH), exposé plus haut. Les sondes PNA Cy3-(TTAGGG) et FITC-(CCCTAA) sont hybridées à tour de rôle dans le but de limiter les associations aspécifiques. Une fois contrecolorées, Les lames sont observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence Zeiss Axioplan couplé à une caméra CCD. La capture et l'analyse des métaphases sont réalisées à l'aide du logiciel Metasystems (GmbH).

*Chapitre II : Implication du NHEJ et de la RH dans la maintenance des télomères.***1. Inhibition des voies du NHEJ et HR et conséquences sur la radiosensibilité**

Afin d'étudier dans un modèle syngénique, les relations éventuelles entre les mécanismes de la recombinaison et la maintenance des télomères, nous avons choisi de tirer profit des opportunités offertes par l'ARN interférence, technique permettant de réduire le niveau d'expression d'un gène. L'utilisation de vecteurs pEBV siRNA permet d'obtenir des clones présentant de faibles niveaux d'expression (Biard et al., 2005). Ce système permet d'obtenir une réduction importante, spécifique et à long terme (plus de 300 jours en culture) de l'expression d'un gène cible. Plusieurs mois après la transfection, ces vecteurs demeurent épisomaux et associés aux chromosomes. Toutefois l'arrêt de la sélection provoque la perte du vecteur ARNi et la restauration de l'expression.

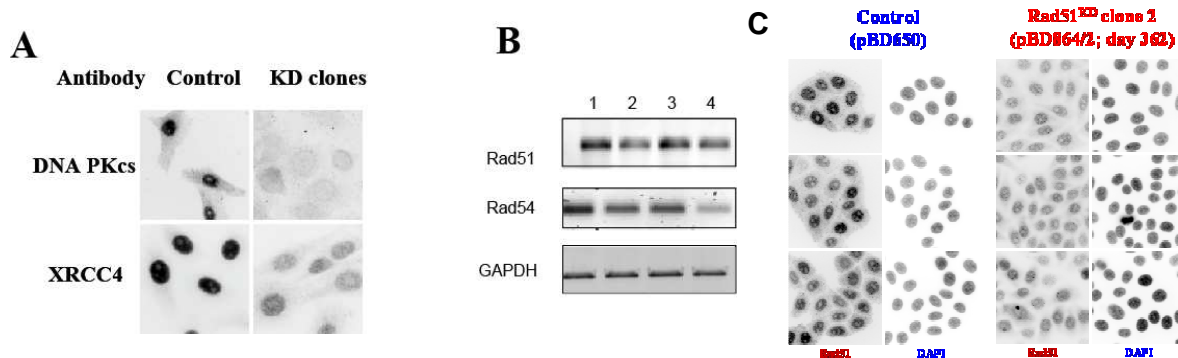
Nous avons utilisé ce système de vecteurs EBV-siRNA afin de réduire l'expression des protéines clés du NHEJ (DNA-PKcs, XRCC4, Ligase IV, Ku70) et de la RH (RAD51, RAD54) dans des cellules HeLa. Le choix de XRCC4, Ku70 et des protéines de la RH est particulièrement intéressant puisque aucune lignée humaine mutée pour ces protéines n'est disponible à ce jour.

Les clones obtenus, indexés avec KD, présentent un taux d'expression basal très faible démontrant toute l'efficacité du système (R2-Fig1). Cette inhibition persiste dans le temps. Notre analyse va porter à la fois sur l'étude des clones établis transitoirement mais aussi sur ceux établis à plus long terme. Seule l'inhibition de RAD51 a soulevé quelques interrogations. En effet, l'expression prolongée du vecteur pEBV-siRAD51 conduit à une réduction de moins de 50% alors que la réduction dans les autres clones avoisine les 90% (R2-Fig1B,C).

La réduction de l'expression des gènes du NHEJ et de la RH permet d'établir un phénotype comparable à celui des cellules provenant de patients humains radiosensibles dans les lignées Hela. En effet, la diminution de l'expression entraîne une augmentation sensible de la sensibilité aux irradiations. Il est intéressant de noter que les cellules déficientes pour le NHEJ sont plus sensibles aux agents génotoxiques que les mutants de la RH.

La diminution de l'expression des gènes XRCC4, DNA-PKcs, et Ligase IV sensibilise les cellules à divers agents génotoxiques comme les RI ou le VP16(Biard, 2007). Par ailleurs, les cellules invalidées pour le NHEJ ou la RH présente une intolérance aux doses aiguës d'irradiation(Biard, 2007). Le blocage consécutif à l'irradiation est altéré puisque les cellules sont

bloquées en S/G2 et indique qu'il pouvait s'agir de cellules endommagées pour l'ADN (Biard, 2007).

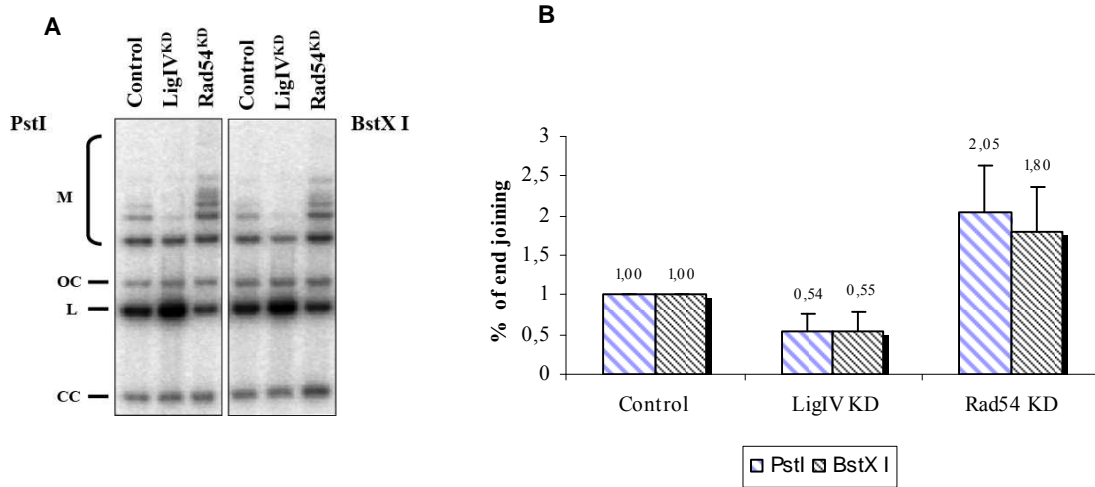


R2-Fig1. Caractérisation des clones HeLa RH^{KD} et NHEJ^{KD}

- Caractérisation des clones HeLa DNA-PKcs^{KD} et XRCC4^{KD}. Coloration par immunofluorescence des clones XRCC4^{KD} (86 jours en culture) DNA-PKcs^{KD} (161 jours en culture) et du clone contrôle avec les anticorps anti-DNA-PKcs et anti-XRCC4.
- Caractérisation des clones HeLa HR^{KD} par RTPCR. RTPCR est réalisé à partir d'ARNm extraits des clones contrôle, RAD51^{KD} (inhibition J+88) et RAD54^{KD} (inhibition J+96). La quantité d'ARNm déposée est déterminée par le niveau d'expression de GAPDH.
- Caractérisation des clones RAD51^{KD} stable. Coloration Immunofluorescence des clones RAD51^{KD} (362 jours en culture), du clone contrôle avec les anticorps anti-RAD51. L'efficacité de l'inhibition de RAD51 est moins prononcée que chez les clones DNA-PKcs^{KD} et XRCC4^{KD}.

2. NHEJ in vitro

Afin d'estimer le NHEJ dans nos clones, nous avons eu recours à un test basé sur l'utilisation d'un substrat d'ADN simple qui permet d'étudier la ligature d'extrémités cohésives ou non-homologues en présence d'extraits protéiques. Ce test a mis en évidence dans une première étude la diminution drastique de l'activité NHEJ dans les cellules DNA-PKcs^{KD}, XRCC4^{KD} (Despras et al., 2007). Nous avons mis en évidence une réduction de 43% de l'efficacité de réparation dans les cellules LIGIV^{KD} (R2-Fig2) corrélant une réparation NHEJ déficiente à la radiosensibilité observée. L'utilisation du test de NHEJ *in vitro* a mis en évidence une altération de la voie NHEJ dans le clone RAD54^{KD} avec une augmentation de l'efficacité de 70% (R2-fig2). Ceci est d'autant plus surprenant que RAD54, appartenant à la voie de la RH n'a jamais été décrit comme inhibant des étapes clés du NHEJ. Toutefois cette augmentation peut traduire la compétition qu'il règne entre le NHEJ et RH. Ainsi, l'inhibition de RAD54 altérerait la recombinaison homologue et favorise par défaut le NHEJ.



R2-Fig2. Efficacité NHEJ in vitro pour les clones HeLa RH et NHEJ^{KD}

- A. Séparation des produits NHEJ sur gel d'agarose obtenus.** Les extraits cellulaires des clones Control^{KD} HeLa control, Ligase IV^{KD} clone 3 (inhibition J+139), RAD54^{KD} clone 5 (inhibition J+185) sont compétents pour le NHEJ in vitro. 10ng de substrat sont incubés en présence de 40µg d'extraits cellulaires. La configuration des extrémités des substrats est indiquée au dessus des gels PstI (3' cohésives) ou BstX (franches). Suite à cette réaction, plusieurs produits sont formés: des multimères linéaires de taille variée (M) correspondant à des jonctions intermoléculaires, des produits circulaires monomériques correspondant à des jonctions intramoléculaires et regroupent des intermédiaires ouverts (OC de l'anglais open circle, forme circulaire relaxée) et des plasmides entièrement re-circularisés (CCC de l'anglais covalently closed circle, forme circulaire super-enroulée), le substrat linéaire résiduel (L). Les produits sont analysés par *southern blotting*.
- B. Comparaison de l'efficacité de réparation du NHEJ entre les clones Ligase IV^{KD} et RAD54^{KD}** selon la configuration des extrémités du substrat: 3'cohésives (PSTI) ou franche (BSTX). Valeurs obtenues après quantification au phospho-imager des différents produits de réparation en (A) ; efficacité = (ccc+oc+M)/(ccc +OC+M+L) x 100). Les valeurs représentées expriment l'efficacité normalisée du NHEJ (rapport efficacité du clone/control).

3. L'effet à court terme de l'inhibition de RH et NHEJ sur la maintenance des télomères

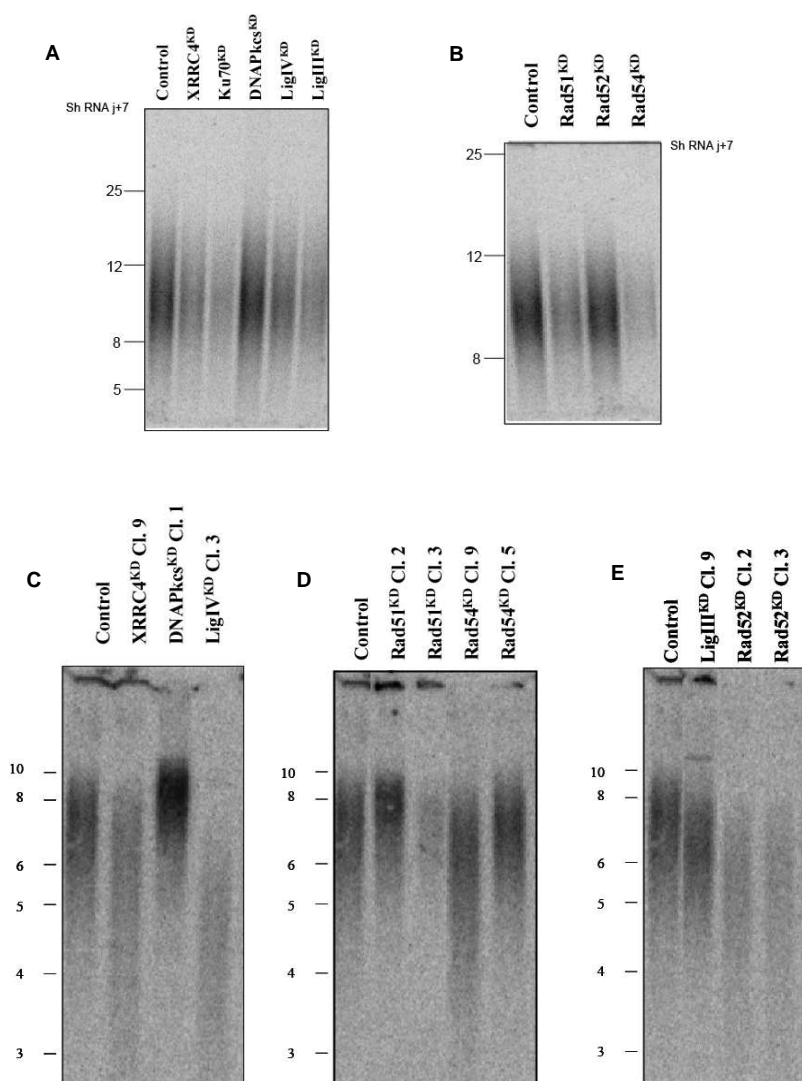
Le NHEJ et la RH constituent des acteurs majeurs de la stabilité du génome. Le lien qu'il existe entre la radiosensibilité et les télomères repose en outre sur l'interaction des protéines de la réparation avec les télomères. Divers travaux réalisés chez les mammifères démontrent que les éléments du NHEJ ou RH participent au maintien de la fonction des télomères. Ainsi, les membres du NHEJ comme DNA-PKcs ou Ku86 sont impliqués activement dans la protection et la régulation de la taille des télomères ainsi que RAD54 ou RAD51D appartenant à la RH. Notre étude vise à déterminer chez l'homme l'impact de l'absence transitoire ou prolongée des voies de la recombinaison sur la fonction des télomères dans un contexte syngénique. Pour y répondre

nous aborderons dans un premier temps les conséquences d'une dérégulation transitoire des voies de la recombinaison sur le maintien des télomères.

A court terme, l'inhibition des gènes codant pour le NHEJ ou la RH n'altère pas la taille des télomères (R2-Fig3). En revanche, l'invalidation du NHEJ et de la RH déstabilise les télomères. L'analyse cytogénétique des clones DNAPKcs^{KD}, Ku7^{KD}, LIGIV^{KD} et RAD51^{KD} RAD54^{KD} obtenus transitoirement révèle que leurs télomères sont perdus systématiquement indiquant une déprotection des télomères (R2-Fig4). En effet, les clones DNAPKcs^{KD}, Ku70^{KD} perdent en moyenne 8 à 9 télomères /cellules alors que le clone contrôle n'en perd que 3 en moyenne. Cette perte est encore plus prononcée dans le clone LIGIV^{KD} puisqu'en moyenne 21 télomères sont perdus par cellule. Ces valeurs élevées sont aussi retrouvées chez les cellules abolissant partiellement la protéine RAD51 après 5 jours à hauteur de 20 télomères perdus/metaphases. Ainsi, dans ces clones, près de 12% des télomères sont perdus pouvant générer une forte instabilité du génome (R2-Fig4).

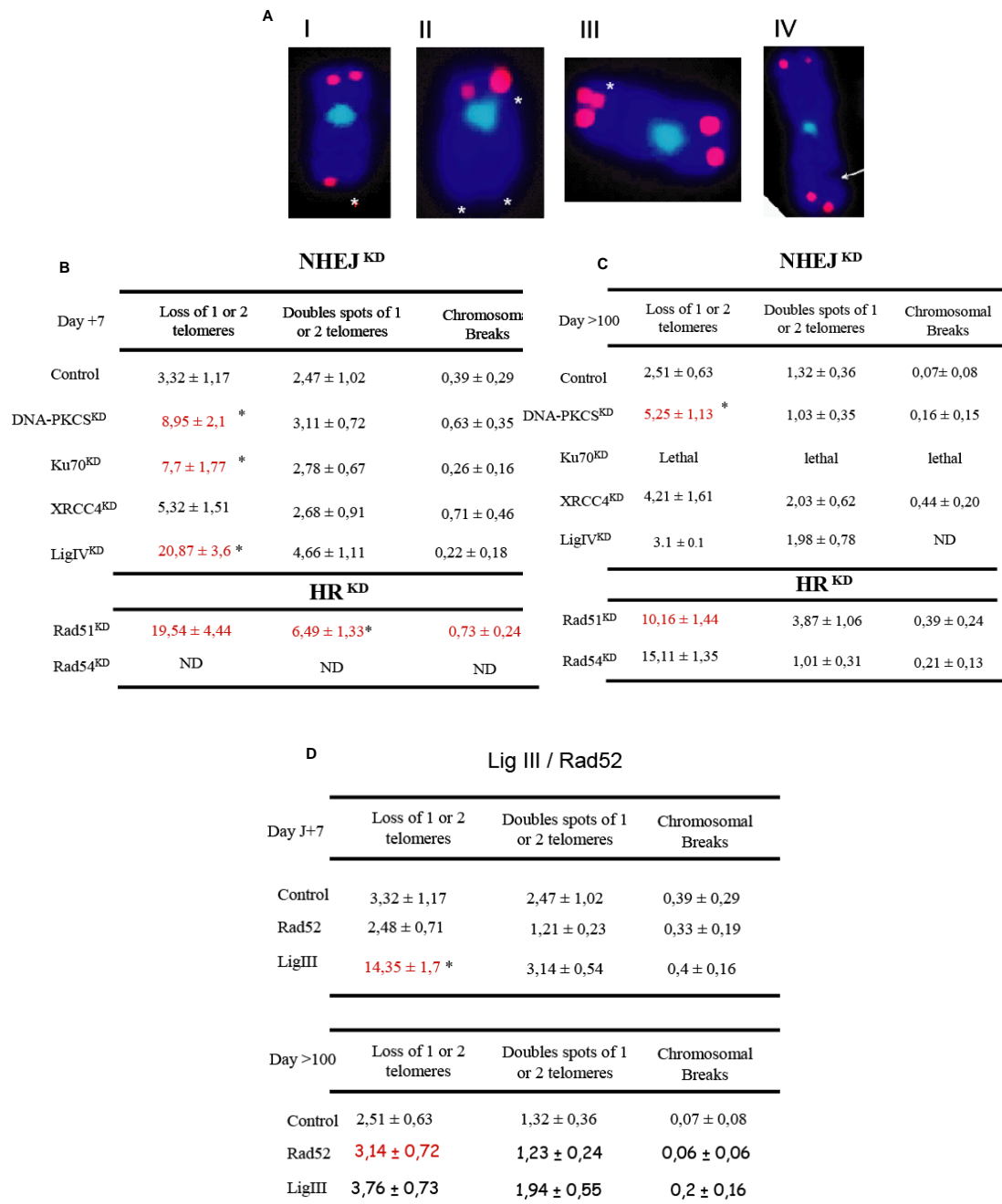
Pourtant, ce dysfonctionnement télomérique ne se manifeste pas par une apparition de chromosomes dicentriques aberrations majeures, observés habituellement après une érosion trop importante ou une altération de la structure des télomères.

Dans le cas de XRCC4, aucune instabilité télomérique (5,32 télomères perdus/ metaphases (R2-Fig4) n'a été notée mais il demeure que son absence provoque une instabilité chromosomique avec 0,7 cassures chromosomiques/cellule. De plus, une instabilité similaire est observée dans les cellules RAD51^{KD} témoignant de l'importance des voies de la recombinaison dans la stabilité chromosomique.



R2-Fig3. Mesure de la taille des télomères des clones HeLa RH et NHEJ^{KD}

- A. Estimation de la taille des télomères des clones NHEJ transitoires (J+7)** XRCC4^{KD}, Ku70^{KD}, DNA-PKcs^{KD}, LigIV^{KD}, LigIII^{KD} par une analyse des TRFs fragments (Telomere Restriction Fragment). Les fragments sont obtenus après digestion de l'ADN télomérique par les enzymes de restrictions HinfI, RsaI (New England Biolabs). Ces fragments sont détectés par Southern Blot après l'hybridation d'une sonde télomérique (TTAGGG)₁₀ marquée au dATP-32P. La quantification de la taille des télomères est réalisée à l'aide du logiciel ImageQuant (Molecular Dynamics). La taille des marqueurs de poids moléculaire est indiquée ci-dessus en Kb.
- B. Estimation de la taille des télomères des clones RH transitoires (J+7)** RAD51^{KD}, RAD52^{KD}, RAD54^{KD} par une analyse des TRFs fragments (Telomere Restriction Fragment).
- C. Estimation de la taille des télomères des clones stables NHEJ^{KD}** XRCC4^{KD} cl.9 (J+276), DNA-PKcs^{KD} cl.1 (J+380), LigIV^{KD} cl.3 (J+130), LigIII^{KD} cl.9 (J+134).
- D. Estimation de la taille des télomères des clones stables RH^{KD}** RAD51^{KD} cl.2 (J+127), RAD51^{KD} cl.3 (J+127), RAD52^{KD} cl.2 (J+154), RAD52^{KD} cl.3 (J+154), RAD54^{KD} cl.5 (J+134), RAD54^{KD} cl.9 (J+134).
- E. Estimation de la taille des télomères des clones stables Ligase III KD cl.9, RAD52 KD (J+140)**



R2-Fig4. Analyse de la stabilité des télomères dans les clones HR et NHEJ^{KD}

- A. Exemples d'aberrations chromosomiques retrouvées dans les clones HeLa HR^{KD} et NHEJ^{KD}.** La détection est réalisée par hybridation in situ de l'ADN télomérique avec une sonde PNA (TTAGGG)-Cy3, ADN centromérique marqué par une sonde pan-centromérique-FITC. (I) Perte d'une séquence télomérique; Perte de 2 télomères sur des chromatides distinctes (II); Doublets télomériques (III) ; cassures chromosomiques (IV).
- B. Fréquences des aberrations chromosomiques télomériques dans les clones transitoires HeLa HR^{KD} et NHEJ^{KD} (J+7).** Recensement des anomalies télomériques: Perte de 1 ou 2 télomères issus du même bras chromosomique; Doublets télomériques sur 1 ou 2 chromatides; Cassures chromosomiques sur une ou deux chromatides. L'étude a été réalisée à partir de 30 métaphases/clones. Les valeurs exprimées correspondent

au nombre moyen d'événements par métaphase analysée. (*) signifie significativement différent du contrôle avec un risque $p < 0.05$ (test t non apparié).

- C. **Fréquences des aberrations chromosomiques télomériques dans les clones stables Hela HR^{KD} et NHEJ^{KD} (inhibition > 100 jours)** Contrôle, XRCC4^{KD} cl.9 (J+ 258), DNAPKcs cl.1 (J+ 352), LigIV cl.11 (J+ 119), RAD51^{KD} cl.3 (J+120), RAD52^{KD} cl.2 (J+135), RAD54^{KD} cl.5 (J+127). Les valeurs exprimées correspondent au nombre d'événements par métaphase \pm Ecart type.
- D. **Analyse de la stabilité des clones transitoires et stables LigIII^{KD}/RAD52^{KD}**. Clones stables Ligase III cl.9 (J+123), RAD52 cl.2 (J+134).

Clones ^{KD}	(1)Telomere Loss only	(2) Telomere Loss + subtelomeric DSB	(1)/(2)	Mitosis
Control ^{KD}	1,05 \pm 0,21	2,32 \pm 0,26	0,45	58
XRCC4 ^{KD}	1,49 \pm 0,22	2,71 \pm 0,22	0,55	57
DNA-PKcs ^{KD}	2,04 \pm 0,23	3,2 \pm 0,24	0,52	56
LigaseIV ^{KD}	2,67 \pm 0,23	0,32 \pm 0,07	8,34	32
Rad51 ^{KD}	7,55 \pm 0,58	2,63 \pm 0,26	2,87	56
Rad54 ^{KD}	12,9 \pm 0,51	2,19 \pm 0,33	5,89	57
Rad52 ^{KD}	1,38 \pm 0,19	1,75 \pm 0,23	0,69	58

R2-Fig5. Contribution relative du NHEJ et de RH dans la stabilité des télomères

Hybridation in situ de l'ADN télomérique avec une sonde PNA (TTAGGG)-Cy3, ADN centromérique marqué par une sonde pan-centromérique-FITC. Recensement des anomalies télomériques: (1) Perte télomériques (1 ou 2 télomères provenant du même bras chromosomique); (2) perte des télomères associées à des cassures télomériques (1 ou 2 telomeres associées à une cassure). Les pertes télomériques associées à des cassures correspondent à des signaux télomériques libres (spots rouges) associée à de l'ADN génomique révélée au DAPI. Cette étude a été réalisée sur les clones Contrôle, XRCC4^{KD} cl.9 (J+ 258), DNAPKcs cl.1 (J+ 352), LigIV cl.11 (J+ 119), RAD51^{KD} cl.3 (J+120), RAD52^{KD} cl.2 (J+135), RAD54^{KD} cl.3 (J+127). Les valeurs exprimées correspondent au nombre moyen d'événements par métaphase analysée. (*) signifie significativement différent du contrôle avec un risque $p < 0.05$ (test t non apparié)

4. L'effet de l'inhibition prolongée des protéines de RH et NHEJ sur la maintenance des télomères

Nous avons donc poursuivi notre analyse sur les effets d'une inhibition à long terme des membres du NHEJ et de la RH. Dans un premier temps, nous avons dû nous résoudre à ne pas étudier Ku70. En effet, après seulement 10 jours l'inhibition de Ku70 s'avère être létale pour les cellules Hela.

L'inhibition prolongée de la LIG IV conduit à une réduction drastique de la taille des télomères (4,5 kb contre 8-9 kb pour le clone contrôle). Une réduction de la taille est aussi constatée pour le clone XRCC4^{KD} (taille moyenne à 6kb). Au contraire, l'inhibition de DNA-PKcs induit un allongement des télomères à hauteur de 12 kb confortant les données décrites dans la littérature

(R2-Fig3). En absence de RAD51 et RAD54, nous avons assisté un raccourcissement plus ou moins marqué selon le clone analysé (R2fig3). Les modifications de la taille ne semblent pas être causées par des variations de l'activité télomérase. En effet, le dosage de l'activité télomérase *in vitro* ne révèle aucune modification significative dans les clones Hela NHEJ^{KD} et HR^{KD} (résultats non présentés).

Une étude comparative long terme/ court terme nous révèle que la majorité des anomalies induites transitoirement ne persistent pas dans le temps indiquant que les anomalies induites interfèrent avec le bon fonctionnement de la cellule et sont donc éliminées par mort cellulaire. En effet, la proportion de pertes télomériques ou de doubles signaux dans les clones NHEJ^{KD}, (LIGIV, DNAPkcs, XRRC4) diminue drastiquement. En effet, prenons l'exemple du clone LIGIV^{KD} le taux de pertes de télomère est de 3 télomères perdus/cellule après 119 jours d'inhibition alors que celui-ci avoisine les 21 télomères perdus après 5 jours d'inhibition (R2fig4). Par contre, les cellules dépourvues de RAD51 et RAD54 conservent un nombre élevé de télomères perdus (respectivement 10 et 15 télomères perdus par cellule) (R2-Fig4). Aux vues des résultats à long terme, il apparaît que les cellules déficientes pour la RH sont plus instables que celles pour le NHEJ.

L'inhibition des 2 voies conduit aux mêmes conséquences c'est-à-dire à un phénotype d'instabilité mais les mécanismes à l'origine de ces pertes demeurent méconnus. Dans le but de déterminer si la RH a un rôle distinct du NHEJ dans la protection des télomères, nous avons affiné l'analyse de la perte télomérique en distinguant la perte d'1 ou 2 télomères associés ou non avec un fragment extrachromosomique. La présence d'un fragment télomérique extrachromosomique traduit une cassure subtélomérique venant de se produire au cours de la division cellulaire. Il s'avère que les aberrations observées dans les mutants du NHEJ diffèrent de celle observées dans les mutants de la RH. Pendant que les mutants du NHEJ présentent des pertes de télomères associées avec des cassures en régions subtélomériques, la dérégulation de la RH cause la perte des télomères (R2-Fig5).

Ces résultats suggèrent que le NHEJ prendrait en charge la réparation des cassures télomériques et subtélomériques (maintien d'architecture télomérique) alors que RH dans la structure des télomères ou de la réplication.

5. Résultats complémentaires : L'invalidation des protéines du B-NHEJ (ligase III) et de la recombinaison RAD52.

Comme nous l'avons exposé au cours de notre introduction, la réparation des cassures doubles brins fait intervenir 2 composantes, une composante dite rapide dépendante de la protéine DNAPKcs et une composante de réparation plus lente indépendante de DNAPKcs dite B-NHEJ. Ce B-NHEJ fait appel à plusieurs composants parmi lesquels on retrouve la Ligase III. L'implication de B-NHEJ dans la maintenance des télomères n'a pas encore été décrite, et dans la perspective d'étudier le rôle du D-NHEJ, il semblait logique de préciser aussi la participation de B-NHEJ.

Parallèlement, nous avons choisi d'inclure dans notre étude un autre membre de la recombinaison, RAD52, très peu décrit pour sa contribution télomérique dans les cellules de mammifères. Chez la levure, RAD52 joue un rôle essentiel dans la mise en place du mécanisme ALT dans les levures dépourvues de télomérase. Par contre, les télomères ont une taille normale dans un mutant RAD52- Δ indiquant que la recombinaison n'est pas essentielle au maintien de l'équilibre de la taille des télomères (Dunn et al., 1984). Chez les mammifères, RAD52, favorise le recrutement de ERCC1 lors du SSA, mais l'absence de RAD52 ne se traduit par des phénotypes marqués comme c'est le cas pour RAD51 ou RAD54.

Nous avons pu établir des lignées RAD52^{KD} et LigaseIII^{KD}. L'extinction de la ligase III perdure lors de la culture et des facteurs lui étant associé sont aussi réprimés tels que XRCC1 (communication personnelle Biard DS). Dans le cas de RAD52, son extinction n'influence pas l'expression des autres partenaires RAD54 et RAD51. Ces clones tolèrent les rayonnements ionisants et ne semblent pas être impliqués directement dans la réponse aux dommages radioinduits. (Biard, 2007). L'influence de la LigaseIII dans la réparation des CDBs a aussi été testée par le test d'activité in vitro NHEJ. De manière, surprenante l'extinction de Ligase III stimule l'efficacité globale du NHEJ (augmentation de 168%) ce qui expliquerait alors sa tolérance pour les cassures radioinduites.

Leurs contributions respectives ont été testées au même titre que les membres du D-NHEJ et de la RH. L'inhibition à court terme de la Ligase III déstabiliserait aussi les télomères avec un taux assez conséquent de pertes de télomères (en moyenne 14 télomères/métaphases) (R2-Fig4). Dans le même temps, l'inhibition de RAD52 n'affecte pas la stabilité des télomères.

A long terme, l'extinction prolongée de RAD52 ou de la Ligase III n'altère pas de manière significative la structure des télomères (R2-Fig2). Par contre un raccourcissement des télomères

est observé dans les cellules RAD52^{KD} alors que l'inhibition de la Ligase III n'affecte pas la longueur des télomères.

Aux vues de ces données, la Ligase III pourrait participer à la protection des télomères pendant que RAD52 contribuerait au contrôle de la longueur des télomères.

Discussion des résultats

Contre toute attente, l'absence prolongée ou non des protéines Ku et DNA-PKcs n'engendre pas de fusions télomériques. Les fusions télomériques résultent d'événements faisant intervenir le mécanisme NHEJ. Dans ce cas, l'absence de fusions indiquerait un défaut majeur du NHEJ dans notre lignée cellulaire. Cependant, seule une altération partielle de l'activité NHEJ a été mise en évidence dans les clones DNAPkcs^{KD} /Ligase IV^{KD} /XRCC4^{KD}, écartant le scénario d'une probable dérégulation du NHEJ responsable de la non fusions des télomères. Cette absence met-elle en lumière un dysfonctionnement d'un mécanisme autre que le NHEJ propre aux cellules Hela ? Pour répondre à ces questions, plusieurs expériences sont en cours de réalisation afin de préciser le réel statut de nos clones face aux fusions. Dans un premier temps, l'apparition spontanée de chromosomes remaniés (composés de fragments chromosomiques issus de différents chromosomes) sera étudiée, ces remaniements sont la manifestation de fusions (télomériques ou non), dans les clones établis transitoirement ou à plus long terme. Il s'agit de détecter des fusions très précocement, si elles se produisent, et de déterminer leurs persistances au cours de la sélection clonale. Il est clair que même dans un certain contexte génétique, les fusions se forment rarement spontanément. Ainsi, nous avons soumis nos clones à un stress génotoxique (l'irradiation) afin de produire un certain nombre de cassures chromosomiques susceptibles d'interagir avec des télomères endommagés. Les remaniements occasionnés impliquant un chromosome lésé et une extrémité chromosomiques seront recensés et permettront d'établir la capacité de la cellule à fusionner ses extrémités « naturelle » ou « artificielles ».

Parmi les autres manifestations d'un dysfonctionnement des télomères, nous avons relevé plusieurs doublets télomériques. L'origine de ces doublets encore peu expliquée dans la littérature. Certains les présentent comme des stigmates d'une lésion télomérique mal ou non réparée. En effet, les séquences télomériques sont considérées comme des régions difficilement réparables comparées à d'autres séquences répétées du génome. Ceci semble être lié à la nature même de la structure des télomères, dense et très compacte, interdisant leurs accès à la machinerie de réparation. La recherche de marqueurs spécifiques des cassures doubles brins a

permis de mettre en évidence certains foci H2AX (marqueurs de cassures doubles brins) aux niveaux de ces doublets télomériques.

Ces doublets peuvent aussi correspondre à la reprise de la réplication des télomères après avoir rencontré une région télomérique endommagée. Face à une cassure télomérique, la machinerie de réplication décrocherait pour poursuivre, plus en aval, la réplication des télomères. Il serait alors intéressant de déterminer la fréquence de ces doublets dans des cellules traitées par des inhibiteurs de la réplication (HU, mimosine, aphidicolin).

Afin de compléter notre analyse, relative à la maintenance des télomères, nous avons entrepris de mesurer les événements de recombinaison télomériques dans les clones établis. Nous établirons le statut de la RH aux télomères et dans le reste du génome à l'aide d'une approche faisant état des échanges de chromatides sœurs dans les clones Hela. La fréquence des SCE aux télomères (T-SCE) sera pondérée à celle observée dans le reste du génome. Par ce biais, nous saurons si le phénotype télomérique témoigne d'un déséquilibre global ou bien résulte d'une altération spécifique illustrant le lien entre la maintenance des télomères et la recombinaison.

Matériels et Méthodes

1. Design des shRNA pEBV

Les stratégies de design et de clonage des ShRNA dans les vecteurs pEBV ainsi que l'établissement des clones Hela ont été décrit. Brièvement, l'étape clef de l'interférence par ARN réside dans la reconnaissance des messagers par de petits ARN. Ces séquences de 21 nt vont cibler les ORF d'un gène précis. Ces séquences sont designées à l'aide d'un logiciel siSearch auxquelles quelques modifications sont apportées (Elbashir et al., 2001; Tuschl, 2001). Une fois synthétisées, ces séquences vont être clonées dans un vecteur pEBVsiRNA-LacZ portant une cassette de résistance à l'hygromycine B. Ces vecteurs portent le promoteur H1 reconnu par l'ARN pol III qui contrôle la transcription des séquences shRNA produisant *in vivo* des petites séquences siRNA. Le criblage bleu/blanc permet d'isoler les bactéries présentant le vecteur pEBV recombinant ayant intégré les séquences codantes pour les shRNA. Pour chaque gène, 2 à 4 vecteurs sont testés à court et long terme. L'efficacité de l'inhibition, le maintien de cette répression dans le temps constituent autant de critères susceptibles de sélectionner le vecteur adéquat afin d'établir une lignée stable (Biard et al., 2005).

2. Culture cellulaire

Les cellules Hela sont cultivées en boîtes de 75 cm² dans du milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) / F12 +10% SVF (Sérum de Veau Fœtal), 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine. Les cellules sont maintenues à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂. A confluence, les cellules sont rincées au PBS 1X et décollées avec de la trypsine/EDTA. Les clones établis à long terme sont maintenus sous pression de sélection en présence de 125µg/ml d'Hygromycine B (Biard et al., 2005).

L'établissement des transfectants stables nécessite l'introduction des vecteurs d'expression pEBV-shRNA-LacZ dans les cellules Hela. Avant la transfection, les cellules sont amplifiées puis disposées dans des boîtes de diamètre 6 à 40% de confluence. 2µg de vecteur d'expression pEBV-shRNA-LacZ sont précipités avec 3 µl de Lipofectamine2000 (Invitrogen). Ce précipitât est ensuite ajouté directement dans le milieu cellulaire et incubé sur les cellules pendant 16 heures. Puis les cellules sont rincées au PBS et incubées avec du milieu frais. La pression de sélection est appliquée 24h après la transfection (Hygromycine 250µg/ml) afin de sélectionner les clones ayant intégré les plasmides. Après environ une semaine de culture, des clones résistants isolés apparaissent et les clones retenus seront sélectionnés par Western blot ou par coloration immunocytochimique (Biard et al., 2005).

3. Western Blot et Immunofluorescence

Après récupération des cellules et lavage au PBS, les culots secs de cellules sont lysés dans une solution hypertonique (25mM Tris-HCl pH7.5, 600mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% Nonidet P40, DTT 1mM, Leupeptine 5µg/ml, Pepstatine 2µM, PMSF 1mM) pendant 40 min à 4°C puis centrifugés 30 min à 13000 rpm à 4°C. Le surnageant correspondant à la fraction protéique est récupéré. Les différents extraits protéiques obtenus sont dosés par la méthode colorimétrique de Bradford (Biorad). 20 µg d'extraits protéiques totaux de chaque échantillon sont dénaturés avec du tampon de Laemmli (SDS 2%, glycérol 10%, 60mM Tris pH6,8, Bleu de bromophénol 0,01%, 100mM DTT), puis déposés sur gel d'acrylamide à 10%. La migration s'effectue dans du tampon de Laemmli (Tris Base 25 mM, glycine 20mM, SDS 1%, pH 8,3) à 130 V pendant 2h30. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (Millipore) activée par des bains successifs de méthanol, d'eau, et de tampon de transfert (Tris base 25 mM, glycine 20mM, pH 8,3). Le gel recouvert par la membrane est déposé entre quatre feuilles de papier Wattman humidifiées avec le même tampon, et soumis à un ampérage de 300 mA pendant 1h, dans un bac

de tampon de transfert. La membrane est ensuite saturée toute la nuit dans un bain de TBS-Tween (Tris 10mM, NaCl 150mM, Tween 0,05%).

Dans le cas des colorations immunocytologique, les cellules sontensemencées sur des lamelles à une densité de 5000 cellules/cm². Les cellules sont ensuite fixées 10 minutes dans du paraformaldehyde 4%. Les anticorps primaires sont dilués dans un tampon B (0,5% Tween20 ; 12% sérum de veau fœtal, 0,036% de NaN₃ dans du PBS) et incubés en présence des cellules fixées pendant 1h. Après plusieurs rinçages successifs PBS-Tween20 0,5%, les anticorps primaires sont révélés par des anticorps secondaires couplés à un fluorochrome Cy3 (Jackson Lab. Inc., 2µg/ml). Les cellules sont contre-colorées avec 4'6'diamino2-phenylidole (DAPI) (4µg/ml). Le pattern est ensuite visualisé par un microscope à épifluorescence couplé à une caméra CDD.

Les protéines d'intérêts sont marquées par des anticorps primaires spécifiques. Nous avons ainsi eu recours à un anticorps monoclonaux anti-ku70, anti-DNAPkcs, anti-XRCC4, anti-LigaseIV, et l'Ac polyclonal anti-RAD51.

5. Reverse Transcription Polymerase Chair Reaction RTPCR

Les ARNm sont isolés à partir de 2x10⁶ cellules avec le mini kit RNAeasy. Pour éviter les contaminations avec l'ADN génomique, une étape supplémentaire d'incubation à la DNAaseI est effectuée avant l'élution de l'ARNm. La transcription inverse est ensuite réalisée sur 0,5µg d'ARN total en utilisant un oligonucléotide (dT)12-18 et la transcriptase inverse Superscript II suivant les recommandations du manufacturier. Les amorces utilisées sont les suivantes :

RAD51-376F 5'-TTTGGAGAATTCCGAACTGG-3';

RAD51-553R 5'-CATCACTGCCAGAGACCA-3';

RAD54-1754F5'-CTAACCGGCTGGTCATGTTT-3';

RAD54-1955R 5'-ACATCCTGCTCCTCATCCAC-3';

GAPDH primers:

GAPDHF1: 5'TGGCAGGTTTTTCTAGACGGC-3',

GAPDHR2: 5'TCATCCATGACAACCTTTGGTATCG-3'

Les échantillons ont été incubés 5 minutes à 95°C puis ont subi 40 cycles de PCR (95°C 30s dénaturation, annealing à 55°C 1mn et l'élongation à 72°C 1mn).

6. Test d'activité NHEJ *in vitro*

Préparation des extraits protéiques

Les cellules sont mises en culture dans des boîtes de 10 cm de diamètre et récupérées par trypsination à 80-90% confluence. Elles sont conservées dans 50% de sérum de veau foetal et 10% de DMSO dans l'azote liquide jusqu'à la préparation des extraits protéiques selon un protocole décrit précédemment avec de légères modifications (Daza et al., 1996); (Pfeiffer et al., 2005). Toutes les étapes sont effectuées à 4°C. Pour chaque préparation, un nombre équivalent de cellules (100 à 150 millions) est décongelé et rincé deux fois dans du PBS (phosphate buffer saline) froid. La taille du culot cellulaire (packed cell volume, PCV) est estimée. Les cellules sont resuspendues dans 4 PCV d'une solution hypotonique (Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA pH 8 1 mM, β -mercaptoéthanol 10 mM, inhibiteurs de protéases Complete (Roche)) et placées sur glace jusqu'à ce que 80 à 90% des noyaux soient séparés de leur cytoplasme tout en restant intacts (HeLa : 40 min). Si nécessaire, les cellules sont homogénéisées (Dounce pilon B, HeLa : 4 aller-retour). Des inhibiteurs de protéase sont ajoutés avant l'addition de 4 PCV d'une solution hypertonique (glycérol 50%, sucrose 25%, Tris-HCl pH 8 50 mM, MgCl₂ 10 mM, β -mercaptoéthanol 4 mM). Les phases sont mélangées doucement et 0,8 PCV d'une solution saturée de sulfate d'ammonium pH 7 est ajouté. L'échantillon est précipité 30 min sous agitation douce et centrifugé à 215 000 g pendant 45 min dans un rotor à angle fixe. Le surnageant (high speed supernatant, HSS) est transféré dans un bécher de 10 ml et supplémenté par du sulfate d'ammonium en poudre à raison de 0,33 g par ml de HSS. La solution est neutralisée par l'addition de soude 1 M (10 μ l par g de sulfate d'ammonium) et placée sous agitation douce pendant 30 min. L'échantillon est centrifugé à 25 000 g pendant 30 min. Le culot est resuspendu dans 1/20ème de HSS dans le tampon de stockage (glycérol 20%, Tris-HCl pH 8 30 mM, KCl 90 mM, β -glycérophosphate pH 7 10 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA pH 8 1 mM, EGTA pH 8 2 mM, β -mercaptoéthanol 2 mM, PMSF 0,5 mM), dialysé contre ce tampon et centrifugé à 20 000 g pendant 5 min. La concentration en protéines est déterminée par Bradford et les aliquotes d'extrait sont conservés dans l'azote liquide (Despras et al., 2007).

Substrats d'ADN

Les substrats avec des extrémités cohésives ou franches dérivent de la digestion par une enzyme de restriction du plasmide pSP65 (3 kb ; Promega) : 3'-coh. (Pst I) et fr. (BstX I). Les digestions

sont séparées sur gel d'agarose 1% et la complétion de la digestion est vérifiée. Les substrats sont excisés, purifiés (kit GeneClean II, Q-BIOgene) et dilués à 10 ng/μl dans du tampon TE.

Réaction NHEJ

La quantité appropriée d'extraits est diluée à 5 μg/μl dans le tampon de stockage puis dialysée contre le tampon de réaction (3-(N-morpholino)-2-hydroxypropane acide sulfonique (MOPSO)-NaOH pH 7,5 50 mM, KCl 40 mM, MgCl₂ 10 mM, β-mercaptoéthanol 5 mM) sur un filtre de microdialyse (White VSWP, 25 mm, 0,025 μm, Millipore) pendant 30 min à 4°C. La réaction standard a lieu dans un volume total de 10 μl contenant 8 μl d'extrait protéique dialysé (40 μg de protéines), 1 μl de substrat (10 ng) et 1 μl de tampon LNB (Tris-HCl pH 8 10 mM, MgCl₂ 1,2 mM, KCl 10 mM, β-mercaptoéthanol 1 mM, ATP pH 7 10 mM, dNTPs 2 mM (soit 0,5 mM de chaque), BSA 0,5 mg/ml). Les échantillons sont incubés à 25°C pendant 6 h. La réaction est stoppée par l'addition de 10 μl de Tris-HCl pH 7,5 40 mM, EDTA 2 mM, SDS 2 mM et l'incubation à 65°C pendant 10 min. Les échantillons peuvent être conservés à -20°C jusqu'à l'analyse des produits de réparation. Pour l'analyse des produits de réparation NHEJ, l'équivalent de 2 ng de substrat est déprotéiné (protéinase K, 2 mg/ml, 30 min à 37°C puis 15 min à 65°C) et séparé sur gel d'agarose 1% contenant 1 μg/ml de bromure d'éthidium afin de séparer les monomères linéaires et circulaires. L'ADN est transféré sur une membrane Hybond N+ (Amersham) et hybridé avec une sonde spécifique de pSP65 marquée au [α-³²P]dCTP (kit Ready-to-go de random priming, Amersham). L'autoradiographie est effectuée par imagerie phosphore (Storm SystemTM, Amersham Biosciences). L'ADN est quantifié à l'aide du logiciel ImageQuant (version 5.0). Pour chaque réaction, l'intensité d'une bande (i.e. d'un type de produit) est normalisée au total de radioactivité déposée dans le puits. L'efficacité du NHEJ est définie comme la somme des produits multimériques linéaires et monomériques circulaires et est exprimée en pourcentage du substrat de départ.

7. Préparation des chromosomes métaphasiques

Les cultures cellulaires sont incubées en présence de 0,2 μg/ml colcemide pendant 1h à 37°C afin d'obtenir un blocage du cycle cellulaire en métaphase. Les mitoses sont récoltées après centrifugation (7 minutes 1400rpm) et un choc hypotonique dans un milieu d'éclatement approprié (Solution de 0,075M KCl) pendant 20 minutes à température ambiante. Ces cellules sont ensuite fixées dans une solution 3 :1 Ethanol/Acide Acétique. Cette opération renouvelée à deux reprises afin d'éliminer un maximum des débris cellulaires et de ne conserver que les

noyaux. Ces suspensions sont conservées à 4°C quelques jours. Enfin, l'étalement des noyaux fixés est réalisé sur des lames humides et froides qui seront séchées à température ambiante une fois le frottis déposé.

8. Visualisation des télomères par hybridation *in situ* des télomères

L'hybridation *in situ* s'effectue sur des cellules métaphasiques et interphasiques à l'aide d'une sonde télomérique PNA (CCCTAA)₃ marquée à la Cyanine 3 (Perceptive Biosystem). Les hybrides PNA-ADN sont très stables. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la quantité de répétitions télomériques ciblées (Lansdorp, 1996). Les étalements sont fixés à 2 reprises dans une solution de formaldéhyde 4% puis subissent une digestion à la pepsine (1mg/ml, pH=2, 10min, 37°C) afin de faciliter l'accès de la sonde aux extrémités chromosomiques. Après une série de lavages, fixation et déshydratation, les lames sont dénaturées à 80°C suivie d'une hybridation de la sonde télomérique à 37°C pendant 2h. Une fois rincées, les lames sont contre-colorées au DAPI (1ng/ml) et montées en lames/lamelles avec une interface PPD. Les lames sont observées au microscope à épifluorescence Zeiss axioplan couplé à une camera CCD. La capture et l'analyse des métaphases sont réalisées à l'aide du logiciel ISIS (Metasystems, GmbH).

9. Evaluation de la taille des télomères par Southern Blot

Une fois extrait, 5µg d'ADN génomique sont digérés par les enzymes RsaI/HinfI (5U/ µg d'ADN). Les fragments sont séparés sur un gel d'agarose 1% 0,5X TBE selon une migration par un champ pulsé de 6V/cm pendant 21h. Le gel est dénaturé dans une solution de 0,4N NaOH puis transféré sur une membrane de nylon (Hybond XL, Amersham). Cette membrane est ensuite hybridée à l'aide d'une sonde télomérique (TTAGGG)₆ marqué en 5' au 32P dans une solution de CHURCH à 55°C. La membrane est enfin exposée à un écran Phosphoimager et l'acquisition des profils densitométriques se fait à l'aide du logiciel ImageQuant®, Amersham.

Chapitre III : Le complexe MRN, son rôle dans la réparation des cassures doubles brins et le maintien de stabilité chromosomique et des télomères.

Notre attention s'est portée sur les 3 membres du complexe MRN. Ce complexe basé sur la présence de RAD50, MRE11 et NBS1 joue un rôle crucial dans la signalisation des dommages de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire et la stabilité génomique. Son rôle dans la stabilité chromosomique s'explique par son intervention dans les mécanismes de réparation doubles brins. MRN constitue un élément décisif quant à l'orientation de la réparation des cassures doubles brins (RH ou le NHEJ).

Au delà de son propre rôle dans la réparation, le complexe MRN participe au maintien de l'intégrité des télomères. En effet, le complexe MRN est associé aux télomères par le biais des interactions qu'il entretient avec TRF2. Ainsi, MRN participe à l'ensemble du métabolisme des télomères ; il serait aussi bien impliqué dans la réplication, la protection (formation Tloop, élongation de la queue télomérique 3' riche en G) ou le contrôle de la taille des télomères.

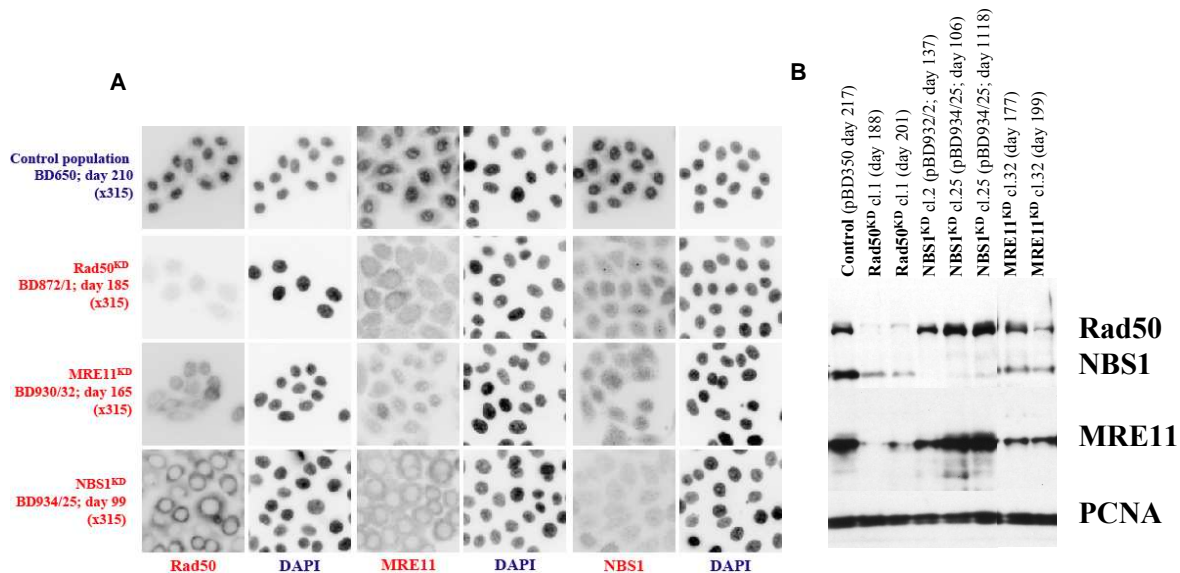
Ces gènes sont essentiels à la viabilité des cellules humaines ce qui limite les études visant à déterminer leurs contributions respectives dans le maintien des télomères ou dans la réparation des cassures doubles brins. La plupart des études ont recours à des expérimentations sur des cellules issues de patients atteints de syndrome d'hypersensibilité ATLD et NBS mutées respectivement pour MRE11 et NBS1 excluant toute possibilité d'une étude comparative.

Dans le but de mieux appréhender le rôle de MRN dans ces différents domaines, nous avons établi des lignées humaines déficientes pour les éléments constitutifs du complexe MRN à l'aide de vecteurs pEBV siRNA qui permettent d'obtenir une réduction importante, spécifique et à long terme (plus de 300 jours en culture) de l'expression d'un gène cible. Notre travail nous a donc permis d'établir les conséquences d'une absence transitoire ou plus prolongée du complexe MRN sur la réparation de l'ADN et la stabilité des télomères au sein d'une même lignée cellulaire.

1. Les vecteurs pEBV-siRNA permettent d'obtenir une réduction spécifique, importante et à long terme de l'expression du complexe MRN.

Compte tenu de l'efficacité du système, le niveau protéique a été réduit sensiblement pour chacun des protagonistes. Ainsi, le niveau résiduel d'expression atteint très difficilement les 10% du niveau constitutif de cellules non traitées. Cette réduction est maintenue dans le temps permettant la construction de clones stables qui à long terme, réprime l'expression des les

protéines du complexe MRN. Nos analyses sont portées sur des clones dont l'extinction perdurait après plus de 100 jours en culture garantissant un phénotype stable. L'analyse de l'expression de ce complexe dans chacune des conditions montre que l'extinction de RAD50 ou de MRE11 à court ou long terme, réprime l'expression de l'ensemble du complexe (R3-Fig1). Ces résultats confortent des données selon lesquelles les mutations naturelles de MRE11, dans les cellules ATLD ou tumorales HTC116, réduisent l'expression de RAD50 et NBS1. Parallèlement, l'extinction de NBS1 n'interfère pas dans l'expression de MRE11 et RAD50, mais induit une séquestration de ces protéines dans le cytoplasme limitant l'accès à l'ADN présent dans le noyau. Ce phénotype de relocalisation de MRE11 et RAD50 a déjà été observé par le passé dans les cellules NBS (Carney et al., 1998).



R3-Fig1. Caractérisation des clones Hela MRN^{KD}

A. Déstabilisation du complexe MRN par l'inhibition d'un de ces composants. Coloration par immunofluorescence des cellules Hela contrôle, clones RAD50^{KD} cl.1 (185 jours en culture) MRE11^{KD} cl.32 (161 jours en culture) et du clone NBS1^{KD} cl.25 (99 jours en culture) avec les anticorps anti-MRE11, anti-NBS1 et anti-RAD50. L'inhibition de RAD50, MRE11 ou NBS1 conduit à une localisation cytoplasmique du complexe, habituellement présent dans le noyau.

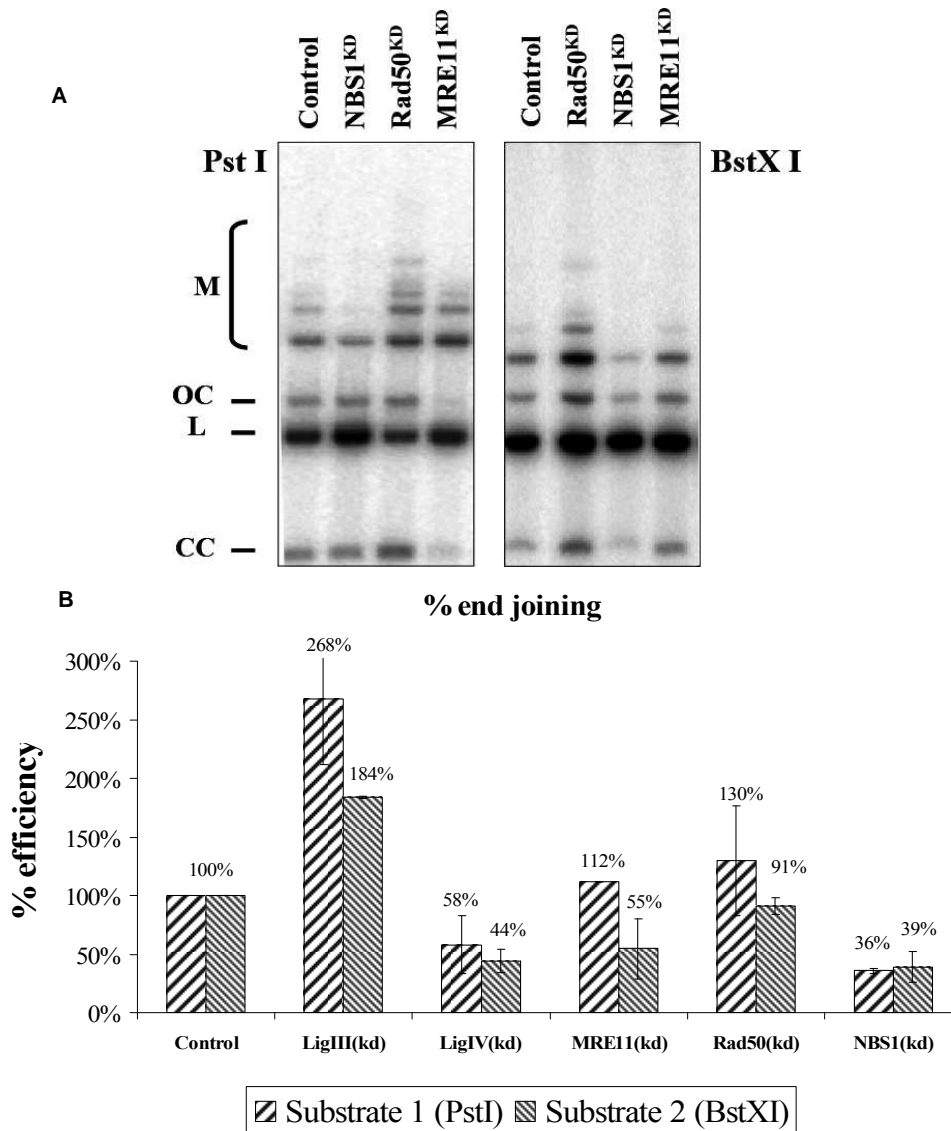
B. Analyse, par Western blot, de l'expression protéique de RAD50, MRE11 et NBS1 des clones stables Hela MRN^{KD}. L'analyse a porté sur les clones RAD50^{KD} cl.1 aux passages (J+181) et (J+201); les clones NBS^{KD} cl.2 (J+137), cl.25 J+106 et J+118; MRE11^{KD} cl.32 (J+177 et J+199). L'inhibition de RAD50 ou MRE11 affecte l'ensemble des protagonistes du complexe. En revanche, l'inhibition de NBS1 n'altère que l'expression de la protéine NBS1.

2. La réduction de l'expression des gènes MRE11 et NBS1 par des vecteurs pEBV-siRNA permet d'établir un phénotype similaire à celui des cellules ATLD et NBS dans la lignée HeLa.

A l'instar des mutations hypomorphiques du complexe MRN, l'inhibition respective des différents membres sensibilise les cellules aux RI et agents endommageant l'ADN qui se traduit par une altération de la réponse à l'irradiation (absence de blocage du cycle en G1/S) (Biard, 2007). La majorité des cellules exposées à une forte dose de rayons γ sont bloquées en G2. Cependant, l'intolérance aux dommages radioinduits ne se manifeste pas en absence de RAD50 alors que ces mêmes cassures semblent plus toxiques et moins bien tolérées à plus long terme (Biard, 2007). Cette hypersensibilité résulte de l'accumulation des cassures mal réparées mais le rôle de MRN dans cette accumulation demeure obscur. Nous avons tenté de déterminer la contribution de MRN dans les différentes voies de la recombinaison et notamment celle du NHEJ.

3. Le NHEJ *in vitro* est altéré dans les cellules NBS KD.

Pour cela, nous avons mesuré *in vitro* leur capacité de réparation des CDBs par la voie NHEJ. Ce test permet d'étudier à la fois les jonctions intra-moléculaires et inter-moléculaires à partir d'un plasmide linéarisé en présence d'extraits protéiques. Quelque soient la nature des extrémités du substrat (cohésifs ou franches), l'efficacité de la réaction de ligation est réduite de 70% dans les cellules NBS1^{KD}. Ainsi, l'absence de NBS1 interfère dans la religation du substrat par NHEJ. La déplétion de MRE11 a un effet plus modéré sur l'efficacité de réparation par NHEJ. En effet, alors qu'aucune modification significative n'est observée avec le substrat cohésif, une diminution de l'efficacité globale de 50% est observée en présence de substrats à bouts francs dans les extraits du clone MRE11^{KD}. Dans le même temps, l'inhibition de RAD50 ne conduit pas à une modification de l'efficacité du NHEJ ce qui expliquerait la tolérance aux cassures radioinduites (R3-Fig2). Le complexe MRN est un acteur majeur de la recombinaison, il conviendrait de déterminer quelles sont les conséquences d'une dérégulation de la stabilité du complexe MRN sur la RH. Une diminution de la fréquence des événements de recombinaison est attendue mais seule l'analyse de la RH permet de confirmer ces attentes. Pour cela, nous avons entrepris une analyse des échanges de chromatides sœurs, manifestation d'événements de conversion génique, sur l'ensemble des clones MRN. Cette étude nous révélera si l'absence prolongée du complexe MRN affecte l'équilibre de la RH dans les cellules humaines.



R3-Fig2. Efficacité NHEJ *in vitro* pour les clones Hela RH et NHEJ^{KD}

A. Séparation des produits NHEJ sur gel d'agarose obtenus. Les extraits cellulaires des clones Control^{KD} Hela control, MRE11^{KD} cl.32 (J+163), NBS1^{KD} cl. 2 (J+164), RAD50^{KD} cl.1 (J+145) sont compétents pour le NHEJ *in vitro*. 10ng de substrat sont incubés en présence de 40µg d'extraits cellulaires. La configuration des extrémités des substrats est indiquée au dessus des gel PstI (3' cohésives) ou BstX (franches). Suite à cette réaction plusieurs produits sont formés: des multimères linéaires de taille varié (M) correspondant à des jonctions inter-moléculaires), des produits circulaires monomériques correspondant à des jonctions intra-moléculaires et regroupant des intermédiaires ouverts (OC de l'anglais open circle, forme circulaire relaxée) et des plasmides entièrement recircularisés (CCC de l'anglais covalently closed circle, forme circulaire super-enroulée), le substrat linéaire résiduel (L). Les produits sont analysés par *southern blotting*.

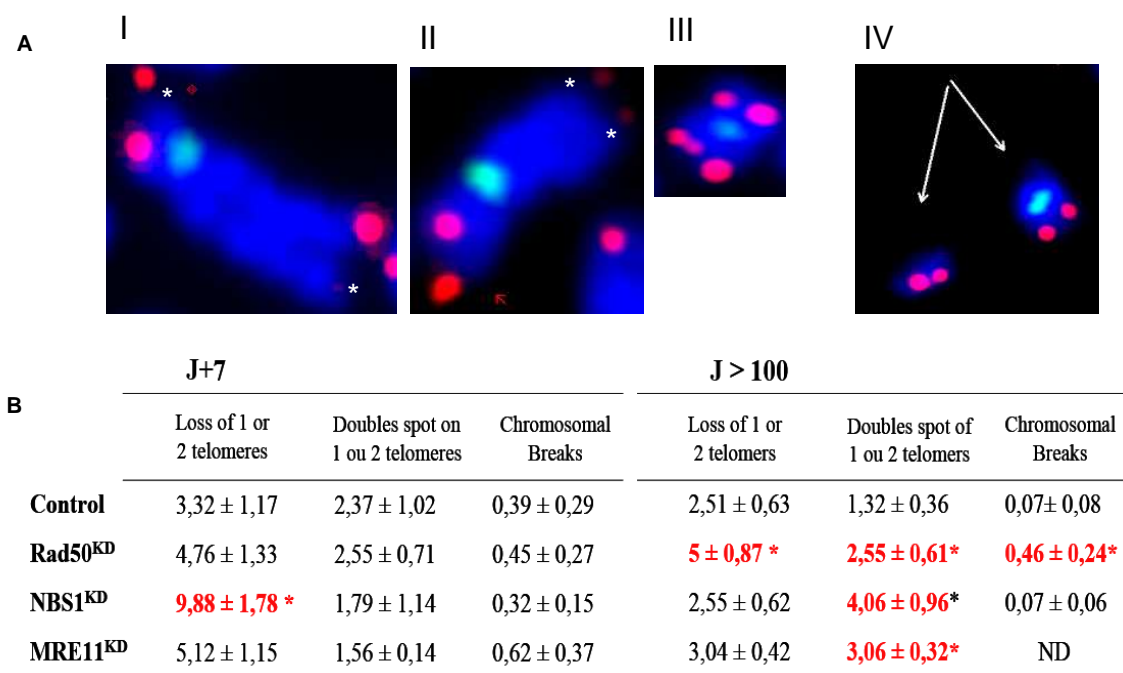
B. Comparaison de l'efficacité de réparation du NHEJ entre les clones Hela control, Ligase IV^{KD} clone 3 (inhibition J+139), LigIII^{KD} clone 9, MRE11^{KD} cl.32 (J+163), NBS1^{KD} cl. 2 (J+164), RAD50^{KD} cl.1 (J+145) selon la configuration des extrémités du substrat: 3'cohésives (PST I) ou franche (BSTX). Les valeurs sont obtenues après quantification au phospho-imager des différents produits de réparation en (A) ; efficacité = (ccc+oc+ M)/(ccc +OC+M+L) x 100). Les valeurs représentées expriment l'efficacité normalisée du NHEJ (rapport efficacité du clone d'intérêt/clone contrôle) (n=3)

4. À court terme, la réduction d'expression du gène NBS1 induit une instabilité télomérique

Parallèlement, l'étude de la stabilité chromosomique des clones transitoires indique que l'extinction du MRN n'altère pas la régulation de la taille des télomères. Après 7 jours, la diminution d'expression des gènes MRE11, NBS1 et RAD50 ne modifie pas le profil des fragments télomériques (R3-Fig3). Par la suite, une analyse des télomères par une approche d'hybridation in situ, nous a permis de mettre en évidence une perte significative des signaux télomériques en absence de NBS1. 9,88 telomeres/métaphase sont perdus en moyenne après la réduction transitoire de l'expression de NBS1 indiquant un rôle éventuel de NBS1 dans la protection des télomères. Par contre, aucune modification significative n'est relevée en absence de MRE11 ou RAD50 (R3-Fig3).

5. À long terme, la réduction d'expression du RAD50 induit une instabilité télomérique

Afin de déterminer si l'extinction prolongée pouvait induire un phénotype d'instabilité aussi marqué que dans les cellules de patients NBS et ATLD, nous avons recensé les événements de pertes, de cassures ou autres dysfonctionnement télomériques dans les clones établis après plus de 100 jours d'extinction. A long terme, seule la déplétion de RAD50 génère de manière significative des cassures télomériques et chromosomiques avec en moyenne 5 télomères perdus par métaphase soit le double du taux de perte observé pour la lignée parentale. Concernant MRE11 et NBS1, le taux de pertes télomériques ou de cassures chromosomiques n'a permis de déceler une influence significative sur la stabilité chromosomique (R3-Fig3). Certaines analyses complémentaires seraient nécessaires afin de préciser les résultats préalablement obtenus. La majorité des données recueillies font référence à l'étude d'un seul clone par gène ciblé. Il conviendrait d'étendre notre étude à l'analyse de plusieurs clones par gène pour reproduire les tendances préalablement établies. En effet, le phénotype généré peut traduire une implication directe de l'élément ciblé ou bien une dérive apparue lors de la sélection clonale. L'analyse de 5 clones RAD50^{KD}, 2 clones MRE11^{KD} ainsi que 3 clones NBS1^{KD} est prévue à cet effet.



R2-Fig3. Analyse de la stabilité des télomères dans les clones MRN^{KD}

A. Exemples d'aberrations chromosomiques retrouvées dans les clones HeLa MRN^{KD}. (I) Perte d'une séquence télomérique; perte de 2 télomères sur des chromatides distinctes (II); doublets télomériques (III) ; cassures chromosomiques (IV). Hybridation in situ de l'ADN télomérique avec une sonde PNA (TTAGGG)-Cy3, ADN centromérique marqué par une sonde pan-centromérique-FITC.

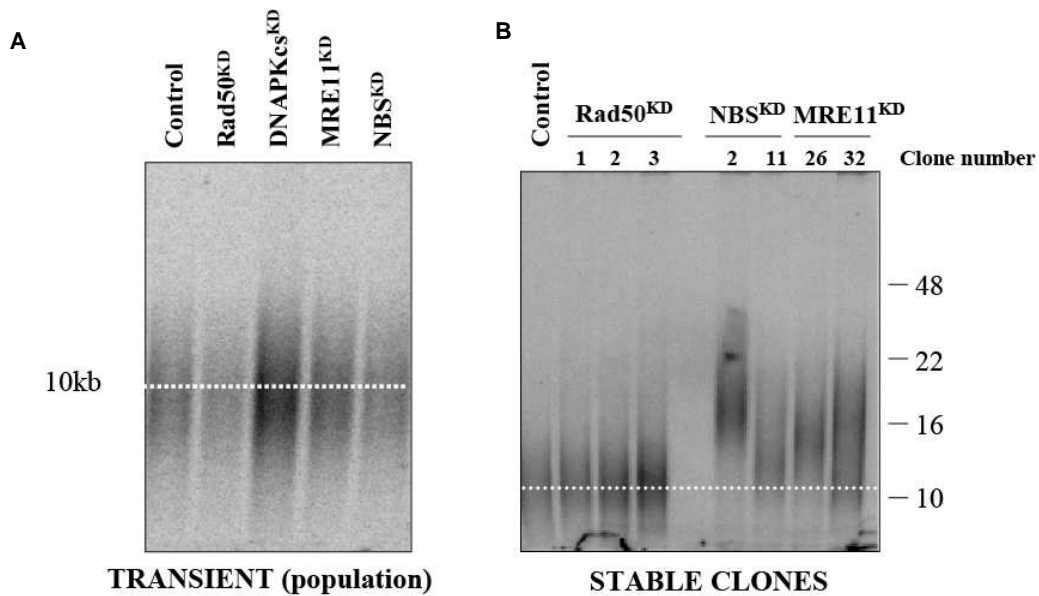
B. Fréquences des aberrations chromosomiques télomériques dans les clones transitoires et stables MRN^{KD} (J+7) et (inhibition > 100 jours) pour les clones Contrôle, RAD50^{KD} cl.1 (J+ 90), NBS1 cl.2 (J+ 85), MRE11^{KD} Cl.32 (J+ 135) Recensement des anomalies télomériques: Perte de 1 ou 2 télomères issus du même bras chromosomique; Doublets télomériques sur 1 ou 2 chromatides; cassures chromosomiques sur une ou deux chromatides. L'étude a été réalisée à partir de 30 métaphases/clones. Les valeurs exprimées correspondent au nombre moyen d'événements par métaphase analysée. (*) signifie significativement différent du contrôle avec un risque $p < 0.05$ (test t non apparié).

6. La réduction prolongée de l'expression des gènes MRE11 et NBS1 mène à une augmentation de la taille des télomères.

La répression à long terme suscite d'autres questions. La déplétion de MRE11 et de NBS1 mène à une élongation rapide des télomères. En effet, dans le clone 932.2 NBS1^{KD}, la taille moyenne des télomères est estimée à 18kb alors qu'elle est moins prononcée dans le clone NBS1^{KD} 932.11 avoisinant 11-12kb. Cette observation indique que le niveau protéique de NBS1 peut directement influencer la longueur des télomères. Dans le cas de MRE11, les deux clones (930.26 et 930.32) possèdent des télomères longs de 14kb. Au contraire l'inhibition de RAD50 n'affecte pas la taille des télomères (R3-Fig4). L'analyse de la taille des télomères sera étendue à d'autres clones MRN^{KD} et complétée par une approche Q-FISH qui permettra de confirmer les données déjà recueillies par Southern Blot.

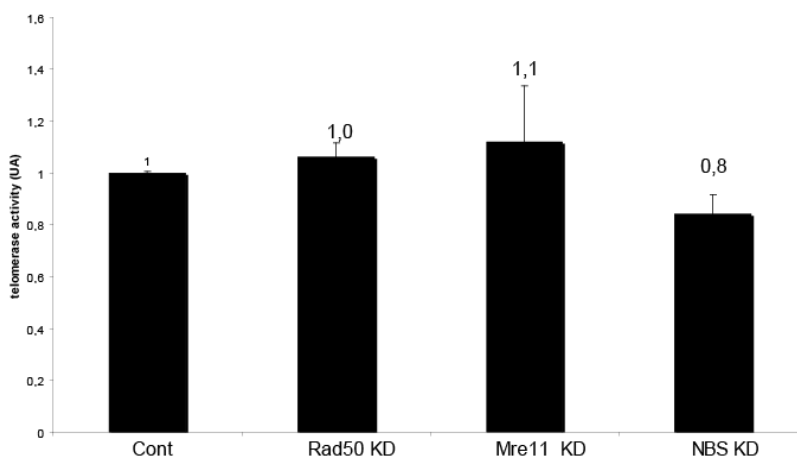
7. La nature de l'augmentation de la taille dans les clones MRE11KD et NBS1KD

Dans un premier temps, nous avons d'abord déterminé si cette élongation résultait de l'activité télomérase. Le test d'activité *in vitro* n'indique pas de modifications de l'activité constitutive de la télomérase (R3-Fig5). Ces analyses seront poursuivies sur d'autres clones afin de lever toute incertitude concernant ces données obtenues. Aux vues de ces changements rapides et brusques, il est possible que cette augmentation traduise un excès de recombinaison télomérique. Nous avons tenté de détecter des produits de la recombinaison télomérique. Pour cela, nous avons eu recours à une approche de migration de l'ADN par électrophorèse en deux dimensions qui permet de discriminer les différentes topologies de l'ADN génomique (circulaire ou linéaire), Ces analyses nous ont permis d'isoler des cercles télomériques extrachromosomiques dans le clone 32.2 NBS1^{KD} suggérant que cette élongation brutale est dépendante de la recombinaison (R3-Fig6). Ces cercles ne sont cependant pas observés dans les autres clones NBS1^{KD} ou MRE11^{KD}. Afin de préciser la nature des événements de recombinaison dans les clones MRN^{KD}, nous envisageons de recenser les événements T-SCE (changes de chromatides sœurs télomériques) dans les clones MRN^{KD}. Contrairement aux cercles extrachromosomiques, produit d'une recombinaison intramoléculaire, les T-SCE résultent d'échanges intermoléculaires. Dans ce cas précis, l'analyse des T-SCE apporterait une information complémentaire dressant un état complet de la recombinaison télomérique dans les clones MRN^{KD}.

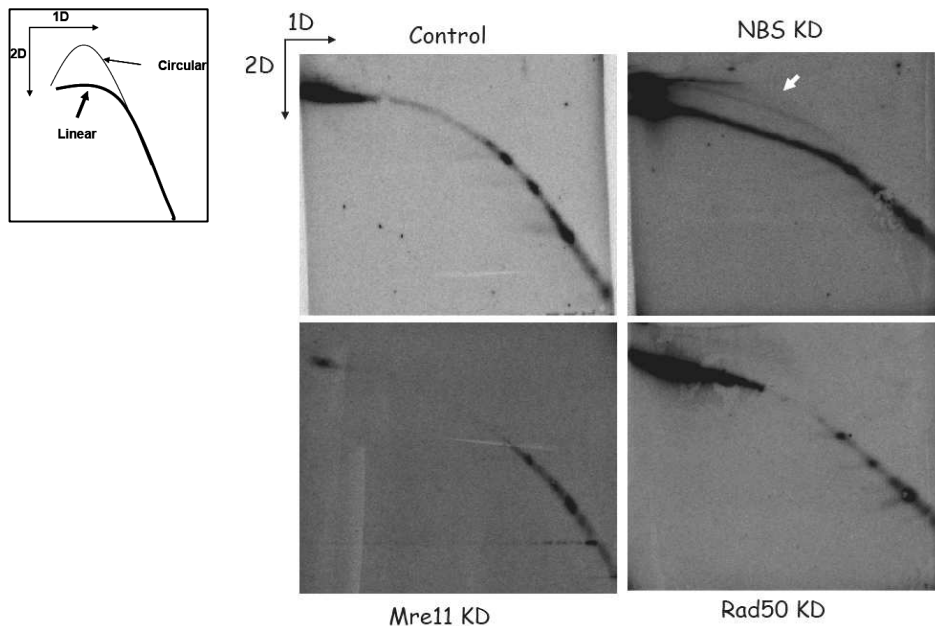


R3-Fig4. Mesure de la taille des télomères des clones Hela MRN^{KD}

- F. Estimation de la taille des télomères des clones MRN transitoires (J+7) MRE11^{KD}, RAD50^{KD}, DNAPKcs^{KD}, NBS1^{KD}, par une analyse des TRFs fragments (Telomere Restriction Fragment). Les fragments sont obtenus après digestion de l'ADN télomérique par les enzymes de restrictions HinfI, RsaI (New England Biolabs). Ces fragments sont détectés par Southern Blot après l'hybridation d'une sonde télomérique (TTAGGG)₁₀ marquée au dATP-32P. La quantification de la taille des télomères est réalisée à l'aide du logiciel ImageQuant (Molecular Dynamics). La taille des marqueurs de poids moléculaire est indiquée ci-dessus en Kb.**
- G. Estimation de la taille des télomères des clones MRN stables (J>100) RAD50^{KD} Cl.1,2,3 ; NBS1^{KD} Cl.2 et 11 ; MRE11^{KD} Cl.26 et 32 par une analyse des TRFs fragments (Telomere Restriction Fragment).**



R3-Fig5 : Activité Télomérase *in vitro*: Mesure de l'activité télomérase *in vitro* des clones MRN^{KD}. Les valeurs exprimées obtenues sont normalisées avec les valeurs du clone contrôle.



R3-Fig 6 : Détection des cercles télomériques extrachromosomiques dans les clones MRN^{KD}

- A. Les ADN génomiques sont séparés selon leurs poids moléculaires (1D) mais aussi leur topologie (circulaire, linéaire, circulaire relâché). Ce schéma présente le profil de migration électrophorétique d'un ADN sous forme linéaire ou circulaire visualisé par une approche dite de « 2D-gel agarose » (Fangman 1998).
- B. Profil de migration des clones RAD50^{KD} cl.1, NBS1^{KD} Cl.2, MRE11^{KD} cl.32. Seul le clone NBS1KD cl2 présente des cercles télomériques extrachromosomiques (flèche blanche).

Matériels et Méthodes

(Cf chapitre précédent)

1. Détection des cercles extrachromosomiques

Les fragments d'ADN seront séparés selon leurs topologies et leurs tailles à l'aide d'une approche de migration électrophorétique dite 2D-gel (Brewer and Fangman, 1988). 30µg d'ADN génomique sont digérés par RsaI/HinI et les fragments sont séparés d'abord selon leur taille dans un gel d'agarose 0,5% 0,5XTBE (1V/cm, 25h) puis selon leur topologie dans une seconde dimension dans un gel d'agarose à 1.1% 0,5XTBE (8h, 6V/cm) suivant les recommandations de (Cesare and Griffith, 2004). Comme les fragments télomériques, les cercles extrachromosomiques sont observés par Southern blot (Cf évaluation de la taille des télomères).

2. Dosage de l'activité télomérase *in vitro*

a. Principe

Le test TRAP est utilisé dans le but de déterminer *in vitro* l'activité de la télomérase dans des tissus ou dans des extraits cellulaires. Il est basé sur l'amplification PCR d'un couple d'oligonucléotides. L'ajout d'extrait protéique contenant la télomérase va permettre à cette enzyme d'allonger l'oligonucléotide, en ajoutant à chaque cycle de PCR une séquence TTAGGG. Ces produits sont amplifiés par PCR et la quantification de ces produits mesurés par ELISA.

b. Extraction protéique

Les extraits protéiques sont réalisés à partir de cellules hela. 10⁶ cellules en culture sont trypsinées et remises en suspension dans du PBS. Après centrifugation à 1000xg pendant 5 min, les cellules sont resuspendues dans 200µl de tampon de lyse contenant 0,5%de CHAPS (*Sigma*) ; 1mM de MgCl₂ ; 10mM de Tris-HCl pH 7,5 ; 1mM d'EDTA ; 1mM de DTT ; 5mM de β-mercaptoethanol, pendant 30 min dans la glace. Les extraits sont ensuite centrifugés à 12000xg pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et la quantité de protéines est quantifiée par spectrophotocolorimétrie par la technique de Bradford.

b. Protocole du test TRAP

Le milieu réactionnel de 50µl comprend 20mM de Tris-HCl pH8,3 ; 50µM de dNTP ; 1,5mM de MgCl₂ ; 63mM de KCl ; 1mM d'EGTA ; 0,005% de Tween 20 ; 20µg/ml de BSA ; 1 unité de *Taq polymérase* ; 0,4µM d'oligonucléotides S, NT et AS ; 20aM de S et NT et la quantité indiquée d'extrait protéique. Une étape d'élongation de S est réalisée pendant 15 min à 30°C puis l'amplification PCR est effectuée (1 min 95°C, 30 cycles de 30s à 95°C, 30s à 50°C et 1 min à 72°C). Ces produits sont amplifiés par PCR et la quantification de ces produits mesurés par ELISA.

DISCUSSION GENERALE

Choix des différents modèles utilisés

En Radiobiologie, l'étude du rôle de la recombinaison dans la maintenance des télomères reste un enjeu majeur compte tenu de son implication au cours de l'oncogenèse. Cette problématique, soulevée au début de la thèse, visait à déterminer l'implication des mécanismes de la réparation, plus particulièrement celle de la recombinaison, dans la maintenance des télomères dans les cellules cancéreuses. L'examen des différents travaux traduit toute la complexité et la difficulté de définir de manière précise le rôle des acteurs de la recombinaison dans la maintenance des télomères. Différentes approches ont permis d'explorer plus en détails le rôle de la réparation de l'ADN notamment celui de la recombinaison (NHEJ, RH) dans le maintien de l'intégrité télomérique. Ces travaux auraient du déboucher sur des conclusions claires et précises, mais la réalité est toute autre puisque les résultats divergent selon le modèle cellulaire employé ou l'organisme étudié. Dans certains cas, il y a autant de modèles cellulaires que de travaux réalisés comme l'illustre le tableau repertoriant les principales données relatives au rôle de la recombinaison dans le maintien des télomères. Prenons l'exemple des partenaires du NHEJ, la majeure partie des travaux résume la contribution des partenaires du NHEJ à celle d'une protection des séquences télomériques contre les cassures ou fusions. Par contre, leur participation dans le contrôle de la taille des télomères demeure controversée puisque dans certaines circonstances le NHEJ favoriserait l'élongation des télomères alors que d'autres cas il la réprimerait.

Dans ce contexte, notre étude visait à limiter les variations liées aux modèles cellulaires utilisés pour établir précisément le rôle de chacune des voies de la recombinaison dans le maintien de l'intégrité télomérique. A partir d'un modèle cellulaire homogène invalidé pour les voies de réparation de l'ADN, nous avons examiné les conséquences sur la maintenance des télomères d'une inhibition prolongée des membres de la RH ou du NHEJ. Dans les faits, une atteinte des voies de recombinaison affecte le bon fonctionnement des télomères menant globalement aux mêmes effets c'est-à-dire à une déstabilisation de la structure des télomères (perte des séquences télomériques, doublets télomériques) voire dans certaines circonstances à une modification de la

taille. La caractérisation précise des anomalies structurelles laisse entendre que ces voies exercent des fonctions distinctes au sein des télomères.

Pour cela, nous avons eu recours à divers moyens pour définir la contribution respective de la RH et du NHEJ dans le maintien de l'intégrité des extrémités chromosomiques. Pour répondre à cette épineuse question, nous avons eu recours à deux modèles cellulaires différents qui chacun leur tour ont su être informatifs. Dans un premier volet, nous nous sommes intéressés à la contribution de p53 à travers sa fonction dans la recombinaison. Dans cette perspective, nous avons surexprimé un mutant stimulant la recombinaison afin de déterminer si une dérégulation de la recombinaison avait une quelconque incidence sur le profil télomérique. Cette approche nécessite un modèle cellulaire particulier qui doit être à la fois stable au cours des passages cellulaires, présenter des télomères facilement observables et une protéine P53 sauvage afin de limiter toute interférence avec le transgène P53 muté. Dans un premier temps, nous avons choisi une lignée SCC6.1 issue d'un carcinome épidermoïde. Cette lignée présentait la particularité d'être relativement stable avec des télomères d'une taille homogène (5-6 kb). Nous n'avons pas observé d'altération de la longueur et de l'hétérogénéité des télomères dans les clones surexprimant le transgène P53R175H. Cependant un examen plus approfondi nous a permis d'identifier l'existence d'une mutation de P53 en position 110. Aucune fonction n'a été attribuée à cette mutation mais nous ne pouvions pas exclure qu'elle ait interféré avec le transgène P53R175H expliquant l'absence de phénotype. Ceci nous a conduit à considérer le statut de p53 dans le choix de notre modèle cellulaire pour ôter toutes incertitudes quant à l'interprétation des résultats.

Nous avons donc sélectionné HCA17.3, lignée fibroblastique humaine immortalisée par hTERT (Rubio et al., 2002), déjà étudiée au sein du laboratoire. Cette lignée se caractérise par une remarquable stabilité chromosomique même en présence d'un stress génotoxique. De plus, elle présente un caryotype normal avec 46 chromosomes et des télomères longs (aux environs de 30 kb) et donc facilement détectable par FISH ou Southern blot (Pirzio et al., 2004). Enfin, contrairement à une majeure partie des cellules immortalisées, l'expression de p21 est induite suite à une exposition aux IR indiquant que P53 reste doté d'une capacité transactivatrice. Toutes ces propriétés font de HCA17.3 un modèle cellulaire adéquat à partir duquel nous avons pu établir des lignées surexprimant le mutant P53R175H, stimulant la recombinaison (Saintigny et al., 1999). L'expression de ce mutant a bien conduit à une augmentation de la recombinaison reproduisant ainsi l'effet observé chez le modèle murin (Saintigny et al., 1999).

L'absence d'effet aux télomères suscite des interrogations quant au choix de la lignée. En effet, la forte stabilité chromosomique n'est pas simplement associée à la longueur des télomères mais probablement associée à l'excès de la sous unité catalytique hTERT. En plus, de sa fonction d'élongation, la télomérase semble exercer d'autres fonctions telles que la régulation de l'expression de gène de la réparation et du remodelage chromatinien pouvant ainsi participer à la réparation de l'ADN ou au cycle cellulaire.

Dans ce contexte, la surexpression de la télomérase pourrait interférer avec la recombinaison ce qui expliquerait l'absence de phénotype. L'inhibition de la télomérase permettrait alors d'établir un lien entre la recombinaison, l'expression de la télomérase et la longueur des télomères. En effet, l'inhibition à court ou long terme permettrait de distinguer la contribution de la taille des télomères et celle de la télomérase dans une éventuelle répression de la recombinaison.

Alors que l'extinction de la télomérase opérerait après quelques jours le raccourcissement des télomères mettrait plus de temps à opérer. Si l'inhibition à court terme de la télomérase suffit à moduler la RH dans les cellules HCA17.3, nous pourrions conclure à un effet propre de la sous unité hTERT indépendamment de sa fonction d'élongation/maintenance. Dans le cas où cette modulation est mise en évidence plus tardivement, elle pourrait alors être associée à une influence de la taille des télomères ; la contribution de la télomérase dans la recombinaison serait alors indirecte. Nous avons inhibé par shARN interférence l'expression de la télomérase, mais cette extinction s'est avérée létale après 10 jours. Cette toxicité n'est pas liée au shARN puisqu'une étude préliminaire dans les cellules Hela démontre qu'une extinction de la télomérase pendant plus de 10 jours est réalisable.

Cette létalité précoce ne nous a pas permis de conclure à une éventuelle modulation de la recombinaison de la part de hTERT. Il semble que la télomérase soit indispensable à la lignée HCA17.3 au-delà de sa fonction de maintenance des télomères. Le seul raccourcissement des télomères ne serait expliqué une mort aussi rapide compte tenu de la taille initiale de 35kb. À raison de 200pb perdus/cycle, 140 divisions cellulaires seraient nécessaires pour que les télomères atteignent une taille critique induisant la mort.

Toutes ces données démontrent qu'en dépit de toutes les précautions prises au départ de notre étude, notre modèle cellulaire s'est avéré peu sensible pour déceler une éventuelle contribution de la recombinaison.

Dans le souci d'établir une réelle contribution de la recombinaison légitime ou non, nous nous sommes résignés à changer de modèle cellulaire mais aussi de stratégie. L'inhibition de

l'expression des protéines de la recombinaison s'avère souvent plus informative qu'une surexpression de protéines. De plus, cette première étude nous a permis d'apprécier l'efficacité de l'invalidation par les shRNA produit dans les vecteurs EBV (D. Biard, brevet CEA).

Afin d'étudier les relations entre la recombinaison et la maintenance des télomères, nous avons établi des clones exprimant de manière stable des séquences ARNi. En effet, l'ARNi constitue un outil biologique puissant permettant de reproduire les défauts biochimiques observés dans certains syndromes humains. Les vecteurs utilisés sont basés sur des séquences shARN produites dans des plasmides réplicatifs dérivés du virus d'Epstein-Barr (pEBV). Ils possèdent la particularité de se répliquer au même rythme que le génome (Aiyar et al., 1998), ce qui permet de limiter le nombre de copies par cellule à des doses physiologiques contrairement au siARN. De plus, ils sont maintenus dans le noyau sous forme épisomale après avoir s'être associés aux chromosomes grâce à la protéine EBNA-1 (Marechal et al., 1999). Ce système limite les déconvenues liées (i) à la surexpression des siARN dans la cellule (ii) à l'intégration aléatoire dans le génome.

La plupart des approches d'ARNi à long terme sont basées sur l'utilisation de vecteurs intégratifs ou de vecteurs viraux. Dans les travaux basés sur des vecteurs non viraux, le long terme reste d'ailleurs tout relatif, la période de stabilité étant généralement de quelques jours, rarement quelques semaines (Butz et al., 2003; Laposa et al., 2003); (Paddison et al., 2002). Les vecteurs pEBV-siRNA présentent des propriétés particulièrement intéressantes pour l'ARNi à long terme: (i) une efficacité en transitoire similaire à celle des siARN duplex (ii) une extinction du gène cible dans plus de 95% des cellules deux semaines après transfection contre 50% avec un vecteur intégratif ; (iii) une extinction du gène cible dans la majorité des clones isolés ; (iv) une extinction stable pendant plus de 450 jours de culture ; (v) le maintien du phénotype associé à la perte de la protéine cible durant toute cette période.

Ce système est d'autant plus intéressant qu'il permet de mimer les pathologies humaines liées à un défaut des voies de la réparation. Ce système permet de reproduire les défauts biochimiques associés à l'altération des voies de la réparation de l'ADN

Ce choix est aussi motivé par le fait que certaines pathologies liées à un défaut de la réparation présentent aussi des altérations des télomères.

Cependant, comme tout modèle, il en ressort quelques inconvénients qu'il faut considérer. Certains gènes sont essentiels à la viabilité cellulaire ; même à un faible taux, l'inhibition s'avère compliquée. En effet dans certains cas, les cellules maintiennent un niveau résiduel qui autorise

la poursuite de la croissance cellulaire mais soulève la question quant à l'analyse du phénotype de perte de fonctions : le niveau résiduel est-il suffisant pour maintenir la survie cellulaire ? Est-il aussi suffisant pour assurer d'autres fonctions ?

De plus, certaines cellules survivent à l'inhibition de gènes essentiels et continuent de proliférer. Dans ce cas précis, la survie peut être associée à un processus d'adaptation qui leur permet de compenser en activant d'autres voies moléculaires. L'analyse du phénotype s'avère périlleux et ne permette pas de trancher en faveur d'une implication directe de l'élément ciblé.

Le choix du modèle cellulaire se justifiait d'abord par des contraintes techniques. La mise en place d'une stratégie d'inhibition basée sur l'expression de vecteurs shRNA nécessite des conditions expérimentales optimales. Dans ces circonstances, une lignée facilement manipulable, avec de surcroît des propriétés de prolifération non négligeables, constituent autant de critères auxquels répondait la lignée Hela.

Par ailleurs, plusieurs études visant elles aussi à préciser le rôle de la réparation de l'ADN dans la maintenance des télomères, ont fait appel à ce modèle cellulaire motivant ainsi notre choix. De plus, il s'agit d'une lignée dont les conditions de transfection sont bien maîtrisées. Un tel outil nous permettait ainsi de valoriser l'apport de nos résultats dans la compréhension des télomères. Cependant, ce choix se heurte à quelques inconvénients. Cette lignée se décline sous plusieurs formes: certaines lignées Hela correspondent à un type cellulaire adhérentes, d'autres se développent dans un milieu en suspension et certaines autres sont dites mixtes (à la fois adhérentes et en suspension). Par abus, nous pourrions même dire qu'il y a autant de lignées Hela que de laboratoires de recherche. Le problème majeur réside alors dans la comparaison des différentes données obtenues dans ces lignées. En effet, la multitude de lignées Hela laisse entendre que celles-ci n'ont plus grand-chose en commun excepté leurs provenances. Il apparaît difficile d'établir un modèle fiable en tenant compte seulement des résultats obtenus dans ces diverses lignées.

Par ailleurs, ces lignées sont polyploïdes (hypotetraploïdes) et leurs caryotypes sont très remaniés et complexes limitant les études ayant trait à la stabilité chromosomique.

Une autre limite du système, inattendue, a perturbé l'analyse de l'instabilité télomérique. En effet, contrairement à d'autres lignées Hela, des fusions télomériques n'ont pas été détectées. Ceci est d'autant plus surprenant que l'instabilité télomérique est avérée. En dépit de toutes ces limites, le système pEBV constitue une approche intéressante. Dans une certaine mesure, ce travail de thèse a permis de valider l'utilisation des vecteurs permettant d'invalider les voies de la

réparation. Ce travail s'inscrit dans le cadre d'études préliminaires visant à optimiser par la suite ce même type de vecteurs mais dans d'autres types cellulaires afin de préciser l'influence des voies de la recombinaison sur le devenir d'un télomère perdu spontanément. En effet, au sein du laboratoire plusieurs études visent à établir les conséquences d'une perte spontanée d'un télomère. Ces pertes peuvent ainsi occasionner des cercles de cassures-fusions-ponts favorables à l'instabilité chromosomique. Ces extrémités restent instables jusqu'à l'acquisition d'un télomère soit par un échange non réciproque soit par fusion.

Notre démarche se distingue des autres en certains points. Alors que l'essentiel des études postulent une atteinte de la réparation des CDBs après l'invalidation ou l'inhibition des gènes codant pour les partenaires de la recombinaison, notre étude va au delà en précisant la nature de ces altérations. En effet, notre travail poursuit l'étude déjà réalisée par Biard D. démontrant que l'inhibition prolongée de l'expression du partenaire altérerait la réponse aux dommages de l'ADN (blocage du cycle en phase G2 et réduction drastique de la survie cellulaire après exposition aux agents génotoxiques). A cette occasion, nous avons caractérisé la contribution de chacune de ces protéines lors de la réparation d'une cassure « propre » par un mécanisme NHEJ. Pour cela, nous avons eu recours à un test de religation *in vitro* permettant de déterminer les événements mis en jeu à la suite de la formation d'une cassure « propre » (générée par une digestion enzymatique) dans un contexte déficient pour la recombinaison. Ce test a permis de confirmer qu'une atteinte de l'expression des membres du NHEJ réduit considérablement son intervention dans la réparation de cassures doubles brins. Cependant, cette analyse est très complexe et difficile à mettre en place compte tenu du nombre de cellules requises pour l'obtention d'extraits protéiques.

De plus, ce test pourrait occulter certaines régulations cellulaires observées dans des conditions physiologiques biaisant toute interprétation. En tenant compte des avancées dans le domaine de la réparation, le recours à des substrats dit *in vivo* constitue une sérieuse alternative à ce test qui reste très limité et beaucoup moins physiologique.

Il aurait été intéressant de déterminer les effets sur la voie complémentaire du NHEJ c'est-à-dire la RH. L'analyse de la recombinaison par une approche SCE est en général peu sensible ainsi que nous avons pu le constater pour la lignée HCA17.3. Les analyses sont en cours pour l'ensemble des lignées Hela invalidées. Nous avons alors envisagé d'utiliser un système basé sur des substrats *in vivo*. Ces vecteurs épisomaux porteurs de copies GFP tronquées restaurent l'expression de cette protéine par conversion génique. Aux premiers abords, cette technique

apparaît séduisante sachant que nous l'avons validé dans un premier temps avec la lignée HCA17.3. Pourtant, ce système n'est pas transposable aux cellules Hela. Différents tests (mesure de la recombinaison en présence ou non d'agents alkylants MNU, ou après expositions aux rayonnements ionisants IR) révèlent que les résultats obtenus sont peu reproductibles interdisant toute analyse de la RH dans nos clones. Le principal inconvénient est relatif aux nombres de copies exprimées par cellules, qui varient selon l'efficacité de transfection. Certains systèmes permettent de mesurer un événement par cellule après l'induction d'une cassure consécutive à une digestion enzymatique. Cette approche dresserait un état de la RH par cellule. Cependant ces approches peuvent difficilement être réalisées de façon comparative sur des lignées déjà invalidées car elles nécessitent une étape de clonage. Il aurait fallu insérer le substrat de recombinaison avant l'établissement des différentes lignées KD.

Rôle de la réparation dans le maintien des télomères

1. Rôle du NHEJ dans la maintenance des télomères

Le télomère, de par sa structure, permet à la cellule de distinguer une cassure double brin d'une extrémité de chromosome assimilée à une « cassure naturelle ». Cette structure nucléoprotéique forme une protection contre tous types d'agressions (oxydatives, dégradation nucléolytique...). Cette distinction disparaît lorsque les extrémités perdent leur protection suite à une érosion massive ou une altération de leur structure. Dans ce cas, les télomères activent la signalisation des dommages de l'ADN menant soit à la sénescence, soit à la mort cellulaire. Des foci regroupant les protéines de la réparation s'associent aux télomères, afin de les signaler comme cassures (Takai et al., 2003). Les systèmes de surveillance de l'ADN interprètent les télomères comme des sites endommagés. Ces télomères endommagés pourraient interférer avec la réparation de cassures générées suite à un stress et s'en suit alors une radiosensibilité (Latre et al., 2003).

La cellule développe des stratégies sophistiquées pour maintenir l'intégrité de ces extrémités. L'une d'entre elles, consiste à recruter des protéines de la réparation pour assurer leur protection. Ce particularisme est d'ailleurs illustré par le rôle majeur exercé par DNA-PKcs et Ku. Il peut paraître paradoxal que des protéines impliquées dans la réparation canonique des cassures doubles brins préserve l'intégrité d'une cassure dite naturelle. Selon certains, ces protéines auraient deux fonctions distinctes : l'une aux télomère, l'autre dans le reste du génome (Ribes-

Zamora et al., 2007). D'autres équipes sont en faveur d'un seul rôle mais orienté selon le contexte moléculaire et cellulaire (Slijepcevic and Al-Wahiby, 2005). Leur action permet un contrôle efficace de l'intégrité du télomère. Dès que le télomère est défectueux (longueur, protection) la signalisation cellulaire de prise en charge des cassures est déclenchée.

Rôle de Ku dans la maintenance des télomères

Jusqu'à présent, il était très difficile de déterminer la contribution de Ku dans le fonctionnement des télomères humains aux vues des difficultés à établir des lignées dépourvues de Ku. En effet, Ku est un gène essentiel chez l'homme et son absence se révèle être létale pour les cellules humaines. Néanmoins, plusieurs travaux dont les nôtres témoignent d'une contribution majeure dans le maintien de l'intégrité des télomères. Ku s'apparenterait alors à une protection prévenant toute recombinaison inappropriée (fusions, délétion ou allongement rapide). A cet effet, nous avons démontré que l'inhibition à court terme de Ku dans les cellules humaines déstabilise la structure des télomères provoquant à terme la perte entière des télomères démontrant que Ku est partie prenante dans la stabilité des télomères. Par ailleurs, d'autres travaux démontrent que l'inactivation fonctionnelle de Ku (délétion d'un allèle, inhibition par siRNA) provoque l'apparition de fusions conservant les séquences télomériques et privilégient donc le scénario d'un rôle direct de Ku dans la protection des télomères humains (Jaco et al., 2004; Myung et al., 2004). Par contre chez le rongeur, plusieurs travaux font état de résultats contradictoires. Alors que certains observent une augmentation des fusions conservant les séquences télomériques dans les souris Ku86^{-/-} (Espejel et al., 2002a; Espejel et al., 2004b; Samper et al., 2000), d'autres démontrent que la perte de Ku86 et Ku70 favorisent des fusions de télomères consécutives à un raccourcissement des télomères (d'Adda di Fagagna et al., 2001). Selon ces dernières observations, ces fusions seraient la conséquence d'une dérégulation de longueur suite à l'invalidation de Ku. Ainsi, les télomères courts constituent un substrat idéal pour former des fusions ce qui écarte par la même occasion l'hypothèse d'un rôle de protection. Cette théorie, assez séduisante, à l'avantage d'avoir été décrite auparavant chez la levure, mais elle implique que les fusions des télomères courts fassent appel à un mécanisme de ligation indépendant de Ku (Baumann and Cech, 2000). En effet, chez les mammifères, les fusions de télomères dysfonctionnels requièrent Ku et LIGIV. La délétion conditionnelle de Ku70 abolit les fusions induites par le mutant TRF2, suggérant alors que les fusions impliquant des télomères courts

différent de celles induite par le dysfonctionnement des télomères (Celli et al., 2006). Une récente analyse des jonctions de fusions issues de télomères courts ou déprotégés révèlent une différence de comportement au niveau des cellules humaines. Selon leurs prédictions, les télomères courts résulteraient des événements de microhomologie, mécanismes indépendants de Ku. Dans ce cas, les fusions observées dans les souris déficientes seraient la conséquence indirecte du rôle de Ku dans la régulation de la taille. Toutefois, cette théorie se heurte à quelques contradictions. En effet, certaines études démontrent que les fusions des télomères courts sont abolies en absence de KU86 suggérant que la fusion des télomères courts fasse appel à des événements dépendant de Ku allant à l'encontre de la théorie présentée un peu plus haut.

La notion de protection est aussi définie par sa capacité à limiter les événements de recombinaison. Il a été ainsi démontré que Ku70 agissait de concert avec TRF2 pour réprimer les échanges de chromatides sœurs au niveau des séquences télomériques. En effet, l'invalidation conjuguée de TRF2 et Ku70 entraîne l'augmentation de la fréquence des échanges télomériques dépendants de la RH. Tous ces résultats concourent à dire que Ku participe activement à la protection des télomères.

La question relative quant à la participation de Ku dans la régulation de la longueur des télomères est encore moins évidente. En plus de son rôle dans la protection des télomères, Ku semble opérer dans la régulation de la taille des télomères mais là encore les conclusions divergent. Chez l'homme, l'inhibition de Ku86 entraîne une réduction de la taille indiquant qu'il joue un rôle de régulateur positif de la taille. Néanmoins, notre analyse n'a pas permis de déceler une variation de la taille après l'inhibition transitoire de Ku70. Ainsi, ce rôle de régulation de la taille apparaît controversé aussi bien chez l'homme que chez les autres mammifères tels que la souris. En effet, dans un cas, son absence entraînerait un allongement de la taille des télomères (Samper et al., 2000) (Espejel et al., 2002a), et dans l'autre la perte des télomères dans les cellules murines (d'Adda di Fagagna et al., 2001). Le rôle de Ku dans le contrôle de la taille peut se justifier aussi par son interaction avec TRF1, élément clef de la régulation de l'homéostasie télomérique. Dans ce cas précis, il se peut que Ku agissent en synergie avec TRF1 pour contrôler la taille. Pourtant, aucune autre donnée ne permet d'étayer un lien direct entre l'interaction Ku/TRF1 et son éventuel rôle dans la régulation de la taille

Ces travaux posent le problème inhérent au rôle Ku dans la biologie des télomères. Est-ce que la fonction de contrôle de la taille est dissociée de celle de la protection si oui comment la régulation se met elle en place ? Certains prônent un rôle direct de Ku dans le maintien des

téломères, alors que d'autres évoquent une conséquence d'une dérégulation de la taille. La réciproque est aussi possible c'est-à-dire que la dérégulation de la protection pourrait être à l'origine d'une modification de la taille. En effet, il a été proposé que l'allongement des téломères observé dans les souris Ku86 *-/-* résulte d'un échange télomérique faisant appel à la RH (Samper et al., 2000). Il est fort à penser que ces 2 fonctions soient distinctes mais intimement lié, ainsi l'altération d'une fonction entraîne le déséquilibre de l'autre fonction.

a) Rôle de DNA-PKcs

A l'instar de son partenaire Ku, DNA-PKcs serait impliqué dans divers processus télomériques. Plusieurs équipes s'accordent à dire que DNA-PKcs contribue à la protection des téломères. Nos résultats vont dans ce sens, démontrant que la perte de l'expression de DNA-PKcs conduit à une instabilité télomérique qui se manifeste par des pertes de téломères entiers. Dans d'autres circonstances il a été avéré que l'intégrité des téломères repose entre autres sur la présence de DNA-Pkcs. L'inhibition de DNA-Pkcs par interférence ARN mène à la perte des extrémités chromosomiques tout en préservant leurs séquences télomériques. Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse d'un défaut de protection. Compte tenu de la taille de la protéine (460kD), nous pourrions spéculer quant à un rôle de protection limitant tout accès aux séquences terminales des chromosomes. En association avec d'autres protéines plus spécifiques, DNA-PKcs masquerait les extrémités chromosomiques empêchant leur reconnaissance par des systèmes de veille de l'ADN. Alternativement, il semble que cette fonction de protection requière l'activité kinase de DNA-Pkcs. Ainsi, le traitement des cellules humaines par un agent pharmacologique, IC86621, ciblant l'activité kinase de DNA-PKcs reproduit le même phénotype que celui obtenu après l'expression de siRNA ciblant DNA-PKcs. Il semble donc que son activité kinase soit nécessaire à la stabilité des téломères (Bailey et al., 2004b). De plus, la proportion de fusions dans les cellules traitées dépasserait de loin celles observés dans des cellules invalidées génétiquement pour DNA-PKcs (Bailey et al., 2004b). Un tel effet peut s'expliquer par la nature de l'inhibition. Une augmentation des fusions post-irradiation est détectée dans des cellules faiblement invalidées pour DNA-PKcs. En présence de dommages, la forme inactive de DNA-PKcs persisterait sur les sites télomériques empêchant toute action d'autres éléments protéiques. L'activité kinase permettrait alors de réguler la fixation d'autres éléments protéiques sur les téломères. A l'image de TRF2, DNA-PKcs régulerait la stabilité des téломères mais dans une moindre mesure puisque son absence ne génère pas de phénotypes aussi sévères que ceux observés après l'inhibition de

TRF2. Il se peut alors que la fonction de Ku et DNA-PKcs soient redondantes expliquant un phénotype télomérique plus modéré.

DNA-PKcs se distingue aussi par sa capacité à réguler la taille des télomères. Nos résultats laissent entendre que DNA-PKcs régulerait négativement la taille des télomères. En effet, les cellules Hela dépourvues de DNA-PKcs présentent des télomères anormalement longs. A ce jour, aucune étude ne fait état d'une corrélation entre le statut de DNA-PKcs et la longueur des séquences télomériques humaines. Ceci étant, certaines études ont été menées chez d'autres mammifères et notamment la souris qui s'accordent à dire que DNA-PKcs régule la taille des télomères, mais leurs conclusions divergent quant à son véritable rôle dans l'homéostasie télomérique. L'examen de la taille des télomères dans les souris SCID, syndrome causé par une mutation hypomorphique de DNA-PKcs, montre un allongement des télomères (Hande et al., 1999), (Goytisoló et al., 2000b). En revanche, une autre étude des souris DNA-PKcs^{-/-} constate aucune variation de la taille ou un raccourcissement des télomères contredisant les précédents faits (Espejel et al., 2002b; Espejel et al., 2004b). Aux vues de nos résultats, il paraît plus plausible d'accréditer la thèse d'une répression de l'élongation des télomères. Toutefois, la nature de l'allongement des télomères demeure obscure. Dans un premier temps, le rôle de l'activité kinase de DNA-PKcs dans la régulation de la taille a été évoqué. En effet, dans les cellules SCID, la reconstitution de l'activité kinase après l'expression d'une forme fonctionnelle de DNA-PKcs restaure une taille des télomères comparable à celle des lignées parentales. Ainsi, une activité résiduelle de DNA-PKcs pourrait interférer dans le contrôle de la taille des télomères (Wong and Slijepcevic, 2004).

Cependant, il a été démontré que l'inhibition prolongée de DNA-PKcs abolissait toute activité kinase dans les cellules Hela (Despras et al., 2007). Il paraît alors difficile de justifier cette élongation par une simple modification de l'activité kinase. Toutefois, la sensibilité du test ne permet pas de conclure à l'abolition complète de son activité kinase.

Cette élongation pourrait-elle impliquer la télomérase ? Selon cette hypothèse, DNA-PKcs réprime l'accès de la télomérase. Donc, la télomérase aurait accès aux télomères dès la suppression de la protéine DNA-PKcs (Espejel et al., 2002b). Cependant, d'autres travaux font état d'une coopération entre la télomérase et DNA-PKcs écartant d'emblée cette hypothèse. En effet, l'invalidation de la protéine DNA-PKcs dans les cellules dépourvues de télomérase accentue le raccourcissement des télomères suggérant une synergie entre ces 2 partenaires. De plus, l'examen des cellules SCID ou DNA-PKcs^{KD} révèle aucune modification de leur activité

téломérase in vitro excluant sa contribution dans les fluctuations de la taille des télomères (Wong and Slijepcevic, 2004).

L'existence de télomères longs peut aussi présager d'une dérégulation de la recombinaison télomérique. De ce fait, l'examen de la recombinaison télomérique révèle des échanges de chromatides sœurs plus nombreux dans les cellules SCID établissant un lien entre l'allongement des télomères et l'état de la recombinaison. De plus, l'expression d'un mutant de hRAD54 dans les cellules SCID affecte la recombinaison des télomères et restaure une longueur des télomères comparable à celle de la lignée parentale (Wong and Slijepcevic, 2004). Ces effets sont aussi reproduits après la reconstitution de l'activité kinase de DNA-PKcs. Par contre, l'expression du mutant Rad54 ou de la forme fonctionnelle DNA-PKcs n'a aucune incidence sur l'évolution du profil télomérique pour les cellules invalidées pour DNA-PKcs (Wong and Slijepcevic, 2004).

Aux vues de ces résultats, la diminution de l'activité kinase de DNA-PKcs mènerait à une stimulation de la recombinaison qui se traduit par une élongation des télomères illustrant la coopération entre le NHEJ et la RH dans le maintien de l'intégrité des télomères.

Néanmoins cette hypothèse ne semble pas s'appliquer à nos clones DNA-PKcs^{KD} puisque aucune modification de la recombinaison télomérique n'a été observée dans ces clones. Il conviendrait alors de co-exprimer un mutant de la recombinaison dans ces cellules afin étayer cette hypothèse. L'ensemble de ces résultats indique que DNA-PKcs jouerait un rôle indirect dans la régulation de la taille des télomères. Sa contribution serait en fait la conséquence de sa propre fonction dans la protection des télomères. A l'image de TRF2, DNA-PKcs protégerait les télomères de la recombinaison. Une altération de sa fonction de protection lèverait le sceau de la répression de la recombinaison télomérique, synonyme d'une élongation des séquences terminales. Pourtant, ce scénarii rend compte de quelques contradictions. Alors comment expliquer que l'abolition complète de DNA-PKcs n'ait aucune incidence sur la longueur des télomères (Espejel et al., 2002b) alors que la réduction de son activité kinase génère des télomères longs ? L'explication la plus probable résiderait dans la présence de DNA-PKcs aux télomères. Dans les souris invalidées, la protéine est indétectable, donc absente des télomères. Par contre, les souris SCID présentent une forme tronquée de DNA-PKcs (domaine C-terminale tronqué) qui pourrait ainsi affecter l'interaction d'autres protéines avec les télomères.

A ce titre, le complexe DNA-PK (DNA-PKcs et Ku) sont des éléments incontournables de la maintenance des télomères tant par leur implication directe dans la protection des télomères que par leurs participations à l'homéostasie télomérique.

b) Rôle de la Ligase IV

Bien qu'absent des télomères, la Ligase IV semble être impliquée dans la protection des télomères. En effet, nos résultats indiquent que son inhibition transitoire ou prolongée porte atteinte à l'intégrité des télomères. Cette atteinte relève probablement d'une fonction liée au maintien de la stabilité chromosomique puisque les cellules *LIGIV*^{-/-} sont très instables et présentent de nombreuses cassures chromosomiques (Ferguson et al., 2000). L'instabilité télomérique ne serait alors que l'une des nombreuses manifestations de l'instabilité plus globale. Cependant, l'ampleur de l'instabilité télomérique dépasse largement celle de l'instabilité chromosomique indiquant que les télomères sont préférentiellement affectés, comparé au reste du génome. D'autres faits dans la littérature précisent la fonction de la Ligase IV dans la maintenance des télomères. Il s'avère que cette protéine est davantage impliquée dans la réponse aux disfonctionnements télomériques que dans la protection des extrémités chromosomiques. Ainsi, les fusions induites par un mutant TRF2, sont abolies suite à l'inactivation de la Ligase IV dans les cellules murines confirmant le rôle du NHEJ dans la réponse à une protection télomérique défaillante (Smogorzewska et al., 2002). Chez l'homme, aucune étude n'aborde cette question compte tenu de la létalité occasionnée par la perte de la Ligase IV et le faible nombre de patients atteints d'un syndrome *LIGIV*.

Cependant, il a été démontré que les patients souffrant de syndromes *LIGIV* possédaient des télomères plus courts que des sujets sains du même âge (Cabuy et al., 2005). Ce raccourcissement prématuré a été mis en évidence dans des cellules provenant de deux patients différents écartant l'hypothèse d'un résultat artefactuel, d'autant qu'il est corrélé à la radiosensibilité cellulaire. Cette tendance a été confirmée par nos soins puisque nous démontrons qu'une inhibition prolongée de la ligase IV mène à une réduction drastique (>50%) de la longueur des télomères. Ce raccourcissement peut témoigner d'une dérégulation de la longueur des télomères mais peut être aussi la conséquence d'une mauvaise réparation qui conduirait à terme à la perte des télomères.

Une analyse plus précise a permis d'étudier les pertes télomériques dans les cellules *NHEJ*^{KD}. En effet, ces pertes sont associées à des cassures subtélomériques suggérant qu'en absence de NHEJ les cassures s'accumulent dans les régions subtélomériques. Cette hypothèse, assez séduisante, se réfère à des travaux faisant état d'une réparation défaillante des lésions télomériques

comparée au reste du génome (Petersen et al., 1998; Richter et al., 2007; von Zglinicki et al., 2000). Selon notre modèle, les protéines du NHEJ présents aux télomères constitueraient un « réservoir » capable d'être mobilisé sur des sites télomériques endommagés. En leur absence, ces cassures s'accumulent et génèrent des pertes de télomères entiers. Dans le but de démontrer cette accumulation, nous avons envisagé de détecter les cassures télomériques en quantifiant le nombre de foci γ H2AX répartis le long des télomères. Ceci nécessite d'étirer au préalable les chromosomes sous forme de fibres tout en conservant la structure chromosomique afin d'optimiser la résolution de la détection.

Certaines protéines du NHEJ contribuent à préserver l'intégrité des télomères en réparant efficacement les dommages télomériques survenus lors d'un stress physiologique (attaques de radicaux libres sur les séquences télomériques) ou autre agression cellulaire. Nos résultats préliminaires semblent montrer des signaux γ H2AX aux télomères défectueux.

2. Rôle de la RH dans la maintenance des télomères

A l'image des protéines du NHEJ, les protéines de la recombinaison homologue participent à l'homéostasie dans les cellules de mammifères mais leur rôle reste à préciser. Chez la levure, la perte de RAD52 ou de RAD51 n'affecte pas la longueur des télomères, en revanche l'inhibition de RAD52 et RAD51 dans un contexte télomérase négative (*est*, *tlc*) accélère l'entrée en sénescence (Le et al., 1999; Lundblad and Blackburn, 1993). A l'exception du rôle joué dans le mécanisme ALT (Henson et al., 2002; Yeager et al., 1999), la contribution de la RH dans le maintien des télomères reste floue. Ainsi, des travaux ont été menés chez la souris pour définir leur rôle dans l'intégrité télomérique. Mais l'analyse reste délicate, en effet, l'inactivation de plusieurs de ces membres est létale pour les cellules de mammifères y compris les rongeurs.

La protéine RAD54, partenaire de RAD51, est impliquée dans l'invasion de brins et son rôle dans la recombinaison est conservé notamment chez les rongeurs. Son inactivation conduit ainsi à une réduction des échanges de chromatides sœurs, produits de la conversion génique. La contribution de Rad54 dans le maintien de l'intégrité des télomères humains n'a pas encore été déterminée. L'établissement des clones Hela RAD54^{KD} nous a permis de mettre en évidence le rôle de RAD54 dans la protection des extrémités chromosomique. En effet, des pertes spontanées de télomères sont observées suite à l'extinction prolongée de RAD54 témoignant d'une éventuelle déprotection des télomères. Ce rôle a été déjà évoqué chez la souris où l'inactivation de RAD54 dans les cellules embryonnaires est à l'origine d'une forte instabilité télomérique qui se manifeste

principalement par des fusions chromosomiques. Il n'est pas rare de retrouver des séquences télomériques au niveau des jonctions formées entre les deux chromosomes indiquant un défaut de protection en absence de Rad54 et non un raccourcissement des télomères. Indépendamment de sa fonction d'helicase, RAD54 contribuerait comme d'autres éléments à l'établissement d'une structure fonctionnelle préservant les extrémités des télomères de toute agression extérieure. Toutefois, cette hypothèse n'a de sens que si RAD54 interagit avec les télomères. Or, à ce jour, la présence de RAD54 aux télomères reste à prouver. Son action nécessiterait l'intervention d'autres partenaires capables d'interagir directement avec les télomères.

Par ailleurs, RAD54 prendrait aussi part à la régulation de l'homéostasie télomérique. Nos travaux mettent en évidence une légère modification de la taille des télomères sans pour autant affecter l'activité télomérase. Ces résultats confortent ceux démontrés chez la souris.

L'examen de souris dépourvues de RAD54 révèle une réduction importante de la longueur des télomères (Jaco et al., 2003). Cependant, l'invalidation de RAD54 ne conduit pas à une perte du signal télomérique supposant que les télomères les plus courts soient allongés par la télomérase afin d'éviter le déclenchement de la sénescence (Jaco et al., 2003). De plus, cette diminution de la taille n'est pas associée à une dérégulation de l'activité télomérase. RAD54 serait donc directement impliqué dans le contrôle de la taille des télomères.

L'ensemble des données recueillies chez l'homme ou le rongeur indiquerait que RAD54 participe à la maintenance des télomères.

Tout comme Rad54 ou de RAD51D, RAD51 pourrait exercer certaines fonctions dans le but de préserver des télomères. RAD51, élément clef de la recombinaison homologue, est essentiel à la viabilité des cellules de mammifères. En effet, l'invalidation de RAD51 dans les cellules murines conduit à une létalité embryonnaire au stade E8 (Tsuzuki et al., 1996). Ces cellules embryonnaires RAD51^{-/-} sont incapables de proliférer et présentent une sensibilité accrue aux radiations ionisantes. L'absence de cellules viables pour l'invalidation génique de RAD51 a limité les études visant à déterminer la contribution de RAD51 dans la maintenance des télomères dans les cellules normales. C'est dans cette optique que s'inscrit notre travail. L'extinction transitoire ou prolongée à l'aide des vecteurs pEBV-siRNA constitue une approche innovante. Comparé à d'autres gènes, l'extinction de RAD51 a été plus délicate. Alors que l'extinction transitoire de RAD51 est concluante avec une efficacité de réduction de l'expression de 95%, à long terme, cette réduction ne représente plus que de 30 à 50% du taux constitutif. Malgré cette faible extinction, nous avons été en mesure d'observer une instabilité télomérique suite à la perte

d'expression de RAD51. A l'instar de RAD54, l'absence partielle de RAD51 se traduit par une accumulation de pertes télomériques ainsi qu'une modeste réduction de la taille. Dans la mesure où cette réduction est partielle, il est facile d'imaginer des conséquences plus marquées si l'extinction avait été totale.

Il est intéressant de constater que les phénotypes télomériques caractérisés après une invalidation à long terme des clones RAD54^{KD} et RAD51^{KD} sont comparables en tout point, il nous faut alors définir la nature de leurs actions. Cette symétrie illustre en fait la contribution de la RH dans le maintien des télomères. Reste à savoir si l'altération des télomères caractérise une action spécifique de la RH aux niveaux des extrémités terminales ou si elle illustre plutôt une instabilité génomique étendue à d'autres régions. En effet, l'accumulation de cassures chromosomiques est en faveur d'une instabilité chromosomique plus globale. Néanmoins, la fréquence à laquelle les télomères sont perdus dans leur totalité est supérieure à celles des cassures observées dans le génome indiquant un effet spécifique et ciblée sur les séquences subtélomériques. Des tests réalisés *in vitro* démontrent que RAD51 et RAD52 sont nécessaires à la formation d'une T-Loop supposant que la RH contribuerait à la mise en place d'une protection à l'extrémités des chromosomes (Verdun and Karlseder, 2006)

Une analyse plus précise révèle que les pertes des télomères dans les cellules HR^{KD} se produisent majoritairement sur une chromatide. Un tel profil évoque un problème survenu lors de la réplication. Le couplage HR-réplication a déjà été abordé dans la littérature mais pour des séquences interstitielles. Lors de la réplication, la polymérase peut rencontrer des lésions qui ralentissent ou bloquent la progression de la fourche. Pour poursuivre cette progression, la machinerie réplivative fait appel à deux mécanismes pour s'affranchir de ces lésions : il s'agit de la synthèse translésionnelle (Kannouche and Stary, 2003) et de la recombinaison homologue (Saintigny and Lopez, 2002). Ces deux mécanismes permettent à la cellule de tolérer certains obstacles aux abords de la fourche de réplication.

L'implication de la RH dans la réplication des télomères ne serait pas fortuite. En présence de la recombinaison, les lésions présentes sur l'un des brins seraient contournées afin de poursuivre la progression de la fourche aux télomères. Par contre, une défaillance de la RH entraînerait un arrêt de la fourche qui pourrait s'avérer plus ou moins délétère selon le brin affecté (Figure 20). L'analyse préliminaire par CoFISH ne permet de conclure à une perte préférentielle d'un des télomères, et suggérerait que les lésions affectent indifféremment les brins directeurs et brins retardataires. La mesure de la progression de la fourche au niveau des séquences télomériques

constitue une approche séduisante afin d'établir la connexion entre la recombinaison et la réplication des télomères. Cette étude apparaît toutefois compliquée compte tenu des contraintes liées à la technique. En effet, le peignage moléculaire assure une résolution d'une dizaine de kb, et nécessite alors des télomères longs pour visualiser aisément la progression de la fourche.

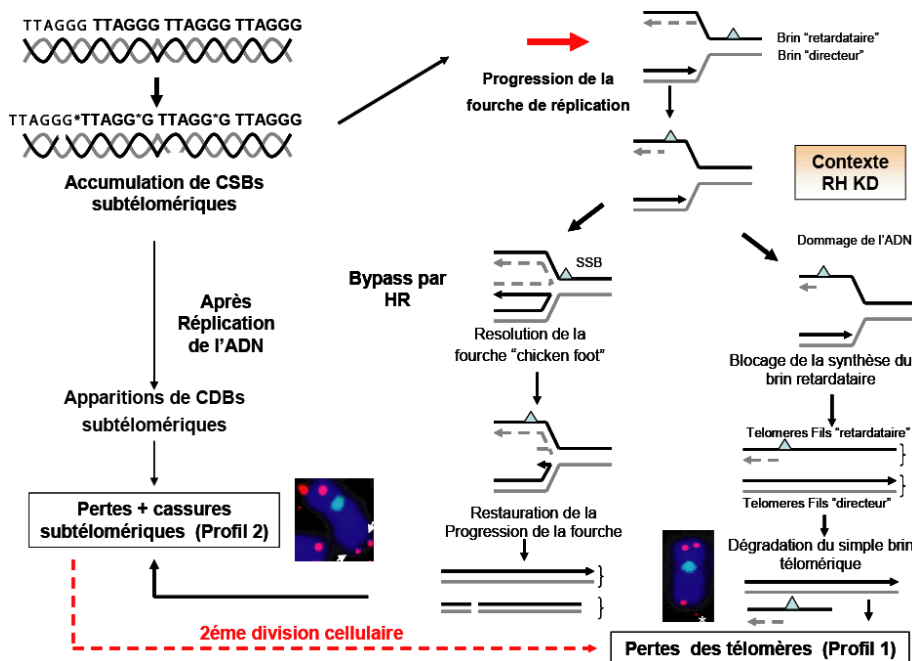


Figure 20: Modèle décrivant la contribution de la RH dans la réplication télomérique.

L'ADN télomérique est soumis à un stress oxydatif générant des lésions de l'ADN télomérique. Selon certains travaux, ces lésions persisteraient dans les régions télomériques compte tenu de la faible accessibilité de la machinerie de réparation. Ainsi, elles sont peu ou mal réparées lorsqu'elles surviennent dans des régions télomériques. Lors de la réplication, ces lésions ralentiraient la progression de la fourche de réplication aux abords des télomères. Dans un contexte proficient pour la RH, ces lésions seraient prises en charge par la recombinaison homologue qui s'affranchit de cette lésion autorisant la poursuite de la réplication (adaptée du modèle de « chicken fork »). La lésion persiste mais ne donne lieu qu'à des cassures subtélomériques correspondant au profil de type II (perte de télomères associée à une cassure). En absence de la RH, cette lésion persiste provoquant l'arrêt de la réplication voire la dégradation d'une partie des brins télomériques matrices, caractéristiques du profil I (perte télomérique seule). Les altérations de type II persistantes génèrent aussi des lésions de type I lors de la division cellulaire suivante.

3. Rôle distincts de la RH et du NHEJ dans l'homéostasie télomérique

Aux vues des données recueillies durant notre étude, il apparaît que la recombinaison illégitime ou non assure le maintien de l'intégrité télomérique. L'absence des protéines du NHEJ ou de la RH conduit aux mêmes effets c'est à dire un dysfonctionnement des télomères, mais leur contribution respective dans ce maintien n'est pas clairement définie dans la littérature. Ainsi, des

altérations diverses peuvent produire les mêmes effets et nous sommes en droit de nous interroger sur la nature exacte de la contribution du NHEJ et la RH au sein des télomères.

La relation entre le NHEJ et la RH pour un même substrat a déjà été décrite dans le cadre de la réparation des cassures doubles brins. Plusieurs hypothèses ont été abordées : voies distinctes (Ristic et al., 2003), collaboration entre les deux voies ou même une compétition (Allen et al., 2003; Allen et al., 2002). Des données récentes sont en faveur d'une contribution distincte dans la réparation des cassures CDBs. Ainsi, les protéines du NHEJ seraient recrutées précocement et de manière transitoire pendant que les acteurs de la RH apparaissent plus tardivement et persistent sur le site endommagé (Kim et al., 2005). Dans ce cas, le NHEJ serait un mécanisme de réparation immédiat alors que la RH prend en charge des cassures résiduelles. Cette organisation pourrait être transposée aux télomères. Plusieurs exemples sous-entendent une contribution distincte dans le maintien des télomères. L'analyse des souris RAD54^{-/-} DNA-PKcs^{-/-} révèle plus de fusions télomériques que dans les simples mutants, indiquant que RAD54 et DNA-PKcs coopèrent dans la protection des télomères (Jaco et al., 2003). Afin de préciser cette collaboration, une analyse des brins impliqués dans les fusions télomériques a été entreprise par CoFISH démontrant que les fusions induites par RAD54 diffèrent de celles consécutives à l'inactivation de DNA-PKcs. En effet, les fusions dans les cellules DNA-PKcs^{-/-} impliquent préférentiellement les télomères issues de la réplication des brins directeurs et suggère que DNA-PKcs a un rôle post réplcatif dans la maintenance des télomères. Par contre, les brins impliqués dans les fusions observées sont aléatoires dans les cellules RAD54^{-/-} suggérant que RAD54 exerce une fonction distincte de celle occupée par DNA-PKcs. Cette collaboration a été mise en évidence dans les souris Ligase IV^{-/-} où l'inactivation de RAD54 accroît le nombre de chromosomes dicentriques (Mills et al., 2004). Bien que la nature des fusions n'ait pas été établie, l'absence conjointe de la ligase IV et RAD54 pourrait être à l'origine de fusions télomériques suggérant un rôle distinct de la LIGIV et RAD54 dans la maintenance des télomères.

La coopération entre la RH et le NHEJ a aussi été évoquée lors de la régulation de la taille des télomères. Comme nous l'avons décrit un peu plus haut, l'inhibition de l'activité kinase de DNA-PKcs dans les cellules SCID favorise l'élongation des télomères et une augmentation de des échanges de chromatides sœurs aux télomères (Wong and Slijepcevic, 2004). Ainsi, une baisse d'activité du NHEJ serait alors compensée par une augmentation de la RH aux télomères confortant l'idée de coopération entre le NHEJ et la RH dans l'homéostasie télomérique.

Aux vues de nos résultats, ces voies exerceraient des fonctions distinctes mais très complémentaires. La voie du NHEJ assurerait la protection des télomères et la réparation d'éventuels dommages CDBs, alors que la RH serait davantage impliquée dans la réplication des télomères. L'établissement de clones double KD réprimant à la fois l'expression d'une protéine de la voie NHEJ et de la RH permettrait de préciser un peu plus la coopération de ces 2 voies dans la maintenance des séquences télomériques humaines. Ainsi plusieurs combinaisons sont envisageables DNA-PKcs^{KD}/Rad54^{KD}, DNA-PKcs^{KD}/RAD51^{KD}, LigIV^{KD}/Rad54^{KD}, LigIV^{KD}/RAD51^{KD}. Techniquement ces combinaisons sont possibles, puisque le vecteur produisant les shRNA est décliné sous deux formes : l'une portant le gène de sélection hygromycine, l'autre avec le gène puromycine. De même que chez les souris doubles KO, l'inhibition conjuguée de la RH et du NHEJ affecterait la viabilité cellulaire conditionnant l'étude des télomères dans ces cellules mais ouvrirait d'autres perspectives dans la compréhension des télomères.

Complexe MRN

1. Modèle syngénique MRN : radiosensibilité et réparation

Le complexe MRE11/RAD50/Nbs1 joue un rôle majeur dans différents processus cellulaires essentiellement dans la réparation des cassures double brin de l'ADN (CDB ou DSB) que ce soit par NHEJ ou par recombinaison homologue, mais aussi dans l'entretien des télomères ou encore dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire. Ce large éventail de fonctions peut s'expliquer par la diversité de ses activités, enzymatiques ou non, du complexe MRN. L'étude du rôle de complexe MRN dans le maintien des télomères a fait l'objet de nombreuses investigations dans les cellules de mammifères et plus particulièrement chez l'homme mettant en évidence les différentes facettes de ce complexe au sein des télomères. Chez l'homme, l'essentiel des données recueillies a été obtenu à partir de cellules provenant de patients arborant des mutations hypomorphiques du gène NBS1 ou bien suite à l'inhibition transitoire des membres du complexe rendant toute comparaison délicate. Dans cette optique, notre travail a permis d'établir les contributions respectives de chacun des membres dans un même fond génétique, conditions appréciables pour les cellules de mammifères. En effet, chez les eucaryotes, l'invalidation des gènes codant pour MRE11, NBS1 et RAD50 est létale ce qui rend difficile l'analyse de leurs rôles respectifs pour quelques mécanismes qu'ils soient. L'étude de cellules issues de patients se heurte à un inconvénient majeur puisque les mutations, à l'origine de ces syndromes, sont dites hypomorphiques. Les protéines formées conservent tout de même une activité biologique

résiduelle. Compte tenu de l'origine de ces cellules, il faut prendre en considération la variabilité interindividuelle lors de l'interprétation des phénotypes. Dans cette perspective, l'utilisation des vecteurs épisomaux pEBVsiRNA NBS1 et siRNA MRE11, nous ont permis de mimer respectivement ces syndromes NBS et ATLD et tout en conservant un même contexte cellulaire (Biard, 2007).

Ces clones NBS1^{KD} et MRE11^{KD} sont semblables en tout point aux cellules issues des patients NBS et ATLD. Ces clones ne tolèrent pas les dommages induits par les agents génotoxiques (RI, VP16) (Biard, 2007) et présentent des profils cytologiques comparables aux cellules des patients. En effet, les protéines MRE11 et RAD50 sont séquestrées dans le cytoplasme des cellules NBS1^{KD} confortant les précédents résultats obtenus dans les cellules de patients NBS (Maser et al., 1997). La comparaison ne s'arrête pas là puisque l'inactivation de MRE11 ou de RAD50 dans les cellules Hela entraîne l'extinction des deux autres partenaires protéiques, mais aussi dans les lignées humaines HCT116 (Takemura et al., 2006). Selon leur hypothèse, la protéine MRE11 devait stabiliser le complexe et prévenir d'une éventuelle dégradation des autres partenaires du complexe MRN par le protéasome. Contrairement aux autres partenaires, RAD50 n'est pas impliqué dans la réponse à l'irradiation. En effet, son inhibition ne sensibilise pas les cellules Hela aux agents génotoxiques (Biard, 2007) et n'occasionne pas de défauts de croissance en accord avec les études réalisées chez des souris exprimant une mutation hypomorphique RAD50S (Bender et al., 2002).

La radiosensibilité des cellules NBS1^{KD} et MRE11^{KD} pourrait s'expliquer par un défaut de la réparation des cassures doubles brins. Chez la levure, le complexe MRX est impliqué dans la voie de réparation du NHEJ et de la RH (Moore and Haber, 1996). Chez l'homme, la participation de NBS1 dans la recombinaison homologue est avérée; par contre son implication dans la régulation du NHEJ reste controversée. Des études *in vitro* ont révélé que le complexe MRN était indispensable à une ligation efficace des extrémités, il a d'ailleurs été proposé que le complexe stabilise et aligne les extrémités de manière à faciliter la réaction de ligation par le complexe XLF /XRCC4/LIGIV (Huang and Dynan, 2002). Au contraire, chez le Xenope, la ligation *in vitro* n'est pas compromise par la déplétion de la protéine MRE11 ce qui exclut tout rôle de MRE11 dans la religation par NHEJ (Di Virgilio and Gautier, 2005). En accord avec les travaux de Huang, nous observons une réduction significative de la religation dans les extraits provenant des cellules NBS1^{KD} et plus modérée dans les cellules MRE11^{KD} confirmant l'implication de NBS1 et MRE11 dans la voie de réparation par NHEJ. En revanche, l'inhibition

prolongée de RAD50 n'entraîne pas de défauts majeurs de la réparation par NHEJ. Toutes ces données indiquent que la radiosensibilité des cellules NBS1^{KD} et MRE11^{KD} peut être corrélée à leur aptitude à réparer efficacement les cassures induites.

Notre modèle permet ainsi de reproduire ou de créer un défaut du complexe MRN dans les cellules humaines et constitue un outil très puissant pour définir le rôle du complexe MRN dans la stabilité des télomères.

2. le Complexe MRN et les télomères

a) MRN et l'instabilité télomérique

Le complexe MRN est impliqué dans le maintien de l'intégrité du génome du fait de sa participation dans la réparation de l'ADN. Compte tenu de leurs ressemblances avec les cassures double brins, les télomères constitueraient une cible toute désignée pour le complexe MRN. D'ailleurs à plusieurs égards, le complexe MRN participe au métabolisme des télomères. Il régulerait la taille des télomères, assurerait leurs protections et veillerait au bon déroulement de la réplication. D'abord décrits chez la levure, plusieurs travaux font part de son rôle dans l'homéostasie télomérique, mais la variété des modèles cellulaires utilisés ne permet pas de définir précisément la contribution respective de chacun aux télomères.

Nous avons montré que l'extinction à court terme de NBS1 occasionne une instabilité télomérique marquée avec notamment un bon nombre de télomères perdus, après seulement quelques jours d'inhibition. Néanmoins, cette instabilité ne persiste pas au cours des divisions cellulaires suggérant que l'accumulation des pertes mène à la mort cellulaire. D'autres travaux confirment que NBS1 joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité télomérique. Ainsi, l'inhibition transitoire de NBS1 dans les cellules humaines lymphoblastiques WTK1 favorise les associations télomériques (Zhang et al., 2005). Par ailleurs, la protection exercée par NBS1 nécessiterait l'intervention d'ATM. Des pertes de télomères entiers sont relevées suite à l'expression d'un mutant NBS1 privé de sites de phosphorylation pour ATM mais aucune modification de la taille n'a été constatée. Ainsi, la fonction de NBS1 aux télomères requiert la protéine ATM (Bai and Murnane, 2003). La perte complète de ces télomères peut résulter de différents mécanismes.

Tout d'abord, les pertes de télomères peuvent provenir de l'accumulation de cassures aux abords des séquences subtélomériques ou télomériques. En effet, la réparation des cassures CDBs est

peu efficace dans les régions télomériques (probablement du à l'encombrement occasionné par les protéines télomériques). En l'absence de NBS1, ces CDBs peuvent persister et provoquer à terme la perte des télomères entiers.

Ensuite, ces cassures peuvent être générées suite à un problème lors de la réplication. Deux hypothèses sont alors possibles : (i) soit l'absence du complexe MRN facilite l'accumulation de lésions qui altéreraient la réplication provoquant la perte stochastique de télomères, (ii) soit son absence entraîne une perte préférentielle d'un télomère, hypothèse en faveur d'un rôle spécifique de MRN dans la réplication.

La première hypothèse suppose que la perte des télomères soit la conséquence d'une mauvaise réparation des dommages qui affecte la réplication quelque soit le brin lésé. Ainsi, les lésions accumulées sur l'un des brins conduiraient à un arrêt de la fourche de réplication suivie de la perte du télomère portant la lésion. Plusieurs arguments vont dans ce sens, en effet la protéine MRE11 est recrutée lors du blocage de la fourche de la réplication dans les cellules de mammifères (Maser et al., 2001; Mirzoeva and Petrini, 2003) pendant que RAD50 est présent au niveau des fourches de réplication dans les cellules humaines (Robison et al., 2004). De plus, des foci MRN apparaissent après l'arrêt de la fourche suite à l'exposition aux UV des cellules XP (Limoli et al., 2002a; Limoli et al., 2002b). Cependant, jusqu'à présent des contraintes techniques (manque de résolution pour identifier les dommages télomériques) empêchent de visualiser une éventuelle présence du complexe MRN aux sites télomériques endommagés.

La seconde hypothèse privilégie un rôle spécifique du complexe MRN dans la réplication des télomères où l'inhibition de NBS1 devrait entraîner alors la perte préférentielle d'un même télomère. Selon des études préliminaires réalisées au sein du laboratoire, la réplication du brin directeur serait préférentiellement affectée dans les cellules NBS1^{KD} suggérant que NBS1 soit impliqué directement dans la réplication des télomères. Ce résultat serait en accord avec le modèle établi selon lequel le complexe MRN serait en charge de la résection des brins télomériques riches en C après la synthèse des chromosomes (Verdun et al., 2005; Verdun and Karlseder, 2006). Selon ce modèle, l'inhibition de NBS1 se traduirait par un défaut de dégradation du brin C et compromettrait la formation d'une extension télomérique simple brin suffisamment longue. Dans ce cas, la T-Loop ne pourrait pas être formée et les télomères seraient plus accessibles aux enzymes de dégradation.

Outre son rôle de protection physique, le complexe semble aussi requis pour la formation d'une structure fonctionnelle des télomères. En effet, le recrutement de MRE11 et ATM -en fin de

phase S/ début G2 (à la fin de la réplication des télomères) s'avère essentiel à la genèse d'une structure adéquate aux extrémités de chromosomes. En absence de MRE11, les télomères sont la cible de réactions enzymatiques non spécifiques des télomères (Verdun et al., 2005). Cette fonction n'a pas pu être mise en évidence dans notre modèle puisque l'extinction prolongée de MRE11 n'affecte pas la stabilité des télomères.

L'inhibition de RAD50 déstabiliserait les télomères dans nos clones Hela bien qu'elle n'ait aucune incidence sur la stabilité génomique (pas de défaut de réparation ou cassures chromosomiques). Ce rôle de protection a déjà été évoqué chez *A.thaliana* où AtRAD50 participerait à la maintenance des télomères. Selon certains auteurs, AtRAD50 protégerait distinctement les télomères intacts et les télomères courts. Dans le cas où les télomères sont intacts, AtRAD50 exerce une simple protection physique limitant les fusions (Vannier et al., 2006). Par contre, en absence de la télomérase, AtTert, le complexe MRN faciliterait leurs élongations par recombinaison prévenant les fusions télomériques (Vannier et al., 2006). Notre modèle ne permet pourtant pas d'affirmer le rôle relatif à la protection des télomères courts, il serait alors intéressant de voir si le comportement vis-à-vis des télomères courts puisse être reproduit dans les cellules humaines. Néanmoins, le rôle de RAD50 dans la maintenance des télomères semble être conservé pendant l'évolution (levure, thaliana, drosophile, homme).

b) MRN et le contrôle de la taille

Les arguments en faveur du rôle de MRN dans la régulation de la taille des télomères restent pour le moins partagés. L'étude de la taille des télomères des cellules issues de patients NBS1 apporte un premier élément de réponse quant au rôle de MRN. Bien qu'aussi longs que ceux des patients AT, les télomères des patients NBS demeurent plus courts que chez des sujets sains (Cabuy et al., 2005; Ranganathan et al., 2001). Ce raccourcissement prématuré attesterait du rôle de NBS1 dans la régulation de la taille des télomères. D'autres éléments évoquent aussi l'intervention du complexe MRN dans le contrôle de l'élongation des télomères par la télomérase. En orchestrant la phosphorylation de TRF1 par ATM, le complexe MRN facilite l'accès de la télomérase en favorisant le départ de TRF1 des télomères (Wu et al., 2007). Cette coopération entre le complexe MRN et la télomérase a été décrite à plusieurs reprises. La restauration de la taille dans les cellules NBS nécessitait l'expression conjuguée de la télomérase et de NBS1 (Ranganathan et al., 2001). De plus, la réduction de la taille de l'extension

télomérique intervenait uniquement après l'inhibition de MRN dans les cellules exprimant la télomérase soulignant la connivence qu'il entretient avec la télomérase (Chai et al., 2006).

Nos résultats vont pourtant à l'encontre de toutes les données déjà décrites. Nous nous attachons actuellement à les confirmer à travers une étude comparative de plusieurs clones invalidés pour chaque membre du complexe MRN. En effet, l'inhibition à long terme de NBS1 et MRE11 stimule l'élongation de la taille des télomères. La nature de cette élongation reste obscure à nos yeux, mais suscite beaucoup d'intérêt. En toute logique, une élongation par la télomérase semblait plausible. Cependant, l'activité télomérase *in vitro* dans les clones ne diffère pas significativement selon les clones excluant l'hypothèse d'une élongation télomérase dépendante. Toutefois, l'approche utilisée pour mesurer cette activité ne permet pas d'estimer l'activité de la télomérase aux télomères et donc cette hypothèse demeure plausible.

Dans ce cas précis, le complexe MRN limiterait l'accès de la télomérase aux télomères contrairement à tout ce qui a été observé à ce jour chez l'homme. L'inhibition du complexe dans une cellule n'exprimant ni la télomérase ni ALT permettrait d'étayer un peu plus cette théorie.

Ce changement rapide et brusque de la taille des télomères rappelle l'élongation basée sur la recombinaison homologe. Parmi les marqueurs d'une activité de recombinaison télomérique, nous retrouvons les mini-cercles télomériques extra-chromosomiques présents dans le clone NBS1^{KD} 932.2. Ces cercles sont détectés par migration électrophorétique en deux dimensions permettant de séparer l'ADN selon sa taille et sa topologie. Dans les cellules ALT, ces cercles sont abondants et associés à une forte activité de la recombinaison. Ces cercles seraient à la fois les produits et les substrats pour l'élongation des télomères. L'apparition de ces cercles est concomitante avec l'allongement rapide des télomères dans NBS1^{KD} témoignant d'une forte activité de la RH aux télomères.

Selon nos résultats, NBS1 réprimerait la recombinaison aux télomères. Il serait intéressant de mesurer les échanges de chromatides soeurs aux télomères afin d'estimer l'activité de recombinaison aux télomères et de la corrélérer avec la présence des cercles extra-chromosomiques. Cependant, il n'est pas sûr que ces événements fassent appel aux mêmes mécanismes, en effet les T-SCE seraient plutôt le produit d'événements interchromatidiens alors que les cercles extrachromosomiques seraient issus d'événements intrachromatidiens.

En revanche, la déplétion de MRE11 induit un allongement des télomères moins prononcé si l'on se réfère au clone NBS1^{KD}. De plus, les cercles télomériques extrachromosomiques sont absents de ces cellules. Il est possible que ces cercles soient indétectables par l'analyse 2D en raison de

leur faible nombre. Dans ce cas, l'apparition de ces cercles pourrait alors être corrélée à la taille des télomères. Chez la levure, ces mini-cercles sont issus de larges délétions télomériques régulant la taille des télomères anormalement longs (Bucholc et al., 2001). Par analogie, nous pouvons supposer que ces mini-cercles soient la manifestation d'une régulation de la longueur des télomères.

Pour ces cercles, deux rôles sont envisagés:

(i) soit ils proviennent de la délétion de télomères anormalement longs, dans ce cas ils apportent la preuve d'une régulation de la longueur des télomères dans les cellules humaines. Cette hypothèse implique l'existence d'une taille seuil. A partir d'une certaine taille, des mécanismes seraient mis en place afin de contrebalancer ces fluctuations et restaurer une taille adéquate. Selon cette hypothèse, les télomères des cellules MRE11^{KD} ne sont pas suffisamment longs pour activer ces processus à l'origine des mini-cercles. Une analyse du profil des télomères et des mini-cercles dans les cellules NBS1^{KD} au cours du temps permettrait d'établir une taille critique au-delà de laquelle les cercles apparaissent, de déterminer la durée de vie de ces cercles et si leurs disparitions coïncident avec une restauration de la taille.

(ii) soit ces cercles constituent des matrices pour une élongation rapide par le mécanisme dit de cercle roulant comme déjà été décrit chez la levure *K.Lactis* (McEachern and Blackburn, 1996). Cette seconde théorie considère que les cercles générés vont en fait permettre à la cellule d'amplifier plus rapidement les télomères (cf rolling circle dans paragraphe ALT).

Ces hypothèses se heurtent à quelques contradictions, la plus flagrante concerne l'implication de NBS1 dans la formation des cercles télomériques. En effet, il a été démontré que l'inhibition de NBS1 abolit la formation des cercles télomériques dans les cellules ALT. De plus, les délétions générées par le mutant de TRF2 sont aussi abolies en absence de NBS1. NBS1 serait donc requis pour la formation de ces cercles. Or, dans les clones étudiés et notamment le clone 32.2, des cercles apparaissent en absence de NBS1 allant à l'encontre des faits présentés ci-dessus.

Toutefois on ne peut résumer nos résultats à un artefact. Chez *A.Thaliana* les mutants AtMRE11-1 et AtMRE11-2 présentent aussi des télomères longs (Bundock and Hooykaas, 2002), cette élongation est aussi retrouvée dans une minorité de cellules AtRAD50^{-/-} (Gallego and White, 2001) et conforte un peu plus notre hypothèse selon laquelle le complexe MRN limiterait les événements de recombinaison télomérique indésirables. Ces conclusions sont restreintes à l'analyse d'un clone puisque le clone 32.11, pour lequel l'extinction de NBS1 est moins

prononcée, présente une légère augmentation de la taille mais dépourvues de cercles extrachromosomiques.

Une réversion de phénotype serait souhaitable, mais les analyses cytogénétiques révèlent une intégration des plasmides en positions interstitielles dans les clones NBS1^{KD} écartant toute possibilité de réversion. Par contre celle-ci reste envisageable pour les clones MRE11^{KD} puisque le plasmide est accroché aux chromosomes et non pas intégré comme c'est le cas dans les autres clones MRN^{KD}.

Homme	Construction	Lignées	Sensibilité aux RI	Instabilité chromosomique	Réparation	Taille des télomères	fusions	Autre	Références
DNA-PKcs	shRNA (J+5)	WTK1	+	+	ND	ND	+/- (+T)	Fusions radioinduites	Zhang 2006
	siRNA (J+3)	WTK1,TK6	++ (ions lourds)	++	ND	ND	++ (+T)	Mutations	Zhang 2005
	IC86621(24h)	MEFs	ND	ND	ND	ND	++ (+T)		Bailey 2004
	ShRNA(J>300)	Hela	++	++	NHEJ	Long	-		
Ku	siRNA (J+3)	Hela, U2OS	ND	+++	ND	Court	+++ (+/-T)	Apoptose après J+5c	Jaco 2005
	Ku86+/-	HCT116	ND	+++	ND	Court	+++ (+/-T)	Élongation du 3'	Myung 2004
	Ku86+/- & Ku70+/-	HCT116	Insensible VP16	ND	ND	Long	-	ND	Uegaki 2006
	Ku86+/-	HCT116	++ VP16 sensible	ND	ND	ND	ND	ND	Li G 2006
	ShRNA(J+7)	Hela	ND	++	ND	-	-	Mort cellulaire J+10	
Ligase IV	Patients	180BR 411BR	+++	ND	ND	Court	ND	ND	Cabuy 2005
		180BR	+++	ND	ND	-	ND	ND	Adda Di Fagnagna 2001
	ShRNA (J>150)	Hela	+++	+++	NHEJ	Court	-		
Xrcc4	ShRNA (J>150)	Hela	+++	+++	NHEJ	Court	-		
Rad52	ShRNA(J>150)	Hela	+/-	++	ND	+/-	-		
Rad51	ShRNA(J>150)	Hela	+/-	++	ND	+/-	-		
Rad54	ShRNA (J>150)	Hela	+/-	++	NHEJ	+/-	-		
Rad51D	shRNA (J+7)	VA13	ND	++	ND	Court (Hétérogène)	++ (+/-T)	Apoptose	Tarsounas 2004
BRCA1	BRCA1 DN	SVCT Hela MCF7 III.7	ND	++	ND	Court	++	Ponts Anaphasiques	French 2006
	BRCA1-/+	GM14090 HCC1937	ND	++	ND	-	++	Ponts Anaphasiques	Al Wahiby 2006
P53	P53-DN + OE Cycline D1	OKF6	ND	ND	ND	Longs Hétérogènes	ND	Prolifération (++) Activation ALT	Opitz 2001
	P53wt-TA	HIO107 (ALT)	ND	ND	ND	ND	ND	Prolifération (-) Répression ALT	Razak 2004
	P53 R175H-TA P53 R273H-TA	HIO107 (ALT)	ND	ND	ND	ND	ND	Prolifération (++) ALT	
	OE P53 R175H	HCA17.3	Résistant	-	HR	-	-	Pas de Modif T-SCF	
NBS	SiRNA	Hela BJ/HERT IMR90	ND	ND	ND	-	-	Reduction du 3'	Chai 2006
	SiRNA (J+3)	WTK1,TK6	++	++	ND	ND	++ (+T)	Mutations	Zhang 2006
	NBS- S343A/S248A	EJ30	ND	++	ND	-	-	Perte télomère	Bai 2003
	Patients	GM07166 347BR	++ ++	++ ++	ND ND	Court Court	+ -	-	Ranagathan 2001 Cabuy 2003
	ShRNA	GM837 (ALT)	ND	ND	ND	Court (Hétérogène)	-	d'apbs	Zhong 2007
	ShRNA	Hela	++	++	NHEJ	Long	-	Cercles T	
Mre11	SiRNA	Hela BJ/HERT IMR90	ND	ND	ND	-	-	Reduction du 3'	Chai 2006
	ShRNA	Hela	ND	ND	ND	-	-	Incorporation TdT	Verdun 2005
	ShRNA	GM837 (ALT)	ND	ND	ND	Court (Hétérogène)	-	d'apbs	Zhong 2007
	Patients	ATLD	++	ND	ND	ND	ND		
	ShRNA	Hela	++	++	NHEJ	Long	-		
Rad50	SiRNA	Hela BJ/HERT IMR90	ND	ND	ND	-	-	Reduction du 3'	Chai 2006
	ShRNA	GM837 (ALT)	ND	ND	ND	Court (Hétérogène)	-	d'apbs	Zhong 2007
	OE RAD50- Rap1	HT1080	ND	ND	ND	Long	-		Wu 2007
	ShRNA	Hela	-	++	-	-	-		

Figure 21 : Tableau récapitulatif de la contribution des protéines télomériques et de la recombinaison

Dans les cellules humaines intégrant nos résultats. (ND : non déterminée ; (-) pas d'effet ; (+) effet modéré, (++) augmentation significative, (+++) effet drastique ; (-T) sans séquences télomériques à la jonction, (+T) avec séquences télomériques à la jonction)

Conclusions - Perspectives :

L'altération des propriétés télomériques mène à une instabilité génomique favorisant l'émergence des cancers. Ainsi, les télomères constituent une structure unique qui permet à la cellule de distinguer ces extrémités de ces chromosomes des cassures génomiques induites. De nombreuses protéines de la réparation et plus particulièrement de la recombinaison sont présentes de manière transitoire ou permanente au niveau des régions télomériques. Leur contribution dans la maintenance des télomères est évidente. A ce titre, nous avons étudié l'implication de ces protéines dans la protection et la régulation de la taille des télomères. A l'aide d'un système très innovant, nous avons pu invalider spécifiquement les gènes du NHEJ (DNA-PKcs, Ku70, LIGIV, XRCC4, de la RH (RAD51, RAD54, RAD52) et du complexe MRN. Nos résultats, présentés dans le tableau ci-joint (Figure 21), mettent en perspectives les travaux déjà décrits dans la littérature soulignant leur implication dans la stabilité et l'homéostasie télomérique à des degrés plus ou moins prononcés. Par ailleurs, nos travaux suggèrent une contribution distincte de ces deux voies dans la biologie télomérique, inhérente à leurs modes de fonctionnement. Cette complémentarité pourrait traduire en fait un recrutement séquentiel de ces deux voies aux télomères.

L'intégrité télomérique est constamment menacée mais ces agresseurs changent selon la progression du cycle. Les télomères déprotégés sont la cible d'événements de fusions en phase G1 phase qui voit le NHEJ majoritaire. En revanche, pendant la phase S, ces télomères dysfonctionnels ont plus souvent recours à la RH, entraînant des remaniements télomériques majeurs parfois délétères pour la cellule. A l'image des cassures doubles brins, la phase du cycle affecterait le choix des voies de réparation lors de l'endommagement des télomères. Chez la levure, le choix des voies de recombinaison est orchestré par la cycline CDK1 (Ira et al., 2004). Par analogie, il a été proposé que l'activation de CDK1 régule l'intervention des mécanismes de recombinaison aux télomères (Frank et al., 2006). Ainsi, pendant la phase G1, la faible activité CDK1 favorise la fusion des télomères et empêche l'accès de la télomérase. Par contre, durant la phase S, CDK1 autoriserait l'action de la RH et de la télomérase aux télomères. L'une des clefs de voûte de cette régulation serait en fait le complexe MRX. En effet, son activité serait contrôlé selon l'activité CDK1 et modulerait par conséquent la résection des télomères selon le cycle

(Frank et al., 2006). En phase G1, en absence d'activité CDK1, les télomères ont recours au NHEJ pour fusionner. Par contre en phase S, le complexe MRX prendrait en charge les extrémités des chromosomes et faciliterait l'action de la recombinaison (élongation ou délétion) et de la télomérase.

Ce modèle attrayant permettrait de prédire le devenir des télomères en fonction du cycle cellulaire. Dans cette optique, il serait intéressant d'extrapoler ce modèle aux cellules humaines et d'identifier les différents partenaires susceptibles de contrôler, selon la phase du cycle, l'accès des différents mécanismes de recombinaison aux télomères. Pour cela, la mise en place d'un modèle nous permettant de visualiser les fusions sera plus judicieux afin d'établir les contributions du NHEJ dans la genèse des fusions au cours du cycle cellulaire

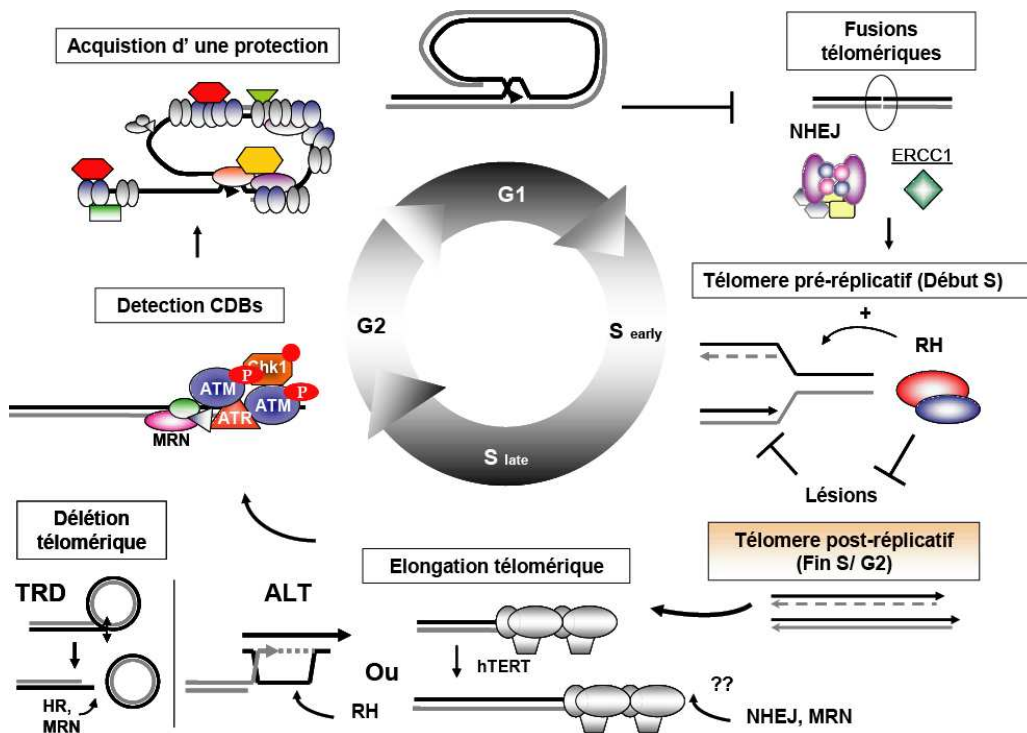


Figure 22: Contribution du NHEJ et de la RH dans la maintenance des télomères conditionées par la phase du cycle.

En phase G1, les télomères endommagés seraient pris en charge par le NHEJ, mécanisme de recombinaison majoritaire durant cette phase de cycle. Pendant la réplication, la RH favoriserait la progression de la fourche si des lésions apparaissent dans les séquences télomériques. Après la synthèse de l'ADN, les télomères néosynthétisés sont pris en charges par les systèmes de veille (MRN/ATM) qui les reconnaissent en tant que séquences endommagées. Cette étape permet par la suite le recrutement de protéines télomériques et de la recombinaison qui facilite l'acquisition d'une structure fonctionnelle protégeant les extrémités des chromosomes. Dans le même temps, la taille de ces télomères peut être modifiée, ainsi les télomères déprotégés constituent un substrat privilégié pour la télomérase ou la RH.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aiyar, A., Tyree, C., and Sugden, B. (1998). The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *Embo J* *17*, 6394-6403.
- Al-Wahiby, S., and Slijepcevic, P. (2005). Chromosomal aberrations involving telomeres in BRCA1 deficient human and mouse cell lines. *Cytogenet Genome Res* *109*, 491-496.
- Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., and Barrett, J. C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 13742-13747.
- Allen, C., Halbrook, J., and Nickoloff, J. A. (2003). Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining. *Mol Cancer Res* *1*, 913-920.
- Allen, C., Kurimasa, A., Brenneman, M. A., Chen, D. J., and Nickoloff, J. A. (2002). DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 3758-3763.
- Allshire, R. C., Dempster, M., and Hastie, N. D. (1989). Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res* *17*, 4611-4627.
- Allsopp, R. C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, A. B., Greider, C. W., and Harley, C. B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 10114-10118.
- Ambrus, A., Chen, D., Dai, J., Bialis, T., Jones, R. A., 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.
- Amiard, S., Doudeau, M., Pinte, S., Poulet, A., Lenain, C., Faivre-Moskalenko, C., Angelov, D., Hug, N., Vindigni, A., Bouvet, P., *et al.* (2007). A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion. *Nat Struct Mol Biol* *14*, 147-154.
- Ancelin, K., Brunori, M., Bauwens, S., Koering, C. E., Brun, C., Ricoul, M., Pommier, J. P., Sabatier, L., and Gilson, E. (2002). Targeting assay to study the cis functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2. *Mol Cell Biol* *22*, 3474-3487.
- Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* *279*, 55117-55126.

Avilion, A. A., Piatyszek, M. A., Gupta, J., Shay, J. W., Bacchetti, S., and Greider, C. W. (1996). Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res* 56, 645-650.

Azzalin, C. M., Reichenback, P., Khoriantuli, L., Giulotto, E., and Lingner, J. (2007). Telomeric Repeat Containing RNA and RNA Surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends. *Science*.

Bachand, F., and Autexier, C. (2001). Functional regions of human telomerase reverse transcriptase and human telomerase RNA required for telomerase activity and RNA-protein interactions. *Mol Cell Biol* 21, 1888-1897.

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

Bai, Y., and Murnane, J. P. (2003). Telomere instability in a human tumor cell line expressing NBS1 with mutations at sites phosphorylated by ATM. *Mol Cancer Res* 1, 1058-1069.

Bailey, S. M., Brenneman, M. A., and Goodwin, E. H. (2004a). Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase-negative cells. *Nucleic Acids Res* 32, 3743-3751.

Bailey, S. M., Brenneman, M. A., Halbrook, J., Nickoloff, J. A., Ullrich, R. L., and Goodwin, E. H. (2004b). The kinase activity of DNA-PK is required to protect mammalian telomeres. *DNA Repair (Amst)* 3, 225-233.

Bailey, S. M., Cornforth, M. N., Kurimasa, A., Chen, D. J., and Goodwin, E. H. (2001). Strand-specific postreplicative processing of mammalian telomeres. *Science* 293, 2462-2465.

Bailey, S. M., Meyne, J., Chen, D. J., Kurimasa, A., Li, G. C., Lehnert, B. E., and Goodwin, E. H. (1999). DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14899-14904.

Baumann, P., and Cech, T. R. (2000). Protection of telomeres by the Ku protein in fission yeast. *Mol Biol Cell* 11, 3265-3275.

Baumann, P., and Cech, T. R. (2001). Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* 292, 1171-1175.

Baumann, P., Podell, E., and Cech, T. R. (2002). Human Pot1 (protection of telomeres) protein: cytoplasmic localization, gene structure, and alternative splicing. *Mol Cell Biol* 22, 8079-8087.

Baumann, P., and West, S. C. (1997). The human Rad51 protein: polarity of strand transfer and stimulation by hRP-A. *Embo J* 16, 5198-5206.

Baur, J. A., Zou, Y., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2001). Telomere position effect in human cells. *Science* 292, 2075-2077.

- Beattie, T. L., Zhou, W., Robinson, M. O., and Harrington, L. (2001). Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* *21*, 6151-6160.
- Bechter, O. E., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2004a). The frequency of homologous recombination in human ALT cells. *Cell Cycle* *3*, 547-549.
- Bechter, O. E., Zou, Y., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2003). Homologous recombination in human telomerase-positive and ALT cells occurs with the same frequency. *EMBO Rep* *4*, 1138-1143.
- Bechter, O. E., Zou, Y., Walker, W., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2004b). Telomeric recombination in mismatch repair deficient human colon cancer cells after telomerase inhibition. *Cancer Res* *64*, 3444-3451.
- Bender, C. F., Sikes, M. L., Sullivan, R., Huye, L. E., Le Beau, M. M., Roth, D. B., Mirzoeva, O. K., Oltz, E. M., and Petrini, J. H. (2002). Cancer predisposition and hematopoietic failure in Rad50(S/S) mice. *Genes Dev* *16*, 2237-2251.
- Benetti, R., Garcia-Cao, M., and Blasco, M. A. (2007a). Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. *Nat Genet* *39*, 243-250.
- Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I., Schotta, G., Klatt, P., Jenuwein, T., and Blasco, M. A. (2007b). Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and derepression of telomere recombination. *J Cell Biol* *178*, 925-936.
- Bertrand, P., Rouillard, D., Boulet, A., Levalois, C., Soussi, T., and Lopez, B. S. (1997). Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. *Oncogene* *14*, 1117-1122.
- Bianchi, A., Smith, S., Chong, L., Elias, P., and de Lange, T. (1997). TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. *Embo J* *16*, 1785-1794.
- Biard, D. S. (2007). Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucleic Acids Res* *35*, 3535-3550.
- Biard, D. S., Despras, E., Sarasin, A., and Angulo, J. F. (2005). Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimick human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol Cancer Res* *3*, 519-529.
- Biessmann, H., Mason, J. M., Ferry, K., d'Hulst, M., Valgeirsdottir, K., Traverse, K. L., and Pardue, M. L. (1990). Addition of telomere-associated HeT DNA sequences "heals" broken chromosome ends in *Drosophila*. *Cell* *61*, 663-673.
- Bilaud, T., Brun, C., Ancelin, K., Koering, C. E., Laroche, T., and Gilson, E. (1997). Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* *17*, 236-239.
- Blackburn, E. H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell* *106*, 661-673.

Blasco, M. A. (2007). The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nat Rev Genet* 8, 299-309.

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

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

Boule, J. B., Vega, L. R., and Zakian, V. A. (2005). The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. *Nature* 438, 57-61.

Boulton, S. J., and Jackson, S. P. (1996). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res* 24, 4639-4648.

Bradshaw, P. S., Stavropoulos, D. J., and Meyn, M. S. (2005). Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nat Genet* 37, 193-197.

Brenner, A. J., Stampfer, M. R., and Aldaz, C. M. (1998). Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. *Oncogene* 17, 199-205.

Brewer, B. J., and Fangman, W. L. (1988). A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell* 55, 637-643.

Broccoli, D., Chong, L., Oelmann, S., Fernald, A. A., Marziliano, N., van Steensel, B., Kipling, D., Le Beau, M. M., and de Lange, T. (1997). Comparison of the human and mouse genes encoding the telomeric protein, TRF1: chromosomal localization, expression and conserved protein domains. *Hum Mol Genet* 6, 69-76.

Bryan, T. M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M. A., and Reddel, R. R. (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 3, 1271-1274.

Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., and Reddel, R. R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo J* 14, 4240-4248.

Bucholtz, M., Park, Y., and Lustig, A. J. (2001). Intrachromatid excision of telomeric DNA as a mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21, 6559-6573.

Bundock, P., and Hooykaas, P. (2002). Severe developmental defects, hypersensitivity to DNA-damaging agents, and lengthened telomeres in *Arabidopsis* MRE11 mutants. *Plant Cell* 14, 2451-2462.

Butz, K., Ristriani, T., Hengstermann, A., Denk, C., Scheffner, M., and Hoppe-Seyler, F. (2003). siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene* 22, 5938-5945.

Cabuy, E., Newton, C., Joksic, G., Woodbine, L., Koller, B., Jeggo, P. A., and Slijepcevic, P. (2005). Accelerated telomere shortening and telomere abnormalities in radiosensitive cell lines. *Radiat Res* 164, 53-62.

Callebaut, I., Moshous, D., Mornon, J. P., and de Villartay, J. P. (2002). Metallo-beta-lactamase fold within nucleic acids processing enzymes: the beta-CASP family. *Nucleic Acids Res* 30, 3592-3601.

Capper, R., Britt-Compton, B., Tankimanova, M., Rowson, J., Letsolo, B., Man, S., Haughton, M., and Baird, D. M. (2007). The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells. *Genes Dev* 21, 2495-2508.

Carney, J. P., Maser, R. S., Olivares, H., Davis, E. M., Le Beau, M., Yates, J. R., 3rd, Hays, L., Morgan, W. F., and Petrini, J. H. (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93, 477-486.

Castella, M., Puerto, S., Creus, A., Marcos, R., and Surrallés, J. (2007). Telomere length modulates human radiation sensitivity in vitro. *Toxicol Lett*.

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

Celli, G. B., Denchi, E. L., and de Lange, T. (2006). Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination. *Nat Cell Biol* 8, 885-890.

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

Chai, W., Sfeir, A. J., Hoshiyama, H., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2006). The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres. *EMBO Rep* 7, 225-230.

Chan, C. S., and Tye, B. K. (1983). Organization of DNA sequences and replication origins at yeast telomeres. *Cell* 33, 563-573.

Chan, W. M., Siu, W. Y., Lau, A., and Poon, R. Y. (2004). How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Mol Cell Biol* 24, 3536-3551.

- Chang, M., Arneric, M., and Lingner, J. (2007). Telomerase repeat addition processivity is increased at critically short telomeres in a Tel1-dependent manner in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 21, 2485-2494.
- Chen, X. Q., Bonnefoi, H., Pelte, M. F., Lyautey, J., Lederrey, C., Movarekhi, S., Schaeffer, P., Mulcahy, H. E., Meyer, P., Stroun, M., and Anker, P. (2000). Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 6, 3823-3826.
- Chi, N. W., and Lodish, H. F. (2000). Tankyrase is a golgi-associated mitogen-activated protein kinase substrate that interacts with IRAP in GLUT4 vesicles. *J Biol Chem* 275, 38437-38444.
- Chiang, Y. J., Kim, S. H., Tessarollo, L., Campisi, J., and Hodes, R. J. (2004). Telomere-associated protein TIN2 is essential for early embryonic development through a telomerase-independent pathway. *Mol Cell Biol* 24, 6631-6634.
- Chikashige, Y., and Hiraoka, Y. (2001). Telomere binding of the Rap1 protein is required for meiosis in fission yeast. *Curr Biol* 11, 1618-1623.
- Chin, L., Artandi, S. E., Shen, Q., Tam, A., Lee, S. L., Gottlieb, G. J., Greider, C. W., and DePinho, R. A. (1999). p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell* 97, 527-538.
- Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P., and de Lange, T. (1995). A human telomeric protein. *Science* 270, 1663-1667.
- Cohen, S. B., Graham, M. E., Lovrecz, G. O., Bache, N., Robinson, P. J., and Reddel, R. R. (2007). Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* 315, 1850-1853.
- Compton, S. A., Choi, J. H., Cesare, A. J., Ozgur, S., and Griffith, J. D. (2007). Xrcc3 and Nbs1 are required for the production of extrachromosomal telomeric circles in human alternative lengthening of telomere cells. *Cancer Res* 67, 1513-1519.
- Cook, B. D., Dynek, J. N., Chang, W., Shostak, G., and Smith, S. (2002). Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol Cell Biol* 22, 332-342.
- Counter, C. M., Ailion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., and Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J* 11, 1921-1929.
- Crabbe, L., Jauch, A., Naeger, C. M., Holtgreve-Grez, H., and Karlseder, J. (2007). Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2205-2210.
- Crabbe, L., Verdun, R. E., Haggblom, C. I., and Karlseder, J. (2004). Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science* 306, 1951-1953.

- Cristofari, G., Adolf, E., Reichenbach, P., Sikora, K., Terns, R. M., Terns, M. P., and Lingner, J. (2007). Human telomerase RNA accumulation in cajal bodies facilitates telomerase recruitment to telomeres and telomere elongation. *Mol Cell* 27, 882-889.
- d'Adda di Fagagna, F., Hande, M. P., Tong, W. M., Lansdorp, P. M., Wang, Z. Q., and Jackson, S. P. (1999). Functions of poly(ADP-ribose) polymerase in controlling telomere length and chromosomal stability. *Nat Genet* 23, 76-80.
- d'Adda di Fagagna, F., Hande, M. P., Tong, W. M., Roth, D., Lansdorp, P. M., Wang, Z. Q., and Jackson, S. P. (2001). Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Curr Biol* 11, 1192-1196.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P., and Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194-198.
- d'Adda di Fagagna, F., Teo, S. H., and Jackson, S. P. (2004). Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev* 18, 1781-1799.
- Dantzer, F., Giraud-Panis, M. J., Jaco, I., Ame, J. C., Schultz, I., Blasco, M., Koering, C. E., Gilson, E., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G., and Schreiber, V. (2004). Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Mol Cell Biol* 24, 1595-1607.
- Daza, P., Reichenberger, S., Gottlich, B., Hagmann, M., Feldmann, E., and Pfeiffer, P. (1996). Mechanisms of nonhomologous DNA end-joining in frogs, mice and men. *Biol Chem* 377, 775-786.
- de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19, 2100-2110.
- Denchi, E. L., and de Lange, T. (2007). Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* 448, 1068-1071.
- Deng, Z., Dheekollu, J., Broccoli, D., Dutta, A., and Lieberman, P. M. (2007). The origin recognition complex localizes to telomere repeats and prevents telomere-circle formation. *Curr Biol* 17, 1989-1995.
- der-Sarkissian, H., Bacchetti, S., Cazes, L., and Londono-Vallejo, J. A. (2004). The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells. *Oncogene* 23, 1221-1228.
- Despras, E., Pfeiffer, P., Salles, B., Calsou, P., Kuhfittig-Kulle, S., Angulo, J. F., and Biard, D. S. (2007). Long-term XPC silencing reduces DNA double-strand break repair. *Cancer Res* 67, 2526-2534.
- Di Virgilio, M., and Gautier, J. (2005). Repair of double-strand breaks by nonhomologous end joining in the absence of Mre11. *J Cell Biol* 171, 765-771.

DiBiase, S. J., Zeng, Z. C., Chen, R., Hyslop, T., Curran, W. J., Jr., and Iliakis, G. (2000). DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus. *Cancer Res* 60, 1245-1253.

Dimitrova, N., and de Lange, T. (2006). MDC1 accelerates nonhomologous end-joining of dysfunctional telomeres. *Genes Dev* 20, 3238-3243.

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and 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.

Donigian, J. R., and de Lange, T. (2007). The role of the poly(ADP-ribose) polymerase tankyrase1 in telomere length control by the TRF1 component of the shelterin complex. *J Biol Chem* 282, 22662-22667.

Downs, J. A., Kosmidou, E., Morgan, A., and Jackson, S. P. (2003). Suppression of homologous recombination by the *Saccharomyces cerevisiae* linker histone. *Mol Cell* 11, 1685-1692.

Dragon, F., Pogacic, V., and Filipowicz, W. (2000). In vitro assembly of human H/ACA small nucleolar RNPs reveals unique features of U17 and telomerase RNAs. *Mol Cell Biol* 20, 3037-3048.

Drayton, S., and Peters, G. (2002). Immortalisation and transformation revisited. *Curr Opin Genet Dev* 12, 98-104.

Dubrana, K., Perrod, S., and Gasser, S. M. (2001). Turning telomeres off and on. *Curr Opin Cell Biol* 13, 281-289.

Ducray, C., Pommier, J. P., Martins, L., Boussin, F. D., and Sabatier, L. (1999). Telomere dynamics, end-to-end fusions and telomerase activation during the human fibroblast immortalization process. *Oncogene* 18, 4211-4223.

Dudognon, C., Pendino, F., Hillion, J., Saumet, A., Lanotte, M., and Segal-Bendirdjian, E. (2004). Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance. *Oncogene* 23, 7469-7474.

Dunham, M. A., Neumann, A. A., Fasching, C. L., and Reddel, R. R. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* 26, 447-450.

Dunn, B., Szauter, P., Pardue, M. L., and Szostak, J. W. (1984). Transfer of yeast telomeres to linear plasmids by recombination. *Cell* 39, 191-201.

Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15, 188-200.

- Ellis, N. A., Goodfellow, P. J., Pym, B., Smith, M., Palmer, M., Frischauf, A. M., and Goodfellow, P. N. (1989). The pseudoautosomal boundary in man is defined by an Alu repeat sequence inserted on the Y chromosome. *Nature* *337*, 81-84.
- Ellison, V., and Stillman, B. (2003). Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA. *PLoS Biol* *1*, E33.
- Espejel, S., Franco, S., Rodriguez-Perales, S., Bouffler, S. D., Cigudosa, J. C., and Blasco, M. A. (2002a). Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *Embo J* *21*, 2207-2219.
- Espejel, S., Franco, S., Sgura, A., Gae, D., Bailey, S. M., Taccioli, G. E., and Blasco, M. A. (2002b). Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance. *Embo J* *21*, 6275-6287.
- Espejel, S., Klatt, P., Menissier-de Murcia, J., Martin-Caballero, J., Flores, J. M., Taccioli, G., de Murcia, G., and Blasco, M. A. (2004a). Impact of telomerase ablation on organismal viability, aging, and tumorigenesis in mice lacking the DNA repair proteins PARP-1, Ku86, or DNA-PKcs. *J Cell Biol* *167*, 627-638.
- Espejel, S., Martin, M., Klatt, P., Martin-Caballero, J., Flores, J. M., and Blasco, M. A. (2004b). Shorter telomeres, accelerated ageing and increased lymphoma in DNA-PKcs-deficient mice. *EMBO Rep* *5*, 503-509.
- Fasching, C. L., Bower, K., and Reddel, R. R. (2005). Telomerase-independent telomere length maintenance in the absence of alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia bodies. *Cancer Res* *65*, 2722-2729.
- Fasching, C. L., Neumann, A. A., Muntoni, A., Yeager, T. R., and Reddel, R. R. (2007). DNA damage induces alternative lengthening of telomeres (ALT) associated promyelocytic leukemia bodies that preferentially associate with linear telomeric DNA. *Cancer Res* *67*, 7072-7077.
- Feldser, D., Strong, M. A., and Greider, C. W. (2006). Ataxia telangiectasia mutated (Atm) is not required for telomerase-mediated elongation of short telomeres. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 2249-2251.
- Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J., and et al. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* *269*, 1236-1241.
- Ferguson, D. O., Sekiguchi, J. M., Chang, S., Frank, K. M., Gao, Y., DePinho, R. A., and Alt, F. W. (2000). The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 6630-6633.
- Folini, M., Brambilla, C., Villa, R., Gandellini, P., Vignati, S., Paduano, F., Daidone, M. G., and Zaffaroni, N. (2005). 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. *Eur J Cancer* 41, 624-634.

Ford, L. P., Zou, Y., Pongracz, K., Gryaznov, S. M., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2001). Telomerase can inhibit the recombination-based pathway of telomere maintenance in human cells. *J Biol Chem* 276, 32198-32203.

Forsythe, H. L., Jarvis, J. L., Turner, J. W., Elmore, L. W., and Holt, S. E. (2001). Stable association of hsp90 and p23, but Not hsp70, with active human telomerase. *J Biol Chem* 276, 15571-15574.

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

Frank, C. J., Hyde, M., and Greider, C. W. (2006). Regulation of telomere elongation by the cyclin-dependent kinase CDK1. *Mol Cell* 24, 423-432.

Freibaum, B. D., and Counter, C. M. (2006). hSnm1B is a novel telomere-associated protein. *J Biol Chem* 281, 15033-15036.

French, J. D., Dunn, J., Smart, C. E., Manning, N., and Brown, M. A. (2006). Disruption of BRCA1 function results in telomere lengthening and increased anaphase bridge formation in immortalized cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 45, 277-289.

Fu, W., Begley, J. G., Killen, M. W., and Mattson, M. P. (1999). Anti-apoptotic role of telomerase in pheochromocytoma cells. *J Biol Chem* 274, 7264-7271.

Gallego, M. E., and White, C. I. (2001). RAD50 function is essential for telomere maintenance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1711-1716.

Garbe, J. C., Holst, C. R., Bassett, E., Tlsty, T., and Stampfer, M. R. (2007). Inactivation of p53 function in cultured human mammary epithelial cells turns the telomere-length dependent senescence barrier from agonescence into crisis. *Cell Cycle* 6, 1927-1936.

Garcia-Cao, M., Gonzalo, S., Dean, D., and Blasco, M. A. (2002). A role for the Rb family of proteins in controlling telomere length. *Nat Genet* 32, 415-419.

Garcia-Cao, M., O'Sullivan, R., Peters, A. H., Jenuwein, T., and Blasco, M. A. (2004). Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet* 36, 94-99.

Gilley, D., Tanaka, H., Hande, M. P., Kurimasa, A., Li, G. C., Oshimura, M., and Chen, D. J. (2001). DNA-PKcs is critical for telomere capping. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15084-15088.

Golub, E. I., Gupta, R. C., Haaf, T., Wold, M. S., and Radding, C. M. (1998). Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Res* 26, 5388-5393.

Golub, E. I., Kovalenko, O. V., Gupta, R. C., Ward, D. C., and Radding, C. M. (1997). Interaction of human recombination proteins Rad51 and Rad54. *Nucleic Acids Res* 25, 4106-4110.

Gomez-Millan, J., Goldblatt, E. M., Gryaznov, S. M., Mendonca, M. S., and Herbert, B. S. (2007). Specific telomere dysfunction induced by GRN163L increases radiation sensitivity in breast cancer cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 67, 897-905.

Gomez, M., Wu, J., Schreiber, V., Dunlap, J., Dantzer, F., Wang, Y., and Liu, Y. (2006). PARP1 Is a TRF2-associated poly(ADP-ribose)polymerase and protects eroded telomeres. *Mol Biol Cell* 17, 1686-1696.

Gonzalez-Suarez, E., Samper, E., Flores, J. M., and Blasco, M. A. (2000). Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nat Genet* 26, 114-117.

Gonzalez-Suarez, E., Samper, E., Ramirez, A., Flores, J. M., Martin-Caballero, J., Jorcano, J. L., and Blasco, M. A. (2001). Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *Embo J* 20, 2619-2630.

Gonzalo, S., and Blasco, M. A. (2005). Role of Rb family in the epigenetic definition of chromatin. *Cell Cycle* 4, 752-755.

Gonzalo, S., Garcia-Cao, M., Fraga, M. F., Schotta, G., Peters, A. H., Cotter, S. E., Eguia, R., Dean, D. C., Esteller, M., Jenuwein, T., and Blasco, M. A. (2005). Role of the RB1 family in stabilizing histone methylation at constitutive heterochromatin. *Nat Cell Biol* 7, 420-428.

Gonzalo, S., Jaco, I., Fraga, M. F., Chen, T., Li, E., Esteller, M., and Blasco, M. A. (2006). DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8, 416-424.

Goytisolo, F. A., Samper, E., Edmonson, S., Taccioli, G. E., and Blasco, M. A. (2001). The absence of the dna-dependent protein kinase catalytic subunit in mice results in anaphase bridges and in increased telomeric fusions with normal telomere length and G-strand overhang. *Mol Cell Biol* 21, 3642-3651.

Goytisolo, F. A., Samper, E., Martin-Caballero, J., Finnon, P., Herrera, E., Flores, J. M., Bouffler, S. D., and Blasco, M. A. (2000a). Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals. *J Exp Med* 192, 1625-1636.

Goytisolo, F. A., Samper, E., Martin-Caballero, J., Finnon, P., Herrera, E., Flores, J. M., Bouffler, S. D., and Blasco, M. A. (2000b). Short telomeres result in organismal hypersensitivity to ionizing radiation in mammals. *J Exp Med* 192, 1625-1636.

- Granotier, C., Pennarun, G., Riou, L., Hoffschir, F., Gauthier, L. R., De Cian, A., Gomez, D., Mandine, E., Riou, J. F., Mergny, J. L., *et al.* (2005). Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends. *Nucleic Acids Res* 33, 4182-4190.
- Gravel, S., Larrivee, M., Labrecque, P., and Wellinger, R. J. (1998). Yeast Ku as a regulator of chromosomal DNA end structure. *Science* 280, 741-744.
- Greider, C. W. (1991). Telomerase is processive. *Mol Cell Biol* 11, 4572-4580.
- Griffith, J. D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R. M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.
- Grobelny, J. V., Kulp-McEliece, M., and Broccoli, D. (2001). Effects of reconstitution of telomerase activity on telomere maintenance by the alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway. *Hum Mol Genet* 10, 1953-1961.
- Hammond, S. L., Ham, R. G., and Stampfer, M. R. (1984). Serum-free growth of human mammary epithelial cells: rapid clonal growth in defined medium and extended serial passage with pituitary extract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 5435-5439.
- Hanaoka, S., Nagadoi, A., Yoshimura, S., Aimoto, S., Li, B., de Lange, T., and Nishimura, Y. (2001). NMR structure of the hRap1 Myb motif reveals a canonical three-helix bundle lacking the positive surface charge typical of Myb DNA-binding domains. *J Mol Biol* 312, 167-175.
- Hande, P., Slijepcevic, P., Silver, A., Bouffler, S., van Buul, P., Bryant, P., and Lansdorp, P. (1999). Elongated telomeres in scid mice. *Genomics* 56, 221-223.
- Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D. K., and Allshire, R. C. (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 346, 866-868.
- Hayflick, L. (1965). The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37, 614-636.
- He, H., Multani, A. S., Cosme-Blanco, W., Tahara, H., Ma, J., Pathak, S., Deng, Y., and Chang, S. (2006). POT1b protects telomeres from end-to-end chromosomal fusions and aberrant homologous recombination. *Embo J* 25, 5180-5190.
- Hector, R. E., Shtofman, R. L., Ray, A., Chen, B. R., Nyun, T., Berkner, K. L., and Runge, K. W. (2007). Telp preferentially associates with short telomeres to stimulate their elongation. *Mol Cell* 27, 851-858.
- Hemann, M. T., Strong, M. A., Hao, L. Y., and Greider, C. W. (2001). The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107, 67-77.

Henderson, E., Hardin, C. C., Walk, S. K., Tinoco, I., Jr., and Blackburn, E. H. (1987). Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs. *Cell* *51*, 899-908.

Henderson, E. R., Moore, M., and Malcolm, B. A. (1990). Telomere G-strand structure and function analyzed by chemical protection, base analogue substitution, and utilization by telomerase in vitro. *Biochemistry* *29*, 732-737.

Henson, J. D., Hannay, J. A., McCarthy, S. W., Royds, J. A., Yeager, T. R., Robinson, R. A., Wharton, S. B., Jellinek, D. A., Arbuckle, S. M., Yoo, J., *et al.* (2005). 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* *11*, 217-225.

Henson, J. D., Neumann, A. A., Yeager, T. R., and Reddel, R. R. (2002). Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* *21*, 598-610.

Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P., Chen, D. J., and Sedivy, J. M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* *14*, 501-513.

Hockemeyer, D., Daniels, J. P., Takai, H., and de Lange, T. (2006). Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell* *126*, 63-77.

Hockemeyer, D., Sfeir, A. J., Shay, J. W., Wright, W. E., and de Lange, T. (2005). POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end. *Embo J* *24*, 2667-2678.

Holst, C. R., Nuovo, G. J., Esteller, M., Chew, K., Baylin, S. B., Herman, J. G., and Tlsty, T. D. (2003). Methylation of p16(INK4a) promoters occurs in vivo in histologically normal human mammary epithelia. *Cancer Res* *63*, 1596-1601.

Holt, S. E., Aisner, D. L., Baur, J., Tesmer, V. M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J. B., Morin, G. B., Toft, D. O., Shay, J. W., *et al.* (1999). Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev* *13*, 817-826.

Horikawa, I., Cable, P. L., Afshari, C., and Barrett, J. C. (1999). Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res* *59*, 826-830.

Hou, M., Wang, X., Popov, N., Zhang, A., Zhao, X., Zhou, R., Zetterberg, A., Bjorkholm, M., Henriksson, M., Gruber, A., and Xu, D. (2002). The histone deacetylase inhibitor trichostatin A derepresses the telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in human cells. *Exp Cell Res* *274*, 25-34.

Houghtaling, B. R., Cuttonaro, L., Chang, W., and Smith, S. (2004). A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2. *Curr Biol* *14*, 1621-1631.

- Hsu, H. L., Gilley, D., Blackburn, E. H., and Chen, D. J. (1999). Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 12454-12458.
- Hsu, H. L., Gilley, D., Galande, S. A., Hande, M. P., Allen, B., Kim, S. H., Li, G. C., Campisi, J., Kohwi-Shigematsu, T., and Chen, D. J. (2000). Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev* *14*, 2807-2812.
- Huang, J., and Dynan, W. S. (2002). Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic Acids Res* *30*, 667-674.
- Hultdin, M., Gronlund, E., Norrback, K. F., Just, T., Taneja, K., and Roos, G. (2001). Replication timing of human telomeric DNA and other repetitive sequences analyzed by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Exp Cell Res* *271*, 223-229.
- Ira, G., Pellicioli, A., Balijja, A., Wang, X., Fiorani, S., Carotenuto, W., Liberi, G., Bressan, D., Wan, L., Hollingsworth, N. M., *et al.* (2004). DNA end resection, homologous recombination and DNA damage checkpoint activation require CDK1. *Nature* *431*, 1011-1017.
- Iwano, T., Tachibana, M., Reth, M., and Shinkai, Y. (2004). Importance of TRF1 for functional telomere structure. *J Biol Chem* *279*, 1442-1448.
- Jaco, I., Munoz, P., and Blasco, M. A. (2004). Role of human Ku86 in telomere length maintenance and telomere capping. *Cancer Res* *64*, 7271-7278.
- Jaco, I., Munoz, P., Goytisolo, F., Wesoly, J., Bailey, S., Taccioli, G., and Blasco, M. A. (2003). Role of mammalian Rad54 in telomere length maintenance. *Mol Cell Biol* *23*, 5572-5580.
- Jacobs, J. J., and de Lange, T. (2004). Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr Biol* *14*, 2302-2308.
- Jady, B. E., Richard, P., Bertrand, E., and Kiss, T. (2006). Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol Biol Cell* *17*, 944-954.
- Jeggo, P., and O'Neill, P. (2002). The Greek Goddess, Artemis, reveals the secrets of her cleavage. *DNA Repair (Amst)* *1*, 771-777.
- Jeyapalan, J. N., Varley, H., Foxon, J. L., Pollock, R. E., Jeffreys, A. J., Henson, J. D., Reddel, R. R., and Royle, N. J. (2005). Activation of the ALT pathway for telomere maintenance can affect other sequences in the human genome. *Hum Mol Genet* *14*, 1785-1794.
- Jiang, W. Q., Zhong, Z. H., Henson, J. D., Neumann, A. A., Chang, A. C., and Reddel, R. R. (2005). Suppression of alternative lengthening of telomeres by Sp100-mediated sequestration of the MRE11/RAD50/NBS1 complex. *Mol Cell Biol* *25*, 2708-2721.

- Jiang, W. Q., Zhong, Z. H., Henson, J. D., and Reddel, R. R. (2007). Identification of candidate alternative lengthening of telomeres genes by methionine restriction and RNA interference. *Oncogene* 26, 4635-4647.
- Johnson, S. M., Shaw, J. A., and Walker, R. A. (2002). Sporadic breast cancer in young women: prevalence of loss of heterozygosity at p53, BRCA1 and BRCA2. *Int J Cancer* 98, 205-209.
- Kaminker, P. G., Kim, S. H., Taylor, R. D., Zebarjadian, Y., Funk, W. D., Morin, G. B., Yaswen, P., and Campisi, J. (2001). TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *J Biol Chem* 276, 35891-35899.
- Kang, S. S., Kwon, T., Kwon, D. Y., and Do, S. I. (1999). Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem* 274, 13085-13090.
- Kannouche, P., and Strydom, A. (2003). Xeroderma pigmentosum variant and error-prone DNA polymerases. *Biochimie* 85, 1123-1132.
- Kanoh, J., and Ishikawa, F. (2001). spRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast. *Curr Biol* 11, 1624-1630.
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, Y., Hardy, S., and de Lange, T. (1999). p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283, 1321-1325.
- Karlseder, J., Hoke, K., Mirzoeva, O. K., Bakkenist, C., Kastan, M. B., Petrini, J. H., and de Lange, T. (2004). The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS Biol* 2, E240.
- Karlseder, J., Kachatrian, L., Takai, H., Mercer, K., Hingorani, S., Jacks, T., and de Lange, T. (2003). Targeted deletion reveals an essential function for the telomere length regulator Trf1. *Mol Cell Biol* 23, 6533-6541.
- Keegan, C. E., Hutz, J. E., Else, T., Adamska, M., Shah, S. P., Kent, A. E., Howes, J. M., Beamer, W. G., and Hammer, G. D. (2005). Urogenital and caudal dysgenesis in adrenocortical dysplasia (acd) mice is caused by a splicing mutation in a novel telomeric regulator. *Hum Mol Genet* 14, 113-123.
- Kelleher, C., Kurth, I., and Lingner, J. (2005). Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro. *Mol Cell Biol* 25, 808-818.
- Kilburn, A. E., Shea, M. J., Sargent, R. G., and Wilson, J. H. (2001). Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability. *Mol Cell Biol* 21, 126-135.
- Kilian, A., Bowtell, D. D., Abud, H. E., Hime, G. R., Venter, D. J., Keese, P. K., Duncan, E. L., Reddel, R. R., and Jefferson, R. A. (1997). Isolation of a candidate human telomerase catalytic

subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* 6, 2011-2019.

Kim, J. S., Krasieva, T. B., Kurumizaka, H., Chen, D. J., Taylor, A. M., and Yokomori, K. (2005). Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *J Cell Biol* 170, 341-347.

Kim, N. W., Piatyszczek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., and Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.

Kim, S. H., Beausejour, C., Davalos, A. R., Kaminker, P., Heo, S. J., and Campisi, J. (2004). TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *J Biol Chem* 279, 43799-43804.

Kim, S. H., Kaminker, P., and Campisi, J. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* 23, 405-412.

Kishi, S., Zhou, X. Z., Ziv, Y., Khoo, C., Hill, D. E., Shiloh, Y., and Lu, K. P. (2001). Telomeric protein Pin2/TRF1 as an important ATM target in response to double strand DNA breaks. *J Biol Chem* 276, 29282-29291.

Koering, C. E., Pollice, A., Zibella, M. P., Bauwens, S., Puisieux, A., Brunori, M., Brun, C., Martins, L., Sabatier, L., Pulitzer, J. F., and Gilson, E. (2002). Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity. *EMBO Rep* 3, 1055-1061.

Kooistra, R., Hooykaas, P. J., and Steensma, H. Y. (2004). Efficient gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 21, 781-792.

Krutilina, R. I., Oei, S., Buchlow, G., Yau, P. M., Zalensky, A. O., Zalenskaya, I. A., Bradbury, E. M., and Tomilin, N. V. (2001). A negative regulator of telomere-length protein trf1 is associated with interstitial (TTAGGG)_n blocks in immortal Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 471-475.

Kumata, M., Shimizu, M., Oshimura, M., Uchida, M., and Tsutsui, T. (2002). Induction of cellular senescence in a telomerase negative human immortal fibroblast cell line, LCS-AF.1-3, by human chromosome 6. *Int J Oncol* 21, 851-856.

Kurumizaka, H., Aihara, H., Kagawa, W., Shibata, T., and Yokoyama, S. (1999). Human Rad51 amino acid residues required for Rad52 binding. *J Mol Biol* 291, 537-548.

Kyo, S., and Inoue, M. (2001). [Telomerase inhibitor]. *Gan To Kagaku Ryoho* 28, 614-621.

Lansdorp, P. M. (1995). Telomere length and proliferation potential of hematopoietic stem cells. *J Cell Sci* 108 (Pt 1), 1-6.

Lansdorp, P. M. (1996). Close encounters of the PNA kind. *Nat Biotechnol* 14, 1653.

- Lansdorp, P. M. (1997). Lessons from mice without telomerase. *J Cell Biol* 139, 309-312.
- Laposa, R. R., Feeney, L., and Cleaver, J. E. (2003). Recapitulation of the cellular xeroderma pigmentosum-variant phenotypes using short interfering RNA for DNA polymerase H. *Cancer Res* 63, 3909-3912.
- Larrivee, M., LeBel, C., and Wellinger, R. J. (2004). The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes Dev* 18, 1391-1396.
- Larrivee, M., and Wellinger, R. J. (2006). Telomerase- and capping-independent yeast survivors with alternate telomere states. *Nat Cell Biol* 8, 741-747.
- Latre, L., Tusell, L., Martin, M., Miro, R., Egozcue, J., Blasco, M. A., and Genesca, A. (2003). Shortened telomeres join to DNA breaks interfering with their correct repair. *Exp Cell Res* 287, 282-288.
- Laud, P. R., Multani, A. S., Bailey, S. M., Wu, L., Ma, J., Kingsley, C., Lebel, M., Pathak, S., DePinho, R. A., and Chang, S. (2005). Elevated telomere-telomere recombination in WRN-deficient, telomere dysfunctional cells promotes escape from senescence and engagement of the ALT pathway. *Genes Dev* 19, 2560-2570.
- Le, S., Moore, J. K., Haber, J. E., and Greider, C. W. (1999). RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* 152, 143-152.
- Leber, R., Wise, T. W., Mizuta, R., and Meek, K. (1998). The XRCC4 gene product is a target for and interacts with the DNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 273, 1794-1801.
- Lee, K. H., Rudolph, K. L., Ju, Y. J., Greenberg, R. A., Cannizzaro, L., Chin, L., Weiler, S. R., and DePinho, R. A. (2001). Telomere dysfunction alters the chemotherapeutic profile of transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3381-3386.
- Lei, M., Podell, E. R., and Cech, T. R. (2004). Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1223-1229.
- Lenain, C., Bauwens, S., Amiard, S., Brunori, M., Giraud-Panis, M. J., and Gilson, E. (2006). The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair. *Curr Biol* 16, 1303-1310.
- Li, B., and de Lange, T. (2003). Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. *Mol Biol Cell* 14, 5060-5068.
- Li, B., and Lustig, A. J. (1996). A novel mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 10, 1310-1326.

- Li, B., Oestreich, S., and de Lange, T. (2000). Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* 101, 471-483.
- Li, H., Zhao, L., Yang, Z., Funder, J. W., and Liu, J. P. (1998). Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 273, 33436-33442.
- Limoli, C. L., Giedzinski, E., Bonner, W. M., and Cleaver, J. E. (2002a). UV-induced replication arrest in the xeroderma pigmentosum variant leads to DNA double-strand breaks, gamma -H2AX formation, and Mre11 relocalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 233-238.
- Limoli, C. L., Laposa, R., and Cleaver, J. E. (2002b). DNA replication arrest in XP variant cells after UV exposure is diverted into an Mre11-dependent recombination pathway by the kinase inhibitor wortmannin. *Mutat Res* 510, 121-129.
- Lin, C. Y., Chang, H. H., Wu, K. J., Tseng, S. F., Lin, C. C., Lin, C. P., and Teng, S. C. (2005). Extrachromosomal telomeric circles contribute to Rad52-, Rad50-, and polymerase delta-mediated telomere-telomere recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4, 327-336.
- Lin, Y., Uemura, H., Fujinami, K., Hosaka, M., Iwasaki, Y., Kitamura, H., Harada, M., and Kubota, Y. (1998). Detection of telomerase activity in prostate needle-biopsy samples. *Prostate* 36, 121-128.
- Linke, S. P., Sengupta, S., Khabie, N., Jeffries, B. A., Buchhop, S., Miska, S., Henning, W., Pedoux, R., Wang, X. W., Hofseth, L. J., *et al.* (2003). p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Res* 63, 2596-2605.
- Liu, D., Safari, A., O'Connor, M. S., Chan, D. W., Laegeler, A., Qin, J., and Songyang, Z. (2004). PTPN22 interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nat Cell Biol* 6, 673-680.
- Loayza, D., and De Lange, T. (2003). POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* 423, 1013-1018.
- Loayza, D., Parsons, H., Donigian, J., Hoke, K., and de Lange, T. (2004). 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* 279, 13241-13248.
- Lobrich, M., and Jeggo, P. A. (2005). Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow. *DNA Repair (Amst)* 4, 749-759.
- Londono-Vallejo, J. A., Der-Sarkissian, H., Cazes, L., Bacchetti, S., and Reddel, R. R. (2004). Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange. *Cancer Res* 64, 2324-2327.
- Lopatina, N. G., Poole, J. C., Saldanha, S. N., Hansen, N. J., Key, J. S., Pita, M. A., Andrews, L. G., and Tollefsbol, T. O. (2003). Control mechanisms in the regulation of telomerase reverse

transcriptase expression in differentiating human teratocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 650-659.

Luiten, R. M., Pene, J., Yssel, H., and Spits, H. (2003). Ectopic hTERT expression extends the life span of human CD4+ helper and regulatory T-cell clones and confers resistance to oxidative stress-induced apoptosis. *Blood* 101, 4512-4519.

Lundblad, V., and Blackburn, E. H. (1993). An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* 73, 347-360.

Lustig, A. J. (2003). Clues to catastrophic telomere loss in mammals from yeast telomere rapid deletion. *Nat Rev Genet* 4, 916-923.

Machwe, A., Xiao, L., and Orren, D. K. (2004). TRF2 recruits the Werner syndrome (WRN) exonuclease for processing of telomeric DNA. *Oncogene* 23, 149-156.

Majka, J., Binz, S. K., Wold, M. S., and Burgers, P. M. (2006). Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *J Biol Chem* 281, 27855-27861.

Makarov, V. L., Hirose, Y., and Langmore, J. P. (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* 88, 657-666.

Malkova, A., Ivanov, E. L., and Haber, J. E. (1996). Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7131-7136.

Marciniak, R. A., Cavazos, D., Montellano, R., Chen, Q., Guarente, L., and Johnson, F. B. (2005). A novel telomere structure in a human alternative lengthening of telomeres cell line. *Cancer Res* 65, 2730-2737.

Marechal, V., Dehee, A., Chikhi-Brachet, R., Piolot, T., Coppey-Moisan, M., and Nicolas, J. C. (1999). Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J Virol* 73, 4385-4392.

Martin, M., Genesca, A., Latre, L., Jaco, I., Taccioli, G. E., Egozcue, J., Blasco, M. A., Iliakis, G., and Tusell, L. (2005). Postreplicative joining of DNA double-strand breaks causes genomic instability in DNA-PKcs-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Cancer Res* 65, 10223-10232.

Maser, R. S., Mirzoeva, O. K., Wells, J., Olivares, H., Williams, B. R., Zinkel, R. A., Farnham, P. J., and Petrini, J. H. (2001). Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis. *Mol Cell Biol* 21, 6006-6016.

Maser, R. S., Monsen, K. J., Nelms, B. E., and Petrini, J. H. (1997). hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 17, 6087-6096.

Maser, R. S., Wong, K. K., Sahin, E., Xia, H., Naylor, M., Hedberg, H. M., Artandi, S. E., and DePinho, R. A. (2007). DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is not required for dysfunctional telomere fusion and checkpoint response in the telomerase-deficient mouse. *Mol Cell Biol* 27, 2253-2265.

Massard, C., Deutsch, E., and Soria, J. C. (2006). Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Ann Oncol* 17, 1620-1624.

Masutomi, K., Possemato, R., Wong, J. M., Currier, J. L., Tothova, Z., Manola, J. B., Ganesan, S., Lansdorp, P. M., Collins, K., and Hahn, W. C. (2005). The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8222-8227.

Masutomi, K., Yu, E. Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J. L., Metz, G. B., Brooks, M. W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J. A., *et al.* (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114, 241-253.

Mateyak, M. K., and Zakian, V. A. (2006). Human PIF helicase is cell cycle regulated and associates with telomerase. *Cell Cycle* 5, 2796-2804.

Mazina, O. M., and Mazin, A. V. (2004). Human Rad54 protein stimulates DNA strand exchange activity of hRad51 protein in the presence of Ca²⁺. *J Biol Chem* 279, 52042-52051.

McEachern, M. J., and Blackburn, E. H. (1996). Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in *Kluyveromyces lactis* lacking telomerase. *Genes Dev* 10, 1822-1834.

McElligott, R., and Wellinger, R. J. (1997). The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *Embo J* 16, 3705-3714.

McIlrath, J., Bouffler, S. D., Samper, E., Cuthbert, A., Wojcik, A., Szumiel, I., Bryant, P. E., Riches, A. C., Thompson, A., Blasco, M. A., *et al.* (2001). Telomere length abnormalities in mammalian radiosensitive cells. *Cancer Res* 61, 912-915.

McPherson, J. P., Hande, M. P., Poonepalli, A., Lemmers, B., Zablocki, E., Migon, E., Shehabeldin, A., Porras, A., Karaskova, J., Vukovic, B., *et al.* (2006). A role for Brca1 in chromosome end maintenance. *Hum Mol Genet* 15, 831-838.

McPherson, J. P., Lemmers, B., Hirao, A., Hakem, A., Abraham, J., Migon, E., Matysiak-Zablocki, E., Tamblyn, L., Sanchez-Sweetman, O., Khokha, R., *et al.* (2004). Collaboration of Brca1 and Chk2 in tumorigenesis. *Genes Dev* 18, 1144-1153.

Meier, A., Fiegler, H., Munoz, P., Ellis, P., Rigler, D., Langford, C., Blasco, M. A., Carter, N., and Jackson, S. P. (2007). Spreading of mammalian DNA-damage response factors studied by CHIP-chip at damaged telomeres. *Embo J* 26, 2707-2718.

- Melek, M., and Shippen, D. E. (1996). Chromosome healing: spontaneous and programmed de novo telomere formation by telomerase. *Bioessays* 18, 301-308.
- Metcalf, J. A., Parkhill, J., Campbell, L., Stacey, M., Biggs, P., Byrd, P. J., and Taylor, A. M. (1996). Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia. *Nat Genet* 13, 350-353.
- Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q., *et al.* (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90, 785-795.
- Mills, K. D., Ferguson, D. O., Essers, J., Eckersdorff, M., Kanaar, R., and Alt, F. W. (2004). Rad54 and DNA Ligase IV cooperate to maintain mammalian chromatid stability. *Genes Dev* 18, 1283-1292.
- Mirzoeva, O. K., and Petrini, J. H. (2003). DNA replication-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol Cancer Res* 1, 207-218.
- Mitchell, J. R., Cheng, J., and Collins, K. (1999). A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end. *Mol Cell Biol* 19, 567-576.
- Molenaar, C., Wiesmeijer, K., Verwoerd, N. P., Khazen, S., Eils, R., Tanke, H. J., and Dirks, R. W. (2003). Visualizing telomere dynamics in living mammalian cells using PNA probes. *Embo J* 22, 6631-6641.
- Mondello, C., Pirzio, L., Azzalin, C. M., and Giulotto, E. (2000). Instability of interstitial telomeric sequences in the human genome. *Genomics* 68, 111-117.
- Moore, J. K., and Haber, J. E. (1996). Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 2164-2173.
- Morin, G. B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59, 521-529.
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., and Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6622-6626.
- Munoz-Jordan, J. L., Cross, G. A., de Lange, T., and Griffith, J. D. (2001). t-loops at trypanosome telomeres. *Embo J* 20, 579-588.
- Munoz, P., Blanco, R., Flores, J. M., and Blasco, M. A. (2005). XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer. *Nat Genet* 37, 1063-1071.

- Murnane, J. P., Sabatier, L., Marder, B. A., and Morgan, W. F. (1994). Telomere dynamics in an immortal human cell line. *Embo J* 13, 4953-4962.
- Myung, K., Ghosh, G., Fattah, F. J., Li, G., Kim, H., Dutia, A., Pak, E., Smith, S., and Hendrickson, E. A. (2004). Regulation of telomere length and suppression of genomic instability in human somatic cells by Ku86. *Mol Cell Biol* 24, 5050-5059.
- Nabetani, A., Yokoyama, O., and 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.
- Nakabayashi, K., Ogata, T., Fujii, M., Tahara, H., Ide, T., Wadhwa, R., Kaul, S. C., Mitsui, Y., and Ayusawa, D. (1997). Decrease in amplified telomeric sequences and induction of senescence markers by introduction of human chromosome 7 or its segments in SUSM-1. *Exp Cell Res* 235, 345-353.
- Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B., and Cech, T. R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277, 955-959.
- Natarajan, S., Groff-Vindman, C., and McEachern, M. J. (2003). Factors influencing the recombinational expansion and spread of telomeric tandem arrays in *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot Cell* 2, 1115-1127.
- Natarajan, S., and McEachern, M. J. (2002). Recombinational telomere elongation promoted by DNA circles. *Mol Cell Biol* 22, 4512-4521.
- Nicholls, C. D., McLure, K. G., Shields, M. A., and Lee, P. W. (2002). Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. Implications on the dominant negative effect. *J Biol Chem* 277, 12937-12945.
- Niida, H., Shinkai, Y., Hande, M. P., Matsumoto, T., Takehara, S., Tachibana, M., Oshimura, M., Lansdorp, P. M., and Furuichi, Y. (2000). Telomere maintenance in telomerase-deficient mouse embryonic stem cells: characterization of an amplified telomeric DNA. *Mol Cell Biol* 20, 4115-4127.
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 211, 90-98.
- O'Connor, M. S., Safari, A., Liu, D., Qin, J., and Songyang, Z. (2004). The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. *J Biol Chem* 279, 28585-28591.
- O'Driscoll, M., and Jeggo, P. A. (2006). The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet* 7, 45-54.

- Ofir, R., Wong, A. C., McDermid, H. E., Skorecki, K. L., and Selig, S. (1999). Position effect of human telomeric repeats on replication timing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 11434-11439.
- Ogata, T., Ayusawa, D., Namba, M., Takahashi, E., Oshimura, M., and Oishi, M. (1993). Chromosome 7 suppresses indefinite division of nontumorigenic immortalized human fibroblast cell lines KMST-6 and SUSM-1. *Mol Cell Biol* *13*, 6036-6043.
- Ogata, T., Oshimura, M., Namba, M., Fujii, M., Oishi, M., and Ayusawa, D. (1995). Genetic complementation of the immortal phenotype in group D cell lines by introduction of chromosome 7. *Jpn J Cancer Res* *86*, 35-40.
- Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* *41*, 181-190.
- Opitz, O. G., Suliman, Y., Hahn, W. C., Harada, H., Blum, H. E., and Rustgi, A. K. (2001). Cyclin D1 overexpression and p53 inactivation immortalize primary oral keratinocytes by a telomerase-independent mechanism. *J Clin Invest* *108*, 725-732.
- Opresko, P. L., Cheng, W. H., von Kobbe, C., Harrigan, J. A., and Bohr, V. A. (2003). Werner syndrome and the function of the Werner protein; what they can teach us about the molecular aging process. *Carcinogenesis* *24*, 791-802.
- Opresko, P. L., Mason, P. A., Podell, E. R., Lei, M., Hickson, I. D., Cech, T. R., and Bohr, V. A. (2005). POT1 stimulates RecQ helicases WRN and BLM to unwind telomeric DNA substrates. *J Biol Chem* *280*, 32069-32080.
- Opresko, P. L., Otterlei, M., Graakjaer, J., Bruheim, P., Dawut, L., Kolvraa, S., May, A., Seidman, M. M., and Bohr, V. A. (2004). The Werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2. *Mol Cell* *14*, 763-774.
- Opresko, P. L., von Kobbe, C., Laine, J. P., Harrigan, J., Hickson, I. D., and Bohr, V. A. (2002). Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J Biol Chem* *277*, 41110-41119.
- Paddison, P. J., Caudy, A. A., and Hannon, G. J. (2002). Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 1443-1448.
- Pandita, T. K., Pathak, S., and Geard, C. R. (1995). Chromosome end associations, telomeres and telomerase activity in ataxia telangiectasia cells. *Cytogenet Cell Genet* *71*, 86-93.
- Pannicke, U., Ma, Y., Hopfner, K. P., Niewolik, D., Lieber, M. R., and Schwarz, K. (2004). Functional and biochemical dissection of the structure-specific nuclease ARTEMIS. *Embo J* *23*, 1987-1997.

- Parkinson, G. N., Lee, M. P., and Neidle, S. (2002). Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* *417*, 876-880.
- Pendino, F., Dudognon, C., Delhommeau, F., Sahraoui, T., Flexor, M., Bennaceur-Griscelli, A., Lanotte, M., and Segal-Bendirdjian, E. (2003). Retinoic acid receptor alpha and retinoid-X receptor-specific agonists synergistically target telomerase expression and induce tumor cell death. *Oncogene* *22*, 9142-9150.
- Pendino, F., Flexor, M., Delhommeau, F., Buet, D., Lanotte, M., and Segal-Bendirdjian, E. (2001). Retinoids down-regulate telomerase and telomere length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 6662-6667.
- Pennarun, G., Granotier, C., Gauthier, L. R., Gomez, D., Hoffschir, F., Mandine, E., Riou, J. F., Mergny, J. L., Mailliet, P., and Boussin, F. D. (2005). Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands. *Oncogene* *24*, 2917-2928.
- Perrem, K., Bryan, T. M., Englezou, A., Hackl, T., Moy, E. L., and Reddel, R. R. (1999). Repression of an alternative mechanism for lengthening of telomeres in somatic cell hybrids. *Oncogene* *18*, 3383-3390.
- Perrem, K., Colgin, L. M., Neumann, A. A., Yeager, T. R., and Reddel, R. R. (2001). Coexistence of alternative lengthening of telomeres and telomerase in hTERT-transfected GM847 cells. *Mol Cell Biol* *21*, 3862-3875.
- Petersen, S., Saretzki, G., and von Zglinicki, T. (1998). Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Exp Cell Res* *239*, 152-160.
- Pfeiffer, P., Feldmann, E., Odersky, A., Kuhfittig-Kulle, S., and Goedecke, W. (2005). Analysis of DNA double-strand break repair by nonhomologous end joining in cell-free extracts from mammalian cells. *Methods Mol Biol* *291*, 351-371.
- Pierce, A. J., Hu, P., Han, M., Ellis, N., and Jasin, M. (2001). Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev* *15*, 3237-3242.
- Pirzio, L. M., Freulet-Marriere, M. A., Bai, Y., Fouladi, B., Murnane, J. P., Sabatier, L., and Desmaze, C. (2004). Human fibroblasts expressing hTERT show remarkable karyotype stability even after exposure to ionizing radiation. *Cytogenet Genome Res* *104*, 87-94.
- Polotnianka, R. M., Li, J., and Lustig, A. J. (1998). The yeast Ku heterodimer is essential for protection of the telomere against nucleolytic and recombinational activities. *Curr Biol* *8*, 831-834.
- Potts, P. R., and Yu, H. (2005). Human MMS21/NSE2 is a SUMO ligase required for DNA repair. *Mol Cell Biol* *25*, 7021-7032.

- Potts, P. R., and Yu, H. (2007). The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nat Struct Mol Biol* 14, 581-590.
- Ranganathan, V., Heine, W. F., Ciccone, D. N., Rudolph, K. L., Wu, X., Chang, S., Hai, H., Ahearn, I. M., Livingston, D. M., Resnick, I., *et al.* (2001). Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit. *Curr Biol* 11, 962-966.
- Razak, Z. R., Varkonyi, R. J., Kulp-McEliece, M., Caslini, C., Testa, J. R., Murphy, M. E., and Broccoli, D. (2004). p53 differentially inhibits cell growth depending on the mechanism of telomere maintenance. *Mol Cell Biol* 24, 5967-5977.
- Reichenbach, P., Hoss, M., Azzalin, C. M., Nabholz, M., Bucher, P., and Lingner, J. (2003). A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed. *Curr Biol* 13, 568-574.
- Ribes-Zamora, A., Mihalek, I., Lichtarge, O., and Bertuch, A. A. (2007). Distinct faces of the Ku heterodimer mediate DNA repair and telomeric functions. *Nat Struct Mol Biol* 14, 301-307.
- Rich, T., Allen, R. L., and Wyllie, A. H. (2000). Defying death after DNA damage. *Nature* 407, 777-783.
- Richardson, C., and Jasin, M. (2000). Frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks. *Nature* 405, 697-700.
- Richie, C. T., Peterson, C., Lu, T., Hittelman, W. N., Carpenter, P. B., and Legerski, R. J. (2002). hSnm1 colocalizes and physically associates with 53BP1 before and after DNA damage. *Mol Cell Biol* 22, 8635-8647.
- Richter, T., Saretzki, G., Nelson, G., Melcher, M., Olijslagers, S., and von Zglinicki, T. (2007). TRF2 overexpression diminishes repair of telomeric single-strand breaks and accelerates telomere shortening in human fibroblasts. *Mech Ageing Dev* 128, 340-345.
- Ristic, D., Modesti, M., Kanaar, R., and Wyman, C. (2003). Rad52 and Ku bind to different DNA structures produced early in double-strand break repair. *Nucleic Acids Res* 31, 5229-5237.
- Robertson, G., Garrick, D., Wilson, M., Martin, D. I., and Whitelaw, E. (1996). Age-dependent silencing of globin transgenes in the mouse. *Nucleic Acids Res* 24, 1465-1471.
- Robison, J. G., Elliott, J., Dixon, K., and Oakley, G. G. (2004). Replication protein A and the Mre11.Rad50.Nbs1 complex co-localize and interact at sites of stalled replication forks. *J Biol Chem* 279, 34802-34810.
- Rogan, E. M., Bryan, T. M., Hukku, B., Maclean, K., Chang, A. C., Moy, E. L., Englezou, A., Warneford, S. G., Dalla-Pozza, L., and Reddel, R. R. (1995). Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Mol Cell Biol* 15, 4745-4753.

Romanov, S. R., Kozakiewicz, B. K., Holst, C. R., Stampfer, M. R., Haupt, L. M., and Tlsty, T. D. (2001). Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature* 409, 633-637.

Rooney, S., Alt, F. W., Lombard, D., Whitlow, S., Eckersdorff, M., Fleming, J., Fugmann, S., Ferguson, D. O., Schatz, D. G., and Sekiguchi, J. (2003). Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells. *J Exp Med* 197, 553-565.

Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L. H., and Lobrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23, 5706-5715.

Rubio, M. A., Kim, S. H., and Campisi, J. (2002). Reversible manipulation of telomerase expression and telomere length. Implications for the ionizing radiation response and replicative senescence of human cells. *J Biol Chem* 277, 28609-28617.

Saintigny, Y., and Lopez, B. S. (2002). Homologous recombination induced by replication inhibition, is stimulated by expression of mutant p53. *Oncogene* 21, 488-492.

Saintigny, Y., Rouillard, D., Chaput, B., Soussi, T., and Lopez, B. S. (1999). Mutant p53 proteins stimulate spontaneous and radiation-induced intrachromosomal homologous recombination independently of the alteration of the transactivation activity and of the G1 checkpoint. *Oncogene* 18, 3553-3563.

Samper, E., Goytisolo, F. A., Menissier-de Murcia, J., Gonzalez-Suarez, E., Cigudosa, J. C., de Murcia, G., and Blasco, M. A. (2001). Normal telomere length and chromosomal end capping in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient mice and primary cells despite increased chromosomal instability. *J Cell Biol* 154, 49-60.

Samper, E., Goytisolo, F. A., Slijepcevic, P., van Buul, P. P., and Blasco, M. A. (2000). Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Rep* 1, 244-252.

Sandell, L. L., and Zakian, V. A. (1993). Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* 75, 729-739.

Sbodio, J. I., Lodish, H. F., and Chi, N. W. (2002). Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase). *Biochem J* 361, 451-459.

Schaffitzel, C., Berger, I., Postberg, J., Hanes, J., Lipps, H. J., and Pluckthun, A. (2001). In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with *Stylonychia lemnae* macronuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8572-8577.

Sengupta, S., and Harris, C. C. (2005). p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 44-55.

- Shampay, J., Szostak, J. W., and Blackburn, E. H. (1984). DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* 310, 154-157.
- Sharma, G. G., Gupta, A., Wang, H., Scherthan, H., Dhar, S., Gandhi, V., Iliakis, G., Shay, J. W., Young, C. S., and Pandita, T. K. (2003). hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene* 22, 131-146.
- Shay, J. W., Pereira-Smith, O. M., and Wright, W. E. (1991). A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 196, 33-39.
- Shen, M., Haggblom, C., Vogt, M., Hunter, T., and Lu, K. P. (1997). Characterization and cell cycle regulation of the related human telomeric proteins Pin2 and TRF1 suggest a role in mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13618-13623.
- Shigeeda, N., Uchida, M., Barrett, J. C., and Tsutsui, T. (2003). Candidate chromosomal regions for genes involved in activation of alternative lengthening of telomeres in human immortal cell lines. *Exp Gerontol* 38, 641-651.
- Silverman, J., Takai, H., Buonomo, S. B., Eisenhaber, F., and de Lange, T. (2004). Human Rif1, ortholog of a yeast telomeric protein, is regulated by ATM and 53BP1 and functions in the S-phase checkpoint. *Genes Dev* 18, 2108-2119.
- Sitte, N., Saretzki, G., and von Zglinicki, T. (1998). Accelerated telomere shortening in fibroblasts after extended periods of confluency. *Free Radic Biol Med* 24, 885-893.
- Slebos, R. J., and Taylor, J. A. (2001). A novel host cell reactivation assay to assess homologous recombination capacity in human cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 212-219.
- Slijepcevic, P., and Al-Wahiby, S. (2005). Telomere biology: integrating chromosomal end protection with DNA damage response. *Chromosoma* 114, 275-285.
- Slijepcevic, P., Hande, M. P., Bouffler, S. D., Lansdorp, P., and Bryant, P. E. (1997). Telomere length, chromatin structure and chromosome fusogenic potential. *Chromosoma* 106, 413-421.
- Smilenov, L. B., Morgan, S. E., Mellado, W., Sawant, S. G., Kastan, M. B., and Pandita, T. K. (1997). Influence of ATM function on telomere metabolism. *Oncogene* 15, 2659-2665.
- Smith, L., Liu, S. J., Goodrich, L., Jacobson, D., Degen, C., Bentley, N., Carr, A., Flaggs, G., Keegan, K., Hoekstra, M., and Thayer, M. J. (1998a). Duplication of ATR inhibits MyoD, induces aneuploidy and eliminates radiation-induced G1 arrest. *Nat Genet* 19, 39-46.
- Smith, L. L., Collier, H. A., and Roberts, J. M. (2003). Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat Cell Biol* 5, 474-479.
- Smith, S., and de Lange, T. (2000). Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr Biol* 10, 1299-1302.

- Smith, S., Gariat, I., Schmitt, A., and de Lange, T. (1998b). Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282, 1484-1487.
- Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *Embo J* 21, 4338-4348.
- Smogorzewska, A., Karlseder, J., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., and de Lange, T. (2002). DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr Biol* 12, 1635-1644.
- Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M. R., Schnapp, G., and de Lange, T. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 20, 1659-1668.
- Snow, B. E., Mateyak, M., Paderova, J., Wakeham, A., Iorio, C., Zakian, V., Squire, J., and Harrington, L. (2007). Murine Pif1 interacts with telomerase and is dispensable for telomere function in vivo. *Mol Cell Biol* 27, 1017-1026.
- Song, K., Jung, D., Jung, Y., Lee, S. G., and Lee, I. (2000). Interaction of human Ku70 with TRF2. *FEBS Lett* 481, 81-85.
- Sonoda, E., Sasaki, M. S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M., and Takeda, S. (1999). Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells. *Mol Cell Biol* 19, 5166-5169.
- Sprung, C. N., Sabatier, L., and Murnane, J. P. (1996). Effect of telomere length on telomeric gene expression. *Nucleic Acids Res* 24, 4336-4340.
- Stampfer, M. R. (1982). Cholera toxin stimulation of human mammary epithelial cells in culture. *In Vitro* 18, 531-537.
- Stampfer, M. R., Garbe, J., Nijjar, T., Wigington, D., Swisshelm, K., and Yaswen, P. (2003). Loss of p53 function accelerates acquisition of telomerase activity in indefinite lifespan human mammary epithelial cell lines. *Oncogene* 22, 5238-5251.
- Stansel, R. M., de Lange, T., and Griffith, J. D. (2001). T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *Embo J* 20, 5532-5540.
- Stansel, R. M., Subramanian, D., and Griffith, J. D. (2002). p53 binds telomeric single strand overhangs and t-loop junctions in vitro. *J Biol Chem* 277, 11625-11628.
- Stavropoulos, D. J., Bradshaw, P. S., Li, X., Pasic, I., Truong, K., Ikura, M., Ungrin, M., and Meyn, M. S. (2002). The Bloom syndrome helicase BLM interacts with TRF2 in ALT cells and promotes telomeric DNA synthesis. *Hum Mol Genet* 11, 3135-3144.
- Stewart, S. A., Hahn, W. C., O'Connor, B. F., Banner, E. N., Lundberg, A. S., Modha, P., Mizuno, H., Brooks, M. W., Fleming, M., Zimonjic, D. B., *et al.* (2002). Telomerase contributes

to tumorigenesis by a telomere length- independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12606-12611.

Sun, D., Thompson, B., Cathers, B. E., Salazar, M., Kerwin, S. M., Trent, J. O., Jenkins, T. C., Neidle, S., and Hurley, L. H. (1997). Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J Med Chem* 40, 2113-2116.

Taccioli, G. E., Amatucci, A. G., Beamish, H. J., Gell, D., Xiang, X. H., Torres Arzayus, M. I., Priestley, A., Jackson, S. P., Marshak Rothstein, A., Jeggo, P. A., and Herrera, V. L. (1998). Targeted disruption of the catalytic subunit of the DNA-PK gene in mice confers severe combined immunodeficiency and radiosensitivity. *Immunity* 9, 355-366.

Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 13, 1549-1556.

Takemura, H., Rao, V. A., Sordet, O., Furuta, T., Miao, Z. H., Meng, L., Zhang, H., and Pommier, Y. (2006). Defective Mre11-dependent activation of Chk2 by ataxia telangiectasia mutated in colorectal carcinoma cells in response to replication-dependent DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 281, 30814-30823.

Tarsounas, M., Munoz, P., Claas, A., Smiraldi, P. G., Pittman, D. L., Blasco, M. A., and West, S. C. (2004). Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein. *Cell* 117, 337-347.

Teng, S. C., and Zakian, V. A. (1999). Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 8083-8093.

Tsuzuki, T., Fujii, Y., Sakumi, K., Tominaga, Y., Nakao, K., Sekiguchi, M., Matsushiro, A., Yoshimura, Y., and Morita T (1996). Targeted disruption of the Rad51 gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6236-6240.

Tuschl, T. (2001). RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem* 2, 239-245.

Ulaner, G. A., Hu, J. F., Vu, T. H., Giudice, L. C., and Hoffman, A. R. (1998). Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res* 58, 4168-4172.

Ulaner, G. A., Hu, J. F., Vu, T. H., Oruganti, H., Giudice, L. C., and Hoffman, A. R. (2000). Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *Int J Cancer* 85, 330-335.

Valerie, K., and Povirk, L. F. (2003). Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 22, 5792-5812.

van Overbeek, M., and de Lange, T. (2006). Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase. *Curr Biol* 16, 1295-1302.

van Steensel, B., and de Lange, T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* *385*, 740-743.

van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* *92*, 401-413.

Vannier, J. B., Depeiges, A., White, C., and Gallego, M. E. (2006). Two roles for Rad50 in telomere maintenance. *Embo J* *25*, 4577-4585.

Varley, H., Pickett, H. A., Foxon, J. L., Reddel, R. R., and Royle, N. J. (2002). Molecular characterization of inter-telomere and intra-telomere mutations in human ALT cells. *Nat Genet* *30*, 301-305.

Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R. C., Thomas, T. E., Harley, C. B., and Lansdorp, P. M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 9857-9860.

Veldman, T., Etheridge, K. T., and Counter, C. M. (2004). Loss of hPot1 function leads to telomere instability and a cut-like phenotype. *Curr Biol* *14*, 2264-2270.

Verdun, R. E., Crabbe, L., Haggblom, C., and Karlseder, J. (2005). Functional human telomeres are recognized as DNA damage in G2 of the cell cycle. *Mol Cell* *20*, 551-561.

Verdun, R. E., and Karlseder, J. (2006). The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell* *127*, 709-720.

Vogt, M., Haggblom, C., Yeargin, J., Christiansen-Weber, T., and Haas, M. (1998). Independent induction of senescence by p16INK4a and p21CIP1 in spontaneously immortalized human fibroblasts. *Cell Growth Differ* *9*, 139-146.

von Zglinicki, T. (2000). Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann N Y Acad Sci* *908*, 99-110.

von Zglinicki, T., Pilger, R., and Sitte, N. (2000). Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* *28*, 64-74.

Vulliamy, T., Marrone, A., Goldman, F., Dearlove, A., Bessler, M., Mason, P. J., and Dokal, I. (2001). The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* *413*, 432-435.

Walmsley, R. M., Szostak, J. W., and Petes, T. D. (1983). Is there left-handed DNA at the ends of yeast chromosomes? *Nature* *302*, 84-86.

Wang, H., Perrault, A. R., Takeda, Y., Qin, W., Wang, H., and Iliakis, G. (2003). Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res* *31*, 5377-5388.

- Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., and Iliakis, G. (2005). DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res* 65, 4020-4030.
- Wang, R. C., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2004). Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* 119, 355-368.
- Wang, S. S., and Zakian, V. A. (1990). Sequencing of *Saccharomyces* telomeres cloned using T4 DNA polymerase reveals two domains. *Mol Cell Biol* 10, 4415-4419.
- Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 239, 197-201.
- Weaver, Z., Montagna, C., Xu, X., Howard, T., Gadina, M., Brodie, S. G., Deng, C. X., and Ried, T. (2002). Mammary tumors in mice conditionally mutant for *Brcal* exhibit gross genomic instability and centrosome amplification yet display a recurring distribution of genomic imbalances that is similar to human breast cancer. *Oncogene* 21, 5097-5107.
- Weinrich, S. L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V. M., Holt, S. E., Bodnar, A. G., Lichtsteiner, S., Kim, N. W., Trager, J. B., *et al.* (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet* 17, 498-502.
- Wellinger, R. J., Wolf, A. J., and Zakian, V. A. (1993). *Saccharomyces* telomeres acquire single-strand TG1-3 tails late in S phase. *Cell* 72, 51-60.
- Wenz, C., Enenkel, B., Amacker, M., Kelleher, C., Damm, K., and Lingner, J. (2001). Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *Embo J* 20, 3526-3534.
- Wong, H. P., Mozdarani, H., Finnegan, C., McIlrath, J., Bryant, P. E., and Slijepcevic, P. (2004). Lack of spontaneous and radiation-induced chromosome breakage at interstitial telomeric sites in murine scid cells. *Cytogenet Genome Res* 104, 131-136.
- Wong, H. P., and Slijepcevic, P. (2004). Telomere length measurement in mouse chromosomes by a modified Q-FISH method. *Cytogenet Genome Res* 105, 464-470.
- Wong, J. M., Kusdra, L., and Collins, K. (2002). Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nat Cell Biol* 4, 731-736.
- Wong, K. K., Chang, S., Weiler, S. R., Ganesan, S., Chaudhuri, J., Zhu, C., Artandi, S. E., Rudolph, K. L., Gottlieb, G. J., Chin, L., *et al.* (2000). Telomere dysfunction impairs DNA repair and enhances sensitivity to ionizing radiation. *Nat Genet* 26, 85-88.
- Wood, L. D., Halvorsen, T. L., Dhar, S., Baur, J. A., Pandita, R. K., Wright, W. E., Hande, M. P., Calaf, G., Hei, T. K., Levine, F., *et al.* (2001). Characterization of ataxia telangiectasia fibroblasts with extended life-span through telomerase expression. *Oncogene* 20, 278-288.

- Wright, J. H., Gottschling, D. E., and Zakian, V. A. (1992). *Saccharomyces* telomeres assume a non-nucleosomal chromatin structure. *Genes Dev* 6, 197-210.
- Wright, W. E., and Shay, J. W. (1992). Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends Genet* 8, 193-197.
- Wright, W. E., Tesmer, V. M., Huffman, K. E., Levene, S. D., and Shay, J. W. (1997). Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* 11, 2801-2809.
- Wright, W. E., Tesmer, V. M., Liao, M. L., and Shay, J. W. (1999). Normal human telomeres are not late replicating. *Exp Cell Res* 251, 492-499.
- Wu, G., Jiang, X., Lee, W. H., and Chen, P. L. (2003). Assembly of functional ALT-associated promyelocytic leukemia bodies requires Nijmegen Breakage Syndrome 1. *Cancer Res* 63, 2589-2595.
- Wu, G., Lee, W. H., and Chen, P. L. (2000). NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells. Implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem* 275, 30618-30622.
- Wu, L., Multani, A. S., He, H., Cosme-Blanco, W., Deng, Y., Deng, J. M., Bachilo, O., Pathak, S., Tahara, H., Bailey, S. M., *et al.* (2006). Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. *Cell* 126, 49-62.
- Wu, Y., Xiao, S., and Zhu, X. D. (2007). MRE11-RAD50-NBS1 and ATM function as co-mediators of TRF1 in telomere length control. *Nat Struct Mol Biol* 14, 832-840.
- Wyllie, F. S., Jones, C. J., Skinner, J. W., Haughton, M. F., Wallis, C., Wynford-Thomas, D., Faragher, R. G., and Kipling, D. (2000). Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts. *Nat Genet* 24, 16-17.
- Xiong, J., Fan, S., Meng, Q., Schramm, L., Wang, C., Bouzahza, B., Zhou, J., Zafonte, B., Goldberg, I. D., Haddad, B. R., *et al.* (2003). BRCA1 inhibition of telomerase activity in cultured cells. *Mol Cell Biol* 23, 8668-8690.
- Xu, D., Popov, N., Hou, M., Wang, Q., Bjorkholm, M., Gruber, A., Menkel, A. R., and Henriksson, M. (2001). Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3826-3831.
- Yamada, M., Hayatsu, N., Matsuura, A., and Ishikawa, F. (1998). Y'-Help1, a DNA helicase encoded by the yeast subtelomeric Y' element, is induced in survivors defective for telomerase. *J Biol Chem* 273, 33360-33366.
- Yang, Q., Zheng, Y. L., and Harris, C. C. (2005). POT1 and TRF2 cooperate to maintain telomeric integrity. *Mol Cell Biol* 25, 1070-1080.

- Yang, Y., Chen, Y., Zhang, C., Huang, H., and Weissman, S. M. (2002). Nucleolar localization of hTERT protein is associated with telomerase function. *Exp Cell Res* 277, 201-209.
- Ye, J. Z., and de Lange, T. (2004). TIN2 is a tankyrase 1 PARP modulator in the TRF1 telomere length control complex. *Nat Genet* 36, 618-623.
- Ye, J. Z., Donigian, J. R., van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A. N., Chait, B. T., and de Lange, T. (2004a). TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J Biol Chem* 279, 47264-47271.
- Ye, J. Z., Hockemeyer, D., Krutchinsky, A. N., Loayza, D., Hooper, S. M., Chait, B. T., and de Lange, T. (2004b). POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev* 18, 1649-1654.
- Yeager, T. R., Neumann, A. A., Englezou, A., Huschtscha, L. I., Noble, J. R., and Reddel, R. R. (1999). Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res* 59, 4175-4179.
- Yu, C. C., Lo, S. C., and Wang, T. C. (2001). Telomerase is regulated by protein kinase C-zeta in human nasopharyngeal cancer cells. *Biochem J* 355, 459-464.
- Yu, C. E., Oshima, J., Fu, Y. H., Wijsman, E. M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., *et al.* (1996). Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272, 258-262.
- Zahler, A. M., Williamson, J. R., Cech, T. R., and Prescott, D. M. (1991). Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* 350, 718-720.
- Zha, S., Alt, F. W., Cheng, H. L., Brush, J. W., and Li, G. (2007). Defective DNA repair and increased genomic instability in Cernunnos-XLF-deficient murine ES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4518-4523.
- Zhang, A., Zheng, C., Lindvall, C., Hou, M., Ekedahl, J., Lewensohn, R., Yan, Z., Yang, X., Henriksson, M., Blennow, E., *et al.* (2000). Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors. *Cancer Res* 60, 6230-6235.
- Zhang, P., Chan, S. L., Fu, W., Mendoza, M., and Mattson, M. P. (2003). TERT suppresses apoptosis at a premitochondrial step by a mechanism requiring reverse transcriptase activity and 14-3-3 protein-binding ability. *Faseb J* 17, 767-769.
- Zhang, Y., Lim, C. U., Williams, E. S., Zhou, J., Zhang, Q., Fox, M. H., Bailey, S. M., and Liber, H. L. (2005). NBS1 knockdown by small interfering RNA increases ionizing radiation mutagenesis and telomere association in human cells. *Cancer Res* 65, 5544-5553.
- Zhong, Z., Shiue, L., Kaplan, S., and de Lange, T. (1992). A mammalian factor that binds telomeric TTAGGG repeats in vitro. *Mol Cell Biol* 12, 4834-4843.

Zhong, Z. H., Jiang, W. Q., Cesare, A. J., Neumann, A. A., Wadhwa, R., and Reddel, R. R. (2007). Disruption of telomere maintenance by depletion of the MRE11/RAD50/NBS1 complex in cells that use alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem*.

Zhou, X. Z., and Lu, K. P. (2001). The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* *107*, 347-359.

Zhu, J., Wang, H., Bishop, J. M., and Blackburn, E. H. (1999). Telomerase extends the lifespan of virus-transformed human cells without net telomere lengthening. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 3723-3728.

Zhu, X. D., Kuster, B., Mann, M., Petrini, J. H., and Lange, T. (2000). Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* *25*, 347-352.

Zhu, X. D., Niedernhofer, L., Kuster, B., Mann, M., Hoeijmakers, J. H., and de Lange, T. (2003). ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Mol Cell* *12*, 1489-1498.

Zijlmans, J. M., Martens, U. M., Poon, S. S., Raap, A. K., Tanke, H. J., Ward, R. K., and Lansdorp, P. M. (1997). Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 7423-7428.

Zou, Y., Gryaznov, S. M., Shay, J. W., Wright, W. E., and Cornforth, M. N. (2004a). Asynchronous replication timing of telomeres at opposite arms of mammalian chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 12928-12933.

Zou, Y., Sfeir, A., Gryaznov, S. M., Shay, J. W., and Wright, W. E. (2004b). Does a sentinel or a subset of short telomeres determine replicative senescence? *Mol Biol Cell* *15*, 3709-3718.

ANNEXES

Implication des mécanismes de la réparation de l'ADN dans la maintenance des télomères et l'instabilité chromosomique dans les cellules humaines

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques particulières conférant une stabilité aux extrémités de chromosomes. La plupart des mécanismes télomériques sont conservée chez les eucaryotes supérieurs notamment chez l'homme. Parmi les fonctions exercées, les télomères développent des stratégies visant à limiter la recombinaison impropre aux télomères afin de préserver l'intégrité chromosomique.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié les mécanismes de maintenance et de protection des télomères chez l'homme, et plus particulièrement le rôle de la recombinaison homologue et recombinaison illégitime.

Je me suis plus particulièrement intéressé au rôle de P53 dans le maintien des télomères, à travers sa fonction dans la recombinaison. Bien que son rôle soit établi dans la maintenance des télomères des cellules ALT, sa fonction est en revanche moins bien décrite dans les cellules présentant une activité télomérase. Dans cette perspective, nous avons établi des clones télomérase (+) exprimant de manière stable le transgène P53R175H, décrit comme stimulant la RH. Cependant, la surexpression de P53R175H ne modifie pas le profil télomérique des ces cellules, se révélant ainsi incapable de stimuler la recombinaison télomérique. L'absence de phénotype pourrait être en fait la conséquence d'une interférence de la télomérase dans la mise en place d'un processus de recombinaison télomérique.

Le deuxième volet de notre étude nous amené à préciser le rôle la recombinaison dans le maintien des télomères. Pour cela, nous avons construit des lignées isogéniques invalidées pour les deux voies majeures de la recombinaison grâce à une nouvelle famille de vecteurs ARNi basée sur des vecteurs EBV (brevet CEA N° 0501483) développé par Biard D. Ce système permet d'obtenir une réduction importante, spécifique et à long terme (plus de 300 jours en culture) de l'expression d'un gène cible. Plusieurs partenaires du NHEJ (DNA-PKcs, XRCC4, LigIV, Ku70), ou de la RH (RAD54, RAD51, RAD52) ou du complexe MRN ont été inhibés dans la lignée HeLa (adénocarcinome cervical).

Dès les premiers jours d'invalidation du gène cible, des altérations de la stabilité des télomères sont constatées. Ces altérations se maintiennent au cours de la sélection (de 100 à 300 jours selon les clones). Ainsi, il semble que l'invalidation du NHEJ conduise à une instabilité télomérique associée à un raccourcissement de la taille des télomères dans le cas de XRCC4 et LigaseIV^{KD}. Malgré une instabilité télomérique prononcée, les cellules RH^{KD} se distinguent pourtant des clones NHEJ^{KD} par des altérations télomériques particulières. En effet, la dérégulation du RH mène à des signaux hétérogènes au sein du même bras chromosomique. En revanche, les anomalies dites de structure (perte associée à des cassures) sont plus abondantes dans les cellules déficientes pour le NHEJ. Ces résultats suggèrent que le NHEJ jouerait un rôle de protection alors que le RH serait plutôt impliqué dans l'élongation et la réplication des télomères.

Cette étude s'est poursuivie avec l'examen de clones MRE11^{KD}, RAD50^{KD}, NBS1^{KD} permettant de clarifier dans un premier temps le rôle de du complexe dans les différentes voies de recombinaison puis sur la maintenance des télomères. A l'image des autres protéines de la recombinaison, RAD50 préserverait l'intégrité télomérique. L'invalidation des protéines NBS1 et MRE11 initie une élongation des télomères, probable manifestation de l'activation de la recombinaison télomérique, absente des cellules RAD50^{KD}. Ainsi, la présence de cercles télomériques extrachromosomiques dans le clone NBS1^{KD} vient étayer cette hypothèse. Le complexe MRE11/RAD50/NBS1 constituerait alors un répresseur de la RH aux télomères.

Mots clés : télomères, réparation de l'ADN, cassures doubles brins, NHEJ, Recombinaison Homologue, interférence ARN, instabilité.