Dynamique et régulation des assemblages nucléoprotéiques des télomères humains : Fonctions de la protéine TRF2.

Simon Amiard

▶ **To cite this version:**

Simon Amiard. Dynamique et régulation des assemblages nucléoprotéiques des télomères humains : Fonctions de la protéine TRF2.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université d'Orléans, 2007. Français. NNT : . tel-00534812

HAL Id: tel-00534812

https://theses.hal.science/tel-00534812

Submitted on 10 Nov 2010

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.

THESE PRESENTEE A L'UNIVERSITE D'ORLEANS POUR OBTENIR

LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ORLEANS

Discipline : Aspect moléculaire et cellulaire de la biologie

PAR

AMIARD Simon

Dynamique et régulation des assemblages nucléoprotéiques des télomères humains :

Fonctions de la protéine TRF2.

Soutenue le **: 18 Juin 2007**

MEMBRES DU JURY :

- Mme Evelyne Sage	**Rapporteur/Institut Curie Paris**
- Mme Bombard Sophie	**Rapporteur/ Université René Descartes Paris V**
- Mr Legrand Alain	**Président/CBM Orléans**
- Mr Paoletti Jacques	**Examinateur/CBM Orléans**
- Mr Gilson Eric	**Examinateur/ENS Lyon**
- Melle Giraud-Panis Marie-Josèphe	**Directrice de thèse/ENS Lyon**

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les diverses personnes qui m'ont aidé pendant cette thèse. Je ne peux les nommer toutes, mais je tiens surtout à exprimer ma profonde gratitude aux personnes suivantes.

En premier lieu, je tiens à m'adresser à ma directrice de thèse, Marie-Josèphe Giraud-Panis. Je vous suis extrêmement reconnaissant pour votre patience et pour la pertinence de vos conseils à la fois techniques et conceptuels qui nous ont permis de mener à bien ce projet. Mais au delà de vos qualités scientifiques, vous avez fait preuve de générosité et de gentillesse à mon égard. Je vous remercie donc de m'avoir aidé, guidé, encouragé lors de ces quatre années, en un mot : MERCI.

Ensuite, mes remerciements se tournent vers les experts, Mme Evelyne Sage et Mme Sophie Bombard, pour avoir accepté de juger mon travail. Un grand merci également au Pr Alain Legrand d'avoir accepté de présider ce jury.

Ensuite, c'est avec plaisir que je désire remercier les personnes qui ont collaboré à ce travail. Je remercie donc Mr le Pr Jacques Paoletti pour m'avoir accueilli au sein de son équipe lors des deux premières années de ma thèse qui se sont déroulées au Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans. Lors de cette période j'ai pu compté sur beaucoup de personnes, comme les « voisins d'à côté » qui se reconnaîtrons, mais surtout sur l'aide précieuse de Michel Doudeau qui a été pour moi beaucoup plus qu'un collègue. Je tiens aussi à saluer tous les membres du CBM pour leur gentillesse et leur disponibilité.

J'ai ensuite été accueilli au Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, à l'ENS de Lyon, au sein de l'équipe de Pr Eric Gilson que je tiens donc tout particulièrement à remercier pour son accueil chaleureux et ses conseils très enrichissants. Merci beaucoup aux membres de l'équipe, trop nombreux pour les citer, qui m'ont accueilli à bras ouvert et ont fait en sorte que mon intégration se fasse de la meilleure façon possible. Un merci tout particulier à mes plus proches « collaborateurs », Anaïs et à Thomas pour leur bonne humeur communicative, ce fut un plaisir de travailler à vos côtés. Merci également pour leur accueil et leur gentillesse aux membres du Laboratoire Joliot-Curie, son directeur, Philippe Bouvet, les thésards (Mathieu, Hervé, Fabien, les indiens,...), les « bio » (Fabien, Seb, Dimitri,..), les « physiciens » (Cendrine, Benji, Cédric,...), sans oublier l'irremplaçable Maggy. A bientôt tous pour une nouvelle « Ninkasi party ».

En dehors du laboratoire, je rend hommage à tous mes amis qui m'ont permis de surmonter certains moments difficiles pendant cette thèse et surtout à Julien, Delphine, Kitoon, Magali, Minou, Julie, tous les « mayennais », et tous ceux dont je ne cite pas le nom, vous êtes tous dans mon cœur à jamais.

Je remercie ma famille pour leur confiance et leurs encouragements. Parmi tous, ma mère et ma sœur m'ont apporté plus que quiconque. Ils sont ma force, ma confiance et ma richesse. Jamais je n'aurais réussi sans elles. Mais je ne pourrais terminer sans avoir une

pensée toute particulière pour Aurélie, la femme de ma vie, qui m’a soutenu et qui a toujours cru en moi.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 5

I- HISTORIQUE ET GENERALITES SUR LES TELOMERES 5

II- LES TELOMERES SONT DES COMPLEXES NUCLEOPROTEIQUES 10

II-1- L'ADN TELOMERIQUE 10

II-1-a- Présentation générale 10

II-1-b- L'extrémité simple brin 11

II-1-c- Régulation des extrémités 12

II-1-d- Les G-quadruplex ou G4 14

II-1-e- Particularités du brin C 18

II-2- LES PROTEINES DE L'ARCHITECTURE TELOMERIQUE 19

II-2-a- TRF1 et TRF2 19

II-2-a-1- Architecture des deux protéines 20

II-2-a-2- TRF1 et TRF2 possèdent des fonctions biologiques différentes 22

II-2-b- hPOT1 25

II-2-c- TIN2 et TPP1 28

II-2-d- hRap1 29

III- HOMEOSTASIE, VIEILLISSEMENT ET PROLIFERATION 31

III-1- LES PHENOMENES DE COMPENSATION DE L'EROSION TELOMERIQUE 31

III-1-a- La télomérase 31

III-1-b- Les cellules ALT 36

III-2- TELOMERES ET PROLIFERATION CELLULAIRE 39

III-3- ROLE DES TELOMERES DANS LE VIEILLISSEMENT 41

III-4- TELOMERE, TELOMERASE ET CANCER 42

IV- TRF2, UNE PROTEINE CLE DES TELOMERES 45

IV-1- LES PARTENAIRES DE TRF2 SONT IMPLIQUES DANS DE NOMBREUSES PATHOLOGIES ___ 45

IV-2- TRF2 INHIBE LA REPONSE AUX DOMMAGES DE L'ADN AUX TELOMERES _____ 46

IV-3- TRF2 CONTROLE LA REPARATION DES TELOMERES _____ 49

IV-3-a- TRF2 stimule le mécanisme de « BER » _____ 49

IV-3-b- TRF2 et la réparation par excision de nucléotide (NER) _____ 51

IV-3-b- TRF2 inhibe le NHEJ _____ 53

IV-4- TRF2 ET LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE AUX TELOMERES _____ 56

IV-5- TRF2 ET LA REPLICATION DES TELOMERES _____ 59

IV-6- TRF2 REMODELE LE TELOMERE EN BOUCLE _____ 60

PROBLEMATIQUE _____ 65

RESULTATS/DISCUSSION _____ 67

I- MISE EN EVIDENCE DE LA STIMULATION D'UN PHENOMENE D'INVASION TELOMERIQUE PAR TRF2 _____ 67

I-1- INTRODUCTION A L'ARTICLE _____ 67

I-1-a- Les phénomènes d'invasion connus et les protéines qui les catalysent _____ 67

I-1-b- Les différents états conformationnels de l'ADN télomérique _____ 70

I-1-c- Impact de la topologie _____ 72

I-2- ARTICLE : "A TOPOLOGICAL MECHANISM FOR TRF2-ENHANCED STRAND INVASION." ___ 75

I-3- RESULTATS SUPPLEMENTAIRES _____ 76

I-3-a- Fixation TRF1/TRF2 sur D-loop, jonctions _____ 76

I-3-b- Invasion : effet d'une drogue stabilisateur de G4 : la télomestatine _____ 80

I-4- DISCUSSION _____ 82

I-4-a- TRF2 se multimérise _____ 82

I-4-b- Le domaine N-terminal est un second domaine de fixation à l'ADN _____ 83

I-4-c- L'invasion sans protéine ou invasion naturelle _____ 85

I-4-d- L'invasion facilitée par TRF2 _____ 87

I-4-e- Modèle de formation de la boucle T ____ 88

I-4-f- Effecteurs et inhibiteurs de la réaction d'invasion ____ 90

II- MISE EN EVIDENCE ET CARACTERISATION D'APOLLON, UNE NOUVELLE PROTEINE TELOMERIQUE ____ 93

II-1- INTRODUCTION A L'ARTICLE : LA DECOUVERTE D'APOLLON ____ 93

II-2- ARTICLE : "THE APOLLO 5' EXONUCLEASE FUNCTIONS TOGETHER WITH TRF2 TO PROTECT TELOMERES FROM DNA REPAIR" ____ 95

II-3- RESULTATS SUPPLEMENTAIRES ____ 96

II-3-a- Influence de TRF2 sur l'activité d'Apollon ____ 96

II-3-b- Recherche de mutants d'Apollon ____ 97

II-4- DISCUSSION ____ 97

II-4-a- Apollon est une nouvelle nucléase présente aux télomères ____ 98

II-4-b- Rôle(s) d'Apollon dans la cellule ? ____ 99

PERSPECTIVES ____ 101

I- ETUDES D'AUTRES PARAMETRES DE LA REACTION D'INVASION ____ 102

II- ROLE DES MODIFICATIONS TOPOLOGIQUES DE L'ADN INDUITE PAR TRF2 ____ 103

III- IMPLICATION DE LA FIXATION DE TRF2 SUR LES JONCTIONS DE HOLLIDAY ____ 104

IV- DETERMINATION DU ROLE D'APOLLON ____ 105

MATERIELS ET METHODES ____ 107

BIBLIOGRAPHIE ____ 111

Abréviations et anglicismes

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADP : Adénosine diphosphate
AFM : « atomic force microscopy » : microscopie à force atomique
ALT : « Alternative Lengthening of Telomeres » : mécanisme alternatif d'élongation des télomères
APBs : « ALT associated Promyelotic leukemia Bodies »
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
BER : « Base Excision repair » : système de réparation par excision de bases
CR : « Conserved Region » : régions conservées de la sous unité hTR de la télomérase
DKC : Dyskératose congénitale
D-loop : « Displacement loop »
ECTR : « Extrachromosomal Telomere Repeats » : séquences télomériques extrachromosomiques
FRET : « Fluorescence Resonance Energy Transfer » : transfert d'énergie de fluorescence
HR : « Homologous Recombination » : Recombinaison Homologue
kb : kilobase
Kd : Coefficient de dissociation
kDa : kiloDalton
Lk : « Linking number » : nombre d'enlacement
ME : Microscopie électronique
NBS : « Nijmegen breakage syndrom » : syndrome de Nimègue
NER : « Nucleotide Excision Repair » : Système de réparation par excision de nucléotides
NHEJ : « Non Homologous End Joining » : Réparation par jonction des terminaisons non-homologues
OB fold : « Oligonucleotide Binding fold »
PML : « Promyelocytic leukemia » :
Q-FISH : « Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization » Hybridation in situ fluorescente quantitative
RMN : Résonance Magnétique nucléaire
RS-SCID : « Severe Combined Immune Deficiency with increased radiosensitivity » : déficit immunitaire combine sévère et sensibilité aux radiations
RT-PCR : « Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction »
siRNA : « small interfering RNA »
SV40 : Virus Simien 40
TBD1 : « TRF1 binding domain » : Domaine de Fixation à TRF1
TERA : « Telomere end recruitment assay »
TIFs : « Telomere Dysfunction Induced Foci »
T-OLA : « Telomere oligonucleotide ligation assay »
TPE : « Telomeric Position Effect » : Effet de position au niveau des télomères
TRFs : « Telomeric Restriction Fragment »
T-SCE : « Telomere Sister Chromatid Exchange » : Echanges entre chromatides sœurs
Tw : « Twist » : Torsion
UV : UltraViolet
Wr : « Writhe » : vrillage

INTRODUCTION

I- HISTORIQUE ET GENERALITES SUR LES TELOMERES

Les premières observations mettant en évidence le rôle essentiel des télomères, ces régions particulières présentes à l'extrémité des chromosomes (figure 1), dans le maintien de l'intégrité des chromosomes, ont été publiées en 1938 par H J Müller. Il observa que des irradiations aux rayons X provoquent des délétions ou des inversions sur l'ensemble du génome excepté au niveau de ces régions terminales des chromosomes où elles sont quasiment indétectables (Muller, 1938). Müller proposa le nom de télomères, du grec *telos* « fin » et *meros* « partie », pour désigner ces régions terminales des chromosomes. A la même époque, B. McClintock démontra que les chromosomes de maïs ayant subi des cassures doubles brins étaient capables de fusionner entre eux contrairement à leurs extrémités qui demeuraient stables (McClintock, 1939).

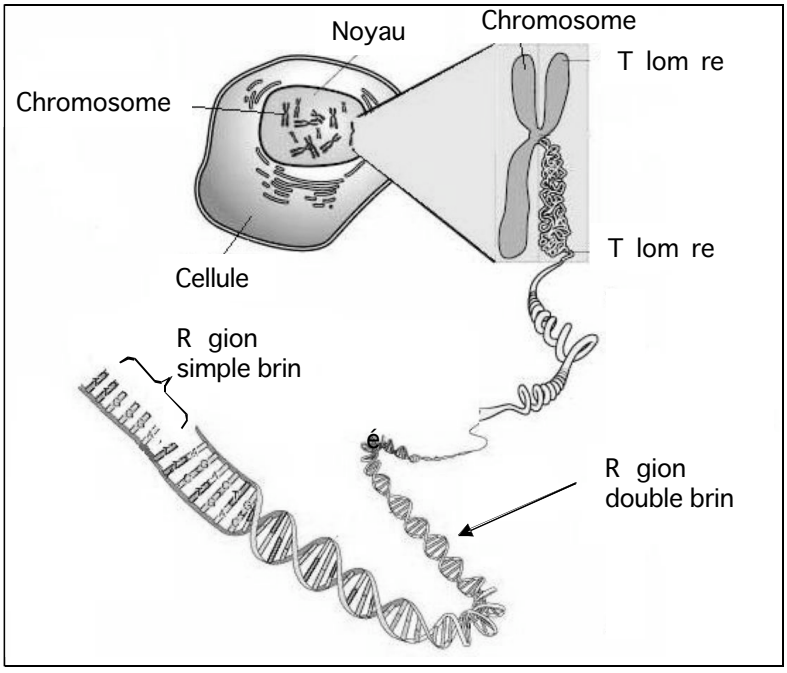


Figure 1 : Les télomères constituent l'extrémité des chromosomes linéaires.

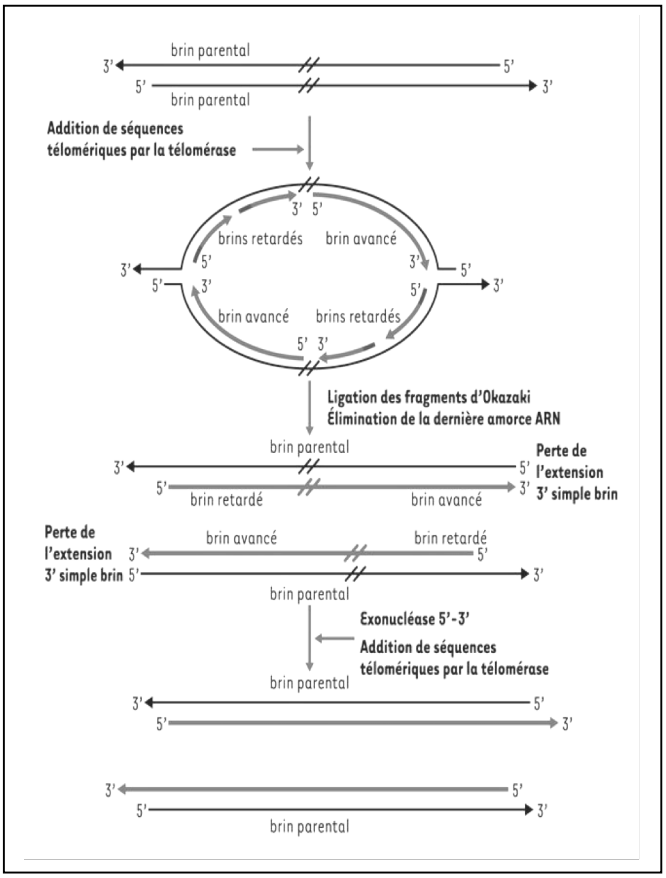
Dans les années 70, E. Blackburn entreprit de séquencer cette partie du chromosome chez le protozoaire cilié *Tetrahymena thermophila* dont le macronucleus possède environ 300 mini chromosomes donc une quantité très importante de télomères (Blackburn et Gall, 1978). Les résultats obtenus par E. Blackburn révèlent la répétition d'un court motif de six nucléotides (5'-GGGGTT) sur l'ensemble des séquences télomériques. Les études ultérieures réalisées sur de nombreux organismes ont montré que les régions télomériques sont en très grande majorité constituées selon la même organisation, avec la répétition de motifs riches en guanine (Table 1).

Organismes	Séquences répétées
Protozoaires	
Tetrahymena	TTGGGG
Oxytricha	TTTTGGGG
Euplotes	TTTTGGGG
Trypanosome	TTAGGG
Champignons	
Saccharomyces	TGTGGTGTGGG
Plantes	
Arabidopsis	TTTAGGG
Silene	TTTAGGG
Vertébrés	
Homo sapiens	TTAGGG
Autres vertébrés	TTAGGG

Table 1 : Les séquences d'ADN télomérique sont constituées de répétitions riches en guanine.

Le raccourcissement des télomères à chaque division cellulaire est une des particularités notables des télomères. En effet, du fait de l'orientation 5' vers 3' du mécanisme de réplication, l'extrémité des télomères ne peut être répliquée intégralement, car la dernière amorce ARN servant à la synthèse du brin retardé ne peut être remplacée en ADN (de Vries et al., 1972) (Watson, 1972) (figure 2). Chaque cycle de réplication provoque donc un raccourcissement des extrémités télomériques. Toutefois, ce phénomène ne peut expliquer à

lui seul la perte de 50 à 150 nucléotides observée pour les télomères humains car seule une dizaine de nucléotides serait concernée à chaque division (Smogorzewska et de Lange, 2004). Ceci suggère qu'il existe des mécanismes de dégradation du télomère, impliquant probablement l'intervention d'exonucléases.



<u>Figure 2 :</u> Le problème de la réplication de l'extrémité des télomères.
La réplication des deux brins d'ADN est réalisée dans des directions opposées à partir de l'origine de réplication. A la fin de la réplication, seule une amorce d'ARN reste présente au niveau de l'extrémité de chaque brin néoformé. Les dernières amorces sont éliminées par l'action d'une exonucléase 5' vers 3', laissant une extrémité simple brin. Chaque cycle de réplication provoque ainsi un raccourcissement des extrémités télomériques.

Les télomères pourtant sans information génétique n'en sont pas moins essentiels car ils constituent des régions protectrices du patrimoine génétique. A l'heure actuelle, il est admis que les télomères ont pour rôle principal de protéger les chromosomes de la machinerie de réparation en empêchant l'extrémité des chromosomes d'être reconnue comme des cassures double brin de l'ADN. Ils sont donc essentiels à la stabilité du génome, car ils sont garants de l'intégrité des chromosomes. Les télomères jouent également un rôle d' « horloge biologique » car la perte de séquence télomérique constitue un « marqueur » de l'âge de la cellule et est à l'origine de l'arrêt de divisions des cellules, ou sénescence réplicative, lorsque

la taille des télomères est trop faible pour leur permettre de remplir leur fonction de protection.

Il existe cependant des phénomènes capables de compenser cette perte et d'éviter le phénomène de sénescence. En effet, certaines cellules ont la capacité de maintenir la taille de leurs télomères à un niveau constant les rendant ainsi toujours fonctionnels. En 1985, Greider et Blackburn découvrent une enzyme chez *Tetrahymena Thermophila*, la télomérase, capable de pallier la perte d'ADN télomérique à l'extrémité des chromosomes (Greider et Blackburn, 1985). Cette enzyme possède une activité de transcriptase inverse, qui allonge les télomères en utilisant leur extrémité simple brin comme amorce. Elle est non-fonctionelle dans la plupart des cellules somatiques (Harley et al., 1990) mais elle est active dans les cellules germinales, dans les cellules souches, dans les cellules épithéliales et dans environ 90% des cellules cancéreuses (Greider et Blackburn, 1996). Cela fait de la télomérase un marqueur pour le diagnostic des cancers et une cible potentielle pour les traitements anti cancéreux.

Il existe également un mécanisme alternatif, télomérase indépendant, capable d'allonger les télomères. Il s'agit du phénomène ALT pour « Alternative lengthening of telomeres » (McEachern et Blackburn, 1996; Bryan et al., 1997; Bryan et al., 1997). Ce mécanisme méconnu implique des phénomènes de recombinaison non réciproques homologues entre les télomères (Dunham et al., 2000).

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques complexes, leur organisation et leur intégrité sont essentielles au fonctionnement normal de la cellule. Tout dérèglement entraîne des conséquences dramatiques pour la survie de la cellule.

La première partie de l'introduction de cette thèse présente l'ADN télomérique ainsi que les protéines qui participent au fonctionnement télomérique. Dans une seconde partie, nous verrons que l'homéostasie télomérique est essentielle pour le contrôle de la prolifération

cellulaire et donc que les télomères seraient impliqués dans le vieillissement naturel et dans la transformation des cellules en cellules cancéreuses. Finalement, nous étudierons plus en détail la protéine TRF2 qui est une protéine clé des télomères et qui est, entre autre, responsable du repliement des télomères en « t-loop », structure suspectée d'être responsable de la protection de l'extrémité des chromosomes.

II- LES TELOMERES SONT DES COMPLEXES NUCLEOPROTEIQUES

II-1- L'ADN télomérique

II-1-a- Présentation générale

L'ADN télomérique consiste en une longue séquence d'ADN non codante présente à l'extrémité des chromosomes. A l'exception de certains diptères comme la drosophile, les séquences télomériques sont assez bien conservées. Elles sont constituées d'un court motif répété en tandem riche en guanine (Wellinger et Sen, 1997) (Table 1). Chez les vertébrés, ce motif répété a pour séquence : 5'-TTAGGG-3'. La taille des télomères chez l'homme fluctue de 5 à 15 kb, mais elle peut varier de quelques centaines à quelques milliers de paires de bases en fonction des organismes. On observe des différences entre individus mais également d'un chromosome à un autre au sein d'une même cellule.

Comme les séquences télomériques présentent de façon conservée une répétition de motifs riches en guanine, cela conduit à une polarité entre les deux brins télomériques : un brin dépourvu de cytosine (brin G) et un brin dépourvu de guanine (brin C). Le brin G étant plus long que le brin C, le télomère présente donc, à son extrémité, une queue simple brin riche en G essentielle à l'architecture télomérique (Figure 3).

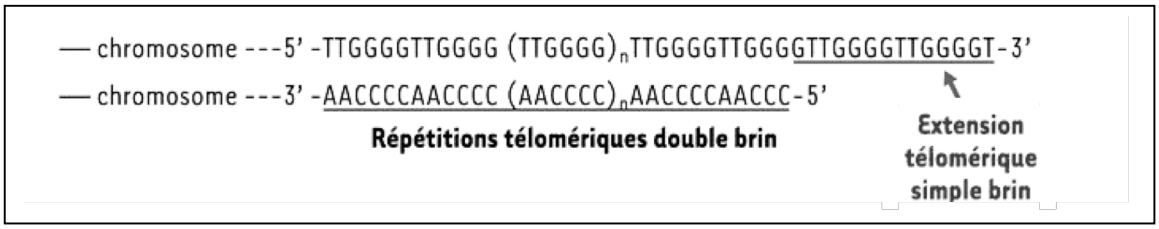


Figure 3 : Représentation de l'extrémité des télomères de *Tetrahymena* :
La taille de la région double brin ainsi que la taille de la région simple brin varient en fonction des organismes.

II-1-b- L'extrémité simple brin

La présence d'une extrémité simple brin de séquence riche en guanine se retrouve de manière conservée à travers les espèces. La taille de cette extension varie en fonction des organismes. Les protozoaires ciliés et les levures possèdent des extrémités de taille faible avec par exemple, 14 à 21 nucléotides pour *Tetrahymena thermophila*. Chez les mammifères, la taille est comprise entre 150 et 300 nucléotides (Makarov et al., 1997) (McElligott et Wellinger, 1997) (Wright et al., 1997). Chez l'homme, l'extrémité simple brin est détectable pendant toute la durée du cycle cellulaire (Wright et al., 1997).

Cette extrémité télomérique simple brin est essentielle pour la survie de la cellule. Son élimination entraîne des dysfonctionnements télomériques et conduit à des fusions télomériques (van Steensel et al., 1998; Karlseder et al., 1999; de Lange, 2002; Takai et al., 2003). Il existe probablement une corrélation entre l'érosion du simple brin télomérique et l'entrée des cellules en sénescence car la taille de l'extrémité simple brin des télomères diminue au cours des divisions. De plus les cellules qui stoppent leur division possèdent un simple brin de faible taille (Stewart et al., 2003).

Lors de la réplication de l'extrémité des télomères, si seul le problème de la réplication des extrémités entrait en jeu, un télomère sur deux seulement présenterait une extrémité simple brin. En effet, le télomère fils issu de la synthèse du brin avancée pouvant être répliqué totalement ne devrait pas présenter d'extension simple brin (Lingner et al., 1995) (Olovnikov, 1973) ce qui a d'ailleurs été mis en évidence dans un système de réplication in vitro du virus SV40 (Ohki et al., 2001).

Makarov et ses collaborateurs ont cependant mis en évidence chez de nombreux types cellulaires normaux et immortels la présence d'extension simple brin sur environ 80% des télomères (Makarov et al., 1997). De plus, on peut observer des extrémités simple brin sur les

deux télomères fils chez la levure et chez les ciliées (Dionne et Wellinger, 1996; Jacob et al., 2001).

La présence des extrémités simple brin sur les deux télomères fils doit donc s'expliquer autrement que par la réplication. L'action de la télomérase dans les cellules où elle est active pourrait contribuer à la formation du simple brin. Cependant, des études comparatives sur la taille du simple brin chez la levure ou dans des cellules de souris ne rapportent pas de différences lorsque l'activité de la télomérase est inhibée (Dionne et Wellinger, 1996; Hemann et Greider, 1999; Yuan et al., 1999). Il a donc été envisagé l'existence d'un mécanisme indépendant de la télomérase qui, à la place d'allonger l'extrémité 3' serait capable d'éroder l'extrémité 5' du brin C ; des activités exonucléases sont ainsi suspectées de participer à l'apparition de ces extrémités (voir section II-1-c).

Malgré tout, la taille des extrémités télomériques est différente entre les deux brins fils issus de la réplication. En effet, l'extrémité simple brin est plus longue pour le télomère issu de la réplication du brin avancé que pour celle du télomère issu de la réplication du brin retardé (Chai et al., 2006) confirmant le rôle important du problème de la réplication des extrémités dans la formation du simple brin terminal.

II-1-c- Régulation des extrémités

J. Shay et W. Wright ont montré que la séquence terminale du brin C est régulée de façon très stricte. En effet, le brin C des télomères de cellules humaines, se termine dans 80% des cas par la séquence 3'-CCA**ATC** (Sfeir et al., 2005). Il est intéressant de noter que le dernier nucléotide du brin C est le même quel que soit le télomère fils, le même mécanisme doit donc intervenir *in fine* sur les deux télomères fils. L'implication de nucléase(s) est fortement pressentie même si à l'heure actuelle, aucune nucléase responsable n'a encore été mise en évidence. Une étude réalisée chez Tetrahymena démontre l'implication de nucléases

dans la formation des extrémités simple brin sur les deux télomères fils (Jacob et al., 2003). Cette étude basée sur une méthode de ligation d'amorces après extension a mis en évidence la participation d'au moins deux étapes indépendantes de clivage de l'ADN, une digestion de quelques nucléotides pour l'extrémité 3' riche en G et une digestion plus importante sur l'extrémité du brin riche en C. Cette étude montre également que la taille de l'extrémité simple brin semble importante car le clivage des deux brins est régulé de façon très stricte. Les nucléases impliquées n'étant pas séquence spécifique, la régulation pourrait être due à la fixation d'une protéine spécifique du brin G similaire à POT1 (Baumann et Cech, 2001) ou à TEBP (Gottschling et Zakian, 1986).

Chez l'homme, plusieurs protéines ayant une activité nucléase sont présentes aux télomères; on peut citer les protéines ERCC1/XPF, la protéine Werner (WRN) ou Artémis. Dans le cas d'Artémis, des résultats récents semblent indiquer que des cellules déficientes en Artémis possèdent toujours la même séquence terminale pour le brin C. Cette protéine n'influerait donc pas sur cette régulation (communication personnelle W. Wright). Le complexe ERCC1/XPF est impliqué dans l'élimination du simple brin G et ne participerait pas non plus à cette régulation (Zhu et al., 2003). La protéine WRN présente bien une activité exonucléase, mais cette activité est orientée dans le sens 3' vers 5', ce qui n'est pas compatible avec la régulation de la séquence terminale du brin C. La nature de cette nucléase est donc toujours une question en suspens.

L'étude de la séquence du brin G, ne montre pas de séquence terminale préférentielle. Toutefois, dans les cellules ayant une activité télomérase, on observe une hausse dans la fréquence de la séquence TTAG, correspondant aux dernières bases de l'ARN de la télomérase (Sfeir et al., 2005). Ce biais serait donc imputable à la télomérase.

II-1-d- Les G-quadruplex ou G4

In vitro, il a été montré que des ADN simple brin télomériques contenant des triplets ou des quadruplets de guanine peuvent former, en présence de certains cations, une conformation particulière, le tetraplex ou G-quadruplex ou G4 (Williamson et al., 1989) (Sundquist et Klug, 1989). A la base des G-quadruplex, on retrouve une structure appelée le G-quartet qui comporte quatre guanines associées dans un plan cyclique par des liaisons hydrogène de type « Hoogsteen ». Dans cette structure, chaque guanine est impliquée dans quatre liaisons hydrogènes par l'intermédiaire des atomes N1, N7, O6 et N2 (Figure 4).

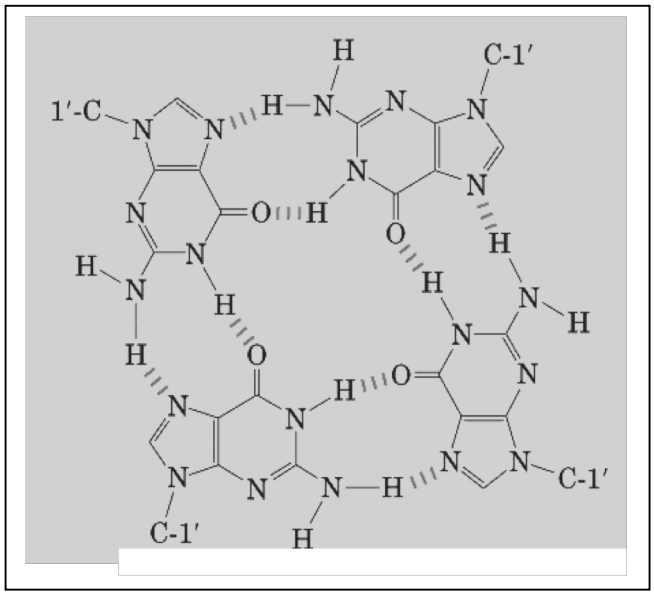


Figure 4 : Représentation d'un G-quartet.

Un G-quadruplex (ou G4) consiste en un empilement hydrophobe de plusieurs G-quartets. Les G4 sont des structures complexes pouvant adopter différentes topologies (Burge et al., 2006), plusieurs paramètres permettent ainsi de les classifier. Tout d'abord, le nombre de G-quartets impliqués peut varier. Ensuite, le repliement peut être intramoléculaire ou mettre en jeu deux ou quatre brins. Par ailleurs, l'orientation des ces brins peut être différente d'une structure à l'autre. Ainsi, une structure en G4 peut avoir les quatre brins orientés dans le

même sens de manière parallèle, trois brins parallèles et un brin anti-parallèle, les brins parallèles deux à deux ou alors alternativement anti-parallèles. En fonction de l'orientation des brins, les séquences reliant les répétitions de guanines vont former des boucles qui peuvent être de trois ordres : latérale, diagonale ou inversée.

La structure en G4 est stabilisée par la présence d'un cation de coordination, les deux cations les plus efficaces pour stabiliser les G-quadruplex sont le potassium et le sodium. L'orientation des brins, parallèle ou anti-parallèle, au sein d'un G4 peut varier en fonction du cation stabilisateur présent (Crnugelj et al., 2002) (Riou et al., 2003) (Neidle et Parkinson, 2003).

Du fait de sa composition nucléotidique, la séquence télomérique humaine est susceptible d'adopter une conformation en G-quadruplex. Des études *in vitro* ont ainsi révélé trois structures intramoléculaires pouvant être adopté par les séquences télomériques humaines. La première structure d'un G4 avec une séquence télomérique humaine a été obtenue, par RMN, en étudiant un oligonucléotide à quatre répétitions en présence de sodium (Wang et Patel, 1993). Dans ces conditions, la molécule AG3(T2AG3)3 adopte une structure en G-quadruplex intramoléculaire antiparallèle impliquant trois G-quartets. Trois boucles TTA apparaissent dans le prolongement des quartets terminaux dont une diagonale (Figure 5).

Des études cristallographiques du même oligonucléotide télomérique à quatre répétitions en présence de potassium montrent une seconde organisation assez différente (Parkinson et al., 2002). En effet, les quatre brins sont orientés de façon parallèle et présentent trois boucles diagonales et externes aux plateaux de quartets (Figure 5).

Récemment, une troisième structure « hybride » a été mise en évidence par dichroïsme circulaire en présence de potassium avec la séquence AG3(T2AG3)3 rallongée en 5'. Dans cette structure, le brin d'ADN est orienté de façon anti-parallèle, puis parallèle, entraînant

ainsi la présence de deux boucles latérales et une boucle inversée (Ambrus et al., 2006) (Luu et al., 2006) (Figure 5).

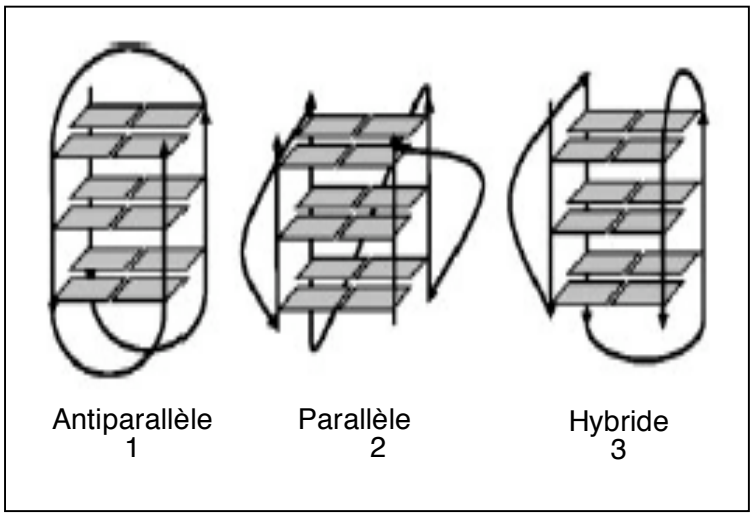


Figure 5 : Différentes conformations adoptées par les séquences télomériques humaines *in vitro* :
1- Structure antiparallèle
2- Structure parallèle
3- Structure hybride

Beaucoup d'études récentes se sont intéressées à la conformation que la séquence télomérique humaine devrait adopter dans les conditions physiologiques (faible concentration en sodium et forte concentration en potassium). Une étude réalisée par dichroïsme circulaire suggère que la structure parallèle serait favorisée (Rujan et al., 2005), mais une autre suggère plutôt que la structure anti-parallèle serait favorisée (Vorlickova et al., 2005). Par ailleurs, des études réalisées par fluorescence d'une molécule unique (FRET) mettent en évidence une grande diversité de structure avec le passage de la structure parallèle à la structure anti-parallèle mettant en jeu des structures intermédiaires (Lee et al., 2005). Des études réalisées par pontage au platine ont montré que les deux structures parallèles et anti-parallèles existent en solution quelque soit le cation présent (Na+ ou K+) (Ourliac-Garnier et al., 2005). En effet, la flexibilité de ces structures permet au platine de se fixer sur le N7 des guanines qui va former des pontages différents en fonction des structures. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence la présence des deux conformations.

La récente découverte de la structure hybride augmente encore l'incertitude concernant la structure adoptée par les séquences télomériques humaines. L'idée qui émerge

actuellement est qu'il n'existe pas qu'une seule structure mais plutôt un mélange de structures.

Ainsi, la structure en G4 a été observée par diverses techniques et à de nombreuses reprises *in vitro*. Toutefois, l'existence des ces structures *in vivo* est toujours sujette à débat (Riou et al., 2003) (Oganesian et Bryan, 2007).

Plusieurs observations argumentent cependant en faveur de l'existence de ces structures *in vivo*. Tout d'abord, les conditions intracellulaires sont tout à fait compatibles avec leur formation, le potassium est en effet présent à forte concentration dans la cellule (environ 160 mM). De plus, plusieurs protéines ont été décrites comme étant capables de se fixer, de cliver, de résoudre ou de favoriser la formation des G-quadruplex. Ainsi, la protéine GQN1 est une nucléase spécifique de ces structures (Sun et al., 2001) ; on peut également citer les protéines WRN et BLM qui sont des hélicases de la famille des recQ capables de résoudre ces structures (Riou et al., 2003) ; la nucléoline, quant à elle, peut reconnaître des G-quadruplex formés avec de l'ADN ribosomal (Hanakahi 1999). Par ailleurs, il existe également plusieurs ligands spécifiques des G-quadruplex. En effet, il a été montré qu'un ligand de la famille des triazines marqué au 14C se localisait au niveau des télomères (Granotier et al., 2005). Par ailleurs, des expériences cellulaires montrent que le traitement de cellules par un autre composé, la télomestatine, déplace les protéines TRF2 et Pot1 des télomères, ce qui suggère que la télomestatine se fixe aux télomères (Gomez et al., 2006 -a).

In vivo, la présence de G4 intramoléculaires à été visualisée par microscopie électronique lors de la transcription de séquences télomériques humaines contenues sur un plasmide chez *E.Coli* (Duquette et al., 2004). Lors de la transcription du brin C, l'ARN naissant s'hybride avec la matrice donnant une structure en forme de boucle (D-loop) où le brin G est désapparié. Ce brin G adopte une conformation en quadruplex mise en évidence par sa sensibilité aux coupures par l'enzyme GQN1. Ces structures pourraient donc apparaître

lors de dénaturation de l'ADN dans la recombinaison ou la réplication. Par ailleurs, ces structures ont été mises en évidences dans le macronoyau de ciliés en utilisant des anti-corps anti-quadruplexe (Schaffitzel et al., 2001).

Différents rôles pour ces structures ont été proposées. Tout d'abord, il se pourrait que les G-quadruplex puissent être un mécanisme de protection de l'extrémité des télomères en permettant la séquestration du simple brin terminal. En effet, des études, chez les ciliés, ont montré que les deux protéines TEBPα et TEBPβ coopèrent pour stabiliser les G-quadruplex, cette structure permettrait ainsi de protéger l'extrémité des télomères (Paeschke et al., 2005). Chez l'homme, de telles structures pourraient aussi participer à la protection de l'extrémité télomérique à certains moments du cycle cellulaire. Il est également possible que ces structures en G4 coexistent et/ou participent à la mise en place de la structure télomérique en boucle, ou boucle T, observée par microscopie électronique, et suspectée d'être responsable de la protection de l'extrémité des télomères (voir partie IV-5 de l'introduction).

II-1-e- Particularités du brin C

Dans certaines conditions, un brin d'ADN simple brin de séquence riche en C peut également adopter une structure particulière appelée, i-motif (Gehring et al., 1993) (Leroy et al., 1993; Kanaori et al., 2001). Ce motif repose sur l'intercalation tête-bêche de deux duplexes parallèles formés de paires de bases C.CH+ (figure 6). Comme le G-quadruplex, il peut être monomérique, dimérique ou tetramérique. La stabilité de ce motif dépend du pH, de la température et de la force ionique. Le motif i intramoléculaire formé par la séquence naturelle télomérique humaine, d[(CCCTAA)$_3$CCCT] persiste à pH 7 (Phan et al., 2000). Ces structures pourraient elles aussi avoir un rôle biologique car certains facteurs ont été trouvé se fixant sur ces séquences (Marsich et al., 1996) (Marsich et al., 1998) (Lacroix et al., 2000). Mais à l'heure actuelle, aucune preuve de son implication biologique n'a été apportée.

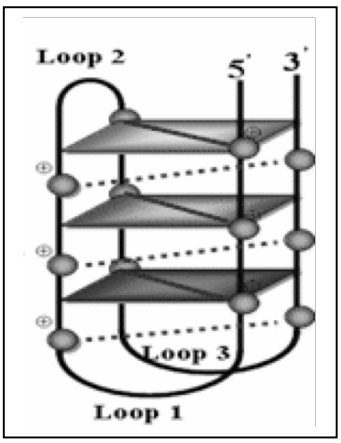


Figure 6 :
Représentation schématique
du « i-motif »

II-2- Les protéines de l'architecture télomérique

De nombreuses protéines participent à la dynamique et à la mise en place de l'architecture télomérique nécessaire à son bon fonctionnement. Chez l'homme, en plus du complexe de la télomérase, on retrouve six protéines abondantes spécifiques des télomères. Ces protéines, TRF1, TRF2, POT1, TIN2, PIP1 et hRap1, ont été décrites comme étant à la base de l'architecture télomérique. Elles forment le complexe « shelterin » (de Lange, 2005) ou « Télosome » (Liu et al., 2004). TIN2, PIP1 et hRap1 sont recrutées aux télomères par l'intermédiaire des protéines TRF1, TRF2 et POT1 qui interagissent spécifiquement avec l'ADN télomérique.

II-2-a- TRF1 et TRF2

Chez l'homme, les deux protéines TRF1 et TRF2 sont les deux seules protéines connues à ce jour à se fixer de façon spécifique sur l'ADN télomérique double brin. La protéine TRF1 pour « TTAGGG Repeat binding Factor 1 » a été identifiée par le groupe de T. de Lange (zhong 1992) (Chong et al., 1995) suivie quelques années après de la protéine TRF2 « TTAGGG Repeat binding Factor 2 », une protéine homologue à TRF1 (Bilaud et al., 1997)

(Broccoli et al., 1997) (Smogorzewska et al., 2000). A l'heure actuelle, les protéines télomériques ont été étudiées chez beaucoup d'organismes : levures, plantes, ou encore plusieurs mammifères. A l'exception des diptères, dont les télomères sont en fait constitués de rétrotransposons (Pardue et al., 2005), tous les organismes étudiés possèdent des protéines équivalentes, plus ou moins similaires à TRF1 et TRF2, témoignant donc d'une conservation dans l'évolution.

II-2-a-1- Architecture des deux protéines

Les protéines TRF1 et TRF2 ont un poids moléculaire d'environ 60kDa et présentent une architecture commune. Elles sont en effet toutes deux composées de quatre domaines bien définis : un domaine de fixation à l'ADN en position C-terminale, un domaine liaison (« linker ») ou charnière de fonction inconnue, un domaine de dimérisation, et un domaine N-terminal, de nature très acide pour TRF1 et très basique pour TRF2, qui a pour rôle, entre autre, de recruter différents partenaires (Figure 7).

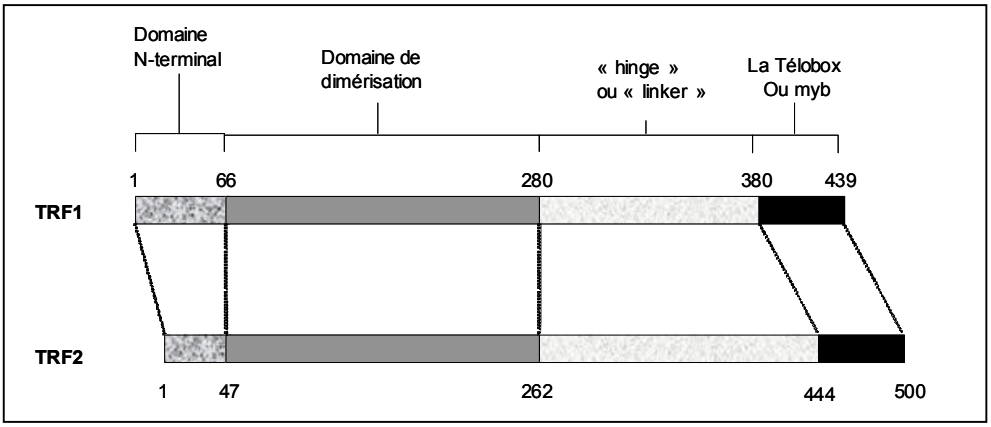


Figure 7 : représentation de TRF1 et de TRF2.
Les quatre domaines sont indiqués.

Le domaine de fixation à l'ADN de ces deux protéines, est très semblable avec 56% d'identité de séquence entre TRF1 et TRF2. Ce domaine de fixation se retrouve chez

beaucoup de protéines impliquées dans les fonctions télomériques de divers organismes ce qui lui a valu le nom de « telobox » (Bilaud et al., 1996). Il présente également une forte homologie de séquence avec le domaine de fixation à l'ADN de l'oncoprotéine c-myb (Gonda et al., 1985), ce qui lui a valu le nom de « myb-like domain » (Chong et al., 1995).

La plupart des protéines « myb-like » non télomériques possèdent trois motifs mybs répétés en tandem dont deux au moins sont nécessaires à la fixation à l'ADN, c'est le cas par exemple de la protéine BAS1 de levure (Hovring et al., 1994). Mais beaucoup de ces protéines possèdent seulement deux motifs, comme par exemple la protéine cdc4 de levure (Ohi et al., 1994). La juxtaposition d'au moins deux domaines mybs semble donc être essentielle pour la reconnaissance de l'ADN. En ce qui concerne les protéines télomériques, ce mode de reconnaissance est conservé. Ainsi, la protéine RAP1 de levure qui possède deux motifs en tandem peut se fixer sous forme d'un monomère (Konig et al., 1996). Les protéines TRF1 et TRF2 quant à elles ne contiennent qu'un seul motif myb par chaîne polypeptidique. Toutefois, elles possèdent un domaine de dimérisation leur permettant de présenter plusieurs « telobox » pour l'interaction avec l'ADN.

Les structures RMN du domaine « myb-like » de TRF1 puis de son complexe avec l'ADN ont été publiées par Nishikawa et ses collaborateurs (Nishikawa et al., 1998; Nishikawa et al., 2001). Ces études suggèrent que chaque monomère pourrait se fixer indépendamment en adoptant une organisation similaire à celle de la protéine Rap1. Chaque monomère est composé de trois hélices α, la reconnaissance de l'ADN est assurée par la seconde et la troisième hélice qui forment un motif hélice-tour-hélice (motif HTH) qui reconnaît la séquence TAGGG et interagit au niveau du grand sillon de l'ADN. Un bras flexible en position N-terminale interagit quant à lui avec le petit sillon et reconnaît la séquence TT. D. Rhodes a étudié la fixation de ce domaine myb de TRF1, isolé, sur l'ADN télomérique humain par des expériences de gel retard. Elle a ainsi montré que la fixation de ce

domaine se fait sous la forme d'un monomère, que sa fixation est spécifique et qu'il présente une forte affinité pour l'ADN télomérique (Kd = 3.2 (+- 0.5) nM). La fixation de ce domaine est centrée sur la séquence 5'-GGGTTA-3', deux domaines pourraient se fixer de manière indépendante avec un décalage de six paires de bases (Konig et al., 1998).

La structure du domaine de fixation de TRF2 a également été obtenue plus récemment par RMN (Hanaoka et al., 2005) et par cristallographie (Court et al., 2005). La comparaison des domaines de TRF1 et de TRF2 ne révèle que de très légères différences entre les deux.

La dimérisation de TRF1 et TRF2 est assuré par un domaine de dimérisation en forme de « fer à cheval », et bien que les domaines de dimérisation soit structuralement très semblables entre les deux protéines, ils présentent des interactions spécifiques qui empêchent leur hétérodimérisation (Fairall et al., 2001).

Les deux autres domaines, le domaine N-terminal et le domaine liaison sont assez différents entre les deux protéines. En ce qui concerne le domaine liaison, aucune fonction n'a été identifiée. En revanche, le domaine N-terminal est connu pour recruter différents partenaires mais il a également été montré qu'il constitue un second domaine de fixation à l'ADN (Fouche et al., 2006). Cette particularité sera analysée dans la partie résultats /discussion.

II-2-a-2- TRF1 et TRF2 possèdent des fonctions biologiques différentes

Malgré leurs ressemblances architecturales, TRF1 et TRF2 présentent des rôles bien distincts. Les fonctions de ces protéines ont été identifiées en modifiant leur expression au sein de cellules présentant une activité télomérase, cette enzyme responsable de l'allongement des télomères et décrite en page 31.

La surexpression de TRF1 dans ces cellules entraîne une diminution de la taille des télomères alors que son inhibition par l'expression d'un allèle dominant négatif entraîne une élongation de la taille des télomères (van Steensel et de Lange, 1997). TRF1 est donc un régulateur négatif de la taille des télomères ; elle interagit avec la protéine PINX1 qui inhibe la télomérase en se fixant directement sur la sous unité hTERT (Zhou et Lu, 2001). *In vitro* PINX1 se lie à la sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT), ainsi qu'à la sous-unité hTR elle-même. PINX1 inhiberait donc l'activité de la télomérase *in vivo* en se fixant au complexe hTERT-hTR (Banik et Counter, 2004).

TRF1 présente d'autres rôles au sein de la cellule, elle est nécessaire à la fois au développement normal des cellules souches embryonnaires, au maintien de la structure des télomères et à la stabilité chromosomique (Iwano et al., 2004). TRF1 est également impliquée dans la résolution des chromatides sœurs lors de la réplication des télomères (Dynek et Smith, 2004). De plus, il s'agit d'un facteur essentiel pour le « telomere seeding », i.e. la formation de télomère *de novo* au niveau de site(s) de coupure non télomériques (Okabe et al., 2000). TRF1 pourrait aussi jouer un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire. La phosphorylation de la sérine 219 de TRF1 par la kinase ATM (Ataxia Telangectasia Mutated) lui permettrait d'arrêter le cycle cellulaire en phase G2/M (Kishi et al., 2001; Kishi et Lu, 2002). De plus, la protéine Pin2 qui est un isoforme de TRF1 possédant 20 acides aminés en moins dans le domaine « linker », jouerait un rôle dans la régulation de la mitose (Zhou et al., 2003), en effet une interaction entre Pin2 et le fuseau mitotique a été proposée (Nakamura et al., 2001). TRF1 est donc un élément clé qui relie la régulation de la taille des télomères et la régulation du cycle cellulaire en activant certains points de contrôles.

TRF1 pourrait donc jouer différents rôles du fait de sa fixation sur les télomères mais aussi sous forme libre au sein de la cellule. Sa fixation aux télomères est contrôlée, entre autre, par la Tankyrase 1 (TANK1). Cette protéine est une PARP (poly(ADP-ribose)

polymérase) qui interagit avec le domaine N-terminal acide de TRF1 et empêche la fixation de TRF1 sur les télomères en lui « greffant » des polymères d'ADP ribose (Smith et al., 1998). Une surexpression de TANK1 entraîne ainsi une augmentation de taille des télomères (Smith et de Lange, 2000). Cette protéine permettrait de déloger TRF1 des télomères lors de la réplication, on sait en effet que TRF1 et TRF2 ont un effet inhibiteur sur l'avancée de la fourche de réplication (Ohki et Ishikawa, 2004).

Comme TRF1, TRF2 joue également un rôle de régulateur négatif des télomères. Cependant, TRF2 agirait de façon indépendante vis à vis de la télomérase (Ancelin et al., 2002).

L'activité de TRF2 peut être inhibée en surexprimant, au sein d'une cellule, un mutant de TRF2 délété de son domaine de fixation à l'ADN et de son domaine N-terminal ($TRF2^{\Delta B \Delta M}$). Cette protéine tronquée va former des hétérodimères inactifs avec la protéine native (van Steensel et al., 1998). L'expression de cet allèle dominant négatif engendre rapidement des fusions télomériques par les extrémités (« end-to-end fusions »). Ces fusions sont dramatiques pour la survie de la cellule, elles aboutissent en effet à la mort de la cellule par apoptose (Karlseder et al., 1999). Les fusions télomériques sont dépendantes de l'élimination de l'extrémité 3' simple brin. Il a été montré que la perte de TRF2 induit une baisse significative de cette extrémité et que cette perte est dépendante du complexe ERCC1/XPF, une endonucléase qui reconnaît les jonctions simple brin/double brin et les coupe *in vitro* (Zhu et al., 2003). TRF2 aurait donc un rôle dans la protection des extrémités, en son absence, les extrémités deviennent « sensibles », elles peuvent ainsi être éliminées et les fusions peuvent survenir.

Lorsque l'on réalise une surexpression de TRF2, on observe une baisse de la taille critique des télomères responsables de l'entrée des cellules en sénescence (Karlseder et al., 2002). TRF2 présente donc deux rôles distincts au niveau des télomères ; elle est essentielle

pour leur protection, mais elle est également impliquée dans la régulation de la taille des télomères. Parallèlement, l'étude du temps de résidence de TRF2 sur les télomères a révélée la présence de deux comportements distincts définissant deux groupes de protéines. Un groupe de temps de résidence faible qui se comporte comme TRF1 et un groupe de temps de résidence plus important qui se comporte comme la protéine hPOT1 (Mattern et al., 2004).

On peut également entrevoir l'importance de TRF2 par le grand nombre de facteurs qui interagissent avec elle. En effet, TRF2 recrute beaucoup de partenaires qui interviennent dans les processus fondamentaux de la cellule comme la réplication, la recombinaison ou encore la réparation (voir partie V). Par ailleurs, certains auteurs ont proposés un rôle pour TRF2 dans la réponse aux dommages à l'ADN et plus précisément dans les premières étapes de la reconnaissance de dommages non télomériques. En effet, on retrouve TRF2 au niveau de dommages, obtenus par une exposition des noyaux à un rayonnement laser, seulement deux secondes après l'induction de ces dommages (Bradshaw et al., 2005). Il s'agit d'une forme transitoire de TRF2, phosphorylée par ATM, que l'on retrouve également au niveau des télomères des cellules ALT (Tanaka et al., 2005).

La dernière partie de cette introduction s'attardera plus particulièrement sur les différents rôles connus de cette protéine clé.

II-2-b- hPOT1

La protéine hPOT1 pour « Protection Of Telomere 1 » a été découverte grâce à sa grande similarité de séquence avec la protéine TEBPα, qui est une protéine capable de fixer l'ADN simple brin télomérique chez le cilié *Oxytrichia nova* (Baumann et al., 2002). Chez les mammifères, contrairement à TRF2, lorsque hPOT1 est inhibée, les télomères ne fusionnent pas et il n'y a pas d'arrêt du cycle cellulaire. En revanche la taille du simple brin diminue et des dommages à l'ADN apparaissent, ces dommages sont transitoires et n'entraînent donc pas

d'arrêt du cycle (Hockemeyer et al., 2005). Récemment, des études réalisées chez la souris ont révélé la présence de deux gènes codant pour deux protéines POT1A et POT1B. Bien que les deux gènes possèdent des séquences très similaires, deux études indépendantes ont montré que l'inhibition indépendante de ces deux gènes chez la souris aboutit à des phénotypes différents. Les souris déficientes en *Pot1a* subissent une létalité précoce alors que les souris déficientes en *Pot1b* sont viables, mais les télomères de ces souris possèdent une très longue queue simple brin (Hockemeyer et al., 2006) (Wu et al., 2006). Chez la souris, ces deux protéines paralogues sont requises pour une protection optimum des télomères. Une telle divergence entre la souris et l'homme est inattendue étant donné les similarités déjà observées entre les deux et cette divergence pourrait nuancer les interprétations faites des résultats obtenus avec cet organisme modèle.

hPOT1 est également impliquée dans la spécificité de séquence observée au niveau de l'extrémité du brin C, en effet, l'inhibition de hPOT1 par ARN interférant conduit à une séquence terminale aléatoire de l'extrémité 5' du brin C des télomères. Deux possibilités sont à envisager, soit hPOT1 recrute une nucléase spécifique, soit sa fixation permet de protéger les extrémités finissant par ATC (Hockemeyer et al., 2005).

La fixation de hPOT1 est très spécifique, le site de fixation minimal sur l'ADN télomérique simple brin est un nonamère de séquence 5'-TAGGGTTAG-3'. Lorsque la séquence télomérique est courte, elle préfère les oligonucléotides contenant les répétitions télomériques à leur extrémité, mais elle est également capable de se fixer sur une séquence contenant les répétitions en position interne lorsque la taille de la séquence télomérique est grande (Loayza et al., 2004). Ceci suggère que hPOT1 peut se fixer sur l'intégralité de l'extrémité simple brin et pas seulement à l'extrémité. Cette protéine se lie à l'ADN télomérique simple brin par l'intermédiaire de deux domaines « OB fold » (Oligonucleotide

Binding fold) situés en position N-terminale. La structure cristallographique de ce domaine en complexe avec un décamère révèle qu'un des deux domaines se fixe sur six résidus internes, alors que le deuxième se fixe à l'extrémité du simple brin (Lei et al., 2004).

In vitro, hPOT1 possède la capacité d'inhiber l'action de la télomérase. Ainsi, l'expression du mutant négatif POT1(ΔOB), qui ne peut pas se fixer sur l'ADN simple brin, induit une rapide élongation des télomères dans des cellules humaines (Loayza et De Lange, 2003). Il a été proposé que la fixation de hPOT1 sur le simple brin télomérique empêcherait celle de la télomérase et donc empêcherait l'élongation des télomères. Ce mutant resterait cependant localisé au niveau des télomères par l'intermédiaire de TRF1 (Kelleher et al., 2005) (Loayza et De Lange, 2003). Ce contrôle exercé par TRF1 pourrait constituer un moyen d'indiquer la taille des télomères à l'extrémité, lieu d'action de la télomérase. Lorsque les télomères sont courts, peu de TRF1 est fixé, le recrutement de hPOT1 est donc limité et l'action de la télomérase serait facilitée (Lundblad, 2003; Smogorzewska et de Lange, 2004).

Mais cette régulation s'avère plus complexe car d'autres études montrent que hPOT1 serait au contraire un régulateur positif de la taille des télomères dépendant de la télomérase (Colgin et al., 2003). Cet effet pourrait être expliqué par la capacité de hPOT1 à éliminer des structures G-quadruplex éventuellement adoptées par le simple brin. Dans un système *in vitro* d'études d'activité de la télomérase, on s'aperçoit que lorsque l'amorce utilisée est de taille compatible avec la formation de G-quadruplex, la processivité de la télomérase est hautement inhibée. Lorsque hPOT1 est ajoutée, elle se fixe du coté 5' et laisse libre les huit derniers nucléotides permettant ainsi de restaurer la processivité de la télomérase (Zaug et al., 2005). De plus, il a été montré qu'en association avec TPP1, elle stimule l'activité de la télomérase (Wang et al., 2007; Xin et al., 2007).

hPOT1 posséderait donc deux effets antagonistes, elle pourrait en fonction des conditions inhiber l'élongation des télomères en empêchant l'accès de la télomérase à son

substrat, mais elle pourrait au contraire permettre une meilleure reconnaissance de la télomérase pour son substrat et stimuler son activité. Cela suggère que les télomères peuvent adopter deux états, un état « on » qui facilite l'action de la télomérase et un état « off » qui bloque l'accès de l'extrémité à la télomérase et que hPOT1 participerait à cette transition (Lei et al., 2005). Il a été proposé qu'un ou plusieurs autres facteurs catalysent cette interconversion, il est probable que cette régulation soit dépendante de l'organisation adoptée par le télomère sous l'influence des protéines dites du complexe « shelterin ». On sait par exemple que hPOT1 interagit aussi avec TRF2 en formant un complexe ternaire avec l'ADN télomérique (Yang et al., 2005).

II-2-c- TIN2 et TPP1

La protéine TIN2 a été découverte en 1999 en utilisant la technique du double hybride en prenant la protéine TRF1 comme cible (Kim et al., 1999). TIN2 est une protéine modulateur de PARP, elle empêche la poly(ADP-ribosyl)ation de TRF1 par la Tankyrase 1, elle contribue ainsi à l'accumulation de TRF1 aux télomères (Ye et de Lange, 2004). TIN2 interagit également avec le complexe TRF2-hRap1 en stabilisant l'association de TRF2 aux télomères et permettrait de faire lien entre TRF1 et TRF2. TIN2 se lie à TRF1 et à TRF2 par des domaines distincts, TBD1 et TBD2 (« TRF1 ou TRF2 binding domain ») (Houghtaling et al., 2004; Kim et al., 2004; Ye et al., 2004). Ce facteur constitue le lien du complexe dit « shelterin », car il permet également de relier TRF1 et TRF2 à la protéine POT1, il permet ainsi d'établir une connexion entre la partie simple brin et la partie double brin des télomères.

Le lien entre POT1 et TIN2 est en fait assuré par une autre protéine intermédiaire appelée TPP1 (à l'origine : PIP1 (Ye et al., 2004), PTOP (Liu et al., 2004) ou TINT1 (Houghtaling et al., 2004)). Cette protéine qui interagit avec TIN2 est indispensable à l'organisation correcte du complexe télomérique (O'Connor et al., 2006). Récemment, deux

équipes ont montré que TPP1 est l'homologue de la protéine TEBPβ (qui forme un hétérodimère avec la protéine TEBPα), identifiée chez le cilié *Oxytrichia nova,* et qu'elle intéragit avec la protéine POT1, qui est l'homologue de la protéine TEBPα (Xin et al., 2007) (Wang et al., 2007). Chez ce cilié, TEBPα et TEBPβ forment donc un hétérodimère responsable de la protection de l'extrémité simple brin des télomères. Ces deux études montrent également que chez l'homme, TPP1 permet d'augmenter l'affinité de POT1 pour le simple brin télomérique et qu'en association avec POT1, TPP1 est nécessaire au recrutement de la télomérase et donc à l'élongation des télomères. Le complexe POT1/TPP1 aurait donc un double rôle aux télomères. Ces deux protéines font parti du complexe dit « shelterin » et sont nécessaires à la mise en place de la structure protectrice des télomères, cependant, elle sont également responsables du recrutement de la télomérase, sans doute lorsque les télomères sont trop courts et ne peuvent plus adopter cette structure protectrice.

II-2-d- hRap1

La protéine humaine hRap1 a également été découverte en 2000 par la technique du double hybride mais en utilisant TRF2 comme cible (Li et al., 2000). Le gène codant pour hRap1 est l'homologue humain du gène codant pour la protéine Rap1 de levure. Cette protéine associée à TRF2, contient un domaine de fixation à l'ADN de type Myb, mais elle semble incapable de se fixer sur l'ADN télomérique (Hanaoka et al., 2001). hRap1 est responsable du recrutement des protéines de la réparation nécessaire au maintien des télomères. En effet, hRap1 recrute les protéines Rad50, Mre11, Ku86/Ku70, et PARP1 (O'Connor et al., 2004). De plus, ce facteur est également un régulateur négatif de la taille des télomères, son inhibition dans les cellules télomérase positive induit une augmentation de taille des télomères et affecte leur hétérogénéité, suggérant un contrôle de l'élongation des

télomères à travers la régulation de la télomérase (Li et de Lange, 2003; O'Connor et al., 2004).

Il existe donc sur les télomères, du moins transitoirement, un complexe télomérique composé de six protéines spécifiques (figure 8). L'interconnexion entre toutes ces protéines permet de relier la fonction de régulation de la taille des télomères par la télomérase à la fonction de régulation de la protection des télomères. En effet, ce complexe permettrait un remodelage des télomères empêchant à la fois l'activité de la télomérase et une protection contre des nucléases ou contre des phénomènes de recombinaison et permettrait ainsi d'éviter les fusions. On peut imaginer que lorsque la taille des télomères est trop courte, les protéines de ce complexe « shelterin » ne pourraient plus organiser l'extrémité télomérique la rendant ainsi accessible. Le complexe permettrait ainsi aux télomères d'exister sous deux états, l'état protégé où le simple brin est séquestré et l'état déprotégé rendant le simple brin accessible et qui en fonction du contexte cellulaire conduit à la sénescence ou à l'allongement du télomère.

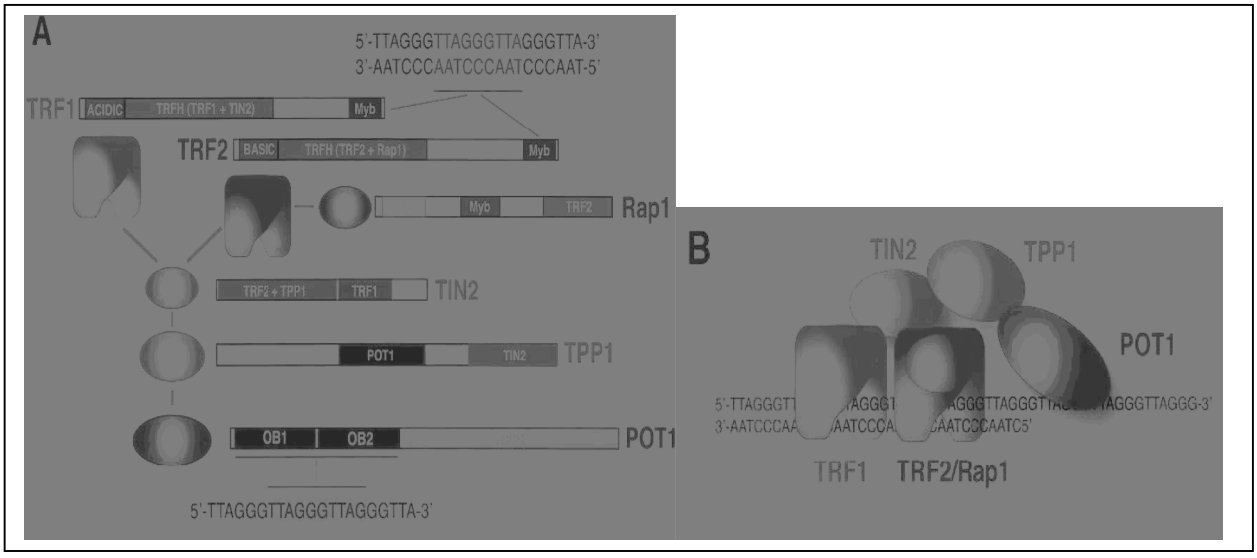


Figure 8 : le complexe shelterin (issue de (de Lange, 2005))
(A) Représentation des six sous-unités connues du complexe shelterin. Les interactions entre les protéines ainsi que les sites de fixation à l'ADN sont également représentés.
(B) Représentation schématique du complexe sur l'ADN télomérique.

III- HOMEOSTASIE, VIEILLISSEMENT ET PROLIFERATION

III-1- Les phénomènes de compensation de l'érosion télomérique

On a vu précédemment que la taille des télomères diminue à chaque cycle de division des cellules et que lorsque les télomères atteignent une taille incompatible avec leur fonction de protection, ils induisent l'entrée des cellules en sénescence. Certaines cellules comme les cellules germinales ou les cellules cancéreuses sont cependant capables de compenser cette perte et donc de continuer à se diviser. Il existe deux mécanismes différents capables de permettre cette élongation : le premier est basé sur l'activité enzymatique de la télomérase, le second, moins décrit, mettrait en jeu des phénomènes de recombinaison (ALT).

III-1-a- La télomérase

En 1985, E. Blackburn découvrit une enzyme capable d'allonger les télomères, la télomérase (Greider et Blackburn, 1985). Elle montra par la suite qu'il s'agit d'un complexe ribonucléopreotéique possédant une activité de transcriptase inverse (Greider et Blackburn, 1987). Le complexe de la télomérase chez l'homme fut mis en évidence peu de temps après (Morin, 1989).

La télomérase est non fonctionnelle dans la plupart des cellules somatiques (Harley et al., 1990), elle est en revanche active dans les cellules germinales et dans des cellules somatiques à fort potentiel de prolifération comme les cellules de la peau (Harle-Bachor et Boukamp, 1996) (Taylor et al., 1996) (Yasumoto et al., 1996), les cellules du système immunitaires (Counter et al., 1995) (Morrison et al., 1996) (Weng et al., 1997), ou les cellules du tissu colorectal (Tahara et al., 1995). Elle est également active dans environ 90% des cellules cancéreuses (Kim et al., 1994) (Greider et Blackburn, 1996).

La télomérase humaine consiste en un complexe de haut poids moléculaire d'environ 1000 kDa (Beattie et al., 2001). Elle possède deux sous-unités principales, une sous-unité ARN (hTR ou hTERC) et une sous-unité protéique catalytique (hTERT), mais de nombreux facteurs viennent s'ajouter à ce complexe et interviennent dans la stabilité, la maturation ou encore la localisation du complexe (Figure 9). La nucléoprotéine, dont l'assemblage a lieu dans le nucléole, est actif sous la forme d'un dimère (Wenz et al., 2001) (Beattie et al., 2001), l'enzyme fonctionnelle est donc composée de deux complexes hTERT/hTR et la dimérisation est assurée par les deux sous-unités ARN qui coopèrent afin d'obtenir une meilleure reconnaissance ainsi qu'une meilleure activité.

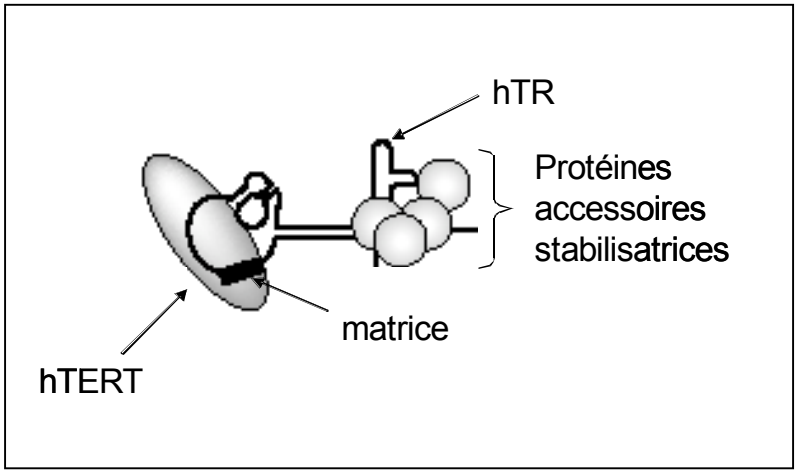


Figure 9 : représentation schématique de la télomérase sous forme monomérique.

La sous-unité catalytique, hTERT, de séquence très conservée entre les espèces, possède une activité de transcriptase inverse (Lingner et al., 1997) (Nakamura et al., 1997) (Nugent et Lundblad, 1998). Cette sous-unité est constituée de quatre domaines (Collins, 2006) (Legassie et Jarstfer, 2006). Le domaine N-terminal (TEN) sert à « l'ancrage » de la télomérase sur les télomères. Le domaine TRBD permet l'interaction à la sous-unité ARN. Le domaine catalytique RT contient sept motifs conservés parmi toutes les transcriptases inverses ainsi qu'un motif télomérase spécifique, le motif T (Nugent et Lundblad, 1998). Le dernier

domaine est le domaine C-terminal (TEC) qui serait impliqué dans la processivité de l'enzyme.

La sous-unité hTR correspond à un transcrit mature d'ARN de 451 nucléotides (Feng et al., 1995). Des expériences de modélisation ainsi que des analyses phylogénétiques réalisées à partir de plusieurs espèces parmi les vertébrés ont permis d'isoler cinq domaines conservés (Chen et al., 2000; Bachand et al., 2001). Le domaine « pseudonoeud » ou CR2-3, le domaine « template » qui contient la séquence matrice homologue à la séquence de l'extrémité simple brin du télomère ; le domaine CR4-CR5 qui est essentiel à l'activité de la télomérase *in vivo* et *in vitro* (Tesmer et al., 1999) ; et les domaines CR7 et CR6/CR8, à boite H/ACA, qui sont importants pour l'accumulation, la maturation et la stabilité d'hTR in vivo (Mitchell et Collins, 2000) (Figure 10). Cette sous-unité contient aussi des régions variables qui modulent son interaction avec hTERT et/ou contrôlent la polymérisation (Chen et al., 2000).

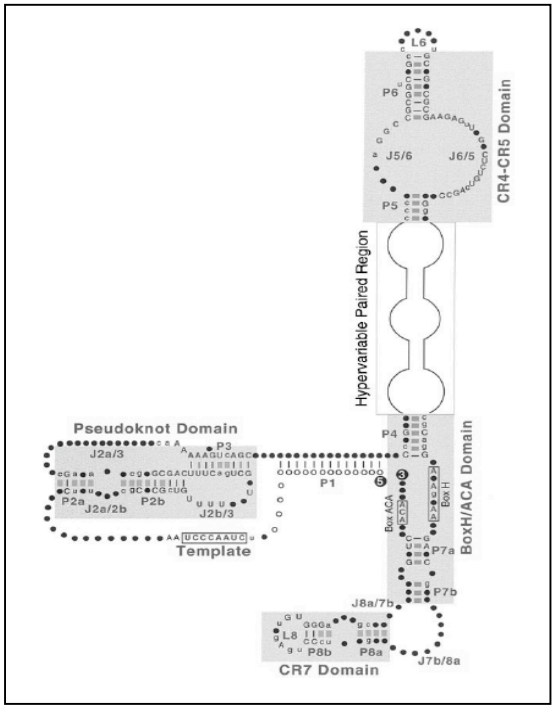


Figure 10 : représentation de la structure secondaire de la sous unité hTR (Chen et al., 2000). Les quatre domaines conservés (CR) sont indiqués.

Les domaines conservés de hTERT et de hTR constituent des sites de reconnaissance pour un certain nombre de facteurs qui s'ajoutent au complexe et qui interviennent dans la

régulation de l'activité de l'enzyme. Chez l'homme la dyskérine qui s'associe au motif H/ACA de la sous-unité ARN a été récemment identifiée comme le seul facteur supplémentaire requis pour avoir la télomérase sous une forme active (Cohen et al., 2007). Des mutations dans cette protéine sont à l'origine de la maladie génétique rare DKC (dyskeratosis congenita) (Dokal, 2000). Il existe également chez l'homme des protéines issus de gènes orthologues du gène EST1 de la levure, dont la mutation est impliquée dans le phénotype « ever shorter telomere », qui leur a donné leur nom, et qui conduit à une baisse progressive de la taille des télomères (Lundblad, 2003).

La télomérase est une enzyme qui allonge l'extrémité 3' des télomères de façon processive. Chaque cycle est amorcé par la reconnaissance de l'extrémité et l'appariement de la matrice. Chez l'homme, la séquence matrice est : CAAUCCCAAUC (Feng et al., 1995). Une fois fixée, la sous-unité catalytique peut entrer en action et synthétiser une répétition télomérique par cycle à partir de la séquence matrice. Un nouveau cycle est amorcé après translocation de l'enzyme sur la répétition nouvellement synthétisée.

Dans les cellules somatiques saines, la télomérase est inactive car la sous-unité hTERT n'est pas exprimée ; la sous-unité hTR quant à elle est constitutivement exprimée et ne semble pas avoir de rôle dans ces cellules (Zimmermann et Martens, 2007). La régulation de la sous-unité hTERT s'effectue au niveau de son promoteur qui est donc inactif dans les cellules somatiques et actif dans les cellules cancéreuses (Takakura et al., 1999). Il existe beaucoup de facteurs de transcription, comme les facteurs c-myc, Sp1, Mad ou Max qui régulent positivement ce promoteur (Wick et al., 1999), à l'inverse, de nombreux facteurs comme p53, et pRB réprime la transcription de ce gène (Kanaya et al., 2000) (Xu et al., 2001). Des modifications épigénétiques comme des méthylations de la séquence promotrice peuvent

aussi intervenir dans la régulation (Cong et al., 2002). Bien que présente dans toute les cellules, la sous-unité hTR est surexprimée dans les cellules cancéreuses. Des régulations transcriptionelle et post-transcriptionelle rentrent également en jeu (Yi et al., 1999).

Le dernier niveau de régulation de la télomérase s'effectue par son accessibilité à son substrat. En effet, l'extrémité simple brin peut être structurée de manière à empêcher sa fixation. De plus, les protéines télomériques régulent également l'activité de la télomérase (Smogorzewska et de Lange, 2004). C'est le cas de la protéine PinX1 qui inhibe la télomérase en se fixant à la sous-unité hTERT in vitro (zhou cell 2001). Comme on l'a vu précédemment, le complexe TPP1/Pot1 est aussi capable de réguler l'activité de la télomérase (Loayza et de Lange, 2004) (Wang et al., 2007) (Xin et al., 2007).

En plus de sa fonction d'élongation des télomères, la télomérase présente d'autres fonctions qui sont encore mal déterminées (De Semir et al., 2007). Des fusions télomériques apparaissent dans les cellules de souris déficientes en télomérase (Lee et al., 1998), démontrant son implication dans la protection des télomères contre le NHEJ (Blackburn, 2005). Récemment, il a été montré que la surexpression de la sous-unité hTERT favorise la prolifération des cellules souches indépendamment de la sous-unité hTR et sans variation de taille des télomères (Munoz et al., 2005; Sarin et al., 2005). De plus, la sous-unité hTERT posséderait une activité non catalytique, capable d'induire l'oncogenèse, indépendamment de l'élongation des télomères (Stewart et al., 2002) et possèderait même une activité antiapoptotique en contrôlant l'expression de certains gènes (Gilley et al., 2005). Clairement, l'avancement de la recherche sur ce point ne permet pas d'avoir une vision globale des fonctions extracurriculaires de cette enzyme.

III-1-b- Les cellules ALT

En 1997, Bryan et Reddel découvraient que certaines lignées cellulaires immortalisées maintiennent la taille de leurs télomères par un mécanisme indépendant de la télomérase. Ces cellules télomérase négatives possèdent des télomères très longs et de taille hétérogène allant de 1kb à 50kb. Dans ces cellules, l'allongement des télomères est basé sur des phénomènes de recombinaison homologue non réciproques entre répétitions télomériques, il s'agit du phénomène ALT pour « Alternative Lenghtening of Telomeres » (Bryan et al., 1997; Bryan et al., 1997) (McEachern et Blackburn, 1996) (Dunham et al., 2000). Ce phénomène concernerait environ un quart des cellules immortelles et de 5 à 10% des cellules cancéreuses.

Une des principales caractéristiques des cellules ALT est la présence des corps APBs pour « ALT associated promyelotic leukemia bodies ». Ces corps nucléaires sont principalement présents lors de la phase G2/M du cycle cellulaire. Ils seraient impliqués dans la régulation de l'apoptose, la prolifération cellulaire, la sénescence et l'activité transcriptionelle de gènes (Wang et al., 2004). Ils regroupent de nombreux facteurs protéiques (Seeler et Dejean, 1999), ils contiennent entre autre la protéine PML (ProMyelotic Leukemia), qui est un coactivateur de p53, les protéines TRF1 et TRF2, RAD51 et RPA qui sont impliquées dans la recombinaison homologue (Yeager et al., 1999), NBS1 et MRE11 qui sont impliquées dans la réparation (Wu et al., 2000) et WRN et BLM qui sont, entre autre, impliquées dans la réplication (Khakhar et al., 2003). Les protéines de contrôle des dommages à l'ADN comme ATM et ATR sont également présentes, suggérant un rôle de ces voies de contrôle dans le phénomène ALT (Nabetani et al., 2004). En plus des nombreuses protéines, les corps APB contiennent également des fragments d'ADN télomériques linéaires (ECTR) et circulaires. Toutefois, ces corps APB ne semblent pas toujours essentiels aux cellules ALT car certaines lignées se développent en leur absence (Fasching et al., 2005).

Les cellules ALT présentent un très fort taux d'échanges télomériques mais qui ne semblent pas reliés à la longueur très inhabituelle de leurs télomères car des cellules embryonnaires fibroblastiques de souris dans lesquelles la taille des télomères est équivalente à celle des cellules ALT ne présentent pas un taux de recombinaison aussi élevé (Londono-Vallejo et al., 2004). La recombinaison inter-télomérique a été mise en évidence par Dunham et ses collaborateurs en 2000, lors de leur étude des variations dans la localisation par FISH d'une étiquette fluorescente insérée initialement sur un seul télomère (Dunham et al., 2000). Après une dizaine de divisions, l'étiquette se retrouve sur au moins cinq télomères. A partir de ces observations, un modèle d'élongation des télomères a été proposé. Dans ce modèle, un brin d'ADN d'un télomère court s'hybriderait avec un brin d'un autre télomère et servirait d'amorce pour la synthèse d'ADN. Le brin nouvellement formé serait alors converti en double brin (Neumann et Reddel, 2002) (Figure 11). Ce mécanisme peut aussi impliquer une amorce et une matrice sur le même télomère (intrachromosomique) ou utiliser comme matrice des séquences extrachromosomales comme les ECTRs (linéaires) ou les cercles extrachromosomiques (Cesare et Griffith, 2004). De même, ces ECTRs et cercles extrachromosomiques pourraient eux-mêmes être générés par ce phénomène recombinatoire (Tokutake et al., 1998) (Wang et al., 2004). Notre connaissance des mécanismes de régulation des télomères dans les cellules ALT est encore très limitée, en particulier le rôle des protéines télomériques. La fonction antirecombinatoire de TRF2 et sa fixation spécifique sur les jonctions de holliday laisse présager une grande importance de cette protéine (Wang et al., 2004) (Fouche et al., 2006).

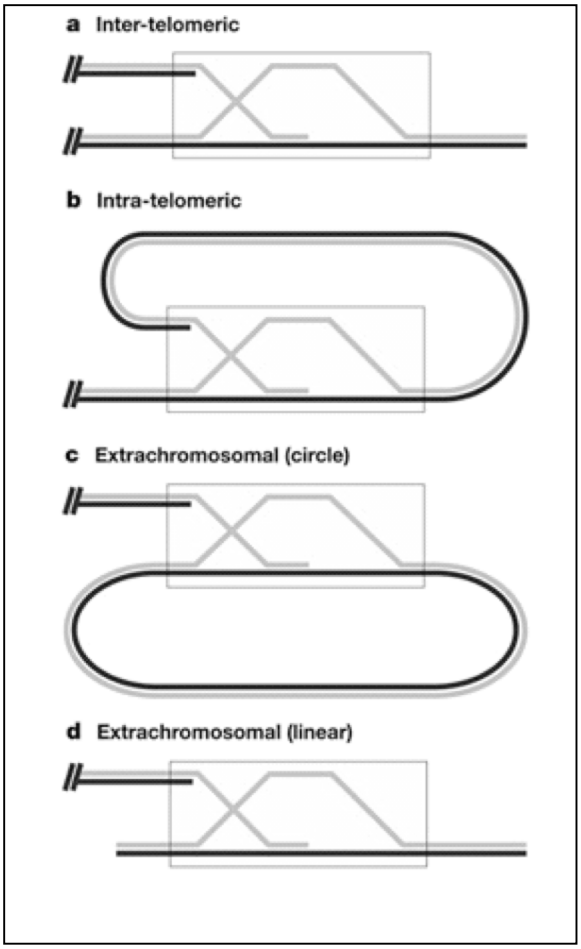


Figure 11 : Le mécanisme ALT (Neumann et Reddel, 2002)

A l'intérieur des cellules ALT, il est proposé qu'un brin d'ADN télomérique terminal puisse envahir d'autres ADN télomériques et s'hybrider au brin complémentaire. La synthèse de la nouvelle séquence télomérique peut être amorcée sur la matrice à laquelle le brin envahi est hybridé, ce simple brin pourra ensuite être converti en double brin. Les amorces possibles peuvent être un autre télomère (a), le même télomère par un repliement en boucle (b), ou des régions télomériques extrachromosomales circulaires (c) ou linéaires (d).

III-2- Télomères et prolifération cellulaire

Au cours des divisions cellulaires, les dommages à l'ADN s'accumulent, il est donc essentiel d'avoir un mécanisme capable de limiter la durée de vie des cellules empêchant ainsi la réplication de gènes endommagés qui pourraient nuire à la stabilité de l'organisme (Gilley et al., 2005). Il existe donc une horloge biologique qui va déclencher l'entrée en sénescence des cellules (sénescence réplicative). Cette horloge est contrôlée par les télomères ; à chaque division cellulaire, la réplication incomplète, de l'extrémité des chromosomes, conduit à une diminution de taille des télomères jusqu'à une taille limite, incompatible avec la fonction de protection des télomères. Une fois cette taille critique atteinte, les cellules entrent en sénescence réplicative, ainsi, la majorité des cellules somatiques ne peuvent se diviser qu'un nombre limité de fois, correspondant à la limite de Hayflick. Cette limite dépend du type cellulaire et de l'espèce ; des fibroblastes humains, par exemple, se divisent de cinquante à quatre vingt fois.

Les cellules sénescentes ne se divisent plus, mais ne meurent pas, elles conservent en effet une activité métabolique avec par exemple un taux anormalement élevé de B-galactosidase, qui est souvent utilisé comme « biomarqueur » de la sénescence. La morphologie de ces cellules change également, elles sont plus grandes et aplaties. L'expression de certains gènes est également modifiée, et il a été proposé que le raccourcissement des télomères serait à l'origine d'au moins quelques uns de ces changements d'expression. Les séquences télomériques sont en effet impliquées dans un mécanisme d'inhibition de l'expression des gènes localisés en amont de la séquence télomérique. Cette inhibition réversible est appelée TPE pour « Telomere Position Effect » (Gottschling et al. 1990). La répression de l'expression des gènes due au TPE s'accompagne d'une condensation plus importante de la chromatine, de modifications de la queue N-

terminale des histones, comme des deacétylations ou des méthylations (Bird, 2002), signes connus d'une hétérochromatinisation de l'ADN.

Le TPE varie en fonction de la distance entre le gène et la séquence télomérique, mais également en fonction de la taille du télomère. De manière générale, plus la séquence télomérique est longue, plus la répression est importante (Buck et Shore, 1995) (Baur et al. 2001). De plus, des éléments dans l'ADN subtélomérique peuvent également modifier l'expression de certains gènes (Fourel et al., 1999). Chez les mammifères, la perte du TPE due au raccourcissement des télomères a donc été proposée comme étant un mécanisme permettant l'entrée des cellules en sénescence (Harley et al., 1990). En effet, quand la taille des télomères diminue, le TPE est atténué ou supprimé et certains gènes qui étaient jusqu'alors réprimés pourraient ainsi être exprimés. Des expériences de RT-PCR couplées à une quantification par hybridation fluorescente (Q-FISH) indiquent que l'expression de gènes proches des télomères est en effet modifiée lors de l'entrée des cellules en sénescences (Ning et al., 2003). De la même manière, le TPE a également été proposé comme étant responsable du changement progressif dans le profil d'expression des gènes en fonction de l'âge de la cellule et donc du vieillissement (Baur et al., 2001; Wood et Sinclair, 2002). Par ailleurs, le TPE pourrait jouer un rôle dans certaines maladies génétiques en contrôlant l'expression de gènes repositionnés après réarrangement (Jalal et al., 2003) (van Karnebeek et al., 2002).

La phase de sénescence peut également être déclenchée avant que la taille des télomères n'atteigne cette limite critique. C'est le cas lorsque les cellules subissent des stress biologiques ou physiques comme des dommages à l'ADN, un stress oxydatif, des activités oncogéniques, des agressions successives par des agents carcinogènes, un manque de facteurs de croissance ou de nutriments ou quand les télomères sont déprotégés (Ben-Porath et Weinberg, 2005) (Itahana et al., 2004).

III-3- Rôle des télomères dans le vieillissement

Le processus de vieillissement est associé à un déclin de tous les organes et de tous les tissus et aboutit à une baisse de viabilité et une augmentation de la vulnérabilité de l'organisme. Le vieillissement est un processus complexe qui dépend de nombreux facteurs intrinsèques et environnementaux. Comme l'étude de ce phénomène chez l'homme est difficile, des organismes modèles ou des cellules humaines en culture sont donc utilisés pour la recherche. La recherche sur ce phénomène est d'autant plus difficile car il est difficile de distinguer les causes du vieillissement des effets du vieillissement.

Le lien entre les télomères et le vieillissement est toujours sujet à débat. Des données contradictoires ne permettent pas de valider avec certitude le rôle des télomères dans le vieillissement. Beaucoup d'études sur la taille des télomères ont été effectuées, il apparaît que la taille des télomères varie beaucoup entre les individus, les tissus et même entre les chromosomes d'une même cellule. Il a cependant été trouvé des corrélations entre le raccourcissement des télomères et la baisse de la longévité (Haussmann et al., 2003) (Vleck et al., 2003). D'autre part, des cellules sanguines issues de différentes pathologies liées à l'âge, comme la maladie d'Alzheimer ou l'arthrosclérose, présentent des télomères de taille réduite (Shay et Wright, 2007).

Mais à l'inverse, d'autres études montrent que parmi les primates, les hommes ont en moyenne les télomères les plus courts et présentent en revanche la plus grande espérance de vie (Kakuo et al., 1999) (Steinert et al., 2002). Chez la souris, mais également chez le poulet, la taille des télomères est très élevée et beaucoup d'organes présentent une activité télomérase intense, cependant ces espèces n'ont pas pour autant une longue espérance de vie (Venkatesan et Price, 1998). Cela suggère que la taille des télomères ne serait pas le seul facteur critique impliqué dans la longévité (Hemann et Greider, 2000). Toutefois, la perte d'activité

télomérase des cellules somatiques lors du développement semble bien imposer une limite à la durée de vie des cellules. Ainsi, bien que la première génération de souris mutantes ayant perdues leur activité télomérase, ne présentent pas de phénotypes caractéristiques de vieillissement prématuré (Lee et al., 1998), après plusieurs générations, ces souris ont une espérance de vie qui diminue fortement et développent des phénotypes similaires à ceux observés dans le vieillissement naturel (Herrera et al., 2000).

J. Campisi propose que les mécanismes de sénescence réplicative et d'apoptose liée à l'absence d'activité télomérase participent au phénotype de vieillissement (Campisi, 2003). Les cellules sénescentes sont ainsi suspectées de sécréter différentes protéines susceptibles de modifier l'homéostasie des cellules environnantes et donc des tissus en général. Ce mécanisme permettrait de protéger les organismes jeunes d'effets délétères à court terme (comme prévenir une prolifération anarchique des cellules) au risque de compromettre plus tard la longévité de l'organisme.

Les données accumulées jusqu'à présent indiquent que les télomères jouent un rôle dans le phénomène de vieillissement. Cependant leur niveau d'implication est encore difficile à déterminer étant donné la variabilité de la taille des télomères entre les individus et la multitude de facteurs (intrinsèques et extrinsèques) impliqués dans ce phénomène.

III-4- Télomère, télomérase et cancer

Parce qu'il permet d'empêcher une prolifération cellulaire non contrôlée, le raccourcissement des télomères est considéré comme un mécanisme anti-tumoral, au contraire de l'activation de la télomérase qui est le plus souvent nécessaire à la transformation cancéreuse. En effet, l'activation de la télomérase participe à l'immortalisation des cellules et est impliquée dans l'apparition de la majorité des cancers. Il est de plus, possible de rendre

des fibroblastes humains immortels en induisant l'expression dans ces cellules de trois gènes, celui de la sous-unité hTERT de la télomérase associée à l'antigène grand T du virus SV40 et à l'oncogène *Ras* (Hahn et al., 1999).

Pourtant, on sait maintenant que l'instabilité génomique due au disfonctionnement télomérique est une cause de cancer par l'inactivation de gènes suppresseurs ou par l'activation d'oncogènes (Brunori et al., 2006). Ainsi, beaucoup d'aberrations chromosomiques observées dans les cellules cancéreuses seraient dues à des cassures ou à des fusions associées à des télomères dysfonctionnels (de Lange, 2002). Dans un contexte où les voies de signalisation p53/Rb sont inactivées, comme c'est le cas dans plus de 50% des cancers, l'instabilité génomique va augmenter ce qui va conduire à une mort cellulaire massive. Certaines cellules échappent à ce destin en stabilisant leurs télomères (Chen et al., 2000) (Figure 12). La protection de l'extrémité des chromosomes est donc essentielle au maintien de la stabilité génomique et à la prévention des cancers (Cervantes et Lundblad, 2002). Mais quelque soit l'origine de l'instabilité, pour devenir cancéreuse, les cellules doivent être capables de compenser l'érosion de leurs séquences télomériques. La réactivation du complexe de la télomérase permet le maintien de la taille des télomères dans environ 90% des cancers (Kim et al., 1994), dans les autres cas, les cellules cancéreuses utilisent le mécanisme ALT. A l'heure actuelle, la télomérase est considérée comme une cible anti-cancéreuse (Zimmermann et Martens, 2007).

IV- TRF2, UNE PROTEINE CLE DES TELOMERES

La protéine TRF2 est la clé de voûte de l'architecture et du bon fonctionnement des télomères. TRF2 fait partie du complexe dit « shelterin », son inhibition conduit à un dérèglement des télomères et à une létalité embryonnaire précoce chez la souris (chapitre II-2-a). TRF2 contrôle notamment l'entrée des cellules en sénescence ainsi que les phénomènes de réparation des télomères. Elle permet à l'ADN télomérique d'adopter une configuration en boucle T.

IV-1- Les partenaires de TRF2 sont impliqués dans de nombreuses pathologies

Tout d'abord, la protéine TRF2 elle même semble jouer un rôle dans l'apparition de certains cancers. En effet, plusieurs cancers comme les cancers de la peau, du poumon ou des cancers gastriques présentent un niveau anormalement élevé de TRF2 (Blasco, 2005) (Munoz et al., 2006). De plus, des souris transgéniques, les souris K5-TRF2, qui surexpriment TRF2 dans les cellules de la peau, présentent des télomères courts et développent plus de cancers que les souris sauvages lorsqu'elles sont soumises à des rayonnements UV (Munoz et al., 2005). La surexpression de TRF2 entraînerait une augmentation de l'instabilité chromosomique favorisant l'apparition de tumeurs.

TRF2 est associée à de nombreux facteurs : ERCC1/XPF, PARP2, WRN, BLM, ATM, MRE11/NBS1/RAD50, KU86, hRap1 et POT1. Presque tous ces facteurs sont impliqués dans une pathologie s'ils sont altérés (Blasco, 2005). Par exemple, la mutation du facteur ATM est responsable de « l'Ataxie télangiectasie », la mutation de NBS1 est responsable du NBS « Nijmegen breakage syndrom » et la mutation de XPF conduit au syndrome « xeroderma pigmentosum ». Toutes ces maladies présentent entre autres

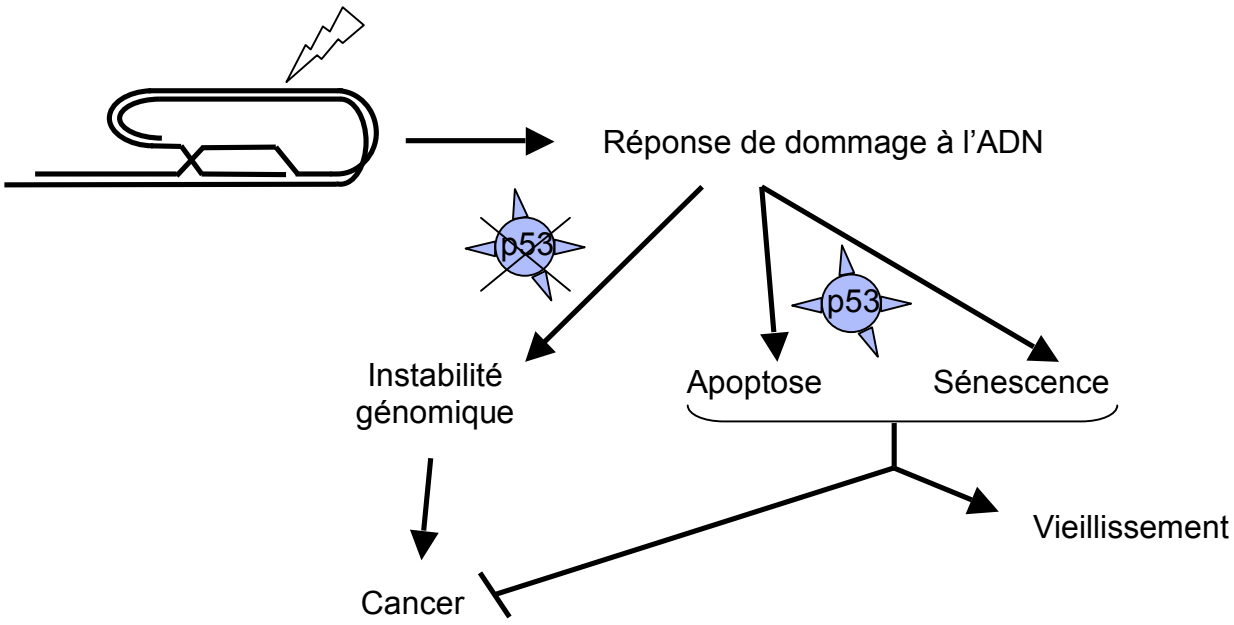


Figure 12 : perte du contrôle cellulaire (Rodier et al., 2005).
Un disfonctionnement télomérique ou une déprotection conduisent à l'apparition d'une réponse de dommage à l'ADN. Si la voie de signalisation (en général p53) est altérée, l'instabilité génomique augmente. Parfois, la mort cellulaire peut être évitée si les cellules trouvent un moyen de compenser la perte des séquences télomériques (par la télomérase ou par le mécanisme ALT). Si la voie de signalisation est fonctionnelle, les cellules sont éliminées par apoptose ou par sénescence.

symptômes des instabilités chromosomiques, une radiosensibilité accrue, des marques de vieillissement prématuré et une susceptibilité à l'induction de cancers, phénotypes que l'on observe dans le cas de dommages télomériques.

Dans le même ordre d'idée, on peut citer aussi les syndromes de Werner et de Bloom. Ces syndromes progéroïdes sont dus à des mutations dans les protéines WRN ou BLM qui appartiennent à la famille des RecQ hélicases (Ellis et al., 1995). Un disfonctionnement de WRN ou de BLM induit une instabilité génomique conduisant à une sensibilité accrue à la formation de cancers et à un vieillissement prématuré. Au niveau cellulaire, les cellules de patients atteints du syndrome de Werner présentent des phénotypes de sénescence précoce, une incidence accrue de délétions et de translocations. La dynamique télomérique est également affectée puisque l'on observe un raccourcissement anormal des télomères, des déficiences dans la réparation des télomères ainsi que dans leur réplication et un taux anormalement élevé d'échanges interchromatidiens.

Bien qu'il soit exagéré de penser que l'on puisse trouver les causes de ces pathologies uniquement dans un dérèglement télomérique, il semble clair que les modifications télomériques qu'elles entraînent participent aux phénotypes observés. A ce titre, le rôle joué par TRF2 devient donc important et digne d'intérêt.

IV-2- TRF2 inhibe la réponse aux dommages de l'ADN aux télomères

Les extrémités des télomères fonctionnels ne sont pas reconnues comme des cassures double brin, en revanche, lorsque les télomères ne sont pas fonctionnels, la voie de détection des dommages à l'ADN est activée et conduit à l'entrée des cellules en sénescence réplicative.

Cette réponse est initiée par la protéine ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) qui va activer la voie p53/pRb (Karlseder et al., 1999).

ATM est une protéine kinase activée par un dommage à l'ADN comme par exemple une coupure double brin. L'activation d'ATM se traduit par son autophosphorylation (Bakkenist et Kastan, 2003) qui va ensuite lui permettre d'activer un certain nombre de protéines, en les phosphorylant à leur tour. C'est le cas de la protéine p53 et des kinases du contrôle du cycle cellulaire comme CHK2, ainsi que les protéines BRCA1 et NBS1 (Karlseder et al., 1999; d'Adda di Fagagna et al., 2003; Takai et al., 2003; Herbig et al., 2004). En absence d'ATM, les protéines ATR ou DNA-PKcs sont susceptibles de jouer le rôle d'activateur de cette voie (Takai et al., 2003; Wong et al., 2003).

Une fois activée, la protéine p53 se lie à l'ADN au niveau du dommage ou de la jonction double brin/simple brin des télomères. L'activation de p53 entraîne soit un arrêt du cycle en phase G1, soit la mort de la cellule par apoptose, soit l'entrée en sénescence. La manière dont p53 induit telle ou telle réponse n'a pas encore été déterminée, plusieurs facteurs comme le type cellulaire, la nature du stress, ou l'environnement cellulaire interviendrait (Artandi et Attardi, 2005). Cependant, l'activation de p53 due à une déprotection des télomères induit en général l'entrée des cellules en sénescence (Figure 13). Cette protéine serait donc à l'origine de la reconnaissance du disfonctionnement (taille critique ou déprotection) et il a été montré que p53 est mutée dans plus de 50% des cancers. La voie par laquelle p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence n'est pas encore totalement élucidée, cependant, l'implication de différents facteurs comme p21 ou le facteur régulateur du cycle cellulaire, pRb, est maintenant admise. L'état de phosphorylation de pRb va engendrer l'arrêt ou le passage en phase S du cycle cellulaire. Le dérèglement de la protéine pRb est également à l'origine de nombreux cancers. La voie p53-p21-pRb est ainsi à l'heure actuelle considérée comme la principale responsable de l'entrée des cellules en

sénescence en réponse à un disfonctionnement télomérique. La voie p16/pRb serait elle responsable de l'entrée en sénescence en réponse aux stress non télomériques (Zhang, 2007).

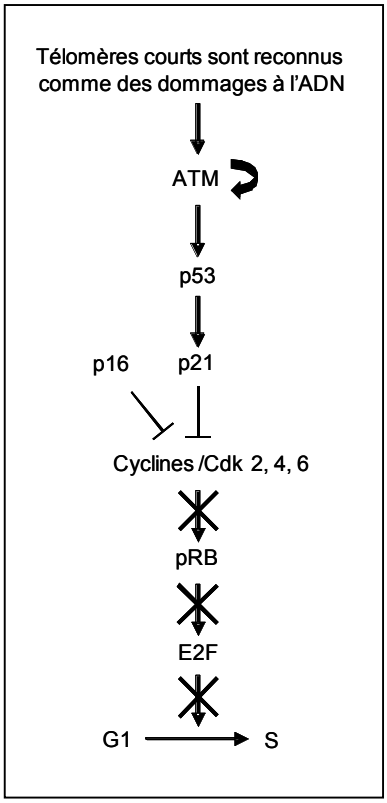


Figure 13 : Voie d'entrée des cellules en sénescence réplicative après détection d'un disfonctionnement télomérique.
Une fois activée par ATM, la protéine p53 va activer à son tour le facteur p21 qui va bloquer l'action de différentes kinases responsables de l'hyperphosphorylation de pRB. Sans cette activation de pRb, différents gènes nécessaires à la transition G1/M ne sont pas transcrits et le cycle est bloqué.

Il apparaît donc comme essentiel de protéger les extrémités des télomères et d'empêcher l'entrée en action des protéines de contrôle des dommages à l'ADN comme ATM. Cette fonction est assurée par TRF2. Ainsi, lorsque TRF2 est inhibée, on observe en fin de phase S, l'apparition de TIFs (« Telomere Dysfunction Induced Foci ») qui sont des foyers de dommages caractéristiques des télomères déprotégés où s'associent de nombreux facteurs de contrôle des dommages de l'ADN tel que 53BP1, gamma-H2AX, Rad17, ATM, et Mre11 (Takai et al., 2003). On observe également l'apparition de fusions télomériques et l'entrée des cellules en sénescence (d'Adda di Fagagna et al., 2003) (Takai et al., 2003). TRF2 serait donc le garant de l'état fonctionnel des télomères. Ceci est en accord avec le fait que lorsque TRF2 est surexprimée, on observe une baisse de la taille moyenne des télomères induisant l'entrée des cellules en sénescence (Karlseder et al., 2002).

L'entrée des cellules en sénescence TRF2-dépendante serait due à un changement de conformation des télomères. Lorsqu'ils sont trop courts, les télomères ne pourraient plus recruter assez de TRF2, la structure protectrice ne pourrait plus être maintenue, l'extrémité des télomères deviendrait alors accessible et serait reconnue comme un dommage par les protéines de contrôle activant ainsi la voie de la sénescence (Karlseder et al., 2002).

Lorsque les télomères sont fonctionnels, TRF2 serait donc responsable de l'inhibition d'ATM, contrôlant ainsi l'entrée des cellules en sénescence. Cette inhibition pourrait s'effectuer par interaction directe entre TRF2 et ATM, en effet, une interaction a été observée au niveau de son site d'autophosphorylation l'empêchant ainsi d'être activée, mais pourrait également être due à une compétition entre les deux protéines pour la fixation sur l'extrémité télomérique (Karlseder et al., 2004).

IV-3- TRF2 contrôle la réparation des télomères

Les cellules humaines ont développé des mécanismes de réparation très performants dans le but de protéger leur patrimoine génétique. Bien que les télomères ne portent pas d'information génétique, les systèmes de réparation sont également essentiels.

IV-3-a- TRF2 stimule le mécanisme de « BER »

La réparation par excision de bases (BER) est le principal mécanisme adopté par les télomères pour réparer les coupures simple brin. Cette voie de réparation est aussi essentielle dans le maintien de l'intégrité du génome car il s'agit du premier mécanisme de réparation des bases qui ont subi des dommages comme une oxydation, une alkylation, une désamination ou une hydrolyse. Etant donné leurs séquences riches en G, les télomères sont plus

particulièrement sensibles aux dommages oxydatifs et alkylants, de plus les protéines qui se fixent sur les télomères, TRF1 et TRF2, et qui sont essentielles pour la dynamique télomérique, sont très sensibles à toute modification de la séquence d'ADN (von Zglinicki, 2002). Par exemple, la fixation de TRF1 et de TRF2 sur l'ADN télomérique est inhibée quand une ou plusieurs 8-oxo-guanines sont incorporées dans l'ADN télomérique (Opresko et al., 2005). Ce mécanisme doit donc être performant au niveau des télomères pour permettre une affinité optimum des protéines télomériques et donc un fonctionnement normal des télomères.

Dans cette voie de réparation, le brin d'ADN contenant le site lésé est éliminé par l'endonucléase APE1, ensuite, en fonction du nombre de bases à remplacer, deux voies différentes peuvent être activées. Une voie de réparation à brèche courte (1 nucléotide) impliquant l'ADN polymérase β, associée au complexe XRCC1-ADN ligase III. La deuxième voie est une voie de réparation à brèche longue (6 à 13 nucléotides). Dans ce cas la réparation par excision de nucléotides engendre une brèche de 30 nucléotides environ, prise en charge par les ADN polymérases δ et/ ou ε. Il y a, dans ce cas, intervention de la Flap endonucléase 1 (FEN-1). De nombreuses protéines accessoires interviennent également: PCNA, p53, poly(ADPribose) polymérase 1 et 2 (PARP1 et PARP2) et WRN (von Zglinicki, 2002).

La protéine télomérique TRF2 interagit avec la plupart des protéines de la BER. Des interactions avec WRN (Opresko et al., 2002), XRCC1 et PARP2 (Dantzer et al., 2004) ont été mises en évidence. De plus, TRF2 interagit directement avec la DNA polβ et avec la nucléase FEN-1 (Muftuoglu et al., 2006). *In vitro*, TRF2 stimule l'activité de la DNA polβ aussi bien sur des substrats télomériques que sur des substrats non télomériques, suggérant ainsi une interaction protéine-protéine indépendante de l'ADN. En ce qui concerne FEN-1, la fixation de TRF2 ne serait pas incompatible avec l'activité de cette enzyme mais aucune

stimulation n'a pu être observée. TRF2 agirait donc en synergie avec la BER pour empêcher l'accumulation trop importante de lésions sur les télomères.

Au delà de leur importance dans la réparation, les protéines impliquées dans ce système de réparation sont également impliquées dans la dynamique télomérique. En effet, lorsque la DNA polβ est surexprimée, on observe l'apparition de disfonctionnements télomériques comme des pertes de séquences télomériques et des fusions par les extrémités (Fotiadou et al., 2004). La quantité de polβ doit donc être parfaitement régulée pour éviter ces disfonctionnements et donc une instabilité génomique.

TRF2 interagit aussi avec PARP2 qui est une protéine essentielle au bon fonctionnement de la BER. Activée par l'apparition d'une cassure d'ADN, elle interagit avec différents acteurs de la BER comme la DNApolB et la ligase III. PARP2 empêche la fixation de TRF2 sur les télomères en fixant des polymères d'ADP ribose au niveau du domaine de dimérisation et du domaine Myb-like. La fonction de cette régulation *in vivo* n'est pas encore connue, mais PARP2 joue un rôle dans le maintien de l'intégrité des télomères, en effet, des cellules de souris déficientes en PARP2 contiennent de nombreuses coupures de chromatides ainsi que nombreuses extrémités de chromosomes sans signal télomérique (Dantzer et al., 2004). TRF2 interagit aussi avec PARP1 qui agit également sur la fixation de TRF2. Cependant, PARP1 ne se retrouve pas au niveau des télomères dans les cellules normales, on la retrouve lorsque les cellules subissent des dommages à l'ADN ou quand les télomères sont trop courts, indiquant plutôt un rôle de PARP1 dans la réparation des télomères (Gomez et al., 2006-b).

IV-3-b- TRF2 et la réparation par excision de nucléotide (NER)

La réparation par excision de nucléotides est utilisée pour réparer différents types de lésions, notamment les photolésions induites par les rayonnements UV. Dans les cellules humaines, beaucoup de protéines sont impliquées dans cette voie de réparation. L'apparition

de la lésion et sa reconnaissance par la protéine XPC entraîne une distorsion et une ouverture de la double hélice d'ADN sur quelques résidus. La protéine XPA va se fixer sur les simples brins en interaction avec la protéine RPA. Les hélicases XPB et XPD vont intervenir pour obtenir un complexe « ouvert » sur 25 à 30 paires de bases. Cet intermédiaire « ouvert » est le site de reconnaissance et de clivage par les enzymes XPG et ERCC1/XPF. Ces deux enzymes sont des endonucléases spécifiques de structure, qui clivent l'ADN au niveau de jonction simple brin/double brin avec une polarité opposée. Le brin lésé est ainsi éliminé et la brèche est remplie par la polymerase δ ou la polymerase ε.

TRF2 est suspectée d'influencer ce mécanisme au moins au niveau des télomères car elle interagit avec l'hétérodimère ERCC1/XPF (Zhu et al., 2003) (partie IV-3-b)). Par ailleurs, la protéine hRPA qui est une protéine qui se fixe sur de l'ADN simple brin et qui intervient dans d'autres mécanismes comme la réplication, ou la recombinaison homologue est suspectée de jouer un rôle au niveau des télomères. Au cours de ces différents processus, hRPA protége les extrémités simple brin transitoirement formé au cours de ces processus et empêche ainsi leur association ou leur repliement. Cette protéine interagit avec de nombreuses protéines que l'on retrouve également aux télomères comme Rad52, Rad51, p53, XPG, WRN ou BLM (Fanning et al., 2006). Des expériences de spectroscopie de fluorescence révèlent par ailleurs que la fixation de hRPA sur un oligonucléotide organisé en G-quadruplex entraîne la déstructuration de cette structure. De plus, chez la levure, RPA est nécessaire au maintien de la taille des télomères en facilitant la fixation de la protéine Est1p aux télomères, régulant donc l'activité de la télomérase (Schramke et al., 2004).

IV-3-b- TRF2 inhibe le NHEJ

Le système du NHEJ (Non Homologous End-Joining) est un mécanisme général de réparation des cassures double brin de l'ADN qui permet de ligaturer deux extrémités d'ADN sans homologie de séquence. Chez les mammifères, il requiert la participation de plusieurs protéines: le complexe Ku (constitué de l'hétérodimère Ku70/Ku80), le complexe Ligase IV/XRCC4, le complexe DNAPK/Artémis et le complexe MRN (constitué de trois sous-unité : Mre11, Rad50 et NbsI). La fixation du complexe Ku au niveau de la coupure double brin permet dans un premier temps de bloquer la dégradation de l'ADN et de recruter les différents partenaires nécessaires à la réparation. Ku recrute également la sous-unité catalytique DNA-PKcs pour former le complexe actif de la DNA-PK. L'activité de cette kinase est nécessaire entre autre à l'activation de l'activité endonucléase d'Artémis qui élimine le simple brin éventuellement présent au niveau de la cassure double brin, ce qui est essentiel pour l'étape de ligation assurée par la DNA ligase IV. Le complexe MRN permet un alignement correct de l'ADN et est également responsable avec Ku du recrutement de la ligase IV. L'étape de polymérisation lors de ce mécanisme est assurée par des polymérases de la famille des Pol X (Polλ, Polμ et la TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)) (Riha et al., 2006).

Lorsque TRF2 est inhibée, par l'expression de l'allèle dominant négatif $TRF2^{\Delta B \Delta M}$, on observe des disfonctionnements télomériques qui se traduisent par l'apparition de chromosomes dicentriques formés par des fusions télomériques (van Steensel et al., 1998; Celli et de Lange, 2005). Si les deux kinétochores d'un chromosome dicentrique s'attachent à des pôles différents de la cellule lors de la mitose, des ponts anaphasiques vont apparaître conduisant à des cassures des chromosomes. Ces nouveaux sites de coupures vont à nouveau fusionner avec d'autres sites de coupure. Il y a ainsi la mise en place d'un cycle de cassure-fusion-pont. Ces fusions sont détectables sur des étalements de chromosomes métaphasiques

ainsi que par des analyses de la taille de l'ADN par « southern blot » qui révèlent la présence de fragments télomériques (TRFs « Telomeric Restriction Fragment ») d'environ deux fois la taille moyenne d'un télomère.

Ces fragments n'apparaissent pas après inhibition de TRF2 dans des cellules déficientes en ADN ligase IV ou en protéine Ku70, ceci indiquent que le mécanisme de NHEJ « Non Homologous End Joining » est responsable de ce phénomène (Smogorzewska et al., 2002) (Celli et al., 2006).

A l'extrémité des télomères, le simple brin terminal constitue un obstacle pour l'étape de ligation. Le complexe nucléase ERCC1/XPF est nécessaire à son élimination (Zhu et al., 2003). On sait en effet que la perte de séquence télomérique en général, et la perte en particulier du simple brin télomérique observée dans les keratinocytes de souris où TRF2 est surexprimée est dépendante de ERCC1/XPF (Munoz et al., 2005). Récemment, le même phénomène a été observé pour des cellules humaines (Wu et al., 2007). Cependant, l'activité nucléase elle-même de cette protéine ne semble pas requise. En effet, des études récentes suggèrent que l'action de XPF aux télomères semble découplée de son activité nucléase nécessaire à la réparation par la NER. En effet, lorsque des protéines mutées pour le domaine nucléase sont introduites dans des cellules humaines déficientes en XPF, celles-ci sont capables de reverser le phénomène de raccourcissement des télomères dépendant de TRF2 alors qu'elles sont inefficaces dans la réparation de dommages induits par UV. Il est donc possible que XPF soit nécessaire pour recruter une autre nucléase qui, elle, assurera l'élimination du simple brin (Wu et al., 2007).

Quoiqu'il en soit, ces fusions télomériques sont catastrophiques pour la cellule, la répression du NHEJ aux télomères est donc déterminante pour la survie des cellules et il a été montré que TRF2 est capable d'interagir avec cette nucléase. TRF2 contrôlerait ainsi son

activité et empêcherait l'action du mécanisme de NHEJ aux télomères (Zhu et al. 2003) (Figure 14).

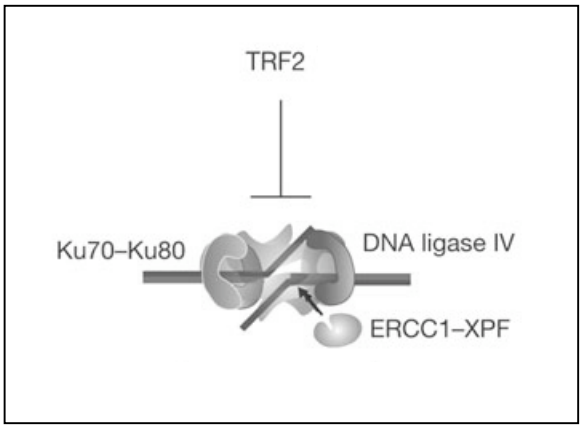


Figure 14 : TRF2 protège les télomères contre le NHEJ. Lorsque TRF2 est inhibée, le simple brin terminal est éliminé et les fusions télomériques apparaissent.
Nature Cell Biology - **8**, 855 - 890 (2006)

Un des paradoxes de la biologie des télomères est que les protéines de NHEJ peuvent être à la fois délétères pour le bon fonctionnement télomérique et participer aussi à la protection des télomères. Ainsi, des fusions télomériques apparaissent lorsqu'un des trois composants du complexe de la DNAPK est muté (Hsu et al., 2000) (Samper et al., 2000) (Bailey et al., 1999). La sous-unité Ku80 jouerait aussi un rôle particulier dans la protection des télomères. Cette sous-unité se fixe directement sur l'ADN télomérique (Bianchi et de Lange, 1999; Hsu et al., 1999) et se fixe aux protéines TRF1 et TRF2 (Hsu et al., 2000; Song et al., 2000). Lorsqu'on inhibe l'activité de Ku80 par ARN interférant, on observe une perte d'ADN télomérique et une augmentation des aberrations télomériques (Jaco et al., 2004) (Myung et al., 2004).

Il apparaît donc que la régulation des protéines du NHEJ soit cruciale pour la dynamique télomérique et tout porte à croire que TRF2 est la protéine essentielle à ce contrôle.

IV-4- TRF2 et la recombinaison homologue aux télomères

La recombinaison Homologue (HR) est un processus général d'échange de matériel génétique entres séquences homologues. Il implique différents types de protéines dont RAD51, RAD52, RAD54, RPA, le complexe MRN et les paralogues de RAD51 (RAD51B, C, D, XRCC2 et XRCC3) (Liu et al., 2007).

Ce mécanisme intervient notamment lors du phénomène de réparation de cassures double brin au sein du génome. Lorsque la recombinaison homologue est activée, le chromosome endommagé est reconstitué à partir d'une séquence homologue située sur un chromosome non endommagé. Ce processus intervient en général lors de la phase S lorsque les deux chromatides sœurs sont présentes. Dans ce processus de réparation, environ une dizaine de protéines intervient. On retrouve au départ les kinases ATM/ATR qui sont recrutées au niveau du site endommagé, le complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1) intervient ensuite pour générer des extrémités 3' simple brin par digestion du brin 5'. L'étape d'alignement avec une séquence homologue intacte et d'échange de brin avec invasion du simple brin à l'intérieur du double brin homologue est assurée par la protéine Rad51 et est stimulée par les protéines Rad52, Rad55/Rad57 et Rad54. L'ADN polymérase permet ensuite d'allonger le brin inséré en utilisant le brin homologue. Quand la boucle créée est suffisamment grande, le second fragment 3' s'insère à son tour et est également polymérisé. La migration de la jonction serait assurée par des hélicases de la famille RUVB. Les brins sont finalement ligaturés après la résolution, par le complexe RAD51C/XRCC3, des jonctions de Holliday formées entre les deux brins (Liu et al., 2004).

Les cellules ALT utiliseraient ce mécanisme de recombinaison pour assurer l'élongation de leurs télomères. A l'intérieur des corps PMLs de ces cellules, les protéines télomériques et l'ADN télomérique cohabitent en effet avec les protéines de la recombinaison

comme MRE11, NBS1, RAD50, RAD51, RAD52, RPA, BLM, et WRN (Henson et al., 2002). Pour l'instant, le rôle de TRF2 dans ce processus reste encore à déterminer.

Ce phénomène de recombinaison homologue a également été proposé pour expliquer la perte de larges fragments d'ADN télomériques dans des cellules exprimant le mutant $TRF2^{\Delta B}$. Pourtant, ces cellules maintiennent leur extrémité 3' simple brin et sont toujours protégées contre le NHEJ. Ces délétions n'aparraissent pas dans les cellules déficientes pour XRCC3, qui en association avec RAD51C possède une activité de resolvase pour les jonctions de Holliday, mais également dans les cellules déficientes pour le complexe Mre11. Des analyses par gel à deux dimensions révèlent que l'expression de $TRF2^{\Delta B}$ induit l'apparition de cercles télomériques avec une distribution de taille semblable à celle des boucles T présentes à l'extrémité des télomères (voir ci-après, partie IV-6). Toutes ces observations ont conduit à l'hypothèse que ces pertes télomériques seraient dues à une résolution de la boucle télomérique par les protéines de la recombinaison homologue de la boucle télomérique, d'ou le nom de "t-loop HR" (« t-loop Homologous Recombination ») (Wang et al., 2004) (Figure 15). Lorsque TRF2 est fonctionelle, ce phénomène serait inhibé. On ne sait en revanche toujours pas si le domaine basique de TRF2 est impliqué dans la répression de la migration de la jonction ou bien dans la protection de ces jonctions contre les résolvases.

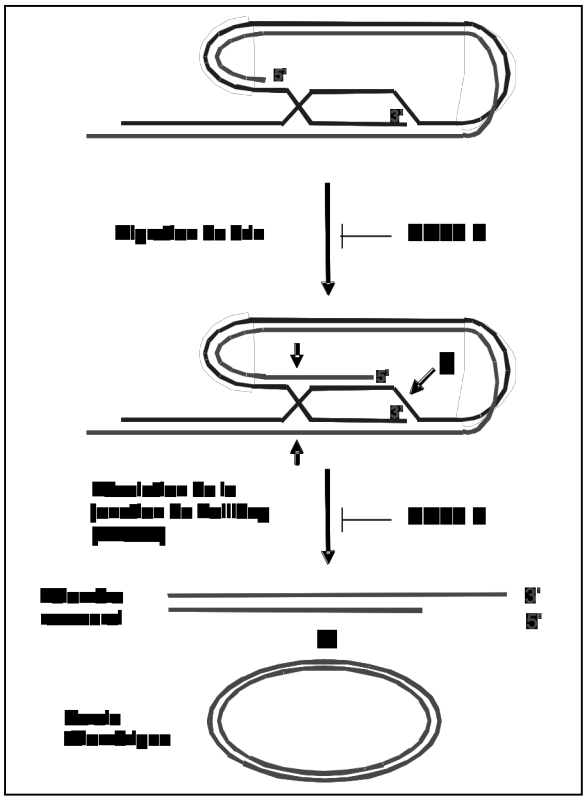


Figure 15 : Modèle de la « t-loop HR » issu de (Wang et al., 2004). L'étape d'élimination de la boucle serait assurée par plusieurs nucléases. XRCC3/Rad51C est suspecté d'être à l'origine de la résolution de la jonction de Holliday. Une nucléase non identifiée serait nécessaire à la digestion de la D-loop.

La recombinaison homologue est aussi impliquée aux télomères dans les échanges d'ADN télomérique entre chromatides sœurs ou T-SCE (« Telomere Sister Chromatid Exchange ») qui peuvent s'avérer délétères pour la cellule si l'échange effectué est non réciproque conduisant à l'apparition d'un télomère court. Le mécanisme mis en jeu n'a pas été déterminé, mais TRF2 et Ku seraient impliquées dans la répression de ce phénomène car des cellules déficientes en ces deux protéines présentent une augmentation de ces échanges non réciproques (Celli et al., 2006).

Les protéines participant à la recombinaison homologue semblent également être impliquées dans la dynamique télomérique. C'est, par exemple, le cas de la protéine RAD51D, qui est une protéine RecA-like de transfert de brin d'ADN, essentielle dans ce phénomène de recombinaison homologue. Cette protéine participe également à la protection des télomères contre le raccourcissement et contre les fusions. En effet, l'inhibition de RAD51D dans les cellules ALT conduit à une érosion télomérique et à l'apparition de fusions

(Tarsounas et al., 2004). Le complexe MRN participe également à la régulation de la taille des télomères, car il est nécessaire au maintien de l'intégrité des télomères chez les insectes, les plantes et les levures (Lombard et Guarente, 2000). In vitro, le complexe MRN possède une activité 3'-5' exonucléase et une activité endonucléase de l'ADN simple brin (Paull et Gellert, 1998). Le rôle de ce complexe dans la maturation de l'extrémité des télomères a été démontré (Tomita et al., 2003), cependant, il n'est pas responsable de la spécificité du nucléotide terminal du brin C (Chai et al., 2006). Chez l'homme, ce complexe est associé aux télomère grâce à une interaction avec TRF2 (Zhu et al., 2000).

IV-5- TRF2 et la réplication des télomères

La réplication aux télomères est peu connue, bien que ce mécanisme soit essentiel aux télomères étant donné qu'il participe au raccourcissement télomérique responsable du rôle d'horloge biologique attribué aux télomères.

Les mécanismes de réplication des télomères chez les eucaryotes supérieurs présentent cependant quelques particularités. Il existe en effet des propriétés de réplication propres aux télomères dans la ségrégation des deux chromatides sœurs, par rapport aux mécanismes présents pour les bras des chromosomes ou des centromères. Ce mécanisme dépend de la tankyrase 1, car une inhibition de cette protéine empêche la séparation des deux chromatides au niveau des télomères, sans doute par la présence de « ponts protéiques » (Dynek et Smith, 2004).

Chez l'homme, on sait que les télomères sont de mauvais substrats pour la réplication, sans doute à cause de leur capacité à adopter des structures particulières. De plus, les protéines TRF1 et TRF2 ont un effet inhibiteur sur la progression de la fourche de réplication (Ohki et Ishikawa, 2004). Malgré cela, la réplication des télomères est aussi rapide que pour

le reste du génome (Ten Hagen et al., 1990). Il est donc probable que lors de la réplication, des facteurs télomériques, comme la Tankyrase 1, régulent la fixation de TRF1 et de TRF2 et participent à la réplication correcte des télomères. Par ailleurs, des hélicases permettraient d'aider la progression de la fourche de réplication aux télomères en éliminant les structures éventuelles adoptées par les séquences télomériques. Il a ainsi été proposé que la protéine hélicase WRN permette la résolution de structure, comme les G-quadruplex, pouvant se former sur ce brin G, empêchant l'avancée de la fourche de réplication (Crabbe et al., 2004). Les protéines télomériques et donc TRF2, pourrait participer à la réplication lors du passage de la fourche aux télomères. La protéine télomérique Taz1 est d'ailleurs impliquée dans la réplication correcte des télomères chez *S. pombe*, (Miller et al., 2006).

IV-6- TRF2 remodèle le télomère en boucle

Sachant l'importance de la protection télomérique, plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Certainement le plus ancien, un modèle proposé implique la fixation de protéines télomériques spécifiques protégeant ainsi l'extrémité (Greider, 1999). Ce mode de protection a pu être mis en évidence pour les télomères des chromosomes macronucléaires du cilié *Oxytrichia fallax* (Murti et Prescott, 1999). La structuration du simple brin terminal en G4 est également une hypothèse qui a été proposé pour expliquer la protection des extrémités télomériques. Ce mode de protection est susceptible d'entrer en jeu à un moment du cycle cellulaire car les conditions intracellulaires sont compatibles avec la formation des G-quadruplex. Cependant, aucune preuve directe de l'existence *in vivo* des G-quadruplex n'a été apportée.

Une autre hypothèse va émerger en 1999, lorsque J. D. Griffith met en évidence par microscopie électronique un repliement de l'extrémité du télomère sur lui même formant ainsi une boucle terminale appelée « t-loop » ou boucle T (Griffith et al., 1999). Ces premières observations ont été faites sur des télomères synthétiques ou purifiés de cellules humaines et de souris, mais ces structures ont maintenant été mise en évidence chez de nombreuses espèces comme les ciliés (Murti et Prescott, 1999), le trypanosome (Munoz-Jordan et al., 2001) ou le petit pois (Cesare et al., 2003). Des boucles ont également été purifiés à partir de noyau d'érythrocyte de poulet et de lymphocytes de souris (Nikitina et Woodcock, 2004) (Figure 16).

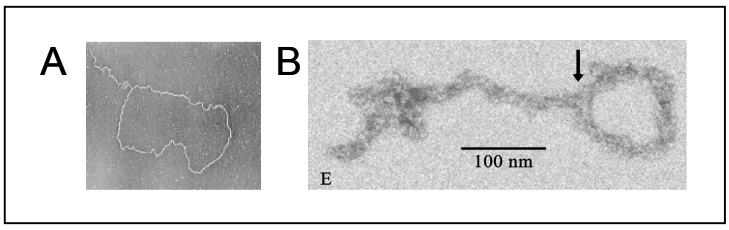


Figure 16
A. Visualisation de la boucle T par ME sur de l'ADN télomérique purifié de cellule Hela (Griffith et al., 1999).
B. Visualisation de la boucle T par ME sur de la chromatine télomérique native (Nikitina et Woodcock, 2004).

A l'aide d'un système modèle construit à partir d'un plasmide, Griffith et ses collaborateurs ont analysé les conditions *in vitro* de formation de cette structure par ME. Ainsi, ils ont montré que TRF2 est nécessaire et suffisante à la formation de cette structure et que, au contraire, TRF1 n'est pas capable de former cette boucle.

De plus, la formation de la « t-loop » avec des séquences humaines nécessite la présence d'au moins une répétition simple brin à l'extrémité et que cette extrémité doit posséder une homologie de séquence stricte avec la partie double brin. La séquence contenant

la jonction simple brin/double brin doit contenir des séquences télomériques indiquant que la fixation de TRF2 au niveau de cette jonction pourrait être importante (Stansel et al., 2001).

Des observations en ME montrent qu'une fois la boucle T formée, on peut fixer la protéine SSB, (« single strand binding protein », qui est une protéine se fixant sur des séquences d'ADN simple brin sans spécificité de séquence), au pied de la boucle. De plus, il est possible de ponter covalement la structure en boucle par réaction du psoralène et sous UV, suggérant donc une proximité très grande des brins. En accord avec ces résultats, un modèle a été avancé pour expliquer la formation de cette boucle. Il a ainsi été proposé que la formation de la boucle serait due à un repliement du télomère sur lui-même avec une insertion de l'extrémité simple brin G dans la double hélice en amont. Il y aurait donc invasion du brin G et hybridation de ce brin avec le brin complémentaire. Cette invasion du brin G induirait au pied de la boucle la formation d'une structure en « D-loop » par déplacement du brin G du double brin expliquant donc la reconnaissance par la SSB. Des expériences de pontage au psoralène suggèrent aussi la participation de la double hélice en amont du simple brin et donc la formation au pied de la boucle d'une jonction de Holliday (Stansel et al., 2001) (Figure 17).

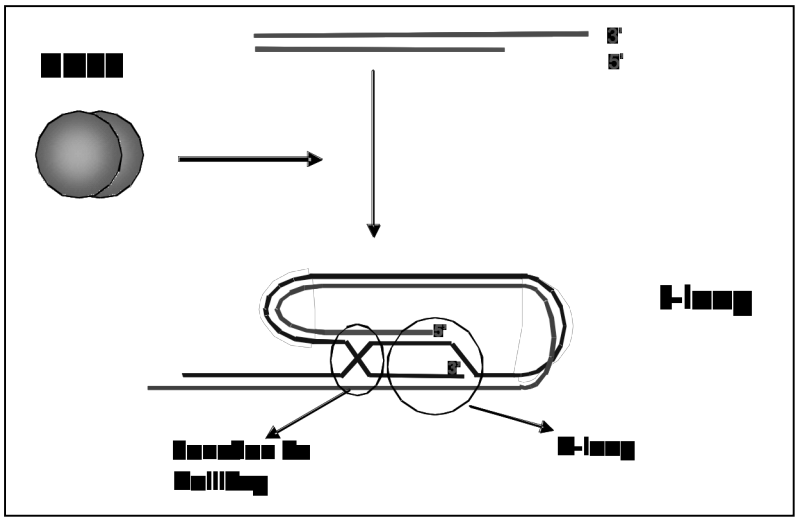


Figure 17 : Modèle de formation de la boucle T. En présence de TRF2, le simple brin terminal « envahit » le double brin en amont et se retrouve ainsi protégé (Stansel et al., 2001).

Des étude de microscopie à force atomique de formation de la boucle en présence de TRF1 et de TRF2 ont également été effectuées (Yoshimura et al., 2004). Ces expériences ont confirmé le rôle de TRF2 dans la formation de la « t-loop », mais elles ont également montré

que TRF2 se fixerait sous la forme d'un tétramère au niveau du pied de la boucle. Chez *S. pombe*, une protéine télomérique organisée en multimère et responsable de la formation d'une t-loop a également été étudiée, il s'agit de la protéine Taz1. Chez cet organisme, cette protéine s'organise en hexamère (trimère de dimère) formant une structure en forme de « doughnut » avec un trou de 3nm de diamètre au centre du multimère (Tomaska et al., 2004). Ce modèle basé sur la multimérisation des protéines télomériques responsables de la formation de la t-loop pourrait donc être un modèle conservé au cours de l'évolution.

Pour l'instant, il n'existe pas de preuves biologiques de l'existence des boucles T *in vivo*. Toutefois, des données indirectes semblent indiquer qu'une telle structure peut exister, notamment la formation de cercles télomériques lorsque $TRF2^{\Delta B}$ est surexprimée dans les cellules (Wang et al., 2004).

Les implications de la structure en boucle T sont de plusieurs ordres. Tout d'abord, on peut imaginer que dans cette structure, l'extrémité télomérique soit protégée. Dans le cas d'un raccourcissement exagéré des télomères ou de la perte de TRF2, la formation de la « t-loop » deviendrait impossible, l'extrémité des télomères ne serait plus protégée et serait reconnue comme une coupure double brin par les facteurs de contrôle déclenchant l'entrée des cellules en sénescence. Ce serait donc la perte de la structure qui entraînerait sénescence et apoptose (Karlseder et al., 2002). Les télomères humains se présenteraient donc sous deux états en fonction de la présence ou non de la « t-loop », un état « fermé » ou « t-loop + » avec le simple brin inaccessible et un état « fermé » ou « t-loop - » où le simple brin est accessible. Une situation similaire a été proposé chez *Saccharomyces cerevisiae* (Teixeira et al., 2004). Cette structure confirmerait également l'importance de TRF2 dans la protection télomérique et dans la survie de la cellule (Griffith et al., 1999; Stansel et al., 2001).

Le taux relativement faible de molécules adoptant cette structure dans les expériences de ME (environ 20% avec un simple brin de taille allant de 100 à 200 nucléotides) semble

suggérer que, si la boucle T est une conformation majeure des télomères *in vivo*, d'autres protéines que TRF2 doivent être impliquées. Les autres protéines du complexe dit « shelterin » pourraient ainsi participer à la formation et la régulation de la boucle T. TRF1, qui possède la capacité de courber l'ADN et de créer des synapses entres deux ADN (Griffith et al., 1998), pourrait aider au repliement du télomère. D'autre part, la protéine POT1 pourrait stabiliser la « D-loop » en se fixant sur le simple brin exclu (Smogorzewska et de Lange, 2004) (Yang et al., 2005) (Loayza et De Lange, 2003). Mais il est également possible que des protéines de la recombinaison homologue interviennent. En effet, si la formation de la t-loop est assurée par l'invasion du simple brin dans la partie double brin homologue, des protéines impliquées dans des phénomènes d'échanges de brins comme la protéine RAD51 pourrait aider à sa formation.

A l'inverse, il devrait exister des protéines capables d'éliminer cette boucle, de façon à créer la dynamique nécessaire aux phénomènes de réplication ou d'élongation par la télomérase entre autres. On sait qu'*in vitro* l'activité hélicase et l'activité exonucléase de la protéine WRN coopèrent pour résoudre des D-loop télomériques modèles. WRN pourrait donc agir sur la boucle T, par exemple en phase S, pour permettre la progression de la fourche de réplication (Opresko et al., 2004).

T. de Lange propose que la structure en boucle T soit à la base d'un mécanisme ancestral d'élongation des télomères (de Lange, 2004). Elle propose ainsi que les premiers eucaryotes auraient pu stabiliser la taille de leurs télomères par la « t-loop » de façon indépendante de la télomérase par un système de réplication « rolling circle » en utilisant la boucle elle-même comme matrice ou en utilisant les cercles extrachromosomiques créés par la résolution de la boucle comme il a été montré chez *K. lactis* (Cesare et Griffith, 2004). (Natarajan et McEachern, 2002).

PROBLEMATIQUE

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques complexes extrêmement importantes pour la protection du patrimoine génétique. On a vu qu'au delà de leur rôle de protection des chromosomes et de contrôle de l'intégrité du génome, ils font partie intégrante de la vie de la cellule et sont soumis à la plupart des processus cellulaires.

La protéine TRF2 apparaît comme la protéine essentielle dans le maintien de l'intégrité des télomères. Une inhibition de TRF2 entraîne une létalité embryonnaire ; de plus, un dérèglement de TRF2 ou de l'un de ses partenaires, est à l'origine de maladies ou de cancers. TRF2 a pour fonction principale de protéger l'extrémité des télomères contre les mécanismes classiques de réparation des cassures doubles brins comme le NHEJ et la recombinaison homologue. Lorsqu'elle est absente, les extrémités télomériques sont reconnues comme des dommages à l'ADN et sont abusivement réparés entraînant ainsi des aberrations chromosomiques incompatibles avec la survie de la cellule.

L'une des hypothèses pour expliquer comment TRF2 exerce cette fonction de protection est basée sur un remodelage de l'extrémité des télomères conduisant à la formation d'une structure protectrice en boucle, la boucle T. Cette structure permettrait aux télomères d'adopter une conformation fermée protégeant l'extrémité contre les réparations inadéquates ou contre l'attaque de nucléases. Mais à l'heure actuelle, bien que de nombreux indices penchent en sa faveur, ce mode de protection n'a pour l'instant jamais été formellement démontré.

Ainsi, beaucoup d'interrogations subsistent. Par exemple, on ne sait pas si cette structure est transitoire ou si elle persiste tout au long du cycle cellulaire. De plus, le modèle actuel de formation de la t-loop par l'invasion du simple brin en amont à l'intérieur du double brin n'a jamais été démontré. Par ailleurs, la manière dont TRF2 permet la formation de cette

structure est, elle aussi, totalement inconnue. Est-ce que cette protéine possède une activité hélicase ? Possède-t-elle des propriétés d'échange de brin comme la protéine RecA bactérienne qui intervient dans la recombinaison homologue ? S'agit-il d'un tout autre mode d'action ? A ce jour, chez l'homme aucune étude n'a permis de mettre en évidence une quelconque activité de TRF2 induisant une ouverture de l'ADN et une invasion d'un oligonucléotide à l'intérieur de la partie double brin. Cette thèse présente donc une étude de l'implication de TRF2 dans ce phénomène d'invasion télomérique et propose un mode d'action de TRF2 qui était jusque là inconnu.

Par ailleurs, il a été proposé que le modèle de formation de la boucle T implique la formation de deux structures particulières, une jonction de Holliday et une structure en D-loop. Nous avons donc entrepris une étude comparative de fixation de TRF2 et de TRF1 sur différents substrats afin de déterminer si ces différentes structures peuvent être reconnues par les protéines télomériques et quels domaines seraient impliqués, le cas échéant.

L'un des paramètres fondamentaux dans la dynamique des télomères est la présence d'une extrémité simple brin. Cette extrémité constitue le substrat utilisé par la télomérase, il est indispensable à la formation de la boucle T et dès qu'il est absent, des fusions entre les télomères apparaissent. Sa présence est due en partie au problème de la réplication incomplète des télomères, mais il est maintenant admis que des nucléases participent à sa formation. La présence de plusieurs nucléases aux télomères a déjà été mise en évidence, mais récemment au laboratoire, la protéine Apollon, une protéine appartenant à la famille des β-CASP β-metallo-lactamases, a été découverte comme interagissant avec les télomères et plus particulièrement avec TRF2. La dernière partie des résultats de cette thèse porte donc sur la caractérisation de l'activité enzymatique de cette protéine ainsi que sur l'effet de son interaction avec TRF2 sur cette activité.

RESULTATS/DISCUSSION

I- Mise en évidence de la stimulation d'un phénomène d'invasion télomérique par TRF2

I-1- Introduction à l'article

La manière dont la « t-loop » se replie à l'extrémité des chromosomes n'a pas encore été élucidée. A l'heure actuelle il est seulement admis que TRF2 est nécessaire et suffisante pour permettre à l'extrémité des télomères d'adopter cette conformation. Toutefois, une hypothèse a été proposée qui implique un repliement du télomère sur lui-même et l'invasion du simple brin terminal dans la partie double brin en amont stabilisant ainsi la structure (Figure 17).

I-1-a- Les phénomènes d'invasion connus et les protéines qui les catalysent

Plusieurs processus connus font intervenir dans leur mécanisme une étape lors de laquelle un simple brin envahit une séquence double brin. Le phénomène d'invasion le plus connu intervient lors de la recombinaison homologue, très bien décrit, chez *E. Coli*. Dans cet organisme, ce mécanisme fait intervenir une vingtaine de protéines, mais c'est la protéine RecA qui est responsable de l'étape d'échange de brins. L'invasion est initiée par la fixation de RecA de façon coopérative sur le simple brin formé, au niveau de la région lésée, formant un filament nucléoprotéique comprenant 6 monomères par tour d'hélice. Ce filament forme ensuite un complexe avec de l'ADN double brin et permet la reconnaissance de la séquence homologue et l'alignement des deux brins d'ADN complémentaires induisant la formation transitoire d'une triple hélice. RecA induit ensuite l'échange de brin avec une polarité 5' vers 3' à l'intérieur du double brin. Cette réaction magnésium dépendante est coûteuse en énergie. Le Magnésium et l'hydrolyse de l'ATP sont nécessaires pour que RecA puisse adopter une

conformation active. RecA est ainsi considérée comme un « moteur » moléculaire induisant l'invasion de façon « directe ».

Après l'intervention de RecA, d'autres protéines entrent ensuite en action, la migration de la jonction est assurée par le complexe RuvAB (Kowalczykowski et al., 1994) (Bianco et al., 1998) et la résolution est assurée par la protéine RuvC.

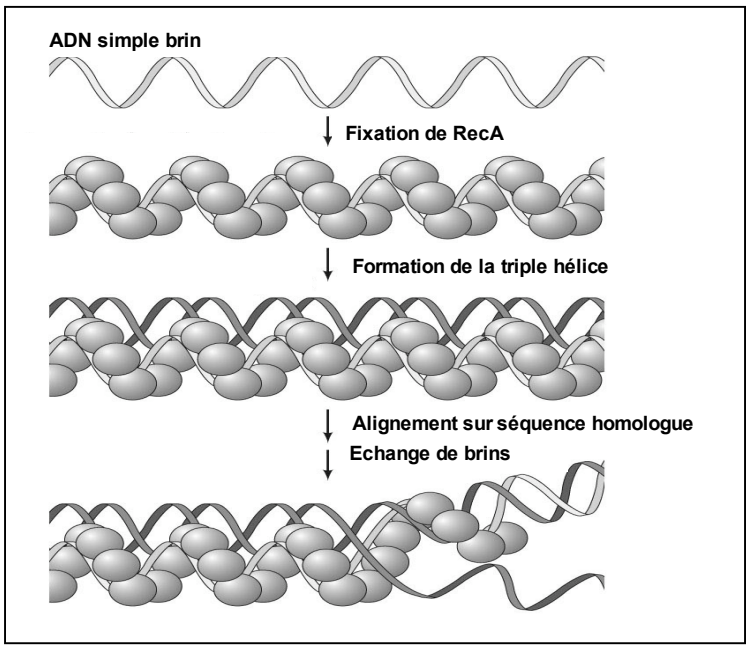


Figure 18 : l'étape d'échange de brins médiée par RecA lors de la recombinaison homologue chez E. Coli (adaptée de The CELL, 4ème édition, figure 6.38-2006).

Chez les vertébrés, la protéine Rad51, qui est l'homologue de RecA, et qui intervient dans la recombinaison homologue est également capable de catalyser une invasion (Kurumizaka et al., 2002). Le mode utilisé est de type RecA avec un alignement de brins homologues en présence d'ATP et de Mg2+. Cependant le mécanisme moléculaire est peu connu car l'étude du phénomène d'invasion chez ces organismes s'avère assez difficile, le bon fonctionnement de la protéine humaine hRad51 nécessitant plusieurs partenaires (Mazin et al., 2000).

Un autre mécanisme d'échange de brins a aussi été décrit. Il s'agit de la réaction d'échange de brin médiée par la protéine RecT lors d'un mécanisme de recombinaison indépendant de RecA chez *E. Coli*. Dans ce cas, la réaction d'invasion peut avoir lieu sans ATP et en très faible concentration en Mg2+, elle est même inhibée à forte concentration car

le Magnésium empêche la fixation de RecT sur le double brin. RecT utilise donc un mode d'échange de brins, pour l'instant mal caractérisé, mais qui semble radicalement différent de celui décrit pour RecA (Noirot et Kolodner, 1998).

Au delà des aspects mécanistiques du mode d'action des protéines impliquées se pose la question de l'influence de la séquence d'ADN dans le processus d'invasion. Du fait de leurs caractéristiques structurales et dynamiques particulières, les séquences télomériques pourraient avoir un comportement différent de celui de l'ADN plus « classique ». Une étude d'échange de brin réalisée par Zein et Levene avec des séquences télomériques humaines a été réalisée en utilisant la protéine RecA, à défaut de hRad51 (Zein et Levene, 2005). Bien que la topologie du complexe ternaire formé entre RecA, l'ADN simple brin et le double brin contenant des répétitions télomériques montre une conformation très semblable de celle adoptée par des séquences non répétées, une particularité essentielle a été mise en évidence. Lors de la réaction d'échange de brin, des associations d'ordre supérieur entre les plasmides substrats ont été observées. Les séquences télomériques semblent donc capables de former des structures multimériques complexes. Les auteurs proposent que cette propriété pourrait participer aux phénomènes de recombinaison qui permettent l'élongation des télomères dans les cellules ALT.

Ainsi, plusieurs schémas réactionnels existent qui peuvent nous donner des pistes quant au mode d'action de TRF2. Dans la première publication présentée (annexe 1), nous avons mis au point un test d'invasion qui permet d'étudier ce phénomène en utilisant une séquence télomérique double brin contenue dans un plasmide et donc topologiquement contrainte. Les paramètres et les conditions de la réaction ont été analysés ainsi que l'influence des protéines télomériques TRF2 et TRF1. Nous avons montré que, contrairement à TRF1, TRF2 stimule la réaction d'invasion. En étudiant la dépendance de cet effet

stimulateur de TRF2 vis à vis de l'ATP ou du magnésium, nous avons pu en déduire que TRF2 se comporte différemment de RecA.

I-1-b- Les différents états conformationnels de l'ADN télomérique

La conservation des séquences répétées télomériques au cours de l'évolution avec un brin riche en G et un brin riche en C suggère un rôle de ces séquences dans l'organisation télomérique. Au delà de l'aspect de la spécificité de séquence des protéines telles que TRF1, TRF2 ou POT1, on peut aussi s'interroger sur les propriétés intrinsèques de cette séquence et de leur influence sur la biologie des télomères.

Plusieurs études ont déjà mis en évidence des caractéristiques structurales remarquables de ces séquences. Ainsi, il a été montré que le brin C de l'ADN télomérique présente une sensibilité particulière à la digestion par la nucléase S1 qui reconnaît et coupe l'ADN simple brin (Budarf et Blackburn, 1987). En effet, les premières études réalisées sur l'ADN télomérique des ciliés ont démontré que bien qu'il possède une structure B classique avec 10.5 pb/tour (Henderson et al., 1987), l'ADN télomérique est capable d'adopter des structures non conventionnelles non duplex (Hastie et Allshire, 1989).

F. Kamanetskii et ses collaborateurs ont beaucoup étudié les caractéristiques des séquences télomériques en commençant par celle de *Tetrahymena*. Ces auteurs ont déterminés que, dans des conditions de stress topologique et à pH faible (inférieur à 4,4), le double brin subit une transition conformationelle, aboutissant à une structure en épingle à cheveux ou « hairpin » pour le brin C, stabilisée par des paires de bases non Watson-Crick (le (C,A) hairpin), le brin G restant non structuré (Lyamichev et al., 1989). Ils proposèrent alors que ce brin G puisse s'hybrider avec un oligonucléotide simple brin contenant une séquence complémentaire riche en cytosine.

Par la suite, ces mêmes auteurs montrèrent qu'une séquence humaine double brin contenant 12 répétitions et soumise à ces mêmes conditions de stress topologique et de pH, adopte une conformation contenant quatre domaines distincts : une première partie, qui s'organise en une triple hélice intramoléculaire, est suivie d'un « hairpin » impliquant le brin C ; une partie simple brin G s'organise en G-quadruplex et une partie simple brin G reste non structurée (Voloshin et al., 1992). Comme la précédente, cette structure peut accueillir un oligonucléotide simple brin homologue riche en C. Les auteurs estiment que c'est probablement le surenroulement, plus que le pH, qui génère et stabilise ces structures, suggérant que l'on pourrait retrouver ce genre de structure à un pH neutre si le stress topologique est suffisant.

D'autres études se sont intéressées à la conformation adoptée par la séquence télomérique humaine TTAGGG en fonction du nombre de répétitions présentes à l'intérieur d'un ADN circulaire fermé (Huertas et al., 1994). Quand la séquence télomérique contient moins de 8 répétitions, seul le brin C se structure en un hairpin intramoléculaire. A partir de 8 répétitions, le brin G se structure également, probablement par la formation de triple hélices (ou triplex pyrimidine-purine-pyrimidine) et/ou de G-quadruplex.

De façon générale, les séquences télomériques adoptent donc des conformations particulières dans des conditions de pH acide et/ou de surenroulement négatif élevé. Ces différentes conformations partagent une propriété, celle de permettre l'association d'un simple brin, un phénomène qui pourrait participer à la formation de la t-loop à l'extrémité des télomères. Dans notre étude, nous avons observé que les séquences télomériques constituent un excellent substrat pour l'invasion par un simple brin homologue. Dans nos conditions et en concentration équimoléculaire entre le plasmide receveur et la sonde, environ 9% de la sonde interagit avec le plasmide alors qu'une séquence non télomérique ne donne aucun signal d'invasion.

I-1-c- Impact de la topologie

L'état topologique des extrémités des télomères pourrait être un facteur déterminant dans la formation de la t-loop en aidant à l'extrusion de structures capables d'accueillir un simple brin complémentaire. De nombreuses expériences ont mis en évidence l'importance de la topologie de l'ADN dans la vie de la cellule.

La notion de torsion de l'ADN a été proposée en 1965 après des observations de l'ADN par ME (Vinograd et al., 1965). Ces expériences expliquent pourquoi deux structures circulaires de même taille peuvent ne pas migrer de la même façon sur un gel d'agarose. Dans leurs expériences, une espèce présentait des enchevêtrements et correspondait à une forme « vrillée » (forme I), elle migrait rapidement sur un gel d'agarose alors qu'une autre apparaissait sous la forme de cercle ouvert et correspondait à une forme sans contrainte, ou relâchée (forme II), et dont la migration était ralentie. L'élimination des tensions de la forme I par une coupure simple brin permettait de passer à la forme II.

On parle ainsi de surenroulement, car il s'agit d'un enroulement d'ordre supérieur à l'enroulement intrinsèque de l'ADN. Le taux de surenroulement peut être exprimé par la variation du nombre d'enlacement ou Lk pour « linking number ». Le Lk est une mesure du nombre de fois qu'un des brins de l'ADN croise l'autre dans une molécule topologiquement fermée. Ce nombre ne peut être modifié tant qu'il n'y a pas d'ouverture d'un ou des deux brins de la molécule. Ce Lk est donc une propriété topologique d'une molécule « fermée » d'ADN et ne dépend pas d'une géométrie particulière de l'ADN. Des molécules d'ADN qui diffèrent seulement par leur Lk sont appelées des topoisomères.

Le Lk correspond à une somme de deux valeurs : le « twist » (Tw) qui correspond au nombre de tours d'hélice et le « writhe » (Wr) défini par le nombre de fois que la double hélice s'enroule autour d'elle-même dans l'espace. Le surenroulement d'une molécule se décrit par la variation de son nombre d'enlacement (ΔLk) par comparaison avec l'état relâché

de cette même molécule (Lk0). Cette variation peut trouver sa source dans des changements dans le « twist » (ouverture ou contraction de la double hélice) et/ou dans le « writhe » (enroulement de la double hélice) et peut être négative (surenroulement négatif) ou positive (surenroulement positif).

Ce qui est vrai pour une molécule circulaire fermée (comme un génome circulaire), s'applique également à l'ADN linéaire. L'ADN linéaire des eucaryotes présente en effet des zones d'attachement à la matrice nucléaire créant ainsi des domaines fermés indépendants topologiquement et en général surenroulé négativement. *In vivo*, les protéines qui agissent sur la variation du nombre d'enlacement d'une molécule d'ADN sont appelées des topoisomérases. Cette famille d'enzymes s'avère être très diversifiée, car il existe des enzymes capables d'éliminer les supertours (sous tension) vers une forme relaxée (sans tension), mais également des enzymes capables, à l'inverse, de créer des supertours, ces topoisomérases sont appelés des gyrases. Deux grandes classes de topoisomérases ont cependant été identifiées. Les topoisomérase de type I et les topoisomérase de type II.

Les topoisomérases de type I agissent en se fixant de façon covalente sur l'ADN et en clivant un seul brin d'ADN, ensuite, soit le brin intact passe à travers la cassure du brin clivé (type I-A), soit le brin clivé tourne autour du brin intact (type I-B). Quelque soit le mécanisme utilisé, le brin clivé est ensuite ressoudé et l'enzyme est relarguée avant de recommencer éventuellement un nouveau cycle. Les topoisomérases de type I-A, comme la topoisomérase de Coli, ne sont capables de relaxer que les supertours négatifs. La topoisomérase de germe de blé appartient au type I-B et est capable de relaxer à la fois les supertours positifs et les supertours négatifs. Cette enzyme agit entre autre en amont de la fourche de réplication pour éliminer les supertours positifs générés lors de la séparation des deux brins. La réverse gyrase, qui appartient au groupe I-A et qui est présente chez les archaebactéries qui vivent à 80°C,

crée des supertours positifs, sans doute pour que l'ADN soit plus résistant à l'ouverture et à la dénaturation, ce qui est important au vu des conditions de vie de ces organismes.

Les topoisomérases de type II agissent en clivant les deux brins de l'ADN. Dans ce système, une autre partie du double brin passe à travers la coupure avant que celle-ci ne soit refermée par l'enzyme. La protéine gyrase qui appartient à cette famille est la seule topoisomérase capable d'induire du surenroulement négatif. Cette enzyme participe par exemple à l'initiation de la réplication chez les procaryotes (Forterre et al., 2007).

La présence de surenroulement est essentielle à la plupart des mécanismes intervenant sur l'ADN. Tout d'abord, il participe à la compaction de l'ADN en lien avec les nucléosomes. Le surenroulement de l'ADN est également important pour la reconnaissance et la fixation de nombreuses protéines. En effet, la plupart des protéines sont sensibles au surenroulement négatif car dans ces conditions, l'ADN se trouve dans une configuration haute en énergie comparée à l'ADN sans contraintes. Le taux de surenroulement peut également contrôler l'expression de certains gènes. Ce contrôle de l'expression des gènes par le surenroulement est magnifiquement représenté par l'expression de la topoisomérase I et de la gyrase chez *E. Coli.* En effet, pour garder un niveau de surenroulement précis, l'expression de la topoisomérase est activée quand le surenroulement augmente (Tse-Dinh, 1985), et l'expression de la gyrase est augmentée quand le surenroulement diminue (Menzel et Gellert, 1983).

Le taux de surenroulement peut également intervenir dans la capacité d'ouverture de la double hélice. Le surenroulement négatif permet en effet de dérouler la double hélice et d'augmenter la capacité d'ouverture de l'ADN ce qui influence l'initiation de certains phénomènes comme la réplication ou la transcription. A l'extrémité des télomères, l'état topologique pourrait ainsi participer à l'ouverture du double brin et donc à la formation de la boucle télomérique. Nous avons donc étudié l'impact de TRF2 sur la topologie de l'ADN.

Pour cela, nous avons utilisé un test de relaxation de plasmide qui nous renseigne sur la capacité de la protéine à agir sur la topologie et de préciser la nature des supertours créés. Ainsi nous avons montré que TRF2 génère sur l'ADN du surenroulement positif. Par l'étude des différents mutants de TRF2, nous avons pu établir l'existence d'une corrélation entre la capacité de TRF2 à stimuler la réaction d'invasion, à former avec l'ADN des complexes de grande taille apparente et sa propriété de modification de la topologie. La visualisation des complexes TRF2/ADN par microscopie de force atomique révèle une condensation de la double hélice probablement due à un enroulement de la double hélice autour de la protéine sous forme tetramérique. Ces résultats nous ont amenés à proposer un modèle impliquant la multimérisation de TRF2 et la modification de la topologie de l'ADN pour expliquer l'effet stimulateur de TRF2 sur l'invasion télomérique.

I-2- Article : "A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion."

Simon Amiard, Michel Doudeau, Sebastien Pinte, Anaïs Poulet, Christelle Lenain, Cendrine Moskalenko, Dimitar Angelov, Nele Hug, Alessandro Vindigni, Philippe Bouvet, Jacques Paoletti, Eric Gilson and Marie-Josèphe Giraud-Panis.

Nat Struct Mol Biol. 2007 Feb;14(2):147-154.

nature structural & molecular biology

A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion

Simon Amiard[1,2], Michel Doudeau[2], Sébastien Pinte[1], Anaïs Poulet[1,3], Christelle Lenain[1], Cendrine Faivre-Moskalenko[3,4], Dimitar Angelov[1,3], Nele Hug[5], Alessandro Vindigni[6], Philippe Bouvet[1,3], Jacques Paoletti[2], Eric Gilson[1] & Marie-Josèphe Giraud-Panis[1,3]

Telomeres can fold into t-loops that may result from the invasion of the 3′ overhang into duplex DNA. Their formation is facilitated *in vitro* by the telomeric protein TRF2, but very little is known regarding the mechanisms involved. Here we reveal that TRF2 generates positive supercoiling and condenses DNA. Using a variety of TRF2 mutants, we demonstrate a strong correlation between this topological activity and the ability to stimulate strand invasion. We also report that these properties require the combination of the TRF-homology (TRFH) domain of TRF2 with either its N- or C-terminal DNA-binding domains. We propose that TRF2 complexes, by constraining DNA around themselves in a right-handed conformation, can induce untwisting of the neighboring DNA, thereby favoring strand invasion. Implications of this topological model in t-loop formation and telomere homeostasis are discussed.

© 2007 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

Telomeres, the termini of eukaryotic chromosomes, are composed of specialized structures, which provide a protective cap for chromosome ends to preserve them from degradation and illicit repair[1,2]. Human telomeric DNA is composed of long arrays of 5′-T_2AG_3 repeats and ends with a 3′ single-stranded guanine-rich tail (G-tail). The G-tail is the substrate for the telomerase enzyme, which elongates telomeric DNA[2,3]. *In vitro*, the G-tail can fold into quadruplex structures where guanines associate through Hoogsteen base-pairing[4]. Analysis by EM of the structure of telomeric DNA from various sources has revealed the presence of lasso-like structures, called t-loops[5]. Inside the t-loop, the G-tail is proposed to invade the double helix and to be protected, once buried, from nucleolytic attacks, telomerase elongation or both[5,6]. The t-loop could also constitute a recombination intermediate, leading to rapid telomere shortening by intratelomeric deletion events[7,8]. It is worth noting that strand invasion between different telomeres could also serve as a substrate for the conversion event involved in the maintenance of telomere length by telomerase-independent mechanisms (the ALT pathway)[9]. Overall, strand invasion of the G-tail into the duplex part of telomeric DNA is expected to take part in several mechanisms dictating telomere fate.

Telomere repeat factor-1 (TRF1) and TRF2 and protection of telomeres-1 (POT1) are telomeric DNA-binding proteins that organize large nucleoprotein complexes involved in essential telomeric functions[10–13]. As shown *in vitro*, TRF2, but not TRF1, promotes the formation of the t-loop and might pair single-stranded DNA to double-stranded DNA[5,6]. As both TRF1 and TRF2 share very similar DNA-binding domains, the disparity in their action on t-loops is puzzling and suggests differential activities on telomeric DNA. However, the mechanisms behind the action of TRF2 on strand invasion are still unknown.

In this report, we examine the mechanisms by which human TRF2 stimulates telomeric strand invasion. We show that TRF2, but not TRF1, introduces torsional stress in DNA either through dense coiling or right-handed wrapping. Our observations support a model where TRF2 enhances strand invasion by inducing DNA untwisting.

RESULTS

A strand invasion assay for telomeric DNA repeats

To examine the role of TRF2 in strand invasion, we developed a simple assay based on the uptake of a single-stranded telomeric probe by a plasmid DNA. In equimolar concentrations of a G-rich probe containing 15 5′-T_2AG_3 repeats (T15G) and of a supercoiled pTelo2 DNA containing 650 base pairs (bp) of the same repeats, roughly 9% of the probe molecules are associated with the plasmid (**Fig. 1a**,**b**, lane 3). Such an association is observed for both G-rich and C-rich probes (**Supplementary Fig. 1** online). It does not occur when the telomeric probe is mixed with the nontelomeric pUC19 plasmid DNA and is favored by increasing salt concentration (**Supplementary Fig. 1**).

Next, we tested the sensitivity of pTelo2 DNA to digestion by the mung bean nuclease, which is specific for single-stranded DNA.

[1]Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule de l'Ecole Normale Supérieure de Lyon, CNRS UMR 5161, IFR128, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France. [2]Centre de Biophysique Moléculaire, UPR301 CNRS, rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France. [3]Laboratoire Joliot Curie, Ecole Normale Supérieure, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France. [4]Laboratoire de Physique, Ecole Normale Supérieure, 46 Allée d'Italie, 69364 Lyon Cedex 07, France. [5]Swiss Institute for Experimental Cancer Research, Chemin des Boveresses 155, CH-1066 Epalinges s/Lausanne, Switzerland. [6]International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology, Padriciano 99, I-34012 Trieste, Italy. Correspondence should be addressed to E.G. (eric.gilson@ens-lyon.fr).

Received 25 June 2006; accepted 20 December 2006; published online 14 January 2007; doi:10.1038/nsmb1192

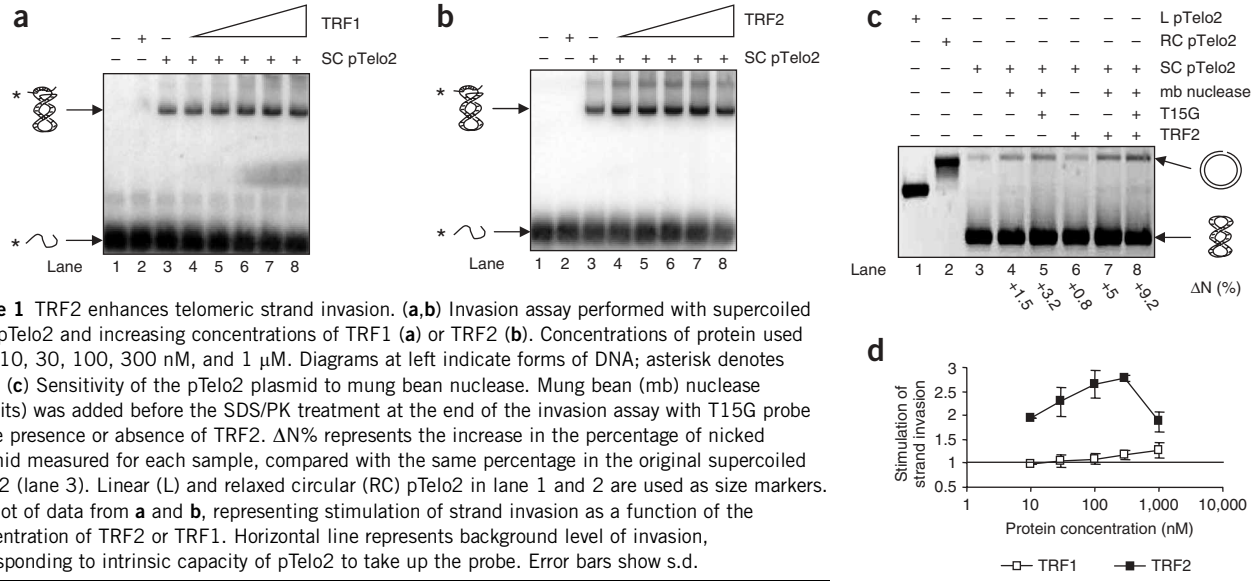


Figure 1 TRF2 enhances telomeric strand invasion. (**a**,**b**) Invasion assay performed with supercoiled (SC) pTelo2 and increasing concentrations of TRF1 (**a**) or TRF2 (**b**). Concentrations of protein used were 10, 30, 100, 300 nM, and 1 μM. Diagrams at left indicate forms of DNA; asterisk denotes label. (**c**) Sensitivity of the pTelo2 plasmid to mung bean nuclease. Mung bean (mb) nuclease (5 units) was added before the SDS/PK treatment at the end of the invasion assay with T15G probe in the presence or absence of TRF2. ΔN% represents the increase in the percentage of nicked plasmid measured for each sample, compared with the same percentage in the original supercoiled pTelo2 (lane 3). Linear (L) and relaxed circular (RC) pTelo2 in lane 1 and 2 are used as size markers. (**d**) Plot of data from **a** and **b**, representing stimulation of strand invasion as a function of the concentration of TRF2 or TRF1. Horizontal line represents background level of invasion, corresponding to intrinsic capacity of pTelo2 to take up the probe. Error bars show s.d.

Supercoiled pTelo2 DNA has an intrinsic sensitivity in this assay, and the addition of a G-rich oligonucleotide increases it by roughly two-fold (**Fig. 1c**, lanes 4 and 5). This shows that the uptake of the single strand by the plasmid DNA coincides with the opening of the double helix, which explains why the reaction is sensitive to the level of negative supercoiling of the target plasmid (**Supplementary Fig. 1**, compare lanes 2 and 10)[14,15]. This, together with the fact that our experimental conditions (pH 8) do not favor triple-helix formation[15], suggests that the invading oligonucleotide hybridizes with one of the two strands, displacing the other one and forming a so-called D-loop.

Previous work has shown that the uptake of homologous single-stranded fragments is a property of supercoiled DNA, regardless of its sequence[14]. However, under our conditions, we did not observe strand association when using a probe of identical length but hybridizing outside the telomeric tract (BP19, **Supplementary Fig. 1**). This, together with the faint but appreciable signal we obtained for the association of the probe with a linearized plasmid DNA (**Supplementary Fig. 1**), indicates that 5′-T_2AG_3 repeats are particularly good substrates for strand invasion, making the reaction not strictly dependent on DNA supercoiling, as previously reported for *Tetrahymena thermophila* telomeric DNA[16]. The greater efficiency of the reaction observed in linear compared with relaxed circular molecules (compare lanes 2 and 6 in **Supplementary Fig. 1**) could be due to the formation of positive supercoils in the circular substrate upon D-loop formation, which would destabilize the invasion product. In linear molecules, such topological stress is expected to be rapidly dissipated. In agreement with this interpretation, UV laser cross-linking, which creates covalent interstrand cross-links at guanine sites (H. Menoni, S. Dimitrov and D. Angelov, unpublished data), greatly increases the amount of probe found associated with the relaxed circular plasmid DNA (**Supplementary Fig. 1**).

TRF2 but not TRF1 stimulates strand invasion

The DNA-binding activities of purified TRF1 and TRF2 proteins were analyzed by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) using a double-stranded probe containing four 5′-T_2AG_3 repeats (**Supplementary Fig. 2** online). Full-length TRF1 and TRF2 give complexes in the same range of concentrations (**Table 1**). However, in contrast with TRF1, TRF2 enhances the uptake of the telomeric probe by the plasmid DNA, with a stimulation factor of roughly three-fold and uptake peaking at a concentration of TRF2 corresponding to one dimer for every three repeats (**Fig. 1a**,**b**,**d** and **Table 1**). This value falls in the same range as the estimated quantities of TRF2 molecules present in various cell types[17]. TRF2 stimulates the invasion of probes containing four or six repeats (data not shown) and of the C-rich telomeric probe (**Supplementary Fig. 3** online). It is also capable of increasing strand invasion on relaxed circular and linear forms of the plasmid by roughly two-fold (data not shown). Its stimulatory effect does not require a preliminary incubation with the single-stranded probe (**Supplementary Fig. 3**). Notably, at the optimal concentration of TRF2, we observed a three-fold increase in pTelo2 sensitivity to the mung bean nuclease, compared with its sensitivity in protein-free samples (**Fig. 1c**, compare lanes 4 and 5 with lanes 7 and 8). The fact that TRF2 causes an increase in the opening of the plasmid DNA that correlates with its capacity to enhance association suggests that TRF2 stimulates D-loop formation.

TRF2 does not require a particular order in the addition of reactants, does not need magnesium or ATP and does not promote

Table 1 Properties of deletion mutants and chimeric proteins

Proteins	Relative stimulation of strand invasion (%)	DNA binding ($C_{1/2}$, in nM)	Binding sequence specificity	Migration in polyacrylamide gel
TRF2	100	15 ± 5	+	–
$TRF2^{\Delta B}$	68	40 ± 10	+	–
$TRF2^{\Delta M}$	28	73 ± 10	–	–
$TRF2^{\Delta L\Delta M}$	55	52 ± 10	–	–
$TRF2^{\Delta B\Delta M}$	<10	>1,000	NA	NA
B^{TRF2}	<10	>600	–	+
$TRF2^{M1}$	100	25 ± 5	+	–
$TRF2^{A\Delta B}$	<10	30 ± 10	+	+
TRF1	17	35 ± 5	+	+

$C_{1/2}$, concentration of protein required to obtain half DNA binding in EMSAs. NA, not applicable.

© 2007 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

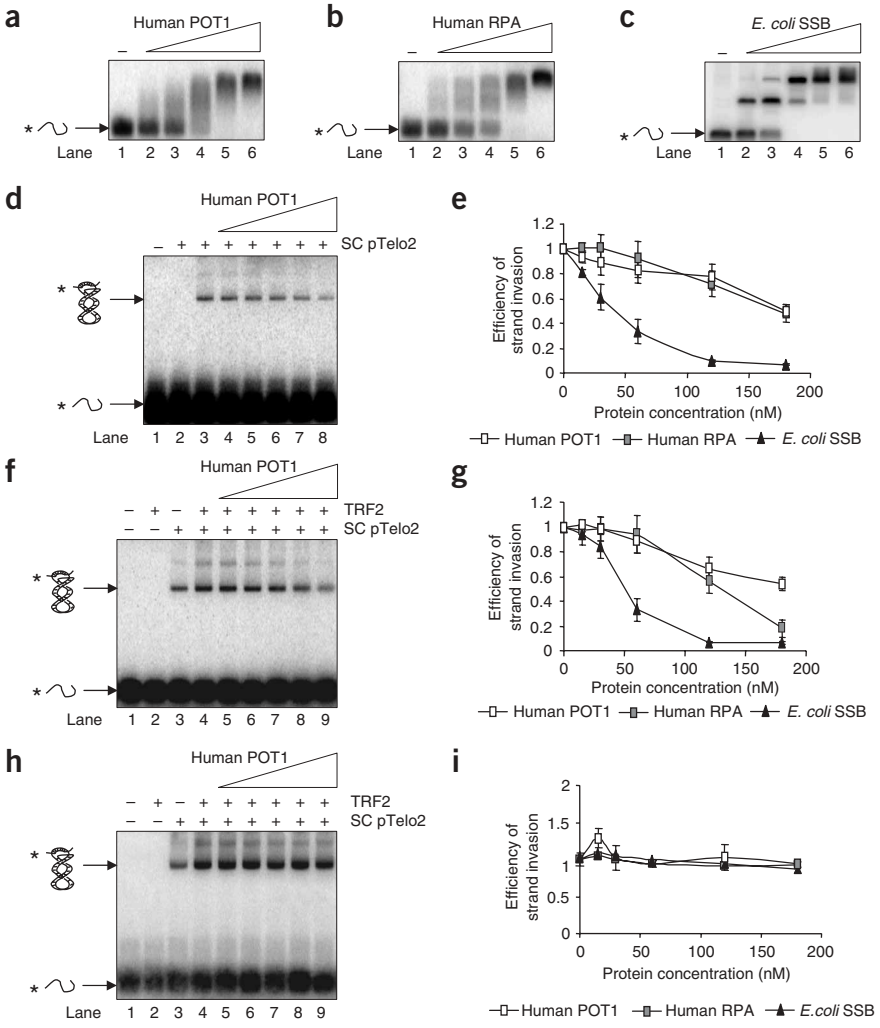


Figure 2 RPA and POT1 binding do not impair strand invasion. (**a**–**c**) Analysis of protein binding by EMSA using the T15G probe. All proteins used were at 15, 30, 60, 120 and 180 nM. Migrations were done in polyacrylamide gels for *E. coli* SSB and in agarose gels for POT1 and RPA. (**d**) Invasion assay with SCpTelo2 and increasing concentrations (as in **a**–**c**) of POT1. (**e**) Plot of data from **d** and similar experiments with RPA and the *E. coli* SSB proteins, representing efficiency of strand invasion (compared to the protein-free sample) as a function of protein concentration. Error bars show s.d. (**f**) Invasion assay with SCpTelo2 and increasing concentrations of POT1, in the presence of TRF2 (30 nM). The single-stranded probe was preincubated with POT1 (concentrations as in **a**–**c**). (**g**) Plot of data from **f** and similar experiments with RPA and *E. coli* SSB, representing efficiency of strand invasion (compared to the sample containing only TRF2) as a function of protein concentration. Error bars show s.d. (**h**) Invasion assay with SCpTelo2 and increasing concentrations of POT1, in the presence of TRF2 (30 nM). POT1 was added at the end of the invasion reaction (concentrations as in **a**–**c**). (**i**) Plot of data from **h** and similar experiments with RPA and *E. coli* SSB, as in **g**.

strand exchange under conditions where the bacterial RecA protein acts efficiently[18] (**Supplementary Figs. 3** and **4** online). We conclude that TRF2 enhances the intrinsic tendency of the duplex telomeric DNA to associate with a single-stranded DNA molecule; therefore, it seems to act as a chaperone in the invasion process. The mechanism followed is quite distinct from the one used by the RecA-type recombinases. In contrast, TRF1 seems to have no effect on the strand-invasion reaction (**Fig. 1b**,**d**).

RPA and POT1 do not impair strand invasion

To address the role of telomeric proteins in strand invasion further, we tested purified human replication protein A (RPA)[19] and human POT1[10] proteins. We used *Escherichia coli* SSB as an unrelated nonspecific single strand–binding protein. EMSA results (**Fig. 2a**–**c**) show that the binding affinities are similar for all three proteins, falling in the range between 20 nM for SSB and 40 nM for POT1. Incubating the T15G probe with subsaturating concentrations of these proteins before the invasion assay only leads to a slight decrease in the efficiency of the reaction for POT1 and RPA and to an extensive inhibition with SSB (**Fig. 2d**,**e**). Even at a protein concentration leading to saturation of the probe (120 nM), only ~20% of the invasion is inhibited by RPA and POT1, whereas ~90% is inhibited by the *E. coli* SSB. These results suggest that SSB–DNA complexes are ineffective for invasion, whereas POT1–DNA and RPA–DNA complexes can be engaged in a strand-invasion reaction. When TRF2 was added to the reaction, the profiles were not greatly modified (**Fig. 2f**,**g**), arguing against synergistic effects of RPA or POT1 with TRF2 on strand invasion. The same results were obtained upon incubation of these proteins with the plasmid DNA or with TRF2 before the invasion assay (data not shown). None of these proteins alter TRF2-mediated stimulation once the invasion has taken place (post-incubation, **Fig. 2h**,**i**), showing that the inhibition is caused by binding to the probe, rather than by a direct interaction with the plasmid DNA or with TRF2. Overall, these results show that, in contrast with the binding of the *E. coli* SSB protein, the binding of POT1 or RPA is compatible with a strand-invasion reaction.

TRF2 C-terminal domain is not necessary for invasion

Next, we tested a mutated form of TRF2 ($TRF2^{M1}$), which was constructed by replacement of the TRF2 Myb-like telobox DNA-binding domain (domain M) by the one from TRF1. This protein binds DNA equally well, as expected[20], and stimulates strand invasion similarly to TRF2 (**Supplementary Fig. 2** and **Table 1**). We conclude that the difference between TRF1 and TRF2 regarding strand invasion does not originate from their Myb-like telobox DNA-binding domains. Nevertheless, TRF2 appears to require DNA binding to stimulate strand invasion, as the truncated mutant form $TRF2^{\Delta B\Delta M}$, which does not bind DNA, does not stimulate invasion (**Supplementary Fig. 2** and **Table 1**). Furthermore, competition with TRF1 for DNA binding decreases the ability of TRF2 to stimulate strand invasion (**Supplementary Fig. 3**). We conclude that the capacity of TRF2 to enhance strand invasion relies both on its capacity to bind DNA and on another property that is absent or inhibited in TRF1.

Unexpectedly, $TRF2^{\Delta M}$ and $TRF2^{\Delta L\Delta M}$, which lack the C-terminal DNA-binding domain of TRF2, are capable of stimulating strand

© 2007 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

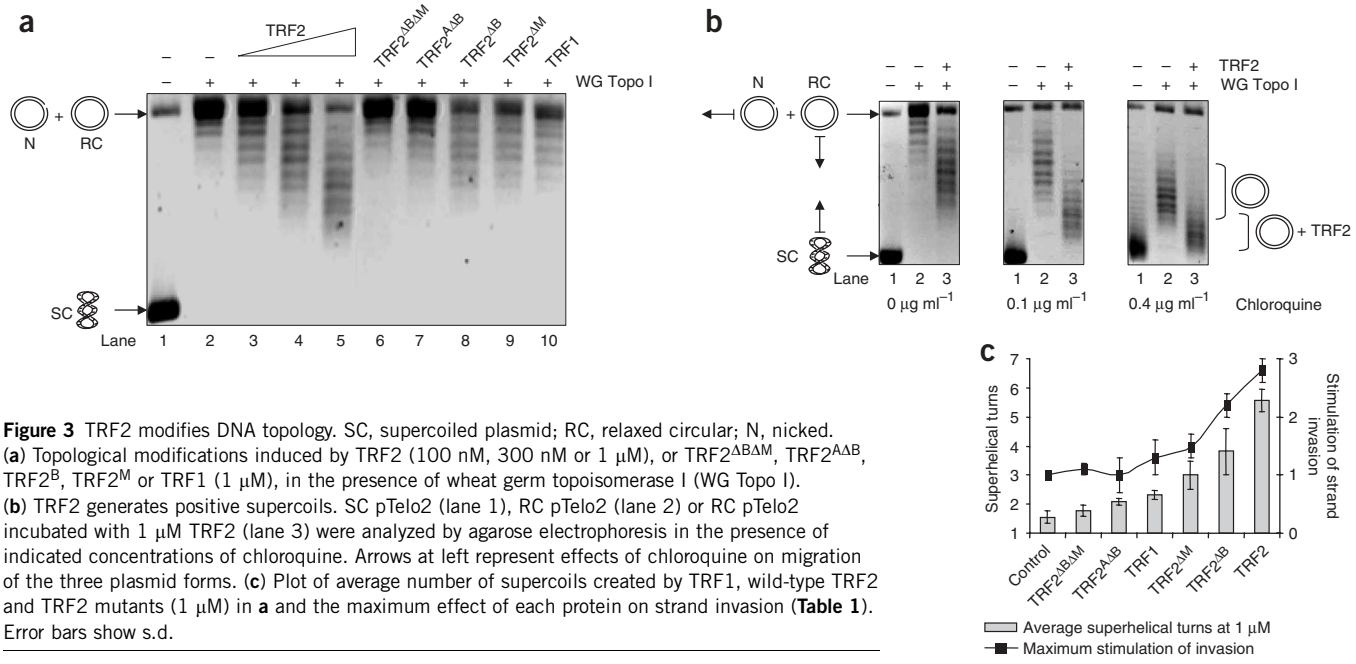


Figure 3 TRF2 modifies DNA topology. SC, supercoiled plasmid; RC, relaxed circular; N, nicked. (**a**) Topological modifications induced by TRF2 (100 nM, 300 nM or 1 μM), or TRF2$^{\Delta B\Delta M}$, TRF2$^{A\Delta B}$, TRF2^{B}, TRF2^{M} or TRF1 (1 μM), in the presence of wheat germ topoisomerase I (WG Topo I). (**b**) TRF2 generates positive supercoils. SC pTelo2 (lane 1), RC pTelo2 (lane 2) or RC pTelo2 incubated with 1 μM TRF2 (lane 3) were analyzed by agarose electrophoresis in the presence of indicated concentrations of chloroquine. Arrows at left represent effects of chloroquine on migration of the three plasmid forms. (**c**) Plot of average number of supercoils created by TRF1, wild-type TRF2 and TRF2 mutants (1 μM) in **a** and the maximum effect of each protein on strand invasion (**Table 1**). Error bars show s.d.

invasion (**Table 1**). In fact, these proteins bind DNA substantially (**Supplementary Fig. 2** and **Table 1**). Competition experiments show that their binding is not specific for telomeric DNA (**Supplementary Fig. 2**, **Table 1** and data not shown). Moreover, a synthetic peptide of 45 residues encompassing the basic N-terminal domain (named B^{TRF2}) is able to bind DNA (**Supplementary Fig. 2** and **Table 1**). These results show that TRF2 contains an additional DNA-binding domain at its extreme N terminus, in agreement with recent data[21].

The TRFH domain is necessary but not sufficient

The truncated forms TRF2$^{\Delta B}$, TRF2$^{\Delta M}$ and TRF2$^{\Delta L\Delta M}$ stimulate strand invasion, whereas TRF2$^{\Delta B\Delta M}$ and B^{TRF2} do not (**Table 1**). This shows that the TRF-homology (TRFH) domain is necessary but not sufficient for strand invasion. The linker domain seems dispensable for strand invasion, and it might even cause a decrease in the efficiency of the invasion reaction. We propose that TRF2-mediated stimulation of strand invasion depends on its TRFH domain and on the capacity of the C- or N-terminal part of the protein to bind DNA. In agreement with this hypothesis, we observed similar strand-invasion stimulations for TRF2 and TRF2$^{\Delta M}$ with the telomeric DNA of budding yeast, which is not bound specifically by TRF2 (**Supplementary Fig. 3**).

Replacing the B domain with the acidic domain of TRF1 (in the TRF2$^{A\Delta B}$ protein) abolishes the capacity of TRF2 to stimulate strand invasion but does not modify the DNA-binding affinity of the protein (**Table 1** and **Supplementary Fig. 2**). This raises the possibility that the TRFH domain of TRF1 could also play a role in strand invasion but is prevented from doing so by its N-terminal acidic domain. Unfortunately, we were unable to purify a mutated form of TRF1 lacking its N-terminal domain to test this hypothesis directly.

As previously reported[22–24], we observed that TRF2–DNA complexes, but not TRF1–DNA complexes, adopt an unusual structure that prevents their entry into polyacrylamide gels during electrophoresis (**Table 1** and **Supplementary Fig. 5** online). This property is conserved in TRF2$^{\Delta B}$, TRF2$^{\Delta M}$ and TRF2$^{\Delta L\Delta M}$ but is lost in TRF2$^{A\Delta B}$ and B^{TRF2}, revealing a noteworthy correlation between the ability of TRF2–DNA complexes to enhance strand invasion and their inability to migrate in polyacrylamide gels. Overall, these results suggest that the TRFH domain of TRF2 is involved in the formation of an unusual nucleoprotein structure that favors strand invasion.

TRF2 binding generates positive supercoiling

To investigate the type of unusual structure induced by TRF2, we examined whether this protein modifies the topology of its DNA substrate, using a relaxation assay. The incubation of a relaxed form of the plasmid with increasing concentrations of TRF2 leads to a ladder of products that migrate faster than the relaxed form but slower than the initial supercoiled plasmid (**Fig. 3a**, lanes 2 to 5). These bands do not result from contamination of the TRF2 preparation by DNA or nuclease (**Supplementary Fig. 6** online), indicating that they correspond to topoisomeres with different linking numbers.

To evaluate further the status of the TRF2-induced topoisomeres, we analyzed the same relaxation reactions on agarose gels containing chloroquine. This drug, which generates positive supercoiling in

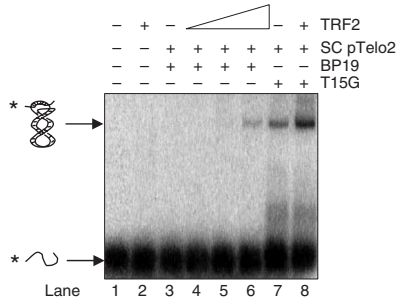


Figure 4 TRF2 stimulates invasion outside the telomeric tract. Invasion assay was performed under the usual conditions using BP19 and increasing concentrations of TRF2 (10 nM, 100 nM, 1 μM). For comparison, invasion assay was performed with pTelo2, T15G alone (lane 7) and T15G with 100 nM TRF2 (lane 8).

© 2007 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

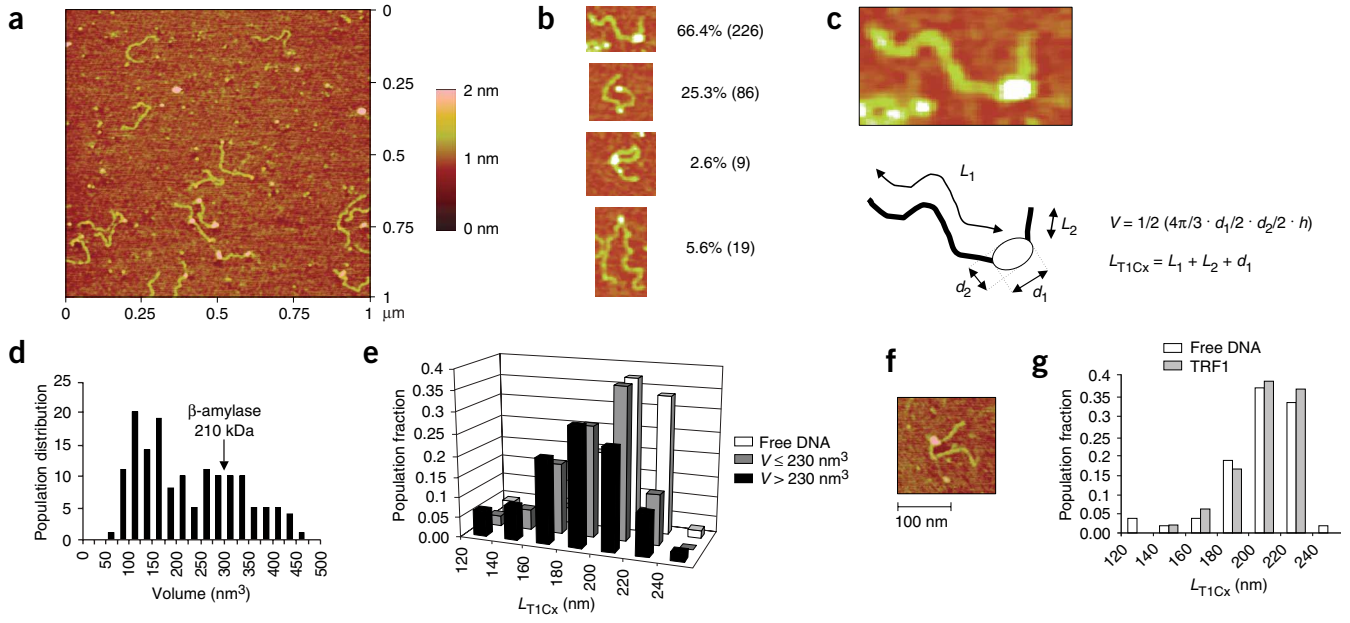


Figure 5 TRF2 condenses telomeric DNA. (**a**) AFM image showing free DNA and various complexes obtained with TRF2. (**b**) Nature and classification of the TRF2 complexes observed. Top, one-protein DNA complex; second row, two-protein DNA complex; third row, TRF2-dependent DNA loop; bottom, TRF2-dependent DNA dimer. (**c**) Diagram of dimensions measured on the AFM images and formula used for calculation of the complexes volumes (V) and DNA total length for objects containing one TRF2 complex (L_{T1Cx}). (**d**) Histogram representing distribution of volumes calculated ($n = 170$). Arrow shows volume obtained for β-amylase. (**e**) Histogram representing distribution of L_{T1Cx} for free DNA (white), TRF2–DNA complexes with volumes $\leq$ 230 nm^3 (gray) and TRF2–DNA complexes with volumes $>$230 nm^3 (black). (**f**) Example of TRF1–DNA complex obtained by AFM. (**g**) Histogram representing distribution of L_{T1Cx} for free DNA (white) and TRF1–DNA complexes (gray).

constrained DNA molecules, is expected to shift negatively supercoiled DNA upward on the gel, whereas positively supercoiled or relaxed DNA will be shifted downward[25]. TRF2-treated DNA always migrates faster than the relaxed circular form, whereas the negatively supercoiled form of the plasmid is shifted upward, comigrating with the TRF2-mediated forms at the higher concentration of chloroquine (**Fig. 3b**). This indicates that the TRF2-induced supercoils are positive. We inferred from these results that inside the TRF2–DNA complex, where it is protected from the topoisomerase, the DNA is positively supercoiled, and that outside the complex, the DNA gains negative supercoils to compensate. With the optimal TRF2 concentration for strand invasion, we observed the creation of roughly eight superhelical turns at maximum and a mean of four turns, indicating that, on average, one turn is introduced by seven dimers (**Fig. 3a**, lane 4). This value is very similar to that obtained for other proteins known to create positive supercoiling: the architectural proto-oncogene protein DEK[26], the histone protein HMf from the archaeum *Methanothermus fervidus*[27] and the *E. coli* SeqA protein[28].

Proteins efficient in stimulating strand invasion (TRF2, TRF2$^{\Delta B}$ and TRF2$^{\Delta M}$) modify DNA topology, whereas proteins that do not stimulate strand invasion, or do so very poorly (TRF1, TRF2$^{\Delta B\Delta M}$ and TRF2$^{A\Delta B}$), are inefficient in modifying DNA topology (**Fig. 3c** and **Supplementary Fig. 7** online). Overall, for TRF1, TRF2 and their various truncated and chimeric forms studied here, there is a noteworthy correlation between the capacities to stimulate strand invasion, to induce torsional stress and to form unusual DNA complexes that do not enter into polyacrylamide gels (**Table 1** and **Fig. 3c**). Notably, TRF2 induces the invasion of the nontelomeric single-stranded probe BP19 into pTelo2 DNA (**Fig. 4**) but not into pUC19 DNA (data not shown). This shows that the effect of TRF2 telomeric DNA binding on strand invasion can be propagated through the plasmid.

TRF2 condenses DNA

One way for a protein to increase the linking number of its bound DNA is to coil or wrap the double helix around itself. This results in an apparent decrease in the length of the target DNA when viewed by EM[29]. To evaluate this, we carried out atomic-force microscopy (AFM) studies of TRF2 bound to the telomeric fragment of 650 bp extracted from the pTelo2 DNA (**Fig. 5a**). Under AFM conditions, 56.5% of the DNA is bound ($n = 602$), and the bound DNA mainly contains either one (66.4%) or two complexes (25.3%) (**Fig. 5b**). Other forms, such as protein-mediated DNA dimers and loops, can also be observed, although with low frequencies (5.6% and 2.6%, respectively; such a low number is expected for loops, because the DNA fragment lacks a 3′ telomeric overhang).

We calculated the volume (V) of each protein ball for 170 objects containing either one or two TRF2–DNA complexes, from the measured diameters (d_1 and d_2) and height (h) of each protein globule (**Fig. 5c**). On the basis of these volumes, the objects tested can be divided in two different populations (**Fig. 5d**). In the first population (46% of the objects), the volumes fall within a range compatible with either a monomeric or dimeric form of TRF2 ($V \leq 230$ nm^3), taking previous AFM studies on TRF2–DNA complexes as a reference[30]. The second population (54%) contains larger complexes compatible with tetrameric forms or higher ($V > 230$ nm^3). As a size control, we measured a volume of 300 ± 10 nm^3 for β-amylase, which has a molecular weight of 210 kDa on average; as ~240 kDa is expected for the TRF2 tetrameric form, this shows that the measured volumes correspond well with the molecular weights and thus the oligomeric forms.

© 2007 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

© 2007 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

We then measured the apparent contour length (the sum of the length of the free DNA with the larger of the complex's two diameters, L_{T1Cx}; **Fig. 5c**) of the DNA in each object containing one TRF2 complex. **Figure 5e** shows the distribution of these length values for the two populations of volumes calculated above ($V \leq 230$ nm^3 and $V > 230$ nm^3) and for free DNA. With the population corresponding to the smaller complexes (41 objects), we obtained a mean value for the apparent DNA length of 196 ± 4 nm, which is only slightly smaller than the mean value for the protein-free objects (209 ± 3 nm). This suggests that small TRF2–DNA complexes have little effect on the apparent length of the DNA. In contrast, for the larger complexes (49 objects), the DNA length appeared significantly shorter than that of free DNA (190 ± 4 nm, a difference of 19 nm; $P < 0.001$), indicating that the formation of large TRF2 complexes causes condensation. We also performed the same experiment with TRF1 and measured the dimensions of 49 different TRF1–DNA complexes (an example of a TRF1 complex is shown in **Fig. 5f**). We obtained the same distribution for the apparent length of the DNA in TRF1 complexes, with an average size of 210 ± 3 nm, as for the protein-free samples (mean 209 ± 3 nm), showing that TRF1, in contrast with TRF2, does not condense DNA (**Fig. 5g**). As we did not detect coils in our TRF2 AFM images, DNA coiling would have to involve short loops (dense coiling) below the AFM detection threshold (~65 bp) to account for the loss of 19 nm, a possible but unlikely hypothesis. Rather, we favor a wrapping model, which, taking into account the dimensions of the protein in its tetrameric form, would be consistent with one turn around a globular core. Similarly, a 28-nm decrease in DNA length was observed by AFM for the one-turn wrapping around the bacterial RNA polymerase plus σ^{70} (~450 kDa, about twice the size of a TRF2 tetramer)[31,32].

DISCUSSION

The main finding of this work is that the binding of TRF2 to telomeric DNA changes the conformation of the double helix by generating positive supercoiling. As AFM analyses show that DNA is condensed within TRF2 complexes, it is highly likely that TRF2 coils or wraps DNA around itself. We also show that TRF2 stimulates homology-dependent strand invasion. It is worth noting that TRF1 is unable to perform or to assist any of these activities. Moreover, we note a strong correlation between the abilities of a variety of TRF2 mutant proteins to modify DNA topology and to stimulate strand invasion. Notably, TRF2 does not seem to behave in a RecA-like manner in strand invasion, as it does not require ATP and cannot catalyze a strand-exchange reaction.

Our findings support the model that TRF2 stimulates strand invasion by promoting unwinding of DNA outside its complex (**Fig. 6a**). In a constrained DNA molecule, TRF2-mediated positive supercoiling is expected to untwist DNA outside the TRF2 complex. This increase in negative supercoiling would contribute to lowering the energy barrier for the opening of the double helix. Indeed, negative superhelicity in telomeric DNA has been shown to promote the formation of eclectic structures that leave single-stranded region(s) exposed and allow the uptake of one or both complementary single strands[15,16,33–37]. In agreement with this model, addition of TRF2 to the plasmid causes an increase in the amount of single-stranded DNA, and addition of topoisomerase I extensively decreases strand invasion and the stability of the final product (data not shown). Furthermore, TRF2 binding also enhances single-strand invasion in a region of the plasmid that does not contain telomeric sequences, suggesting that the effect of TRF2 can be propagated.

Strand invasion and TRF2 stimulatory effects can be observed on relaxed or linear DNA, suggesting that TRF2 could promote strand invasion in the natural context of linear telomeric DNA as well. However, we noted that the association of the single strand with duplex telomeric DNA is unstable when formed with nonsupercoiled DNA molecules and can be detected at an appreciable level only after UV laser cross-linking. In our AFM studies, we observed a low but detectable amount of TRF2-induced loops (2.6% of complexes), which probably correspond to the loops previously observed on larger telomeric fragments[30]. Being constrained, these loops could constitute substrates for topological modifications and strand invasion, explaining why TRF2 can enhance invasion in the linear plasmid.

In the course of our characterization of the TRF2 mutants, we discovered that the basic N-terminal domain of TRF2 has double-stranded DNA–binding activity, with no specificity for telomeric sequences. The contribution of this second DNA-binding domain to the affinity of TRF2 for telomeric DNA seems to be very modest. However, when TRF2 is bound to DNA through its C-terminal Myb-like domain, the N-terminal basic domain is expected to make additional DNA contacts that could modify the structure and the properties of TRF2–DNA complexes. Indeed, a synergistic effect has previously been reported between the deletion of the N-terminal basic domain and of the C-terminal DNA-binding domain in the creation of a dominant-negative allele for telomere protection and TRF2 localization[38,39].

We estimate from our *in vitro* studies that 30 TRF2 dimers lead to an appreciable increase in the ability of a plasmid DNA of roughly 3 kbp to allow a strand invasion reaction. A negatively supercoiled t-loop could subsequently constitute a good substrate either for a *cis*-invasion reaction, stabilizing the looped structure, or for a *trans*-invasion reaction, mediating telomere-telomere association (**Fig. 6b**). This model stresses the importance of the positioning of TRF2 at the double strand–single strand junction (in agreement with ref. 6) and of TRF2 multimerization (in agreement with ref. 30) in the formation of t-loops.

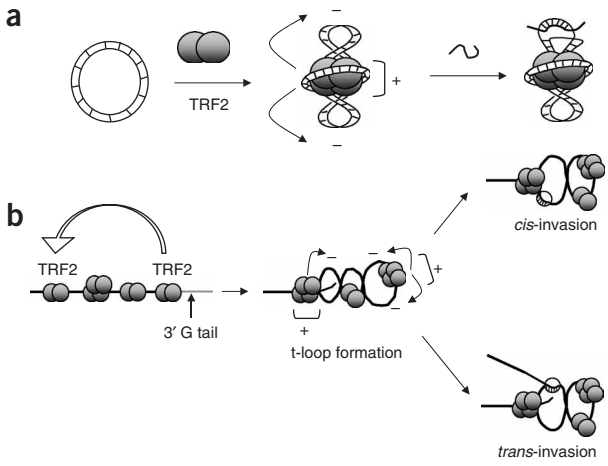


Figure 6 A topological model for telomeric strand invasion. (**a**) Binding of TRF2 on pTelo2 increases the negative superhelicity of the unbound part of the DNA, stimulating strand invasion. (**b**) On natural telomeres, long-range TRF2 interactions, by creating the t-loop, form a topologically closed domain that could be unwound as a result of TRF2 binding and be more readily invaded by the telomeric G-tail. This invasion could proceed intramolecularly (*cis*-invasion) and therefore participate in t-loop stabilization or telomere-assisted replication. Alternatively, the invasion could involve two telomeres (*trans*-invasion) and thus promote telomere association, as well as being involved in telomere replication similarly to the *cis*-oriented invasion.

The expression of TRF2$^{\Delta B}$ in human telomerase-positive cell lines causes no immediate uncapping, but it generates rapid telomere shortening and t-loop–sized telomeric circles, suggesting that this TRF2 mutant still allows t-loop formation[8]. This is in agreement with our *in vitro* data showing that TRF2$^{\Delta B}$ is still able to stimulate strand invasion (**Table 1**). Similarly, we show that the TRF2$^{\Delta M}$ mutant is not totally devoid of activity, and it has previously been shown to retain some of TRF2's capacity to protect telomeres[38].

Similar to TRF2, the Rap1 protein from *Saccharomyces cerevisiae* has also been shown to stimulate the association of telomeric single strands and double strands and to modify DNA topology[35]. Thus, this could well be a general and ancient property of telomeric proteins involved in capping and maintenance. The binding of purified POT1 and RPA to the G-strand does not prevent invasion, whereas binding of the bacterial SSB does. It is noteworthy that both the telomere-specific and the general single-stranded DNA–binding proteins found in human have evolved the ability to permit strand invasion, at least at a low molar ratio of protein to single strand. Additional proteins, including proteins involved in recombination and DNA damage response, could influence strand invasion and t-loop formation[19,40]. TRF1 seems to have no effect on the strand-invasion reaction, but this does not exclude other contributions of TRF1 to t-loops, for example through creation of telomeric DNA synapsis[19,41].

Another implication of this work is that proteins involved in the control of DNA topology should influence t-loop formation and telomere function. Indeed, modification of topoisomerase II activity suppresses the defect of fission yeast cells harboring a deletion of the gene encoding Taz1, an ortholog of TRF2 (ref. 42).

We believe that the finding of a topological activity for TRF2 sheds new light on telomere conformation. Our work provides new leads for further examination of the mechanisms of t-loop clearance and for deciphering the role of this structure in telomere biology.

METHODS

Plasmids, oligonucleotides and protein purification. See **Supplementary Methods** online.

Electrophoretic mobility shift assays and topology assays. See **Supplementary Methods**.

Strand invasion and nuclease assays. Plasmids (200 ng) were incubated with the proteins (concentrations given correspond to the dimer form of the proteins) in 10 µl of 50 mM HEPES (pH 8), 0.1 mg ml^{-1} BSA, 1 mM DTT, 100 mM NaCl and 2% (v/v) glycerol (invasion buffer) for 10 min at 20 °C. We added the radiolabeled oligonucleotide (13.5 nM), and after 15 min of incubation at 20 °C, the reaction was stopped by SDS (1% final w/v) and 6 µg of proteinase K (SDS/PK). After 30 min at 20 °C, ficoll was added (3% final w/v) and the samples loaded on a 1% agarose gel in 1× TBE (80 mM Tris-Cl, 80 mM boric acid, 2 mM EDTA). Migrations were carried out at 4.5 V cm^{-1} in 1× TBE at 20 °C for 2 h. The relative effect on strand invasion was calculated as the difference between the maximum efficiency of strand invasion obtained for each protein and the same value for a protein-free experiment, normalized to the same difference for the TRF2 protein, taken as a reference. For **Figure 2**, purified human POT1 (ref. 43) and RPA[44] proteins were added in the invasion assay and, before treatment with SDS/PK, a 15-fold excess of T15C was added to the reaction. When indicated, at the end of the invasion assay, we added 5 units of mung bean nuclease (NEB) and incubated it 2 h at 30 °C before the SDS/PK treatment and electrophoresis.

UV-laser DNA-DNA cross-linking. The invasion reaction was performed as above using 800 ng of either relaxed circular or linear pTelo2, previously purified by gel electrophoresis. Before the SDS/PK treatment, the samples were subjected to one pulse with the fourth harmonic of a Nd:YAG laser[45,46] for a duration of 5 ns at a wavelength of 266 nm (0.1 J cm^{-2}). After this step, samples were treated as above.

Atomic force microscopy. Telomeric DNA (10 nM) was incubated with either TRF2 or TRF1 (100 nM) in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA and 50 mM NaCl at 25 °C for 30 min, then diluted five-fold in the same buffer and immobilized onto aminopropyltriethoxysilane (APTES)-mica surfaces[47]. AFM imaging was carried out using a Nanoscope III AFM (Digital Instruments) in Tapping Mode in air, with silicon tips (resonant frequency 250–350 kHz) at scanning rates of 3 Hz over scan areas 1 µm wide. The images have been flattened using a homemade MATLAB (The Mathworks; http://www.mathworks.com) script to remove the long-term drift of the setup.

Note: Supplementary information is available on the Nature Structural & Molecular Biology website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank R. Rahmouni for advice. This work was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer ("équipe labellisée") and from "Région Centre". C.L. is supported by fellowships from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

AUTHORS CONTRIBUTIONS

S.A., M.D., S.P., A.P., C.L., C.F.-M., D.A., N.H., A.V. and M.-J.G.-P. did and interpreted the experiments. P.B. and J.P. contributed to the design of the experiments. E.G. and M.-J.G.-P. coordinated the whole study and cowrote the paper.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare that they have no competing financial interests.

Published online at http://www.nature.com/nsmb/
Reprints and permissions information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions

1. Chan, S.R. & Blackburn, E.H. Telomeres and telomerase. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **359**, 109–121 (2004).
2. Smogorzewska, A. & De Lange, T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 177–208 (2004).
3. Wenz, C. *et al.* Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules. *EMBO J.* **20**, 3526–3534 (2001).
4. Wang, Y. & Patel, D.J. Guanine residues in d(T2AG3) and d(T2G4) form parallel-stranded potassium cation stabilized G-quadruplexes with anti glycosidic torsion angles in solution. *Biochemistry* **31**, 8112–8119 (1992).
5. Griffith, J.D. *et al.* Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**, 503–514 (1999).
6. Stansel, R.M., de Lange, T. & Griffith, J.D. T-loop assembly *in vitro* involves binding of TRF2 near the 3′ telomeric overhang. *EMBO J.* **20**, 5532–5540 (2001).
7. Ancelin, K. *et al.* Targeting assay to study the cis functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3474–3487 (2002).
8. Wang, R.C., Smogorzewska, A. & de Lange, T. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* **119**, 355–368 (2004).
9. Dunham, M.A., Neumann, A.A., Fasching, C.L. & Reddel, R.R. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat. Genet.* **26**, 447–450 (2000).
10. Bauman, P. & Cech, T.R. Pot1, the putative telomere end binding protein in fission yeast and humans. *Science* **292**, 1171–1175 (2001).
11. Chong, L. *et al.* A human telomeric protein. *Science* **270**, 1663–1667 (1995).
12. Bilaud, T. *et al.* Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat. Genet.* **17**, 236–239 (1997).
13. Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L. & de Lange, T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat. Genet.* **17**, 231–235 (1997).
14. Holloman, W.K., Wiegand, R., Hoessli, C. & Radding, C.M. Uptake of homologous single-stranded fragments by superhelical DNA: a possible mechanism for initiation of genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 2394–2398 (1975).
15. Voloshin, O.N. *et al.* An eclectic DNA structure adopted by human telomeric sequence under superhelical stress and low pH. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **9**, 643–652 (1992).
16. Henderson, E. *et al.* Structure, synthesis, and regulation of telomeres. *Cancer Cells* **6**, 453–461 (1988).
17. Okabe, J., Eguchi, A., Masago, A., Hayakawa, T. & Nakanishi, M. TRF1 is a critical trans-acting factor required for de novo telomere formation in human cells. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2639–2650 (2000).
18. Cox, M.M. The bacterial RecA protein as a motor protein. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 551–577 (2003).

© 2007 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

19. Verdun, R.E. & Karlseder, J. The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell* **127**, 709–720 (2006).
20. Court, R., Chapman, L., Fairall, L. & Rhodes, D. How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: a view from high-resolution crystal structures. *EMBO Rep.* **6**, 39–45 (2005).
21. Fouche, N. *et al.* The basic domain of TRF2 directs binding to DNA junctions irrespective of the presence of TTAGGG repeats. *J. Biol. Chem.* **281**, 37486–37495 (2006).
22. Dantzer, F. *et al.* Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1595–1607 (2004).
23. Li, B., Oestreich, S. & de Lange, T. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* **101**, 471–483 (2000).
24. Opresko, P.L. *et al.* Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J. Biol. Chem.* **277**, 41110–41119 (2002).
25. Shure, M., Pulleyblank, D.E. & Vinograd, J. The problems of eukaryotic and prokaryotic DNA packaging and *in vivo* conformation posed by superhelix density heterogeneity. *Nucleic Acids Res.* **4**, 1183–1205 (1977).
26. Waldmann, T., Eckerich, C., Baack, M. & Gruss, C. The ubiquitous chromatin protein DEK alters the structure of DNA by introducing positive supercoils. *J. Biol. Chem.* **277**, 24988–24994 (2002).
27. Musgrave, D.R., Sandman, K.M. & Reeve, J.N. DNA binding by the archaeal histone HMf results in positive supercoiling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10397–10401 (1991).
28. Klungsoyr, H.K. & Skarstad, K. Positive supercoiling is generated in the presence of *Escherichia coli* SeqA protein. *Mol. Microbiol.* **54**, 123–131 (2004).
29. Rau, D.C., Gellert, M., Thoma, F. & Maxwell, A. Structure of the DNA gyrase-DNA complex as revealed by transient electric dichroism. *J. Mol. Biol.* **193**, 555–569 (1987).
30. Yoshimura, S.H., Maruyama, H., Ishikawa, F., Ohki, R. & Takeyasu, K. Molecular mechanisms of DNA end-loop formation by TRF2. *Genes Cells* **9**, 205–218 (2004).
31. Rivetti, C., Guthold, M. & Bustamante, C. Wrapping of DNA around the *E. coli* RNA polymerase open promoter complex. *EMBO J.* **18**, 4464–4475 (1999).
32. Shin, M. *et al.* DNA looping-mediated repression by histone-like protein H-NS: specific requirement of $E\sigma^{70}$ as a cofactor for looping. *Genes Dev.* **19**, 2388–2398 (2005).
33. Belotserkovskii, B.P., Krasilnikova, M.M., Veselkov, A.G. & Frank-Kamenetskii, M.D. Kinetic trapping of H-DNA by oligonucleotide binding. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1903–1908 (1992).
34. Budarf, M. & Blackburn, E. S1 nuclease sensitivity of a double-stranded telomeric DNA sequence. *Nucleic Acids Res.* **15**, 6273–6292 (1987).
35. Gilson, E., Muller, T., Sogo, J., Laroche, T. & Gasser, S.M. RAP1 stimulates single- to double-strand association of yeast telomeric DNA: implications for telomere-telomere interactions. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5310–5320 (1994).
36. Huertas, D., Lipps, H. & Azorin, F. Characterization of the structural conformation adopted by (TTAGGG)n telomeric DNA repeats of different length in closed circular DNA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **12**, 79–90 (1994).
37. Lyamichev, V.I. *et al.* An unusual DNA structure detected in a telomeric sequence under superhelical stress and at low pH. *Nature* **339**, 634–637 (1989).
38. Brunori, M. *et al.* TRF2 inhibition promotes anchorage-independent growth of telomerase-positive human fibroblasts. *Oncogene* **25**, 990–997 (2006).
39. van Steensel, B., Smogorzewska, A. & de Lange, T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**, 401–413 (1998).
40. Zhu, X.D., Kuster, B., Mann, M., Petrini, J.H. & de Lange, T. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat. Genet.* **25**, 347–352 (2000).
41. Griffith, J., Bianchi, A. & de Lange, T. TRF1 promotes parallel pairing of telomeric tracts *in vitro*. *J. Mol. Biol.* **278**, 79–88 (1998).
42. Miller, K.M. & Cooper, J.P. The telomere protein Taz1 is required to prevent and repair genomic DNA breaks. *Mol. Cell* **11**, 303–313 (2003).
43. Kelleher, C., Kurth, I. & Lingner, J. Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 808–818 (2005).
44. Henricksen, L.A., Umbricht, C.B. & Wold, M.S. Recombinant replication protein A: expression, complex formation, and functional characterization. *J. Biol. Chem.* **269**, 11121–11132 (1994).
45. Angelov, D., Novakov, E., Khochbin, S. & Dimitrov, S. Ultraviolet laser footprinting of histone H1(0)-four-way junction DNA complexes. *Biochemistry* **38**, 11333–11339 (1999).
46. Spassky, A. & Angelov, D. Influence of the local helical conformation on the guanine modifications generated from one-electron DNA oxidation. *Biochemistry* **36**, 6571–6576 (1997).
47. Lyubchenko, Y.L., Oden, P.I., Lampner, D., Lindsay, S.M. & Dunker, K.A. Atomic force microscopy of DNA and bacteriophage in air, water and propanol: the role of adhesion forces. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1117–1123 (1993).

© 2007 Nature Publishing Group http://www.nature.com/nsmb

I-3- Résultats supplémentaires

I-3-a- Fixation TRF1/TRF2 sur D-loop, jonctions

TRF1 et TRF2 possèdent des propriétés de fixation communes. Elles reconnaissent en effet de façon très spécifiques les séquence d'ADN télomériques humaines et leur fixation est largement diminuée quand cette séquence présente des dommages oxydatifs comme des lésions 8-oxo-guanine (8-dihydro-2'-deoxyguanine ou 8oxoG), la présence de sites abasiques ou d'un « gap » d'un oligonucléotide (Opresko et al., 2005). Comme nous l'avons montré dans l'article, ces deux protéines ont toutefois des modes d'interactions avec l'ADN qui leur sont propres.

Plusieurs études *in vitro* réalisées avec la protéine TRF1 sous sa forme entière révèlent une fixation de cette protéine sous la forme d'un homodimère. Cette fixation entraîne une courbure de l'ADN d'environ 120°C (Bianchi et al., 1997). Cette étude révèle également une flexibilité de fixation remarquable de TRF1. En effet, la fixation de TRF1 n'est pas affectée lorsque les deux sites de fixation reconnus par chacun des deux domaines mybs sont espacés de plusieurs dizaines de bases ou lorsque ces deux sites sont orientés de façon opposée. TRF1 possède également la particularité de rapprocher deux hélices d'ADN contenant des répétitions télomériques, une propriété peut être impliquée dans la formation de la boucle télomérique (Griffith et al., 1998).

En ce qui concerne TRF2, peu d'études sur sa fixation sous sa forme entière ont été réalisées. Un travail réalisé *in vitro* révèle cependant une préférence de fixation de TRF2 sur un substrat possédant une jonction ADN télomérique double brin/simple brin. Dans la méthode utilisée (TERA pour « Telomere end recruitment assay »), l'ADN cible biotinylé est fixé sur des billes magnétiques portant de la streptavidine. Les auteurs analysent la fixation de protéines issues d'extraits nucléaires et caractérisent ces protéines par western blot. Cette

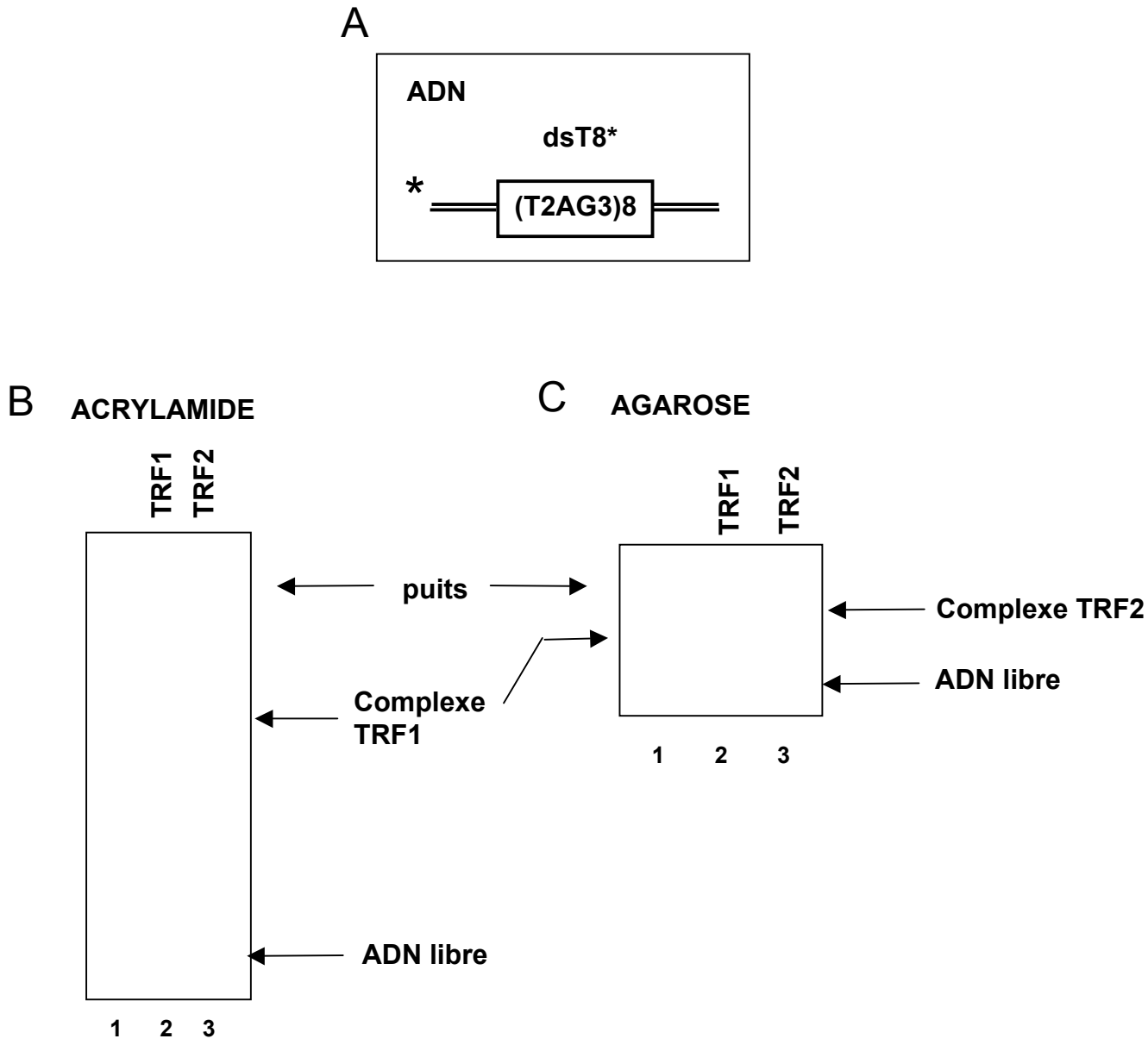


Figure 19 : TRF1 et TRF2 forment avec l'ADN des complexes différents.

A. Représentation schématique du double brin sonde (dsT8) de 54 pdb contenant 8 répétitions télomériques (TTAGGG) au centre.

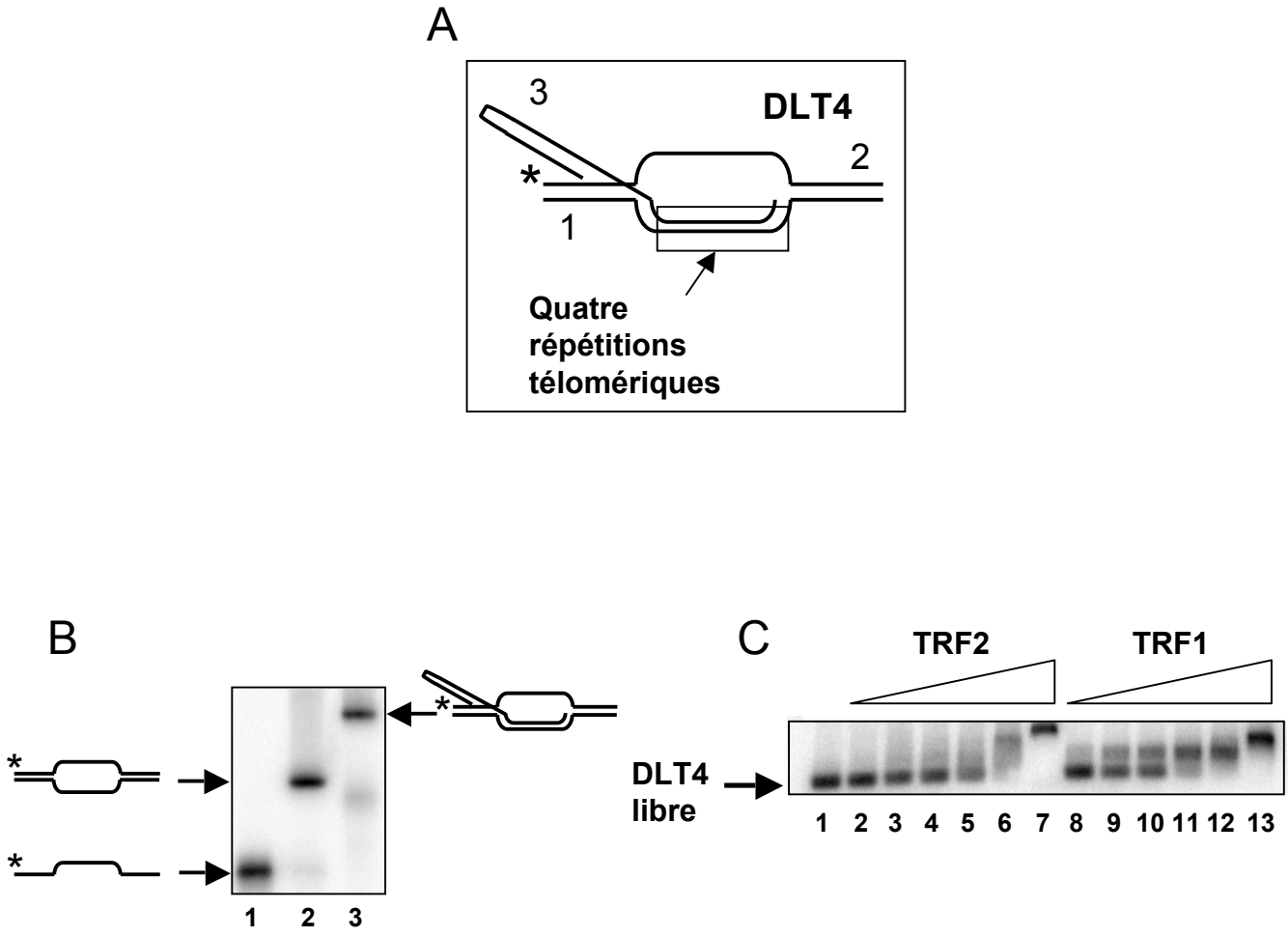
B. Expérience de gel retard avec TRF2 et TRF1 sur dsT8. Les protéines sont incubées 15 minutes à 20°C avec 5nM de dsT8 dans un tampon : 50mM Hépès pH 8, 0,1 mg/ml BSA, 1mM dTT, 100mM NaCl, 2% glycérol (Tampon d'invasion). Les échantillons ont été déposés sur un gel 6% polyacrylamide 0,5X TBE à 4.5V/cm. La migration a été réalisée à 20°C pendant 45 minutes. Puits 1 : dsT8 seul, Puits 2 : TRF1 à 30nM, Puits 3 : TRF2 à 30nM.

C. Expérience de gel retard avec TRF2 et TRF1 sur dsT8. Les conditions de réactions sont les même qu'en B, mais les échantillons ont été déposés sur un gel 1% agarose 0,5X TBE.

technique a donc permis de montrer une préférence de TRF2 pour les jonctions double brin/simple brin contenant au minimum une répétition télomérique simple brin. En revanche, aucune fixation de TRF1 sur ces substrats n'a pu être mise en évidence (Yanez et al., 2005).

Nous avons donc réalisé, en parallèle des travaux présentés dans l'article, une étude de la fixation sur différents substrats que TRF2 pourraient rencontrer dans le contexte télomérique. En ce qui concerne l'ADN double brin, TRF2 se distingue de TRF1 par la formation de complexes de grande taille apparente (en exemple, la figure 19 montre la fixation de TRF1 et TRF2 sur une sonde double brin portant 8 répétitions télomériques). Comme il est décrit dans l'article, TRF2 forme des complexes de grande taille qui ne sont pas capables de pénétrer dans un gel de polyacrylamide, contrairement aux complexes formés par TRF1. Les expériences réalisées avec TRF2 doivent donc être analysées sur des gels d'agarose (figure 19B et C). La table 1 de l'article récapitule entre autre la capacité des troncatures et des mutants à former des complexes qui pénètrent dans un gel de polyacrylamide.

Le substrat décrit dans la figure 20A correspond à une structure en D-loop, structure qui pourrait se retrouver au pied de la boucle télomérique dans l'hypothèse de la formation basée sur l'invasion du simple brin. Après avoir vérifié la formation correcte de notre D-loop (qui comprend 4 répétitions télomériques) (Figure 20B), nous avons analysé la fixation de TRF1 et TRF2 sur cette structure (Figure 20C). Lorsque l'on compare les concentrations pour lesquelles les protéines fixent 50% du substrat contenant 4 répétitions télomériques (table 1 de l'article pour le double brin et figure 19C pour la D-loop), la fixation de TRF1 est comparable à sa fixation sur le double brin (environ 30nM pour les deux substrats). Pour TRF2, sa fixation est diminuée (environ 60nM pour la D-loop contre 15nM pour le double brin). TRF1 semble donc se fixer avec une meilleure affinité sur ce substrat que TRF2.



<u>Figure 20 :</u> Fixation TRF2 et TRF1 sur un substrat en D-loop.

A. Représentation schématique du substrat en D-loop (DLT4) comportant 4 répétitions télomériques.

B. Gel de vérification de formation de la D-loop. Les brins sont hybridés comme indiqués et déposés sur un gel de polyacrylamide 6%. La migration est effectuée pendant 4h à 20°C à 5V/cm. Puits 1 : 5nM de brin 1 radiomarqué. Puits 2 : idem puits 1 et 5nM de brin 2 non radiomarqué. Puits 3 : idem puits 2 et 5nM de brin 3 non radiomarqué.

C. Expérience de gel retard avec TRF2 et TRF1 sur DLT4. Les conditions de réactions sont les même que dans la figure 19C. Les concentrations en protéines sont 3, 10, 18, 30, 60, 100 nM, dans les puits 2 à 7 pour TRF2 et dans les puits 8 à 13 pour TRF1.

La jonction de Holliday est une structure d'ADN en croix qui résulte de l'échange de simples brins entre deux molécules d'ADN. Imaginée par Robin Holliday (Holliday, 1964), elle a été observée pour la première fois par microscopie électronique sur des intermédiaires de recombinaison chez des bactériophages (Valenzuela et Inman, 1975). L'analyse de la fixation de TRF1 et TRF2 sur une jonction de Holliday a donc également été entreprise (Figure 21 et 22). La jonction utilisée est formée de quatre brins de 54 bases (notée a, b, c et d) comprenant chacun deux répétitions télomériques. Les brins sont homologues à l'intérieur des répétitions télomérique et sont hétérologues à l'extérieur. Ainsi, la jonction est semi-mobile et peut migrer sur 12 pdb à l'intérieur des deux répétitions télomériques et le centre de la jonction peut être positionné à 12 positions différentes (Figure 21A). La vérification de la formation de cette jonction est présentée dans la figure 21B. Du fait de sa structure, la migration de la jonction est bien retardée par rapport à un substrat de 108 pb (ds108) comprenant la même composition et le même nombre de bases (puits 7 et 8). Nous avons ensuite comparé la fixation des différentes protéines sur cette jonction (Figure 21C). Dans un premier temps, on peut remarquer que TRF1 et TRF2 se fixent toutes les deux avec une bonne affinité pour ce substrat. La concentration pour laquelle 50% du substrat est fixé est à peu près la même pour les deux (environ 15nM). On peut cependant remarquer que les modes de fixation pourraient être différent entre les deux protéines étant donné que TRF2 forme des complexes surnuméraires lorsque des concentrations élevées sont utilisées. Nous avons ensuite étudiés la fixation de $TRF2^{\Delta B}$ et $TRF2^{\Delta M}$ sur ce substrat. On peut déduire des résultats que contrairement à la fixation de ces deux mutants sur l'ADN double brin, $TRF2^{\Delta M}$ se fixe avec une meilleure affinité sur la jonction que $TRF2^{\Delta B}$. En effet, dans l'article, il est décrit que la concentration en $TRF2^{\Delta B}$ nécessaire pour fixer 50% d'un double brin contenant 4 répétitions télomériques est de environ 40nM et que pour $TRF2^{\Delta M}$, la concentration requise est de environ 73nM (table 1 de l'article). En ce qui concerne la concentration nécessaire pour

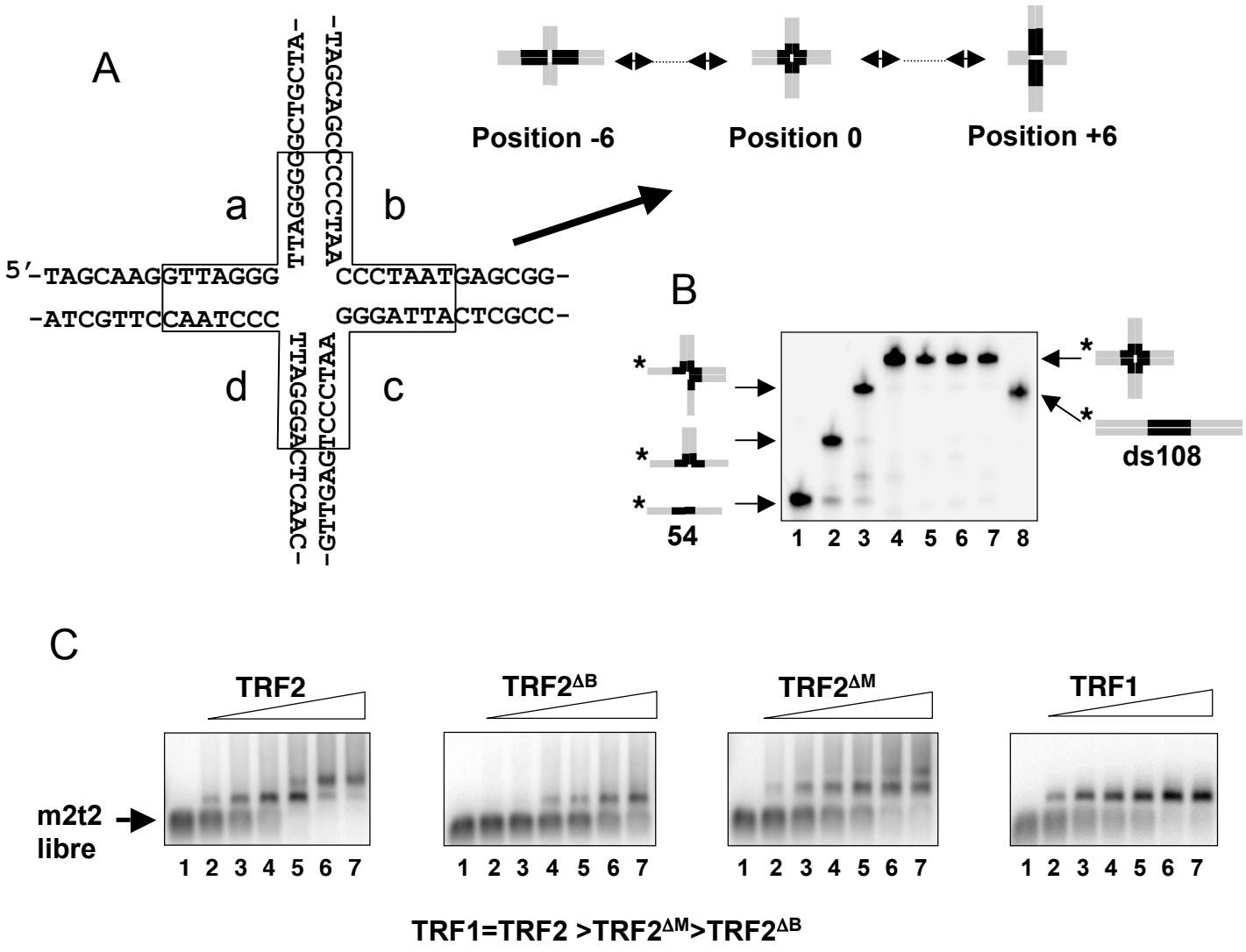


Figure 21: Fixation sur une jonction de Holliday.

A. Représentation schématique de la jonction m2T2 utilisée. Cette jonction semi-mobile est constituée de 4 brins de 54 bases notée a, b, c et d. Elle comporte deux répétitions télomériques en son centre. La jonction étant mobile, le centre peut être positionné à 12 positions différents à l'intérieur des répétitions télomériques.

B. Gel de vérification de formation de la jonction. Les brins sont hybridés comme indiqués et déposés sur un gel de polyacrylamide 6%. La migration est effectuée pendant 4h à 20°C à 5V/cm. Puits 1 : 5nM de brin a radiomarqué. Puits 2 : idem puits 1 et 5nM de brin b non radiomarqué. Puits 3 : idem puits 2 et 5nM de brin c non radiomarqué. Puits 4 : idem puits 3 et 5nM de brin d non radiomarqué. Puits 5, 6, 7 : jonction radiomarquée sur le brin b, c ou d respectivement. Puits 8 : substrat double brin de 108 pb contenant 4 répétitions télomériques.

C. Expérience de gel retard réalisée avec TRF2, TRF2$^{\Delta B}$, TRF2$^{\Delta M}$ et TRF1 sur m2T2. Les protéines sont incubées 15 minutes à 20°C avec 5nM de m2T2 dans un tampon : 20mM Tris-Ac pH8, 0,1 mg/ml BSA, 1mM dTT, 50mM KAc, 30mM NaCl, 5% glycérol. Les échantillons ont été déposés sur un gel 1% agarose 0,5X TBE. La migration a été réalisée à 20°C pendant 45 minutes à 4.5V/cm. Les concentrations en protéines sont 0nM, 10nM, 20nM, 30nM, 50nM, 75nM et 100 nM respectivement dans les puits 1 à 7.

atteindre la fixation de 50% de la jonction, elle est de environ 75nM pour TRF2$^{\Delta B}$ et de environ 30nM pour TRF2$^{\Delta M}$. Afin de déterminer si la fixation de TRF2 sur la jonction est sensible à la présence des répétitions télomériques, nous avons entrepris des expériences de compétitions (Figure 22). Ces expériences consistent à incuber en concentration croissante des quantités d'ADN compétiteurs non radiomarqués, afin de visualiser le déplacement, de la fixation de la protéine étudiée, de l'ADN radiomarqué vers le compétiteur et ainsi de définir le substrat préférentiel de la protéine. Le premier compétiteur utilisé correspond à la jonction m2T2 elle-même. Le second correspond à la jonction m2NSP, qui est de même taille et de même composition que m2T2 mais les séquences télomériques ont été remplacées par une séquence aléatoire de même composition en base, permettant toujours à la jonction d'être mobile sur les 12 positions du centre. Le dernier compétiteur correspond à un ADN double brin (dsT2) de 54 pb de séquence identique au bras de la jonction et contenant donc deux répétitions télomériques au centre.

Les résultats obtenus montrent dans un premier temps que avec TRF2, la compétition la plus efficace est obtenue avec la jonction elle même et que la compétition avec dsT2 est très peu efficace (Figure 22A). TRF2 semble donc avoir une fixation plus importante pour la jonction que pour un ADN double brin comprenant deux répétitions. On peut remarquer que la jonction contenant les séquences aléatoires est en mesure de déplacer TRF2, mais dans une moindre mesure qu'avec la séquence télomérique. La figure 22B récapitule sous forme de graphique les expériences réalisées avec TRF2, TRF2$^{\Delta B}$ et TRF2$^{\Delta M}$. Les résultats obtenus avec TRF2$^{\Delta B}$, révèlent que la distinction entre le substrat jonction et le substrat double brin n'existe plus. Avec TRF2$^{\Delta M}$ en revanche, cette spécificité de fixation sur la jonction n'est pas modifiée. On peut donc en déduire que le domaine B est responsable d'une fixation de TRF2 structure spécifique.

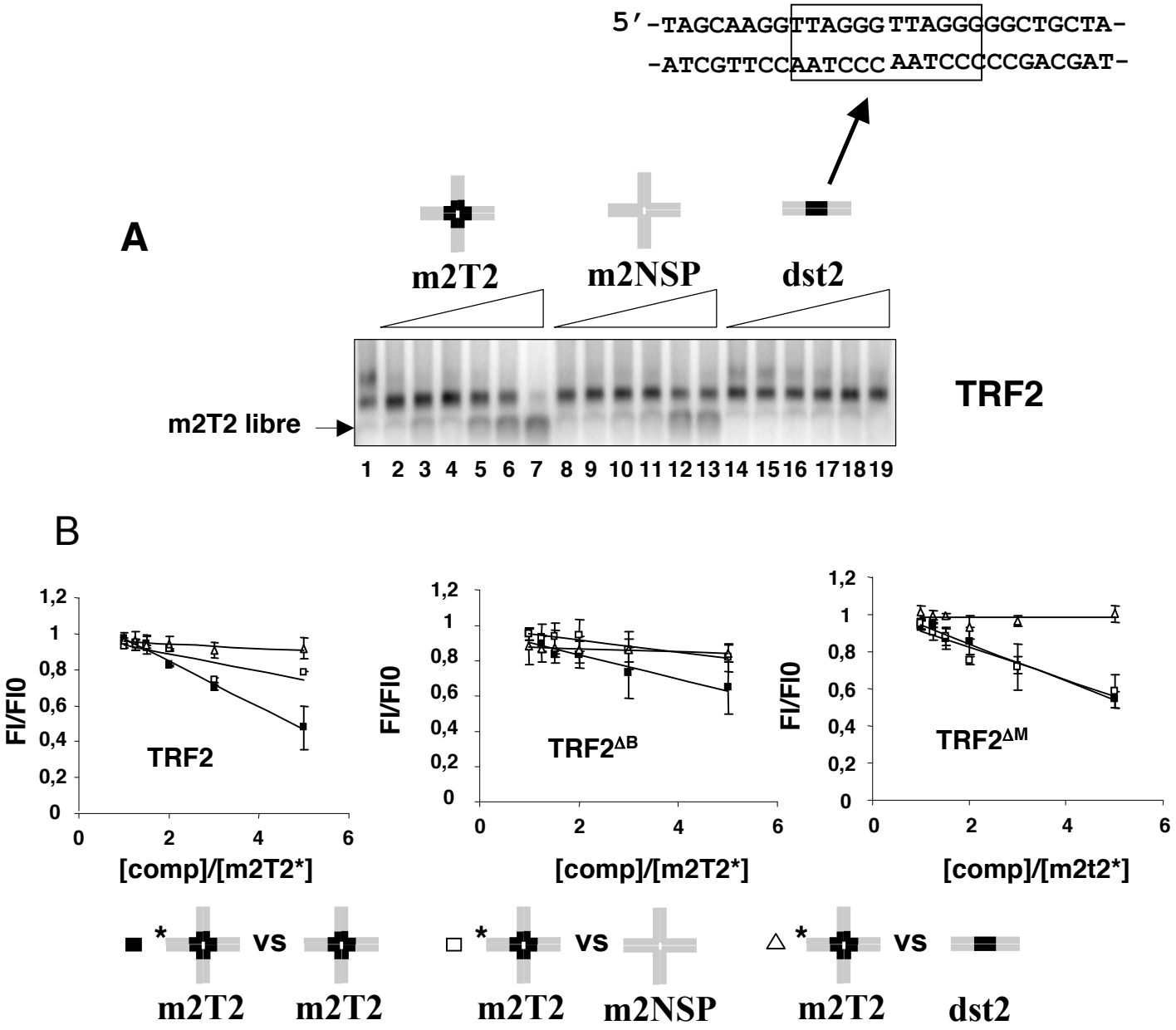


Figure 22 : Le domaine B de TRF2 reconnaît spécifiquement les jonctions

A. Les expériences de compétition ont été réalisées dans les même conditions que les expériences de gel retard, en utilisant TRF2 à 50nM, m2T2 à 5 nM et des concentrations croissantes en compétiteur : m2T2, m2NSP (jonction réalisée sur le même modèle que m2T2, mais la région correspondant aux 2 répétitions télomériques est remplacée par une séquence aléatoire composée des même nucléotides) ou dsT2 (substrat double brin de 54 pdb avec 2 répétitions télomériques au centre).
Les rapports entre les compétiteurs et m2T2 sont : 1, 1.25, 1.5, 2, 3 ou 5 et correspondent aux puits 2 à 7 avec m2T2 comme compétiteur, aux puits 8 à 13 avec m2NSP comme compétiteur et aux puits 14 à 19 avec dsT2 comme compétiteur.

B. Graphiques représentant les rapports entre la fraction de jonction liée en présence de compétiteur (FI) et la fraction liée en absence de compétiteur (FI0).
Les trois protéines TRF2, TRF2$^{\Delta B}$ et TRF2$^{\Delta M}$ ont été testées dans cette expérience.

I-3-b- Invasion : effet d'une drogue stabilisateur de G4 : la télomestatine

Dans la lutte anti-cancéreuse, plusieurs stratégies d'inhibition de la télomérase ont été expérimentées. Une voie alternative qui prend un essor considérable à l'heure actuelle ne consiste plus à inhiber la télomérase directement, mais vise à empêcher l'accès de la télomérase à son substrat, c'est à dire à l'extrémité simple brin télomérique (Patel, 2002).
Dès 1998, Jean-Louis Mergny et Claude Hélène proposent que des ligands stabilisateurs des G-quadruplex pourraient empêcher l'accès de la télomérase aux télomères (Mergny et Helene, 1998). En effet, certaines molécules ont la capacité de se fixer sur des structures quadruplex et de stabiliser leur formation par exemple sur le simple brin télomérique, entraînant alors une inhibition de la télomérase (Kerwin, 2000). Ces ligands pourraient donc entrer dans la composition de traitements anticancéreux car limitant l'action de la télomérase, ils pourraient baisser le potentiel prolifératif des cellules cancéreuses (Kerwin, 2000) (Pennarun et al., 2005).

La télomestatine est un de ces composés. Il s'agit d'une substance naturelle extraite de *Streptomyces anulatus* (figure 23A). Elle possède une très grande spécificité de fixation, et donc de stabilisation, sur les structures G-quadruplex intramoléculaires télomériques humaines (Kim et al., 2002) (Rosu et al., 2003) (Gomez et al., 2004). Des expériences *in vivo* révèlent qu'après traitement des cellules à la télomestatine, les extrémités simple brin des télomères raccourcissent et sont moins sensibles à un traitement au DMS (Dimethyl Sulfate), une sonde spécifique du N7 des guanines, suggérant une organisation locale en quadruplex (Gomez et al., 2004).

Il a également été montré qu'à une concentration non toxique pour une cellule saine, (fibroblastes ou cellules épithéliales), la télomestatine induit l'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses positives télomérase (Shammas et al., 2004). On observe ainsi dans ces cellules, la dissociation de TRF2 et de hPOT1 des télomères, la baisse de la taille du simple

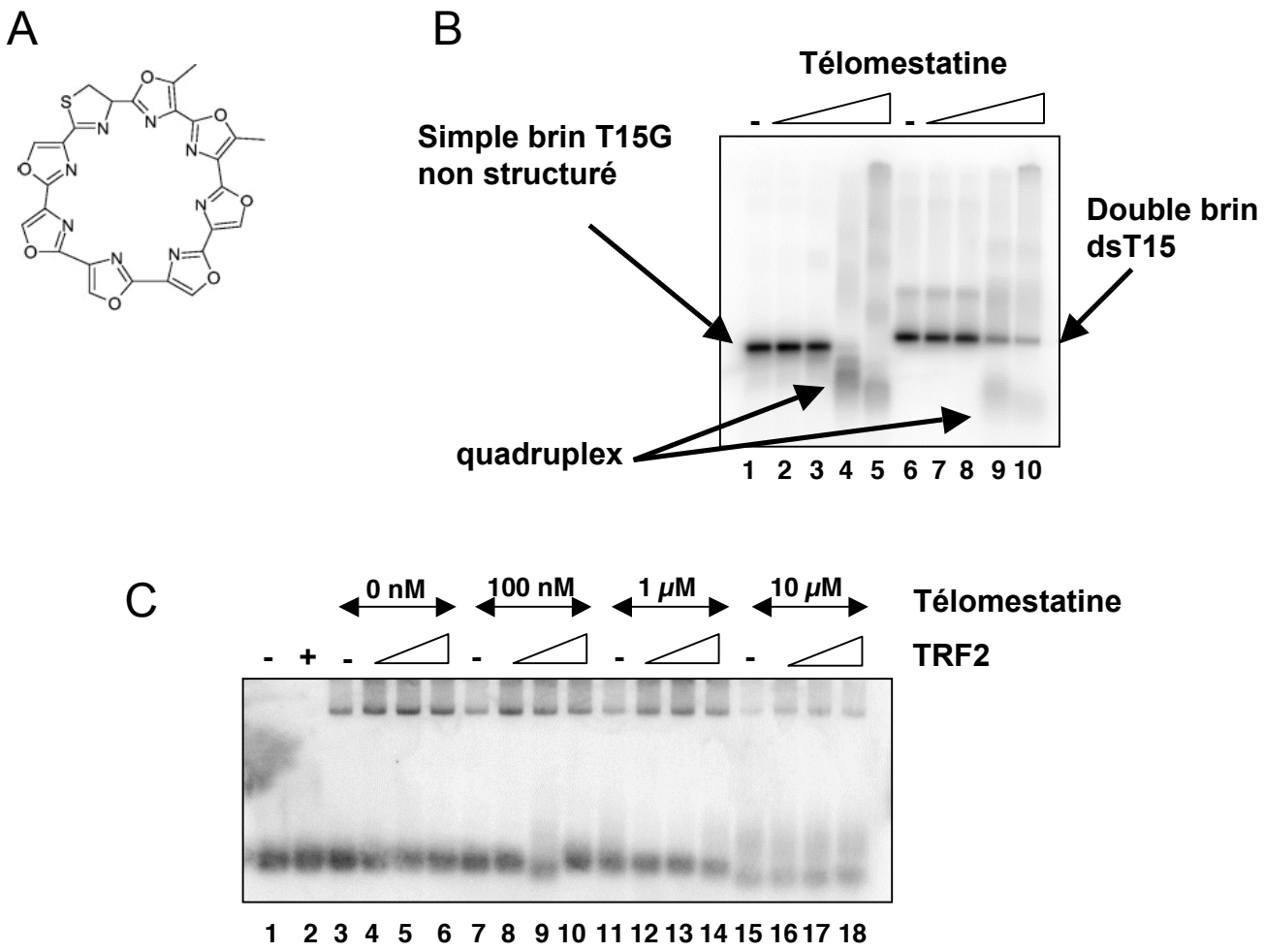


Figure 23 : Effet de la télomestatine dans l'expérience d'invasion.

A. Représentation schématique de la molécule de télomestatine.

B. Test de formation de G4 sur l'oligonucléotide T15G (contenant 15 répétitions télomériques) et sur le double brin correspondant (dsT15), en présence de télomestatine. La télomestatine est incubée avec T15G à 5nM pendant 15 minutes à 20°C dans le tampon d'invasion. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide 6%. La migration se fait à 4.5V/cm à 20°C pendant 3h30. Puits 1 : T15G seul, Puits 2 à 5 : T15G à 5nM est incubé avec des concentrations croissantes en télomestatine (10nM, 100nM, 1µM et 10µM). Puits 6 à 10 : même expérience mais réalisée avec le double brin dsT15 à 5nM obtenu en hybridant T15G avec son oligonucléotide complémentaire.

C. Test d'invasion en présence de télomestatine. L'oligonucléotide est incubé 15 minutes avec différentes concentrations en télomestatine avant d'effectuer la réaction d'invasion. Puits 1 : T15G seul, Puits 2 : T15G + TRF2 à 1µM, Puits 3 à 6 : T15G pré-incubé sans télomestatine, Puits 7 à 10 : T15G pré-incubé avec la télomestatine à 100nM, Puits 11 à 14 : T15G pré-incubé avec la télomestatine à 1µM, Puits 15 à 18 : T15G pré-incubé avec la télomestatine à 10µM. TRF2 est ajouté comme indiqué : 30nM puits 4, 8, 12, 16; 100nM puits 5, 9, 13, 17 et 1µm puits 6, 10, 14, 18.

brin, la formation de ponts anaphasiques et la mort des cellules par apoptose suite à une activation de la réponse de dommages à l'ADN par la voie ATM (Gomez et al., 2006 -a) (Tahara et al., 2006). Les effets observés sont semblables à ceux obtenus lors de l'inhibition de TRF2 par surexpression de l'allèle mutant négatif $TRF2^{\Delta B \Delta M}$. L'hypothèse qui a été avancée pour expliquer l'effet de la télomestatine est que ce composé empêcherait la formation de la structure télomérique protectrice. On peut ainsi imaginer que le simple brin télomérique ne soit plus capable d'envahir la double hélice, ce qui pourrait avoir pour conséquence la perte de la boucle télomérique.

Nous avons donc essayé de déterminer l'impact de ce composé dans notre test d'invasion. Dans un premier temps, nous avons analysé l'interaction entre la télomestatine et notre simple brin sonde T15G, ou le duplex (dsT15) formé par l'hybridation de T15G et de son complémentaire, par électrophorèse en gel de polyacrylamide (Figure 23B). Après une incubation à une concentration d'au moins 1µM de télomestatine, la migration de l'oligonucléotide T15G change de profil reflétant l'apparition de quadruplex. L'aspect diffus de la bande peut s'expliquer par l'hétérogénéité du produit obtenu car un ou plusieurs G-quadruplex peuvent se former à différents endroits dans la séquence qui contient 15 répétitions télomériques. Même si l'effet est moins important sur le duplex, on observe toutefois l'apparition de bandes similaires à celles obtenues avec l'oligonucléotide T15G simple brin attestant d'un déplacement de l'équilibre de la forme duplexe vers la forme quadruplexe en présence de télomestatine.

Nous avons ensuite testé l'effet de ce composé dans le test d'invasion (figure 23C). Lorsqu'une pré-incubation de l'oligonucléotide en présence de télomestatine est effectuée, on observe une baisse de l'invasion spontanée indiquant que la formation de G-quadruplex n'est pas favorable à l'invasion. Dans ces conditions, l'effet stimulateur de TRF2 semble perdurer.

I-4- Discussion

I-4-a- TRF2 se multimérise

TRF1 et TRF2 présentent une architecture commune avec quatre domaines assez bien déterminés (Figure 7 de l'Introduction p.20). Leur domaine de fixation à l'ADN, le domaine Myb-like, est le domaine qui présente le plus d'homologie entre les deux protéines avec 57% d'identité de séquence. Cependant, les caractéristiques de fixation des protéines entières sur le double brin sont radicalement différentes. La particularité la plus flagrante concerne la taille apparente du complexe se fixant à l'ADN. La figure 19 permet de visualiser par des expériences de gel retard, que les complexes formés par TRF1 avec l'ADN, décrits comme des dimères, pénètrent dans un gel de polyacrylamide et que à l'inverse, ceux formés par TRF2 semblent de taille trop importante pour pénétrer dans ce type de gel et doivent donc être étudiés en gel d'agarose alors que les tailles en monomères des deux protéines sont quasiment identiques (environ 60 KDa). Les résultats d'AFM présentés en figure 5 de l'article montrent que TRF2 peut former un complexe de taille supérieure à celui de TRF1 avec probablement une tétramérisation de TRF2 lors de sa fixation sur l'ADN. TRF2 est donc capable de se multimériser et dans cet état multimérique, elle peut se fixer sur l'ADN. Nous pensons que les complexes incapables de migrer en gel de polyacrylamide correspondent en fait à ces espèces multimérisées.

La table 1 de l'article présente les différents mutants de TRF2 que nous avons étudié et la capacité de leur complexe avec l'ADN à migrer sur un gel de polyacrylamide et nous renseigne sur l'importance des différents domaines pour cette multimérisation. Tout d'abord, le domaine Myb-like de fixation ne semble pas être à l'origine de ce phénomène. En effet, la fixation de la protéine chimère $TRF2^{\Delta M}TRF1^{M}$ est quasiment identique à la fixation de TRF2 en terme d'affinité et de comportement (Tableau 1 de l'article). Ce domaine semble donc être

interchangeable et n'est probablement pas responsable de l'apparition des complexes de grandes tailles.

L'influence des domaines N-terminaux de TRF1 et de TRF2 est en revanche assez différente. Pour le mutant TRF2$^{A\Delta B}$, le remplacement du domaine N-terminal de TRF2, qui est très basique, par celui de TRF1, qui est très acide inhibe la formation du complexe de haut poids moléculaire. Soit ce domaine de TRF2 est responsable de la multimérisation, soit le domaine acide de TRF1 déstabilise le complexe multimérique. Pour répondre à cette question, nous avons essayé de produire une protéine chimère de TRF1 dans laquelle le domaine acide est remplacé par le domaine basique de TRF2, mais la production de cette chimère n'a pu être réalisée. On peut cependant noter le fait que le domaine N-terminal de TRF2 seul forme des complexes capables de migrer sur un gel de polyacrylamide et que la troncature TRF2$^{\Delta B}$ est toujours capable de former des complexes de haut poids moléculaire. Le domaine N-terminal de TRF2 ne semble donc pas non plus à l'origine de la multimérisation. De plus, nous avons montré qu'un mutant de TRF2 ne portant que le domaine N-terminal et le domaine de dimérisation (TRF2$^{\Delta L\Delta M}$) se comporte comme la protéine entière en terme de nature du complexe. On peut donc en déduire que cette propriété de TRF2 trouve son origine dans le domaine de dimérisation.

I-4-b- Le domaine N-terminal est un second domaine de fixation à l'ADN

Une autre caractéristique de TRF2 est sa capacité de fixation à l'ADN par l'intermédiaire de son domaine N-terminal. En effet, les études de fixation que nous avons réalisées montrent une capacité de fixation de la protéine TRF2$^{\Delta M}$ qui ne possède plus de domaine de fixation Myb-like (Tableau 1 de l'article et figure supplémentaire 2G). Cette fixation dépend du domaine N-terminal, car la protéine TRF2$^{\Delta B\Delta M}$ n'est plus capable de se fixer à l'ADN (Tableau 1 de l'article et figure supplémentaire 2I), alors que le peptide N-

terminal seul en est capable (Tableau 1 de l'article et figure supplémentaire 2L). Cette fixation de TRF2$^{\Delta M}$ est faible et les expériences de compétitions indiquent que la fixation de cette protéine n'est pas spécifique (Tableau 1 de l'article et figure supplémentaire 2M).

Toutefois, cette propriété contribue à l'affinité de TRF2 pour l'ADN car la protéine TRF2$^{\Delta B}$, dépourvue du domaine B, est moins affine pour l'ADN que la protéine entière (Tableau 1 de l'article et figure supplémentaire 2F). Ces résultats sont en accord avec les expériences *in vivo* qui montrent un effet synergique entre le domaine N-terminal et le domaine C-terminal. En effet pour obtenir un délocalisation totale de TRF2 des télomères, l'allèle dominant négatif introduit ne doit plus contenir, ni le domaine C-terminal, ni le domaine N-terminal (Brunori et al., 2006) (van Steensel et al., 1998). Par ailleurs il a été observé par l'équipe de Meyn une localisation précoce de TRF2, dépendante du domaine N-terminal, au niveau des sites de dommages non télomériques crées par irradiation au laser de fibroblastes humains (Bradshaw et al., 2005).

De plus, des expériences préliminaires réalisées au laboratoire montrent que ce domaine B est impliqué dans la reconnaissance des jonctions quatre voies ou jonctions de Holliday (figure 21/22). Nous avons en effet montré que TRF2 se fixe avec une bonne affinité sur les jonctions et que cette affinité est obtenue principalement par l'intermédiaire de son domaine B. En effet, les expériences de compétition révèlent que le domaine myb-like n'est pas nécessaire à la fixation de TRF2 sur ces substrats et que TRF2 est en mesure de se fixer sur des jonctions ne comportant pas de séquences télomériques. Ce domaine B constitue donc un deuxième domaine de fixation qui, contrairement au domaine myb-like permet une reconnaissance de structure et non pas une reconnaissance de séquence. On peut noter que l'affinité de TRF1 pour la jonction est également très importante. Etant donné qu'elle ne possède pas le domaine B de TRF2, on peut penser que TRF1 se fixe d'une autre manière. Une des particularités de cette protéine est sa remarquable flexibilité de fixation sur l'ADN

télomérique (Bianchi et al., 1997) et comme la jonction est mobile, on peut imaginer que TRF1 se fixe à la jonction dans sa conformation la plus étendue de manière à avoir les répétitions télomériques sous forme ressemblant à un double brin.

La particularité de fixation du domaine B de TRF2 est en accord avec les résultats publiés récemment par l'équipe de Jack Griffith en ME (Fouche et al., 2006). Par ailleurs, ces auteurs s'intéressent également à la formation de la boucle télomérique. En utilisant un modèle télomérique (Griffith et al., 1999), ils mesurent le taux de formation de boucle par ME et l'influence de TRF2. Ils proposent ainsi que le domaine B participe à la formation de la boucle télomérique car le taux de formation de la boucle catalysé par TRF2 diminue fortement en l'absence du domaine N-terminal (d'environ 12% avec TRF2 entière à seulement 2,5% avec $TRF2^{\Delta B}$). D'autres données suggèrent aussi l'implication de TRF2 dans la protection et la stabilité des boucles T. En effet, la surexpression de $TRF2^{\Delta B}$ dans des cellules HeLa et BJ/hTERT, provoque l'apparition de délétions télomériques importantes qui s'accompagnent de la formation de cercles qui correspondent probablement à l'élimination des « t-loops » (Wang et al., 2004). L'hypothèse avancée est qu'en se fixant, TRF2 protègerait ces structures en empêchant qu'elles soient reconnues par une ou des résolvases, les endonucléases spécifiques de ces structures.

I-4-c- L'invasion sans protéine ou invasion naturelle

Lors de notre étude, nous avons mis en évidence une association entre un oligonucléotide simple brin contenant plusieurs répétitions télomériques (la sonde) et un plasmide contenant une région complémentaire. Cette association peut être interprétée de trois façons différentes. La première pourrait être une hybridation entre la sonde G et le brin C du double brin entraînant l'exclusion du brin G plasmidique. La seconde met en jeu une hybridation par formation d'un tetraplex entre la sonde et le brin G du plasmide (ces deux

hypothèses correspondant à des invasions). La troisième étant la formation d'une triple hélice. Les conditions de formation des triples hélices sont assez particulières et ne correspondent pas à nos conditions de réaction. En effet, ces triplex n'apparaissent qu'à des conditions de pH très acide, permettant aux cytosines d'être protonées et de pouvoir établir des liaisons de type Hoogsteen (Voloshin et al., 1992) (Malkov et al., 1993). Par ailleurs, l'expérience de digestion à la nucléase « Mung Bean » présentée dans la figure 1 de l'article révèle la création de zone(s) simple brin sur le plasmide lors de l'association ce qui n'est pas en faveur de l'hypothèse triple hélice ; nous proposons donc que l'association se fasse par l'intermédiaire d'un phénomène d'invasion.

Il est difficile, sur la base de nos résultats, de différencier entre l'hybridation double brin et la formation de tetraplex. En effet, les séquences télomériques simple brin sont connues pour former des quadruplex. On pourrait penser utiliser l'enzyme GQN1 qui clive ces structures, mais cela ne nous permettrait pas de différencier la formation de G4 entre l'oligonucléotide et le plasmide et la formation de G4 intramoléculaires sur le brin G exclu du plasmide. Cependant le fait qu'une association soit aussi observée avec un simple brin riche en C (Figure Supplémentaire 1a de l'article) nous incite à penser que l'association observée correspond bien à une hybridation du simple brin sous forme de double brin. En revanche, la présence de G-quadruplex sur le brin exclu est envisageable étant donné qu'un tel phénomène a déjà été identifié par ME lors de la transcription d'une séquence riche en G contenu dans un plasmide chez *E. Coli* (Duquette et al., 2004). La formation de G4 sur le brin riche en G pourrait aussi participer directement à l'invasion. En effet, nos expériences révèlent que l'ADN télomérique est un très bon substrat pour cette invasion quel que soit son état topologique (surenroulé, relâché ou linéaire). On peut ainsi imaginer que la formation de G4, même transitoire, dans le brin riche en G puisse faciliter l'ouverture de la double hélice et donc l'invasion par un simple brin complémentaire.

Malgré la capacité d'ouverture de la séquence télomérique humaine, le phénomène d'invasion naturelle semble trop limité pour induire la formation de la boucle T. Les expériences de microscopie électronique et d'AFM indique en effet que la présence de TRF2 est indispensable pour la formation de la boucle (Griffith et al., 1999) (Yoshimura et al., 2004).

I-4-d- L'invasion facilitée par TRF2

Les différentes observations découlant de nos expériences nous indiquent que la manière utilisée par TRF2 pour induire l'invasion est différente de celle qu'utilise la protéine RecA d'*Escherichia Coli*. Tout d'abord, la protéine RecA agit par un processus actif qui requière de l'ATP et du Magnésium (Mazin et al., 2000) (McIlwraith et West, 2001). De plus, RecA interagit avec l'ADN simple brin de façon préférentielle et donc pour être efficace, elle doit être incubée en premier avec ce simple brin. Enfin, RecA forme avec l'ADN une triple hélice de façon transitoire qui prélude à l'échange de brins formant ainsi le produit de la réaction.

En ce qui concerne TRF2, son effet sur l'augmentation du phénomène d'invasion est observé sans ATP et il est même inhibé dans les conditions utilisées pour RecA (à 21mM de Mg2+) (Supplémentaire Figure 4a de l'article) ; l'ordre d'ajout des réactifs lors de l'expérience d'invasion n'influe pas sur l'activité de TRF2 (Supplémentaire Figure 3c de l'article) et TRF2 préfère l'ADN double brin à l'ADN simple brin. Enfin, nous n'avons pas pu mettre en évidence ni de formation de triple hélice, ni de réaction d'échange de brin catalysé par TRF2 (Supplémentaire Figure 4b de l'article). Toutes ces observations suggèrent que TRF2 n'agit pas par un processus actif. Nous avons donc envisagé que TRF2 augmente la probabilité d'invasion sans agir directement sur la phase d'invasion. La figure 3 de l'article

démontre que TRF2 agit sur la topologie de l'ADN en surenroulant positivement l'ADN. Par ailleurs, nous avons également montré l'effet de TRF2 sur la topologie par des expériences d'AFM qui mettent en évidence une condensation de l'ADN lorsque TRF2 est fixée sous forme d'un complexe de grosse taille probablement tétramérique (Figure 5 de l'article). Cette condensation correspond probablement à un enroulement de l'ADN autour du multimère protéique. Il existe ainsi une corrélation étroite entre la capacité de TRF2 à former des complexes multimériques, à modifier la topologie de l'ADN et à stimuler l'invasion.

Ces résultats nous ont donc permis de proposer un mode d'action de TRF2 pour expliquer son implication dans le phénomène d'invasion. Ce modèle propose que lors de sa fixation, TRF2 forme un complexe où l'ADN est surenroulé positivement. L'apparition de supertours négatifs compensatoires à l'extérieur des complexes contribuerait à abaisser la barrière énergétique nécessaire à l'ouverture du double brin facilitant ainsi l'invasion du simple brin. Il s'agirait donc d'un phénomène passif dirigé par l'effet topologique de TRF2. En accord avec cette hypothèse nous observons l'apparition d'un signal correspondant à une invasion à l'extérieur de la zone télomérique lorsque TRF2 est ajoutée en concentration très élevée. En effet, si le phénomène topologique est à l'origine de la stimulation, on s'attend à sa propagation en dehors de la séquence télomérique (Figure 4 de l'article).

I-4-e- Modèle de formation de la boucle T

Plusieurs publications font état de la préférence de TRF2 pour une jonction double brin/simple brin (Yanez et al., 2005) (Stansel et al., 2001). Il est donc raisonnable de penser que TRF2 se fixera plus facilement à l'extrémité des télomères où se trouve cette jonction. D'autre part, nous savons que des complexes portant TRF2 sont présents sur une grande part du télomère et grâce à nos expériences, nous savons aussi que TRF2 peut se multimériser. Nous pensons que cette multimérisation permet de créer une boucle telle que celle observée

par ME (Griffith et al., 1999) (Stansel et al., 2001) ou par AFM (Yoshimura et al., 2004). Cette boucle hermétiquement scellée par le complexe multimérique constitue donc un domaine topologiquement indépendant du reste de l'ADN télomérique. Du fait du complexe TRF2-ADN à sa base, mais aussi d'autres complexes TRF2 à l'intérieur de la boucle, l'ADN sera donc négativement surenroulé. Ce surenroulement, favorable à une ouverture de l'ADN, permettrait donc à l'extrémité simple brin d'envahir la double hélice (Figure 6 de l'article). Ce modèle est basé sur une coopération entre un ADN possédant des propriétés d'invasion remarquables et d'une protéine qui lui est spécifique et qui peut le modifier topologiquement pour en augmenter encore la capacité d'invasion.

Ce modèle a plusieurs implications. Tout d'abord, il nous suggère que l'invasion télomérique n'est pas à l'origine de la formation de la boucle mais plutôt une conséquence de la boucle elle même due à la fixation particulière de TRF2. En accord avec cette interprétation, en l'absence de TRF2, il est nécessaire de ponter l'ADN pour observer la boucle dans les expériences de ME (Griffith et al., 1999). Cette invasion, même en intervenant après la formation de la boucle, peut participer à la stabilité de cette dernière en assurant une sorte d'ancrage au pied de la boucle. Stabilisant la structure, il est probable que l'invasion favorise la formation de la boucle par un processus purement thermodynamique.

Notre modèle révèle aussi l'implication de phénomènes topologiques dans la biologie des télomères. Trois autres exemples existent dans la littérature qui s'apparentent à ce phénomène. Ainsi, il a été montré que la protéine Rap1 de *Saccharomyces cerevisiae* est, elle aussi, capable de stimuler une réaction d'invasion et qu'elle modifie aussi la topologie de l'ADN (Gilson et al., 1994). De plus, chez *S. Pombe*, l'organisation de Taz1 aux télomères rappelle en effet celle de TRF2 avec une organisation multimérique (sous forme de « donut » hexamèrique) qui s'avère essentielle à la formation des boucles T (Tomaska et al., 2004). Tout comme TRF2, Taz1 augmente la formation des boucles *in vitro* quand on utilise un

télomère modèle constitué de séquences télomériques de *S. Pombe*. De façon remarquable, des modifications dans l'activité de la topoisomérase II de *S. Pombe* permettent de supprimer les effets délétères de la suppression de la protéine Taz1.

Enfin, il a été montré que la topologie de l'ADN est à l'origine du phénomène de résolution télomérique du spirochète *Borrélia* (Bankhead et al., 2006). Dans ce phénomène, le surenroulement, ici positif, permet de créer une structure transitoire qui va stimuler l'activité de la résolvase ResT, enzyme responsable de la transformation d'intermédiaires de réplication, sous forme d'épingle à cheveux, en télomères.

D'autre part, l'effet de TRF2 sur la topologie de l'ADN pourrait aussi participer à une autre fonction de TRF2, celle-ci non télomérique : la régulation de la réplication du génome d'Epstein-Barr lors de sa phase de latence. L'origine de réplication OriP utilisée par le virus pour se répliquer sous sa forme épisomale, porte des séquences télomériques T2AG3 sur lesquelles se fixe TRF2 (Deng et al., 2002). Cette fixation stimule la réplication (Deng et al., 2003). De façon remarquable, il a été montré que ce phénomène de réplication est dépendant d'une séquence sensible à la topologie et plus exactement au surenroulement négatif (Polonskaya et al., 2004). L'effet topologique de TRF2 que nous avons mis en évidence nous donne la clef de ce phénomène.

I-4-f- Effecteurs et inhibiteurs de la réaction d'invasion

Dans les expériences de microscopie électronique, un crosslink au psoralène est nécessaire pour observer les boucles, et malgré ce traitement, la quantité de boucles observées ne représente que 19% des espèces obtenues. On peut donc aisément supposer que des partenaires interviennent dans la cellule pour faciliter l'invasion et donc la formation de la boucle T.

Nous avons ainsi testé différents partenaires éventuels à commencer par la protéine TRF1. Nous avons observés que la présence conjointe de TRF1 et de TRF2 ne permet pas d'augmenter l'invasion (Supplémentaire Figure 3 de l'article). Au contraire, on observe une compétition entre les deux protéines et le déplacement de TRF2 quand TRF1 est ajoutée en excès. TRF1 pourrait cependant agir lors du repliement du télomère car on sait que TRF1 possède la capacité de courber l'ADN (Bianchi et al., 1997). TRF1 pourrait aussi agir dans la stabilisation de la « t-loop » car les résultats de fixation que nous avons obtenus par gel retard sur une structure en D-loop montrent une bonne affinité de TRF1 pour ces structures (Figure 20).

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de protéines spécifiques du simple brin. Ces protéines pourraient intervenir soit en empêchant, soit en stimulant l'invasion par leur fixation sur l'oligonucléotide simple brin, elles pourraient aussi stabiliser la D-loop formée en se fixant sur le simple brin exclu. La protéine hPOT1 qui est impliquée dans l'homéostasie des télomères (voir introduction) est la protéine qui se fixe spécifiquement sur le simple brin télomérique humain. POT1 joue certainement un rôle dans l'organisation télomérique car une inhibition de cette protéine par siRNA, entraîne une réponse de dommages à l'ADN, la formation de ponts anaphasiques et la mort de la cellule (Veldman et al., 2004; Hockemeyer et al., 2005; Yang et al., 2005). POT1 est donc une protéine essentielle pour la protection des télomères car son absence entraîne un dysfonctionnement télomérique favorable aux fusions.

Dans notre test, la présence de hPOT1 n'est pas incompatible avec l'invasion. En effet, contrairement à la protéine SSB, qui se fixe sans spécificité de séquence sur de l'ADN simple brin, elle n'inhibe pas la réaction (figure 2 de l'article). De plus, une stabilisation de l'invasion par POT1, en se fixant sur le simple brin exclu de la D-loop, est également envisageable. Nous n'avons pas pu mettre en évidence l'effet quantitatif de hPOT1, sur

l'invasion. Cela n'exclut pas une participation active de cette protéine dans ce processus par exemple sur l'aspect cinétique de la réaction.

hRPA est une protéine qui se fixe sur de l'ADN simple brin et qui intervient dans de nombreux mécanismes comme la réplication, la réparation par NER « Nucleotide Exision Repair » ou la Recombinaison Homologue (voir introduction). Dans notre test, la protéine hRPA se comporte comme hPOT1 (figure 2 de l'article), elle n'empêche pas l'invasion et de la même façon, elle est donc aussi un candidat sérieux pour l'invasion télomérique. D'autres protéines pourraient aussi être impliquées. Par exemple, les protéines de la recombinaison. Récemment, dans des expériences similaires aux nôtres, Karlseder et ses collaborateurs ont montré l'implication de protéines telles que RAD51 et RAD52 (Verdun et Karlseder, 2006).

A l'inverse, d'autres protéines pourraient participer à l'élimination de la structure en D-loop résultant de l'invasion. Plusieurs hélicases comme WRN et BLM sont capables de résoudre ces structures en D-loop *in vitro* (Opresko et al., 2004) (Opresko et al., 2004)b et pourraient donc jouer ce rôle d'élimination par exemple lors de la réplication.

Des ligands de quadruplex sont également susceptibles d'interférer avec la réaction d'invasion et la formation de la boucle T. Ainsi la télomestatine, qui est un composé connu pour stabiliser les structures G-quadruplex des séquences télomériques, inhibe l'invasion dans notre test *in vitro*. Cela suggère que l'invasion ne peut avoir lieu lorsque l'oligonucléotide est structuré en G4. Par ailleurs, il a été publié que des cellules cancéreuses traitées à la télomestatine voient la taille de leur simple brin et de leur double brin diminuer fortement entraînant ainsi le relargage de TRF2 et de POT1. Ces effets sont associés à l'apparition de TIFs et à la mort des cellules (Gomez et al., 2006 -a).

II- Mise en évidence et caractérisation d'Apollon, une nouvelle protéine télomérique

II-1- Introduction à l'article : la découverte d'Apollon

A l'origine, une recherche de nouveaux partenaires de TRF2 a été entreprise au laboratoire (par C. Lenain et S. Bauwens) par la technique du double hybride sur une librairie d'ADNc humain et en utilisant un fragment de 227 acides aminés, contenant la partie N-terminale et une large partie du domaine de dimérisation de TRF2 comme sonde. Par cette technique, 29 séquences différentes ont été sélectionnées. L'une d'entre elles appartenait au domaine C-terminal d'une protéine connue sous le nom de hSNM1B (Sensitivity to Nistrogen Mustard 1B) ou DCLRE1B (DNA Cross Link Repair 1B, Gen Bank accession number BC029687).

Cette protéine appartient à la famille des β-metallo-lactamases et plus particulièrement au groupe des protéines β-CASPs (**C**PSF, **A**rtemis, **S**NM1, **P**SO2). A l'inverse des autres β-metallo-lactamases, les protéines de ce groupe agissent sur les acides nucléiques (Dronkert et al., 2000) (Dronkert et Kanaar, 2001). La séquence de hSNM1B est plus particulièrement reliée à celle d'Artémis. Des mutations dans le gène *Artemis* ont été identifiées comme responsables d'une pathologie caractérisée par une augmentation de la radiosensitivité cellulaire et une sévère immunodéficience (RS-SCID) (Moshous et al., 2001). Artémis interviendrait aussi au niveau des télomères, car des cellules ES déficientes en Artémis se caractérisent par une augmentation de l'instabilité chromosomique avec des translocations ainsi que des fusions télomériques (Rooney et al., 2003).

La protéine correspondante est une nucléase qui participe à la réparation de coupures double brin par la voie NHEJ (Riballo et al., 2004) (Wang et al., 2005) et est également responsable du clivage des structures en épingle à cheveux lors de la recombinaison V(D)J

(Ma et al., 2002). Artémis est donc une nucléase et plus particulièrement, elle possède une activité exonucléase 5'-3' intrinsèque (Li et al., 2005) (Ma et al., 2002). Cependant, en présence de DNA-PKcs (la sous-unité catalytique de la protéine kinase ADN dépendante), Artémis est phosphorylée et son activité exonucléase devient endonucléase. Artémis devient alors capable de cliver les structures en épingle à cheveux ainsi que toutes les structures présentant une transition simple brin/double brin comme des boucles, des tiges-boucles ou des « flaps » ou « gaps » (Ma et al., 2002) (Ma et al., 2005).

La protéine hSNM1B, quant à elle, est également impliquée dans la réparation de l'ADN car son inhibition entraîne une sensibilité accrue des cellules au rayonnement γ et aux agents créant des pontages interbrins (Demuth et al., 2004). Nous avons donc entrepris l'étude de cette protéine qui a été renommée Apollon, le frère jumeau d'Artémis dans la mythologie grecque.

L'article présenté ci-après, confirme l'interaction entre Apollon et TRF2 par une expérience de « GST pull down » *in vivo*. L'utilisation de mutants de délétion a permis d'identifier plus précisément les régions impliquées dans l'interaction entre les deux protéines. Une étude d'immunolocalisation a mis en évidence la présence d'Apollon aux télomères avec TRF1 et TRF2 dans des cellules télomérase positive ainsi que dans des cellules ALT. La présence d'Apollon y est dépendante de la fixation de TRF2 car Apollon n'est plus présente aux télomères quand l'allèle dominant négatif $TRF2^{\Delta B\Delta M}$ est surexprimé.

L'étude de la suppression d'Apollon par ARN interférant dans les cellules HT1080 (télomérase positive) révèle l'importance de cette protéine aux télomères. En effet, l'absence d'Apollon entraîne l'apparition de dommages aux télomères détectés sous la forme de TIFs, montrant une colocalisation de TRF1 avec 53BP1. En revanche ces dommages ne s'accompagnent pas de fusions télomériques ni de modifications de la taille des télomères. Dans un contexte $TRF2^{\Delta B\Delta M}$, la suppression d'Apollon a pour effet d'augmenter les

phénotypes dus à l'inhibition de TRF2 comme le retard de croissance, l'apparition de TIFs et la fusion des extrémités des télomères, montrant donc une synergie fonctionnelle entre les deux protéines.

Ma contribution au travail sur Apollon a été, dans un premier temps, de déterminer si Apollon possédait également une activité nucléolytique et de la caractériser le cas échéant. Ainsi, les expériences réalisées et présentées dans l'article ont permis de mettre en évidence une activité 5'exonucléase d'Apollon, en revanche aucune activité endonucléase n'a été observée. D'autres expériences présentées ci-après révèlent un effet stimulateur de TRF2 sur cette activité 5' exonucléase d'Apollon.

II-2- Article : "The Apollo 5' Exonuclease Functions Together with TRF2 To Protect Telomeres from DNA Repair"

Christelle Lenain, Serge Bauwens, Simon Amiard, Michele Brunori, Marie-Josèphe Giraud-Panis and Eric Gilson

Current Biology 16, 1–8, July 11, 2006.

Current Biology *16*, 1303–1310, July 11, 2006 ©2006 Elsevier Ltd All rights reserved DOI 10.1016/j.cub.2006.05.021

Report

The Apollo 5′ Exonuclease Functions Together with TRF2 to Protect Telomeres from DNA Repair

Christelle Lenain,[1] Serge Bauwens,[1] Simon Amiard,[1,3] Michele Brunori,[1] Marie-Josèphe Giraud-Panis,[1,2] and Eric Gilson[1,*]

[1] Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule
Ecole Normale Supérieure de Lyon
Centre National de la Recherche Scientifique
Unité mixte de recerche 5161
Institut Fédératif de Recherche 128
46 Allée d'Italie
F-69364 Lyon
France

[2] Laboratoire Joliot-Curie
Ecole Normale Supérieure de Lyon
46 Allée d'Italie
F-69364 Lyon
France

[3] Centre de Biophysique Moléculaire
Rue Charles Sadron
F-45071 Orléans
France

Summary

A major issue in telomere research is to understand how the integrity of chromosome ends is preserved [1, 2]. The human telomeric protein TRF2 coordinates several pathways that prevent checkpoint activation and chromosome fusions [3–9]. In this work, we identified hSNM1B [10], here named Apollo, as a novel TRF2-interacting factor. Interestingly, the N-terminal domain of Apollo is closely related to that of Artemis, a factor involved in V(D)J recombination and DNA repair [11]. Both proteins belong to the β-CASP metallo-β-lactamase family of DNA caretaker proteins [12, 13]. Apollo appears preferentially localized at telomeres in a TRF2-dependent manner. Reduced levels of Apollo exacerbate the sensitivity of cells to TRF2 inhibition, resulting in severe growth defects and an increased number of telomere-induced DNA-damage foci and telomere fusions. Purified Apollo protein exhibits a 5′-to-3′ DNA exonuclease activity. We conclude that Apollo is a novel component of the human telomeric complex and works together with TRF2 to protect chromosome termini from being recognized and processed as DNA damage. These findings unveil a previously undescribed telomere-protection mechanism involving a DNA 5′-to-3′ exonuclease.

Results and Discussion

Apollo, a Paralog of Artemis, Interacts with TRF2

By using an N-terminal TRF2 fragment of 227 residues as a bait in a two-hybrid screen of a human cDNA library, we obtained one clone corresponding to a cDNA encoding hSNM1B [10] (a detailed description of the procedures used in this work can be found in the Supplemental Experimental Procedures available with this article online). hSNM1B is a paralog of two related proteins: hSNM1A, possibly involved in the repair of DNA inter-strand crosslinks [13], and Artemis, participating in V(D)J recombination and DNA repair [11]. The interaction of SNM1B with TRF2 was recently reported by Freibaum and Counter [14]. Because hSNM1B is more closely related to Artemis than to hSNM1A, we called it Apollo, the twin brother of Artemis in Greek mythology. A C-terminal fragment of Apollo, containing amino acids 412–532, is necessary and sufficient for the interaction with TRF2 (Figure 1A and data not shown).

To demonstrate the in vivo interaction between TRF2 and Apollo in mammalian cells, we transfected COS7 cells with either GST or GST-tagged human TRF2 together with Flag-Apollo [15]. Figure 1B shows that Flag-Apollo copurified with GST-TRF2 but not with GST and that the interaction between both partners is maintained throughout increasingly stringent conditions of the washes up to 0.5% NP40 and 1 M NaCl. To prevent any copurification of both proteins through DNA, we performed DNaseI treatment before the pull-down assay or added ethidium bromide throughout the assay. The interaction was preserved in these conditions (Figure 1C). Therefore, DNA does not seem to be necessary for the in vivo interaction between Apollo and TRF2 in COS7 cells.

To further characterize the TRF2-Apollo interaction, we used GST-fusion proteins containing truncated versions of TRF2 [15] (Figure 1D). Copurification of Flag-Apollo is efficient with constructs containing either the full-length TRF2 protein or the central part of TRF2, but not with constructs in which either the basic N-terminal or the C-terminal Myb-like telobox domains alone are fused to GST (Figures 1E). Because the exogenous GST-TRF2 might be able to heterodimerize with the endogenous TRF2 expressed in COS 7 cells, one cannot rule out the possibility that Apollo interacts with a domain of TRF2 located outside of or overlapping with the central homodimerization domain. Altogether, these data indicate that TRF2 associates with Apollo primarily via its N-terminal domain (amino acids 1–227).

Flag-fusion proteins containing deletion mutants of Apollo were also generated (Figure 1F). As shown in Figure 1G, copurification of GST-TRF2 is efficient with full-length Apollo and with its nonconserved C-terminal domain but not with its β-lactamase-β-CASP N-terminal domain. This is in full agreement with the results of the two-hybrid assay.

Apollo Is a Component of the Human Telomeric Complex

We failed to detect the endogenous Apollo protein by either immunofluorescence or Western blot analysis with homemade antibodies (data not shown), suggesting that it is expressed at extremely low levels, in agreement

*Correspondence: eric.gilson@ens-lyon.fr

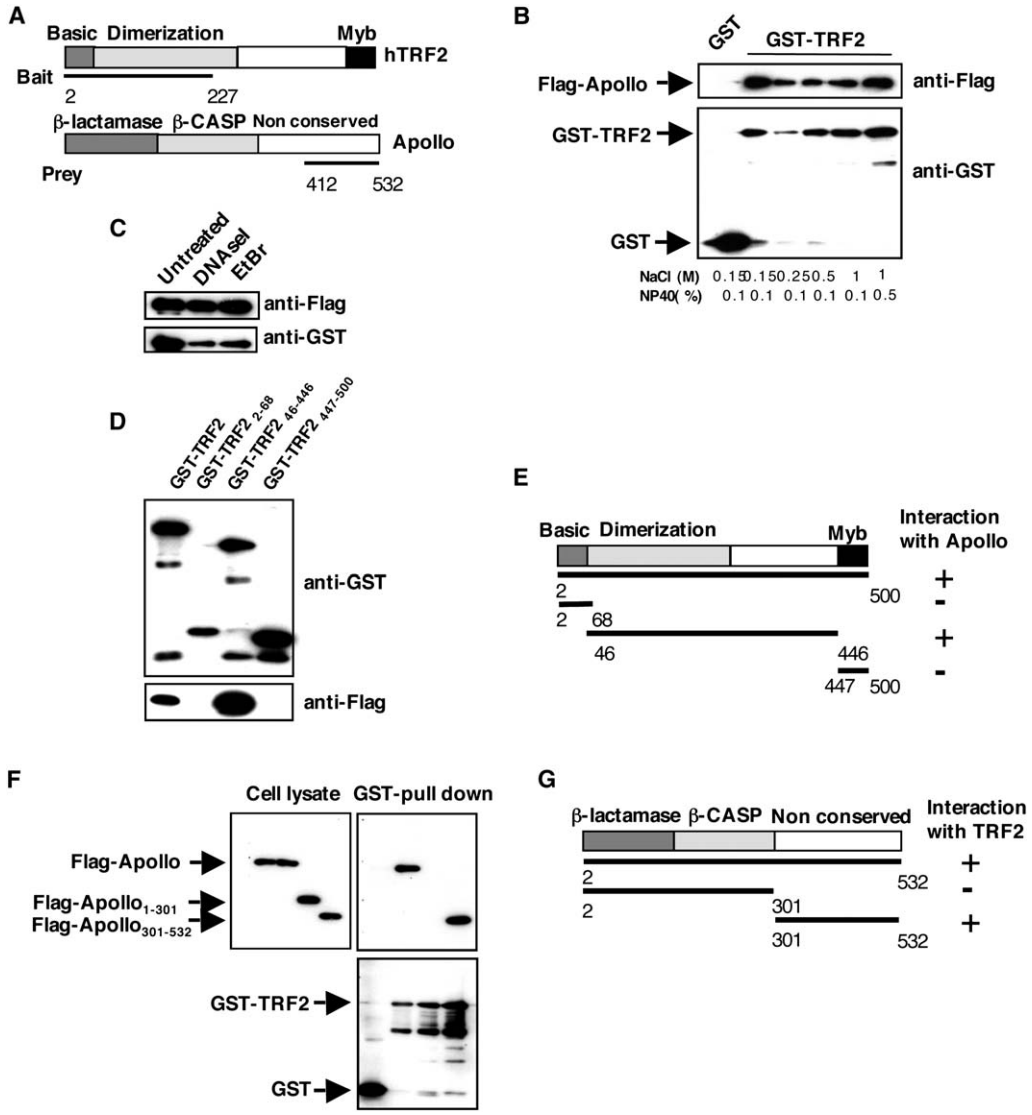


Figure 1. Apollo Interacts with TRF2

(A) Schematic representation of TRF2 and Apollo. The bar underlining TRF2 indicates the part used as a bait in the yeast two-hybrid screen. The bar underlining Apollo indicates the clone isolated in the two-hybrid screen.

(B) GST pull-down experiment with lysates from COS7 cells expressing exogenous Flag-Apollo and either GST or GST fused to TRF2. After pull down, washes were performed with increasing stringency. The interaction was analyzed by immunoblot with anti-Flag and anti-GST.

(C) Interaction between Apollo and TRF2 in the presence of DNaseI (50 U) or ethidium bromide (40 μg/ml).

(D and E) Mapping of the Apollo-interacting domain in TRF2. Deletion mutants of TRF2 were expressed together with Flag-Apollo in COS7 cells, and GST pull-down analysis followed.

(F and G) Mapping of the TRF2 interaction domain in Apollo. Flag-tagged deletion mutants of Apollo were generated and coexpressed in COS7 cells with GST-TRF2; the interaction was analyzed with GST pull-down assays.

both with a previous report [10] and with the weakness of the signal of *Apollo* mRNA we obtained in Northern blots and in PCR experiments on cDNAs from several human tissues (Figure S1 in the Supplemental Data available online). Therefore, in order to determine whether Apollo is part of the telomeric complex in vivo, we used a protein version fused with GFP at its C terminus. Apollo-GFP appears to be functional because it complements the *Apollo* knockdown phenotype (see below). When Apollo-GFP is transiently expressed in two telomerase-positive cell lines (293T and BJ-SV40-hTERT) and in one telomerase-negative ALT line (GM847), almost all the GFP-positive cells show bright nuclear foci, which colocalize with the endogenous TRF1 and TRF2 proteins (Figures 2A_{a-o}). Because TRF1 foci can be considered good markers for interphase telomeres [16, 17], Apollo-GFP appears to be concentrated at telomeres of interphase cells. In a few GM847 cells, Apollo-GFP also colocalizes with large foci containing both TRF2 and PML, which are characteristic of the ALT-associated PML bodies (Figures 2A_{p-s}).

Localizing Apollo to Telomeres Requires TRF2

To test for the involvement of TRF2 in the targeting of Apollo to telomeres, we transfected *Apollo-GFP* constructs in cells expressing a dominant-negative allele,

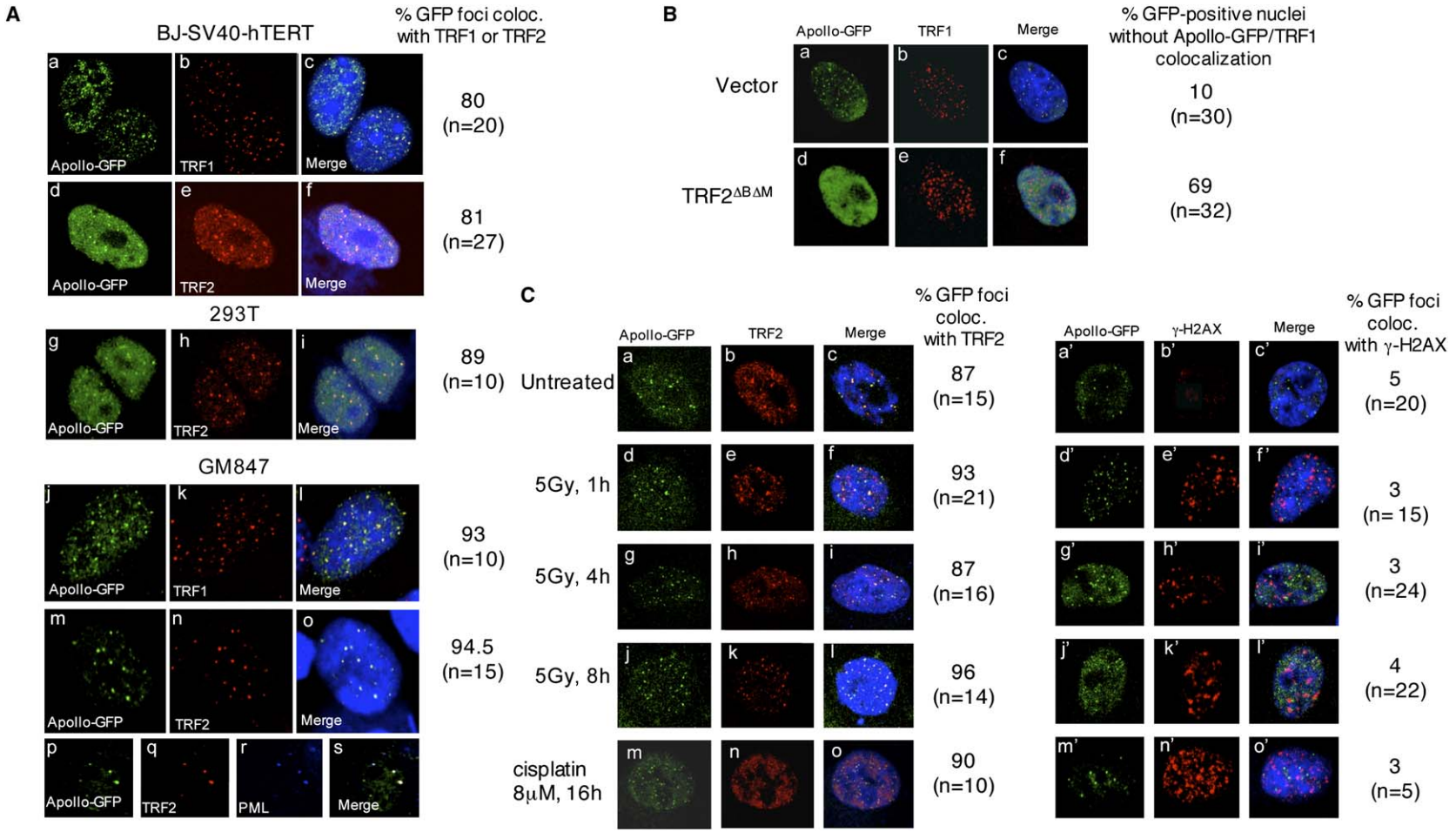
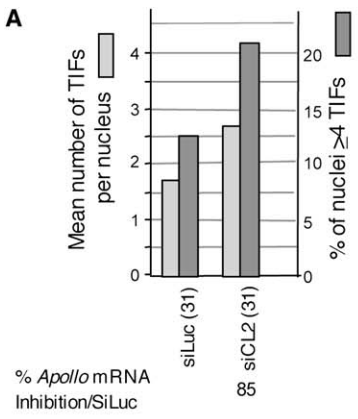


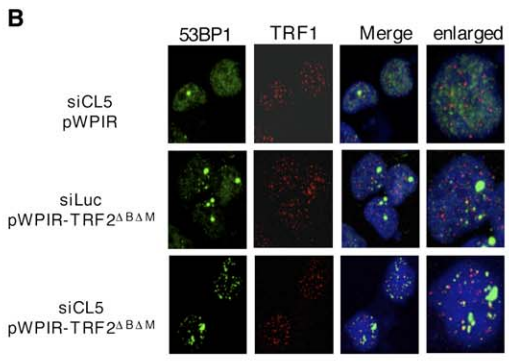
Figure 2. Telomeric Localization of Apollo

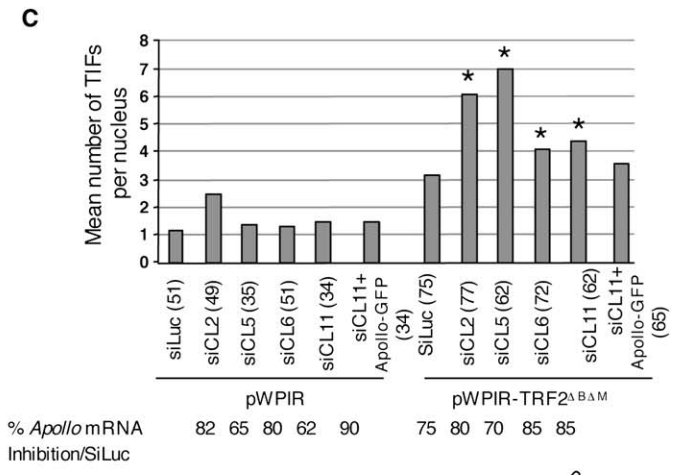
(A) Colocalization of exogenous Apollo with TRF2 and TRF1 in telomerase-positive and ALT cells. BJ-SV40-hTERT (a–f), 293T (g–i), and GM847 (j–s) cells were transfected with a plasmid encoding the Apollo-GFP fusion protein. Apollo was detected either by fluorescence (a and d) or by anti-GFP staining (g, j, m, and p). TRF2 (e, h, and n) TRF1 (b and k) and PML (r) were detected with specific antibodies. Toto3 was used for DNA staining.

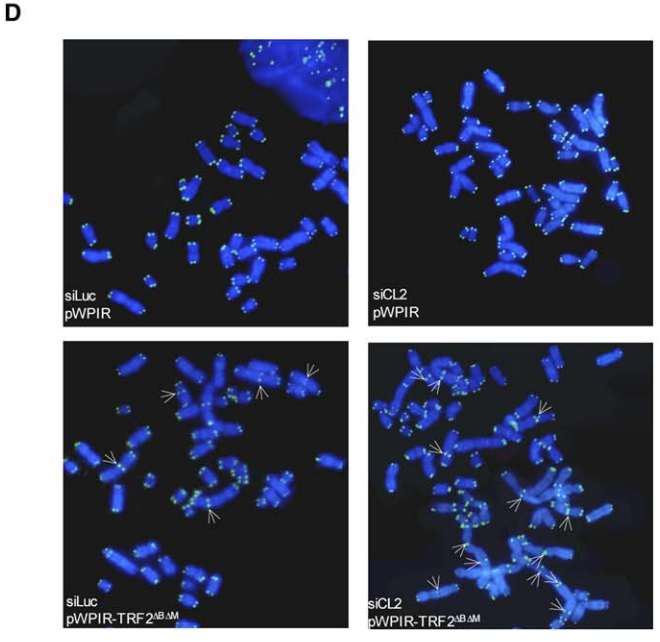
(B) Loss of Apollo telomeric localization upon TRF2 inhibition. pBabe vector that either was empty (a–c) or encoded TRF2$^{\Delta B\Delta M}$ (d–f) was introduced by retroviral delivery in BJ-SV40-hTERT cells. After 6 days of selection, the cells were transiently transfected with the Apollo-GFP plasmid. IF was performed 24 hr after transfection. Apollo was detected by fluorescence (a and d), and TRF1 was detected by anti-TRF1 staining (b and e). Cells with less than three Apollo-GFP foci overlapping with TRF1 were scored as cells without Apollo-TRF1 colocalization.

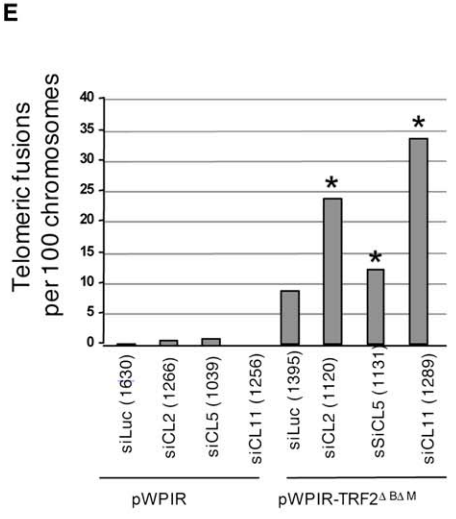
(C) Persistence of telomeric localization of Apollo-GFP after DNA damage. BJ-SV40-hTERT cells (a–l, a′–l′) were γ-irradiated at a dose of 5 grays and fixed 1 hr (d–f, d′–f′), 4 hr (g–i, g′–i′) and 8 hr (j–l, j′–l′) after irradiation. hTERT-immortalized fibroblasts (m–o, m′–o′) were treated with 8 μM of cisplatine for 16 hr and then processed for IF. Immunostaining was performed with anti-TRF2 and anti-γH2AX. Apollo was visualized by fluorescence.

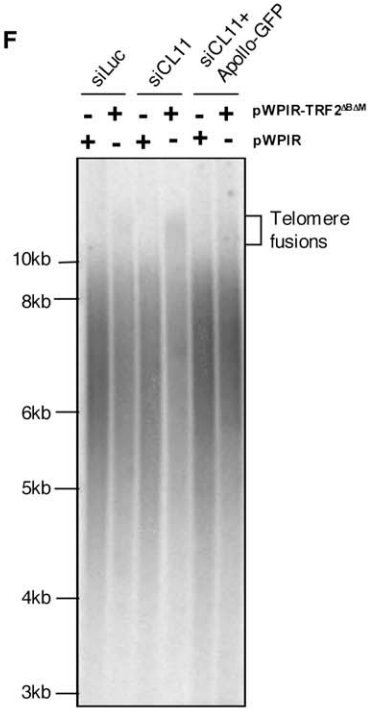

A
Mean number of TIFs per nucleus
% of nuclei ≥4 TIFs
siLuc (31)
siCL2 (31)
% Apollo mRNA Inhibition/SiLuc
85


B
53BP1
TRF1
Merge
enlarged
siCL5 pWPIR
siLuc pWPIR-TRF2ΔBΔM
siCL5 pWPIR-TRF2ΔBΔM


C
Mean number of TIFs per nucleus
siLuc (51)
siCL2 (49)
siCL5 (35)
siCL6 (51)
siCL11 (34)
siCL11+ Apollo-GFP (34)
SiLuc (75)
siCL2 (77)
siCL5 (62)
siCL6 (72)
siCL11 (62)
siCL11+ Apollo-GFP (65)
pWPIR
pWPIR-TRF2ΔBΔM
% Apollo mRNA Inhibition/SiLuc
82 65 80 62 90
75 80 70 85 85


D
siLuc pWPIR
siCL2 pWPIR
siLuc pWPIR-TRF2ΔBΔM
siCL2 pWPIR-TRF2ΔBΔM


E
Telomeric fusions per 100 chromosomes
siLuc (1630)
siCL2 (1266)
siCL5 (1039)
siCL11 (1256)
siLuc (1395)
siCL2 (1120)
sSiCL5 (1131)
siCL11 (1289)
pWPIR
pWPIR-TRF2ΔBΔM


F
siLuc
siCL11
siCL11+ Apollo-GFP
pWPIR-TRF2ΔBΔM
pWPIR
Telomere fusions
10kb
8kb
6kb
5kb
4kb
3kb

TRF2$^{\Delta B \Delta M}$, which removes the endogenous TRF2 from telomeres [5]. In 69% of the GFP-positive nuclei, Apollo-GFP foci disappeared while diffuse nuclear fluorescence intensified (Figure 2B; compare a to d). Because the TRF1 focal pattern is not greatly affected by the expression of the dominant-negative allele of TRF2 (Figures 2B$_b$ and 2B$_e$), we conclude that Apollo-GFP is delocalized from telomeres when the binding of TRF2 to the telomeres is compromised.

Knockdown of *Apollo* causes cell hypersensitivity to inter-strand crosslink-inducing agents and radiation [10], suggesting that this gene is involved in various types of DNA-damage responses. This raises the possibility that the delocalization of Apollo-GFP upon TRF2 inhibition could result from the activation of a cellular response to DNA damage. Therefore, we investigated whether Apollo-GFP can be delocalized from telomeres upon treatment with DNA-damaging agents, such as cisplatin or ionizing radiations. As expected, we observed an increase in the incidence of γ-H2AX foci at sites of DNA damage (Figure 2C). However, these DNA-damage foci do not contain Apollo-GFP, which remains colocalized with TRF2 (Figure 2C). Furthermore, *Apollo* knockdown does not modify the number of DNA-damage foci upon γ-ray irradiation (data not shown). These findings might argue against a direct role of Apollo in the DNA-damage response. However, because TRF2 can be transiently associated with DNA breaks immediately after their formation [18], it is possible that Apollo is involved in the initial stages of DNA-damage recognition, processing, or both.

Apollo Cooperates with TRF2 to Protect Telomeres from the DNA-Damage Response and Fusion

A panel of four interfering RNA sequences (named CL2, CL5, CL6, and CL11) were selected for their ability to reduce Apollo expression, as monitored at the mRNA and protein levels (Figure S2). One of them (CL11) targets the 3′ UTR of the gene and does not reduce the expression of Flag-Apollo or Apollo-GFP, although it leads to a marked reduction in *Apollo* mRNA level (Figure S2 and data not shown). A 2-fold reduction in the level of *Apollo* mRNA in cells selected for the expression of shRNAs corresponding to the CL2 and CL6 sequences correlates with a slight increase in radiosensitivity (data not shown), a previously reported consequence of *Apollo* knockdown [10]. In summary, our knockdown conditions reduce *Apollo* mRNA and protein levels but do not lead to a complete extinction of Apollo expression. In all the experiments presented hereafter, the level of *Apollo* mRNA inhibition is systematically indicated.

Because Apollo interacts with TRF2, we investigated whether it could modulate the cellular and telomere phenotypes triggered by the loss of TRF2. We infected HT1080 cells with a lentiviral vector that was either empty or expressed *TRF2$^{\Delta B \Delta M}$*. On the same day, we transfected these cells either with one of the siRNAs validated to reduce Apollo expression or with siRNA that targeted the *luciferase* gene (siLuc) as a negative control. This procedure was repeated after 2 days (Figure S3A). To confirm the observed phenotype, we cotransfected the aforementioned *Apollo-GFP* gene, whose expression is not inhibited by the 3′UTR CL11 siRNA.

In cells infected with the empty lentiviral vector (pWPIR), only siCL2 reduces the growth rate (Figure S3B and data not shown). This correlates with the fact that siCL2 triggers the highest level of *Apollo* inhibition (Figure S2). Interestingly, siCL2-treated cells exhibit a slight but detectable increase in the frequency of telomere-induced DNA-damage foci (TIFs), as manifested by an increase in the number of nuclear foci containing both TRF1 and 53BP1 (Figure 3A). The fact that the more efficient siRNA causes only a modest telomeric deprotection suggests that a potent inhibition of *Apollo* is required to trigger a detectable telomere dysfunction. Alternatively, although less likely, off-target effects specific of siCL2 could lead to telomere deprotection independently of *Apollo* inhibition.

By contrast, we observed important growth defects triggered by *Apollo* knockdown in TRF2-compromised cells (Figure S3C). The fact that all the tested siRNAs against *Apollo* behave similarly makes off-target effects highly unlikely. Furthermore, *Apollo-GFP* expression, resistant to siCL11 (Figure S2), rescues the growth defect due to this siRNA (Figure 3C), showing that the growth alteration caused by siCL11 transfection is specifically due to a reduced expression of *Apollo*.

The severe growth phenotype of cells altered for TRF2 and Apollo correlates with a higher incidence of a DNA-damage response at telomeres (Figures 3B and 3C). This increase is observed with the four siRNAs directed against *Apollo* and is rescued by *Apollo-GFP* expression in cells transfected with siCL11 (Figure 3C).

Apollo knockdown also significantly increases the frequency of telomeric fusion observed after TRF2 inhibition in metaphase spreads (Figures 3D and 3E).

Figure 3. Knockdown of *Apollo* Increases the Telomere Dysfunction Induced by TRF2$^{\Delta B \Delta M}$

(A) Quantification of TIFs in the indicated HT1080 cells. Cells were fixed 2 days after the first introduction of siRNAs and lentiviruses. The mean numbers of TIFs per nuclei and the percentages of cells with four or more TIFs are represented on the graph. The numbers in brackets represent the numbers of nuclei counted in each condition. The level of *Apollo* mRNA inhibition is indicated below the graph.

(B) Detection of TIFs. The indicated HT1080 cells were fixed 3 days after the second round of siRNAs and lentivirus treament. IF was performed with TRF1 (red) and 53BP1 (green) antibodies. DNA was stained with Toto-3.

(C) Quantification of the number of TIFs in the indicated HT1080 cells. Numbers in brackets represent the numbers of nuclei counted in each condition. An asterisk (*) indicates a p value < 0.05 in comparison with SiLuc- and TRF2$^{\Delta B \Delta M}$-expressing cells (Student's-t test). Also indicated below the bar is the level of *Apollo* mRNA inhibition.

(D) Metaphase spreads from the HT1080 cells expressing the indicated siRNAs and infected with the indicated lentiviruses. Telomeric DNA was stained by hybridization with a fluorescently labeled PNA (CCCTAA) probe.

(E) Quantification of the telomere fusion frequency for 100 chromosomes. The numbers in brackets represent the numbers of chromosomes counted in each condition, and an asterisk indicates a p value < 0.01 (chi2 test).

(F) Analysis of telomere restriction fragments in the HT1080 cells treated with the indicated siRNAs and lentiviruses. HinfI- and RsaI-digested genomic DNA was fractionated on agarose gel. After blotting, the telomeric DNA was detected with a TTAGGG repeat probe. The position of the telomere fusions is indicated on the right of the gel.

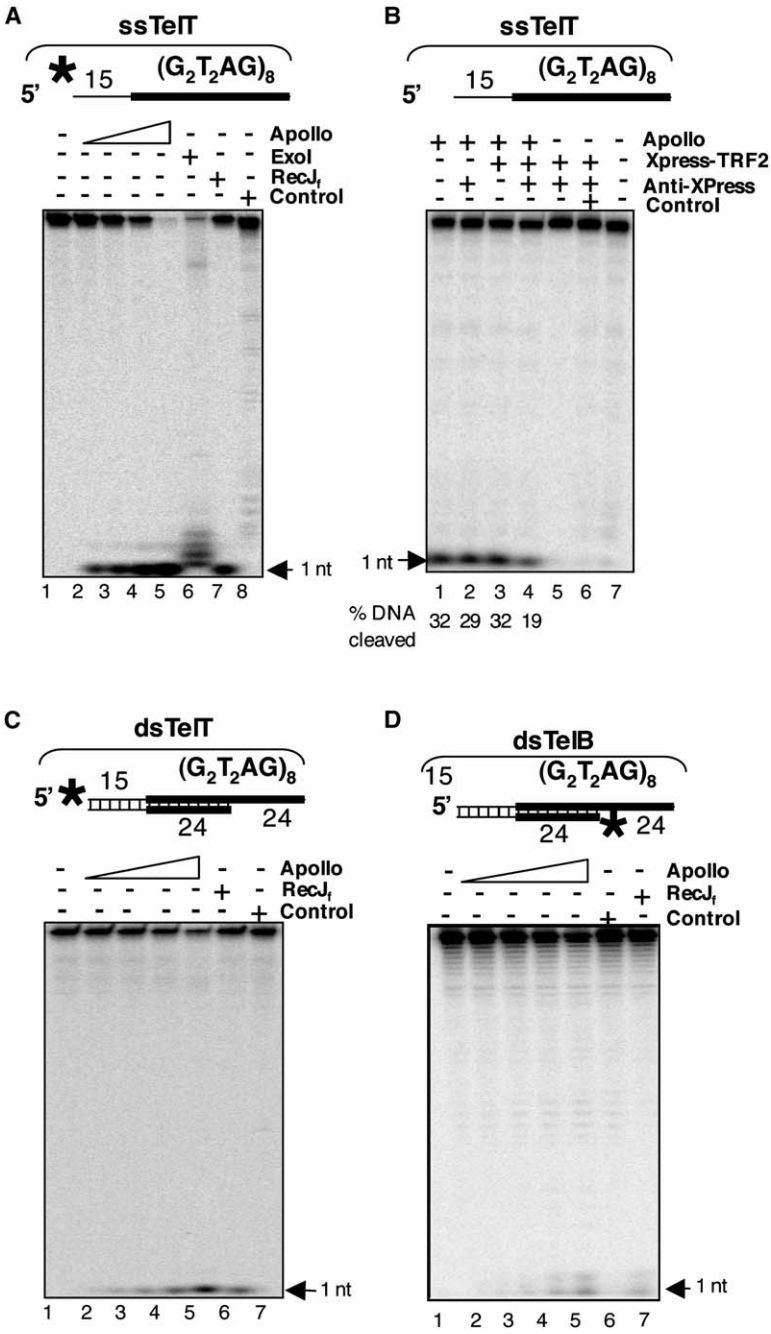


Figure 4. Purified Apollo Exhibits a 5′-to-3′ Exonuclease Activity In Vitro

(A) Activity of the Apollo protein on a 5′-labeled single-stranded DNA in comparison with the 3′-to-5′ *E. coli* Exonuclease I (lane 6), the 5′-to-3′ exonuclease $RecJ_f$ (lane 7), and the control sample (lane 8). The quantities of Apollo were 0.90 ng, 1.75 ng, 8.75 ng, and 17.5 ng. The control sample was performed with the highest dilution of the protein sample.

(B) The immuno-depletion of TRF2 decreases the DNA 5′ exonuclease activity. Five hundred nanograms of TEV1-digested Apollo was incubated 4 hr with protein G sepharose in a total volume of 200 μl in 50 mM Tris pH8, 50 mM NaCl, 0.5 mM EDTA (lane 1), and with 1 μg of purified Xpress-TRF (lane 3) or both (lane 4) After incubation, the supernatant was tested for exonucleolytic activity on ssTelT (5 nM). Lanes 5 and 6 correspond to experiments performed without Apollo (lane 5) or with the control sample (lane 6). Lane 7 shows the undigested probe. We performed this experiment by analyzing the exonuclease activity remaining in the sample after TRF2 immunoprecipitation with an antibody raised against the Xpress epitope (Invitrogen) that was added to the TRF2 N-terminal sequence. Immunoblotting experiments showed a significant enrichment of TRF2 in the Xpress immunoprecipitates (data not shown). We estimated that the experimental error of the percentage of cleaved DNA is less than 10%.

(C) Same experiment as that in (A), but the probe was double stranded and contained a 3′ telomeric overhang. Labeling was performed on the 5′ end of the top strand.

(D) Same experiment as that in (C), but the probe was labeled at the 5′ end of the bottom strand.

As previously documented [5], these fusions can appear as telomeric restriction fragments, which migrate at twice the original mean length. Although these telomeric restriction fragments are barely detectable in TRF2-compromised HT1080 cells, their intensity markedly increased upon *Apollo* knockdown in cells expressing $TRF2^{\Delta B\Delta M}$ but not in control cells (Figures 3F and S4A). We also observed a reduction of these telomeric fusion fragments upon the expression of *Apollo-GFP* in siCL11-treated cells (Figure 3F). These results are in complete agreement with the analysis of the number of telomeric fusions in metaphase spreads (Figures 3D and 3E) and further confirm that *Apollo-GFP* expression, resistant to siCL11, rescues the telomeric phenotype of *Apollo* knockdown. Inhibition of *Apollo* in a $TRF2^{\Delta B\Delta M}$ background is unlikely to cause telomeric dysfunction through telomere shortening because neither long-term shRNA-mediated partial inhibition in SV40-hTERT fibroblasts nor stronger transient knockdown of *Apollo* in HT1080 and HeLa cells led to a detectable change in telomere length (Figure S4 and data not shown). Importantly, transfections with *Apollo* siRNAs do not modify the protein level of $TRF2^{\Delta B\Delta M}$ or endogenous TRF2 (data not shown), ruling out the possibility that the increased sensitivity of Apollo-compromised cells to TRF2 inhibition is due to an upregulation of the dominant-negative form of TRF2 or to a downregulation of endogenous TRF2. In conclusion, these results show that reduced expression of *Apollo* in TRF2-compromised cells intensifies the DNA-damage response at

telomeres and increases the incidence of telomere fusions, providing strong evidence for an important role for Apollo in protecting telomeres.

Apollo Exhibits a DNA 5′ Exonuclease Activity

In order to gain insight on the molecular mechanisms by which Apollo protects telomeres from the DNA-damage response, we purified a protein version presenting a 6xHis tag at the N terminus and a subsequent site of cleavage for the Tobacco Etch Virus protease 1 (TEV1) (named His-Apollo, Figure S5). The fraction eluted from a Nickel column, which contained His-Apollo, was subsequently treated with TEV1 to remove the N-terminal tag (this fraction is labeled "Apollo" in Figure 4). The TEV1-treated fraction exhibits a DNA 5′-to-3′ exonuclease activity, which released the 5′ label as a mononucleotide and which is indistinguishable from the one obtained for the $RecJ_f$ enzyme [19] (Figure 4, lanes 1–7, and Figure S5). An extract made with the vector alone does not show this DNA 5′ exonuclease activity (Figure 4A lane 8). Furthermore, the immunodepletion of a purified TRF2 protein added to the Apollo fraction significantly decreases the exonuclease activity (Figure 4B). These results are consistent with the model in which Apollo interacts with TRF2 and exhibits a 5′ exonuclease activity.

Purified His-Apollo with an intact N-terminal His tag showed reduced nuclease activity when it was compared to the same fraction treated with TEV1 (Figure S5D). Therefore, the His-tag version of Apollo behaves as a partial nuclease mutant, showing that the exonuclease activity depends upon Apollo integrity. This observation is in agreement with previously published results concerning the yeast Snm1 protein, whose β-lactamase domain must be unblocked at its N terminus to exhibit a full activity [20].

Double-stranded DNA substrates, either blunt or with a 3′ overhang, are also digested from their 5′ end by Apollo, although the amount of cleavage is clearly lower than with single-strand substrates (Figures 4C–4D). Of note, DNA substrates composed of telomeric sequences do not appear to be preferentially cleaved by Apollo, either as single-strand or as double-strand DNA (Figures 4C and 4D). No endonucleolytic activity is detected with a 3′-labeled double-stranded probe (data not shown), although one cannot rule out such an activity after in vivo modification or molecular interactions.

Overall, we conclude that recombinant Apollo, as prepared here, encodes a DNA 5′ exonuclease activity. This is consistent with the important homology existing between the N-terminal domain of Apollo and the β-lactamase domain of Artemis.

Conclusions

In this report we have identified Apollo in humans as a telomere component that is recruited by TRF2. When Apollo expression is inhibited in TRF2-compromised cells, the consequences of TRF2 loss are exacerbated; such consequences include growth defects, telomere deprotection, and increased fusions. We conclude that Apollo cooperates with TRF2 to protect telomeric DNA from being recognized and processed by the DNA-repair machinery. In agreement with these data, M. van Overbeek and T. de Lange show that a reduced activity of Apollo induces a telomere-damage response [21] .

The 5′ exonuclease activity of Apollo raises the possibility that this protein contributes to the resection that occurs in the 5′ C-rich strand of telomeric DNA during replication [22]. Interestingly, this activity might be controlled by TRF2 (this work and [23, 24]). Therefore, it would be of great interest to investigate the role of Apollo in G-tail length regulation and in the differential processing of the two daughter strands.

Overall, our findings uncover an unsuspected role for the 5′ exonuclease Apollo in telomere protection and chromosome stability.

Supplemental Data

Supplemental Experimental Procedures and figures are available with this article online at http://current-biology.com/cgi/content/full/16/13/1303/DC1/.

Acknowledgments

We thank T. de Lange and M. van Overbeek for communicating their results prior to publication as well as F. Palladino and F. Magdinier for their critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer ("équipe labellisée") and from the European Community (RISC-RAD FI6R-CT-2003-508842). C.L. is supported by fellowships from the Association pour la Recherche sur le Cancer.

Received: April 4, 2006
Revised: May 4, 2006
Accepted: May 10, 2006
Published online: May 25, 2006

References

1. Lundblad, V. (2000). DNA ends: Maintenance of chromosome termini versus repair of double strand breaks. Mutat. Res. *451*, 227–240.
2. Blackburn, E.H. (2001). Switching and signaling at the telomere. Cell *106*, 661–673.
3. 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.
4. Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., and de Lange, T. (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. Nat. Genet. *17*, 231–235.
5. van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. Cell *92*, 401–413.
6. 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.
7. Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. Curr. Biol. *13*, 1549–1556.
8. Wang, R.C., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2004). Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. Cell *119*, 355–368.
9. Karlseder, J., Hoke, K., Mirzoeva, O.K., Bakkenist, C., Kastan, M.B., Petrini, J.H., and Lange Td, T. (2004). The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage rsponse. PLoS Biol. *2*, E240.
10. Demuth, I., Digweed, M., and Concannon, P. (2004). Human SNM1B is required for normal cellular response to both DNA interstrand crosslink-inducing agents and ionizing radiation. Oncogene *23*, 8611–8618.
11. Le Deist, F., Poinsignon, C., Moshous, D., Fischer, A., and de Villartay, J.P. (2004). Artemis sheds new light on V(D)J recombination. Immunol. Rev. *200*, 142–155.

12. 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.
13. Bonatto, D., Revers, L.F., Brendel, M., and Henriques, J.A. (2005). The eukaryotic Pso2/Snm1/Artemis proteins and their function as genomic and cellular caretakers. Braz. J. Med. Biol. Res. *38*, 321–334.
14. Freibaum, B.D., and Counter, C.M. (2006). hSnm1B is a novel telomere-associated protein. J. Biol. Chem. Published online April 10, 2006. 10.1074/jbc.C600038200.
15. 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., et al. (2004). Functional interaction between poly (ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. Mol. Cell. Biol. *24*, 1595–1607.
16. 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.
17. van Steensel, B., and de Lange, T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. Nature *385*, 740–743.
18. 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.
19. Lovett, S.T., and Kolodner, R.D. (1989). Identification and purification of a single-stranded-DNA-specific exonuclease encoded by the recJ gene of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *86*, 2627–2631.
20. Li, X., Hejna, J., and Moses, R.E. (2005). The yeast Snm1 protein is a DNA 5′-exonuclease. DNA Repair (Amst.) *4*, 163–170.
21. 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*, in press. Published online May 25, 2006. 10.1016/j.cub.2006.05.022.
22. Chai, W., Du, Q., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2006). Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands. Mol. Cell *21*, 427–435.
23. 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.
24. 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.

II-3- Résultats supplémentaires

II-3-a- Influence de TRF2 sur l'activité d'Apollon

Nous avons voulu déterminer si l'interaction entre TRF2 et Apollon modifiait l'activité exonucléase de cette protéine *in vitro* (figure 24). Lorsque l'on réalise les tests d'activité en ajoutant TRF2 en concentration croissante, on observe que l'activité 5' exonucléase d'Apollon sur un substrat simple brin est stimulée. Cet effet est spécifique d'Apollon car TRF2 ne stimule pas l'activité de RecJ (non présentée) ni l'activité 5'exonucléase d'Artémis (figure 24B).

Pour déterminer quel domaine de TRF2 est impliqué dans cette stimulation, nous avons réalisé la même expérience avec différents mutants de TRF2 (figure 25). Le mutant $TRF2^{\Delta M}$ est toujours capable de stimuler l'activité d'Apollon, suggérant que la fixation télomère spécifique de TRF2 sur l'ADN n'est pas requise. En revanche, le mutant $TRF2^{\Delta B}$, pour lequel le domaine N-terminal de TRF2 est délété, n'est plus en mesure de stimuler aussi efficacement l'activité d'Apollon. Ces résultats suggèrent un rôle essentiel de ce domaine B dans la stimulation de l'activité d'Apollon. Cela est en accord avec le fait que la présence de TRF1 ou de $TRF2^{\Delta B\Delta M}$ n'affecte pas l'activité d'Apollon.

TRF2 est également en mesure de stimuler l'activité d'Apollon sur un double brin à bord franc et non télomérique (figure 26A, puits 4 et 5). En revanche si l'on analyse la coupure du côté de l'extrémité 3' simple brin télomérique, TRF2 semble inhiber l'activité d'Apollon (figure 26B puits 4 et 5). On peut probablement interpréter ce résultat par une gêne stérique due à la fixation de TRF2 au niveau de la jonction. Cela nous suggère que TRF2 pourrait inhiber l'enzyme dans un contexte où elle est fixée sur l'ADN, mais l'activer lorsqu'elle est enlevée des télomères par exemple lors de la réplication.

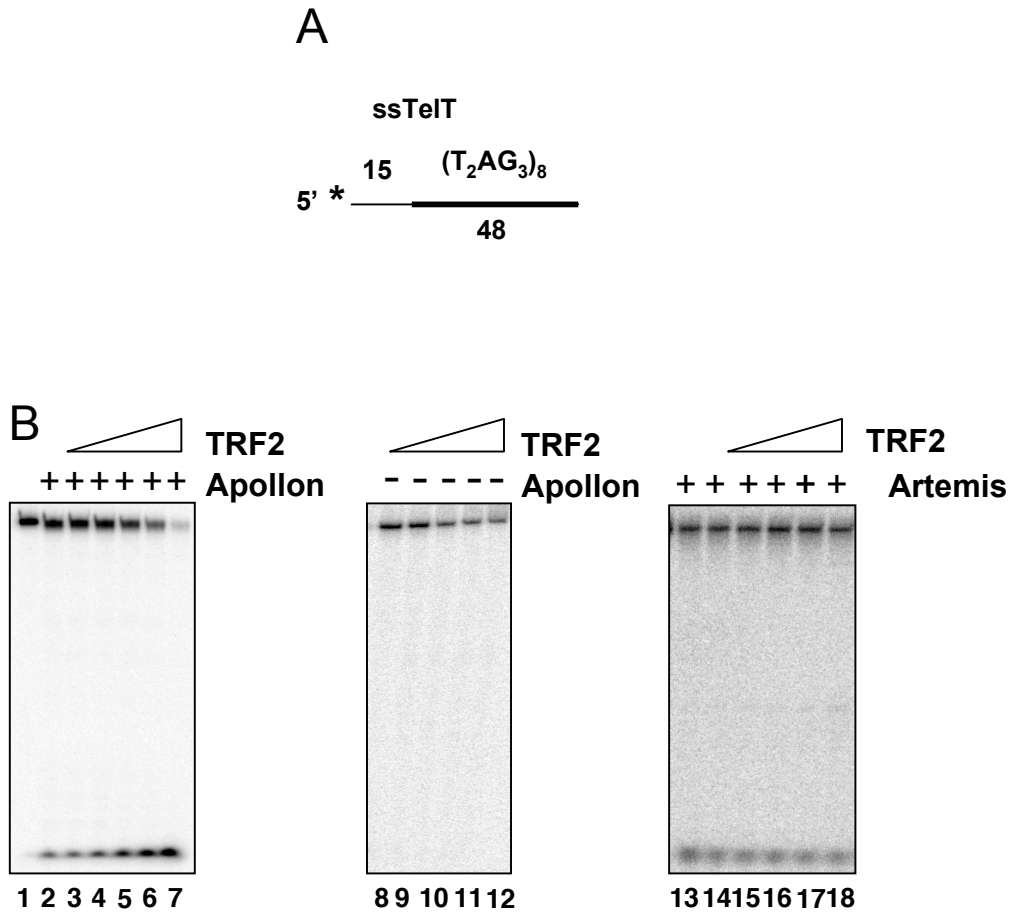


Figure 24 : TRF2 stimule l'activité 5' exonuclease d'Apollon

A. Représentation du substrat simple brin (ssTelT) utilisé dans les test d'activité. Il est composé de 8 répétitions télomériques et il est radiomarqué en 5'.

B. Test d'activité d'Apollon en présence de TRF2. Différentes concentrations de TRF2 sont incubées dans le tampon de réaction (50 mMTris-Cl (pH 8), 0.5mM EDTA, 50mM NaCl, 10mM MgCl2, and 10% glycérol) pendant 15 minutes à 20°C, en absence d'Apollon (puits 1 et 8 à 12), en présence de 13ng d'Apollon (dans les puits 2 à 7) ou en présence de 10ng d'Artémis (puits 13 à 18). L'oligonucléotide ssTelT est ensuite ajouté et la réaction est stoppée au bout d'1h d'incubation à 37°C par ajout de 6μg de protéinase K. Les échantillons sont ensuite chargé sur un gel de polyacrylamide 12% dénaturant. La migration est réalisée à 70W pendant 1 heure. Les concentrations utilisées pour TRF2 sont 6nmol (puits 3 et 14), 20nmol (puits 4 et 15), 50nmol (puits 5 et 16), 100nmol (puits 6 et 17) ou 200 nmol (puits 7 et 18).

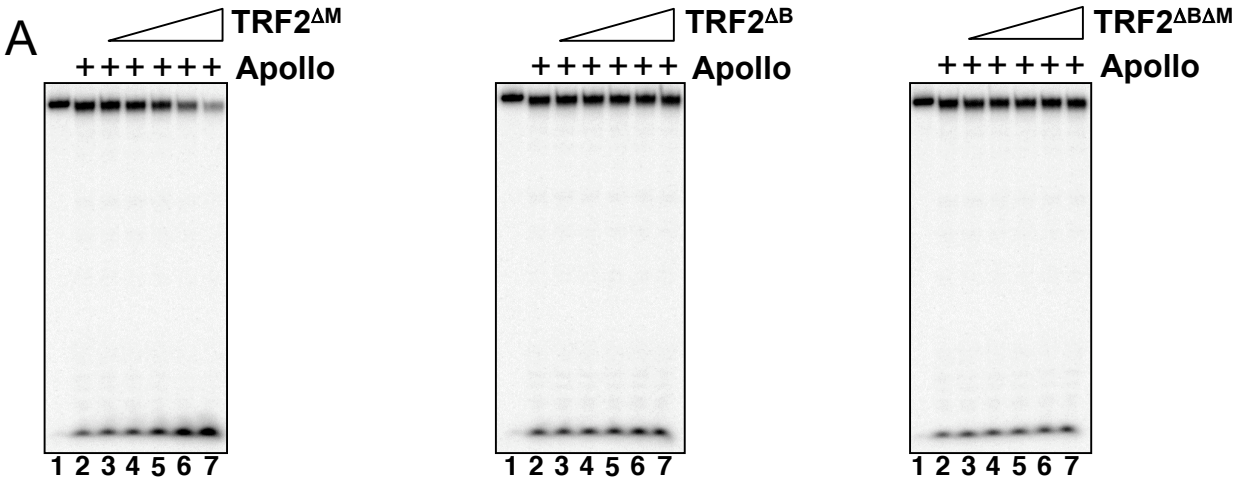
II-3-b- Recherche de mutants d'Apollon

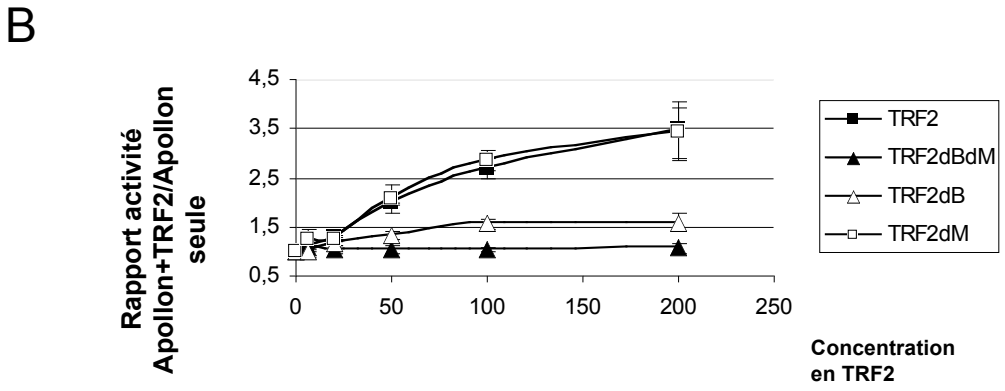
Une des questions que l'on peut se poser concerne l'implication de l'activité nucléolytique d'Apollon dans ses fonctions aux télomères. La réponse à cette question passe par l'expression dans des cellules de mutants inactifs de la protéine. Ces mutants doivent en parallèle être caractérisés *in vitro*. Ainsi nous avons produits trois mutants d'Apollon pour différents acides aminés conservés du domaine metallo-β-lactamase indispensable à l'activité endonucléase d'Artémis (Pannicke et al., 2004) (Poinsignon et al., 2004) (Figure 27A et B). Ces résidus ont été mutés soit séparément (mutant 2 H35A ; mutant 3 D14N) soit par deux (mutant 1 H33A et D35N). Ces mutants ont été analysés *in vitro* sur un substrat simple brin (figure 27C). Aucune activité 5' exonucléase n'a été mise en évidence lors de ces tests. Une activité 3' exonucléase est toutefois visible. Cette activité correspond probablement à la contamination observée dans l'échantillon contrôle (voir article), mais nous ne pouvons exclure qu'elle résulte de nos mutations. La purification de ces protéines devra être améliorée pour pouvoir être plus affirmatif sur ce point.

Ces mutants seront utilisés dans des cellules humaines afin de déterminer s'ils sont en mesure de complémenter les phénotypes obtenus par la suppression d'Apollon dans des cellules sauvages et dans des cellules où TRF2 est inhibée et ainsi de déterminer l'implication de l'activité 5' exonucléase dans la ou les fonctions d'Apollon.

II-4- Discussion

Les expériences réalisées (essentiellement par C. Lenain) au laboratoire ont permis de mettre en évidence Apollon, une nouvelle protéine télomérique possédant un rôle important dans la protection des télomères. Les études que j'ai réalisées révèlent une activité 5' exonucléase stimulée par TRF2. L'article présente ainsi un mécanisme inconnu de protection





<u>Figure 25 :</u> Le domaine B de TRF2 est impliqués dans la stimulation de l'activité d'Apollon.

A. Même expérience que dans la figure 20B mais TRF2 est remplacée par les mutants TRF2$^{\Delta M}$, TRF2$^{\Delta B}$ ou TRF2$^{\Delta B\Delta M}$. Les concentrations en protéines utilisées sont les même pour les quatre protéines.

B. Courbes représentant la quantification de la stimulation de l'activité de coupure d'Apollon en fonction des quantités de TRF2, TRF2$^{\Delta M}$, TRF2$^{\Delta B}$ ou TRF2$^{\Delta B\Delta M}$.
L'activité d'Apollon se définit comme le pourcentage de fraction coupée.

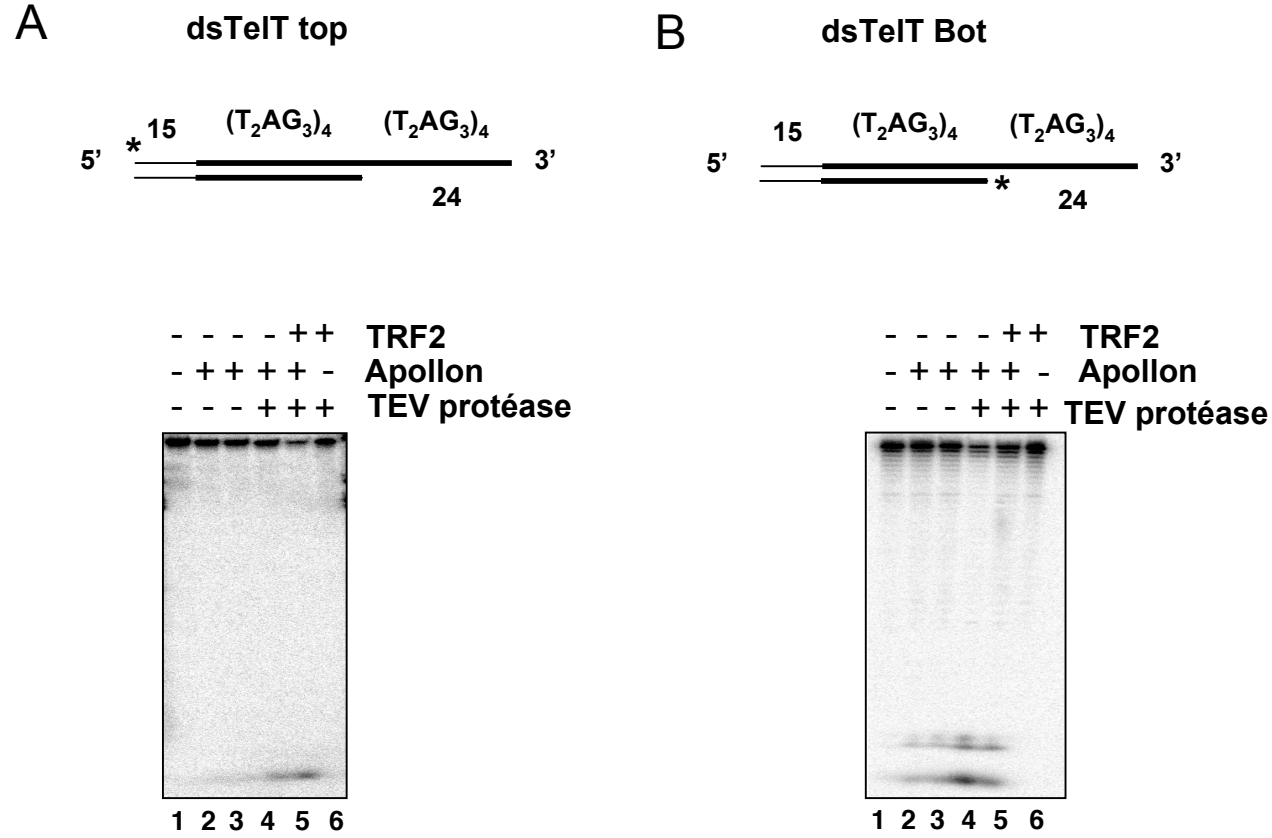
des télomères par une exonucléase. Une étude indépendante réalisée par le groupe de T. de Lange confirme ces résultats (van Overbeek et de Lange, 2006).

II-4-a- Apollon est une nouvelle nucléase présente aux télomères

Les résultats obtenus nous indiquent qu'Apollon est localisée aux télomères grâce à une interaction du domaine C-terminal d'Apollon avec TRF2. Ce domaine C-terminal est un domaine non conservé chez les autres protéines de ce groupe, SNM1A et Artémis, suggérant une fonction télomérique spécifique d'Apollon. SNM1A n'a d'ailleurs pas pu être détectée sur les télomères par Freibaum et Counter (Freibaum et Counter, 2006).

Apollon fait partie d'une famille de protéines impliquées dans la réparation, mais Apollon ne semble pas être recrutée au niveau des sites de dommage après traitement des cellules au cis-platine ou par irradiations ionisantes. Un rôle d'Apollon dans les étapes précoces de la réponse aux dommages ne peut toutefois pas être exclu car elle pourrait être recrutée par l'intermédiaire de TRF2, elle-même recrutée seulement quelques secondes après l'induction d'un dommage (Bradshaw et al., 2005). Ces différents recrutements pourraient participer à la sensibilité accrue aux dommages des cellules déficientes en Apollon (Demuth et al., 2004).

Les tests d'activité réalisés avec Apollon révèlent une activité 5' exonucléase et la disparition de cette activité dans nos mutants indique l'importance du domaine β-lactamase dans cette activité, de façon très similaire à l'activité de la protéine Artémis. Cette activité est plus efficace sur un substrat simple brin que sur un substrat double brin à bord franc. On peut noter le fait que cette activité n'est pas spécifique de la séquence. Une spécificité de séquence n'est peut être pas requise car du fait de son interaction avec TRF2, Apollon se trouve ciblée vers les télomères. Par ailleurs, nous avons montré que TRF2 est capable de stimuler cette activité exonucléase par l'intermédiaire de son domaine basique N-terminal. Ces données



<u>Figure 26 :</u> Effet de TRF2 sur l'activité 5' exonucléase d'Apollon sur un substrat double brin.

A. Les tests d'activité sont réalisés dans les même conditions que précédemment. Le substrat double brin (dsTelT Top) possédant une extrémité 3' simple brin, radiomarqué en 5' sur le brin supérieur est incubé en présence de 20ng d'Apollon (puits 2-6) et de TRF2 à 200nmol (puits 5 et 6). Dans les puits 4 à 6, la TEV protéase a été utilisée pour éliminer l'étiquette N-terminal d'Apollon. La digestion à la TEV protéase est réalisée dans les conditions préconisées par le fournisseur Invitrogen). Le puits 2 montre l'activité d'Apollon dans les conditions de la TEV.

B. Même expérience avec le substrat dsTelT Bot pour lequel, le brin inférieur a été radiomarqué.

suggèrent qu'Apollon et TRF2 pourraient coopérer dans un mécanisme inconnu de dégradation de l'ADN aux télomères.

Il serait attractif de proposer que l'activité 5' exonucléase d'Apollon pourrait être impliquée dans la formation du simple brin à l'extrémité des télomères. En effet, on sait qu'une ou plusieurs activités nucléases agissent aux télomères dans la formation des extrémités à la fois pour les télomères issus de la réplication du brin avancé et à la fois pour les télomères issus de la réplication du brin retardé. De plus, les cellules surexprimant TRF2 s'accommodent plus facilement de télomères plus courts (la taille moyenne déclenchant la sénescence est diminuée). Ceci pourrait s'expliquer, comme le propose Karlseder et ses collaborateurs, par un recrutement accru d'une ou plusieurs nucléase(s), générant plus de simple brin et facilitant donc la formation de la boucle T (Karlseder et al., 2002).

Pour étudier l'influence d'Apollon sur la taille du simple brin télomérique, deux expériences de mesure de taille du simple brin ont été réalisées au laboratoire en présence ou en absence de TRF2 ou d'Apollon (méthodes « in-gel » (Ohki et al., 2001), T-OLA (Cimino-Reale et al., 2001). Les résultats obtenus montrent bien une baisse de la taille du simple brin lorsque TRF2 est inhibée, en revanche la taille reste inchangée lorsque Apollon est inhibée (Lenain, données non présentées).

De plus, Apollon n'est pas responsable de la spécificité de la séquence terminale du brin riche en C (Lenain, données non présentées). L'activité 5' exonucléase d'Apollon ne serait donc pas responsable de la formation du simple brin à l'extrémité des télomères.

II-4-b- Rôle(s) d'Apollon dans la cellule ?

L'inhibition d'Apollon conduit à l'augmentation de TIFs suggérant un rôle de cette protéine dans le mécanisme de protection télomérique contrôlée par TRF2. Le mécanisme de

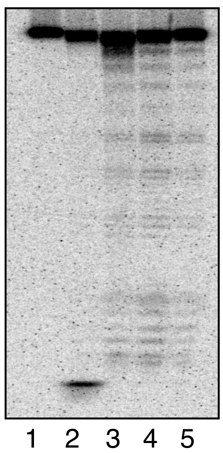
A

```
                              *14                      *33 *35
            1         10      *    20         30       *   *  40
Apollo   ---MNGVLIPHTPIAVDFWSLRRAGTARLFFLSHMHSDHTVGLSSTWA
Artemis  MSSFEGQMAEYPTISIDRFD-RENLRARAYFLSHCHKDHMKGLRAPTL
         ________________________________________________
Consensus     G L  H  IAID F  R    AR FFLSH H DH  GL A
```

B

```
                                   14                  33 35
Apollo           MNGVLIPHTPIAVDFWSLRRAGTARLFFLSHMHSDHTVGLSST
Apollo mutant 1  MNGVLIPHTPIAVDFWSLRRAGTARLFFLSHMASNHTVGLSST
Apollo mutant 2  MNGVLIPHTPIAVDFWSLRRAGTARLFFLSHMHSNHTVGLSST
Apollo mutant 3  MNGVLIPHTPIAVNFWSLRRAGTARLFFLSHMHSDHTVGLSST
```

C



<u>Figure 27 :</u> Effet des mutations du domaine β-lactamase sur l'activité 5' exonucléase d'Apollon.

A. Alignements de séquences du domaine β-lactamase d'Apollon et d'Artémis. La séquence consensus est également indiquée.

B. Les mutagenèses ont été réalisées par la méthode de QuickChange (Stratagene).

C. Les tests d'activité ont été réalisés dans les même conditions que précédemment. Le substrat simple brin (ssTelT) à 5nM, radiomarqué en 5' est incubé en présence de 20 ng d'Apollon (puits 2), de 20ng du mutant 1 (puits 3), de 20ng du mutant 2 (puits 4) ou de 20ng du mutant 3 (puits 5).

PERSPECTIVES

Comme on l'a vu lors de l'introduction, TRF2 est impliquée dans la plupart des processus qui interviennent aux télomères et il se pourrait même qu'elle soit impliquée dans différents mécanismes au delà de ces régions. Ainsi TRF2 possède une multitude de rôles dans le noyau, elle est d'ailleurs parfois comparée à « un couteau suisse ».

Lors de ma thèse, nous avons pu mettre en évidence plusieurs de ses rôles qui confirment l'importance de cette protéine aux télomères. Nous avons mis en évidence un mode de fixation particulier de TRF2 impliquant plusieurs dimères, formant ainsi un complexe de grande taille apparente. Cette particularité s'avère essentielle pour sa capacité à agir sur la topologie de l'ADN, favorisant ainsi l'invasion télomérique, une réaction qui pourrait être impliquée dans la formation de la boucle télomérique.

Par ailleurs, nous avons également montré que le domaine B de TRF2 est impliqué dans un deuxième mode de fixation à l'ADN. En effet, ce domaine présente une spécificité de fixation pour la structure des jonctions de Holliday, ces intermédiaires à quatre brins de la recombinaison homologue.

Nous avons également mis en évidence un nouveau partenaire de TRF2, Apollon, une nucléase dont le rôle biologique reste à préciser. Nous avons cependant déjà montré que cette protéine participe à la protection des télomères en interaction avec TRF2, et que TRF2 est capable de moduler l'activité d'Apollon *in vitro*.

Ainsi, nos résultats participent à l'amélioration de la compréhension du rôle de TRF2 aux télomères et ils ouvrent la voie à beaucoup de pistes de recherche sur le fonctionnement de cette protéine et des télomères en général. Ainsi, nous pouvons définir plusieurs axes pour nos futurs travaux.

NHEJ est toujours inhibé par TRF2 dans ces cellules car le taux de fusions des télomères n'augmente pas. La taille des télomères ainsi que la taille du simple brin ne sont pas non plus affectées, suggérant l'intégrité des chromosomes au sein de ces cellules déficientes en Apollon. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que l'absence d'Apollon puisse créer des dommages qui n'ont pas pu être mis en évidence par les techniques que nous avons employées, ou bien parce qu'ils ne concernent qu'une faible proportion des télomères. La manière dont Apollon protège les télomères contre les dommages à l'ADN reste donc à déterminer.

La suppression d'Apollon augmente les effets de l'inhibition de TRF2, notamment avec perte du pouvoir de prolifération et l'augmentation des fusions et de la formation des TIFs. Il existe donc une synergie fonctionnelle entre les deux protéines.

Au vu des résultats, on peut en déduire qu'Apollon coopère avec TRF2 pour protéger les télomères. Aidée par TRF2, Apollon est peut être nécessaire au repliement correct des télomères. Lorsque Apollon est absente, le repliement des télomères pourrait être perturbé et les télomères touchés pourraient adopter une structure déprotégée reconnue par les mécanismes de réparation. Dans un contexte où TRF2 est active, les défauts télomériques seraient modestes car TRF2 serait toujours en mesure d'empêcher le mécanisme de NHEJ. Par contre, lorsque les deux protéines sont inhibées, les dommages pourraient s'additionner et les effets seraient exacerbés.

I- Etudes d'autres paramètres de la réaction d'invasion

Nos résultats montrent sans ambiguïté que l'ADN télomérique est un substrat particulièrement propice à l'invasion. Cela pourrait paraître contradictoire si l'on considère la proportion de paires de bases GC de l'ADN télomérique. Cependant, on sait que les séquences répétées d'ADN riches en G ou en C sont capables dans certaines conditions de se replier sous forme de tetraplex (G4) ou i-tetraplex. On peut donc imaginer que la formation, même transitoire, de tetraplex dans le brin G (ou dans le brin C) puisse favoriser l'ouverture de la double hélice télomérique. Dans cette hypothèse, des molécules stabilisatrices des G4 pourraient aider à la réaction d'invasion. Nous pensons tester cette hypothèse en utilisant la télomestatine. Les expériences déjà réalisées avec cette drogue (Figure 23) montrent l'inhibition de l'invasion suite au traitement du simple brin. Le même type d'expérience sera réalisé mais en traitant cette fois le plasmide receveur.

Nos résultats montrent également que TRF2 stimule l'invasion par un phénomène indirect en agissant sur la topologie. Nous avons ainsi déterminé l'influence de TRF2 d'un point de vue quantitatif. Il serait maintenant intéressant de définir le paramètre cinétique de cette réaction. En effet, des résultats préliminaires que nous avons obtenus nous indiquent que TRF2 agit fortement sur la cinétique de la réaction d'invasion. Nous pensons quantifier cet effet par l'utilisation d'une méthode d'empreinte au laser UV en champ pulsé, permettant d'obtenir un « instantané » de l'état de l'oligonucléotide. Il est en théorie possible de différencier l'empreinte de l'oligonucléotide simple brin non hybridé de l'empreinte de l'oligonucléotide hybridé avec le plasmide et de suivre l'évolution de cette empreinte dans le temps.

Au delà de l'étude de TRF2, nous étudierons aussi l'effet de hPOT1 et de hRPA par cette méthode. Comme montré dans l'article, ces deux protéines n'influent pas sur l'aspect quantitatif de la réaction, mais cela n'exclu pas un effet sur la cinétique de cette réaction.

Il est également prévu d'étudier l'effet de plusieurs autres protéines télomériques en cours de purification comme : TPP1, TIN2 et hRAP1. De plus, Karlseder et ses collaborateurs ont montré récemment que plusieurs autres protéines comme RAD51, sont nécessaires à la formation d'une structure en D-loop *in vitro* (Verdun et Karlseder, 2006). Nous envisageons donc également d'étudier l'effet de cette protéine d'un point de vue quantitatif et cinétique.

II- Rôle des modifications topologiques de l'ADN induite par TRF2

Nous avons montré que TRF2, par sa capacité à se multimériser et à condenser l'ADN (très probablement par enroulement de l'ADN autour d'elle même), modifie ainsi la topologie de l'ADN. Dans notre modèle, nous proposons que cette propriété aide à la formation et/ou à la stabilité de la boucle télomérique. Nous voudrions vérifier cette hypothèse dans les cellules. Pour cela, nous avons entrepris une mutagenèse du domaine de dimérisation de TRF2 qui semble impliqué dans la multimérisation de la protéine. Nous sélectionnerons les mutants qui ont perdu la capacité de se multimériser et de modifier la topologie et nous les exprimerons dans des cellules, des fibroblastes par exemple, afin d'étudier les effets sur les télomères (taille du simple brin, taille du double brin, dommages à l'ADN télomériques, TIFs, fusions) et surtout nous étudierons la quantité de boucles formées en présence de ces différents mutants. Grâce à ces différents résultats, nous pourrons peut être préciser le ou les rôle(s) biologiques de la boucle télomérique (protection des télomères, accessibilité à la télomérase) ainsi que l'influence de sa présence sur la réplication ou la recombinaison inter-télomérique.

III- Implication de la fixation de TRF2 sur les jonctions de Holliday

On sait qu'au delà de la recombinaison homologue, les jonctions de Holliday sont aussi impliquées dans d'autres processus comme lors de problèmes pendant la réplication conduisant à la régression de la fourche de réplication. En effet, lorsqu'une fourche est confrontée à un obstacle tel qu'une autre fourche progressant en sens contraire ou une bulle de transcription, l'accumulation de contraintes topologiques en aval de la fourche peut provoquer son arrêt et sa régression. Lors de la régression, il y a hybridation des brins naissants entre eux, entraînant l'extrusion d'une quatrième double hélice formant donc une jonction de Holliday, nommée « chickenfoot » (Postow et al., 2001). Dans le modèle de formation de la « t-loop », la présence d'une jonction de Holliday a également été proposée.

Les résultats montrés en figure 21 et 22 indiquent clairement que TRF2, par l'intermédiaire de son domaine B, possède une spécificité de fixation sur les jonctions *in vitro* aidant donc probablement à leur formation. On pourrait donc envisager un rôle de TRF2 dans les phénomènes de recombinaison, par exemple dans les cellules qui utilisent le mécanisme ALT pour l'élongation des télomères et/ou dans la réparation. En ce qui concerne la réplication, TRF2 pourrait interagir avec le « chickenfoot » et aider à son redémarrage par exemple en recrutant des activités hélicases et/ou nucléase. Au niveau de la boucle T, la fixation de TRF2 sur la jonction pourrait stabiliser cette structure.

Pour répondre à ces questions, il est important au préalable de connaître l'effet de TRF2 sur la migration et sur la résolution de ces jonctions. Pour cela, nous avons envisagé d'utiliser un test *in vitro* mis au point par Peggy Hsieh (Panyutin et Hsieh, 1994) qui permet de déterminer les cinétiques de formation et de migration d'une jonction et de comparer dans ce système l'effet des différents mutants de TRF2. L'étude de l'effet de TRF2 sur l'étape de résolution sera, quant à elle, réalisée en utilisant des résolvases de différentes origines. La

résolvase humaine n'étant pas connue, il est néanmoins possible de réaliser cette étude par l'intermédiaire de résolvases connues chez d'autres organismes comme l'Endonucléase I du phage T7 (White et al., 1997) ou le complexe Mus81-EmeI de *S. Pombe* (Gaillard et al., 2003).

IV- Détermination du rôle d'Apollon

Lors de ma thèse, j'ai participé à la mise en évidence d'un nouveau partenaire de TRF2, la protéine Apollon. Nous avons montré que cette protéine possède une activité 5' exonucléase, il nous a donc paru important de déterminer si Apollon intervient dans la formation ou la régulation du simple brin télomérique terminal. Les études préliminaires réalisées en mesurant la taille du simple brin n'ont pour l'instant pas permis de mettre en évidence un tel effet. Le rôle de cette nucléase aux télomères reste donc encore inconnu et sa détermination va probablement nécessiter une étude de longue haleine.

La continuité de l'étude d'Apollon *in vitro* passera dans un premier temps par la mise au point d'un système de production plus efficace de la protéine. En effet, avec le système d'expression bactérien utilisé à l'heure actuelle, nous n'obtenu qu'une très faible quantité de protéines avec un taux de pureté d'environ 10%. Nous désirons donc changer de système d'expression afin d'améliorer ce paramètre. Des systèmes de production en cellule d'insectes ou en cellules de mammifères sont donc à l'étude.

Il sera ensuite plus aisé de poursuivre la caractérisation *in vitro* d'Apollon. Il serait en effet intéressant de regarder l'activité d'Apollon sur différents substrats comme des jonctions de Holliday, des substrats possédant un « flap » ou encore des D-loops et bien sûr de déterminer si TRF2 est en mesure de moduler cette activité sur ces nouveaux substrats. En

effet, les substrats testés jusque là ne permettent peut être pas de mettre en évidence toutes les activités d'Apollon.

Récemment, il a été montré que l'activité nucléolytique d'ERCC1/XPF, une autre nucléase recrutée par TRF2, n'est pas nécessaire à son effet télomérique, à savoir son implication dans le raccourcissement des télomères lorsque TRF2 est surexprimée (Wu et al., 2007). Il serait donc intéressant de déterminer si l'activité exonucléase d'Apollon participe à ces fonctions et si la perte de cette activité est responsable des phénotypes observés lorsque la protéine est inhibée dans les cellules. Pour cela, nous avons entrepris la création de mutants d'Apollon dans la sous-unité catalytique en suivant le modèle des mutants décrits pour Artémis (Pannicke et al., 2004). Les tests déjà réalisés indiquent que l'activité 5' exonucléase a bien été supprimée. Il reste donc à réaliser les tests de complémentation dans les cellules déficientes en Apollon afin de déterminer s'ils sont en mesure de complémenter les phénotypes obtenus par la suppression d'Apollon dans des cellules sauvages et dans des cellules où TRF2 est inhibée.

Par ailleurs on sait que l'activité 5' exonucléase d'Artémis est modifiée en activité endonucléase lorsque la protéine subit une phosphorylation par la DNA-PKcs (Ma et al., 2002). Dans un premier temps, il serait intéressant de savoir si la DNA-PKcs est également capable de phosphoryler Apollon et si ces phosphorylations éventuelles ont un impact sur l'activité d'Apollon ainsi que sur son interaction avec TRF2. Par la suite, il conviendra de déterminer le ou les sites de phosphorylation afin de produire des mutants non phosphorylables et d'étudier leurs effets *in vivo*.

Matériels et méthodes

Oligonucléotides

Les oligonucléotides ont été synthétisés par la société MWG Biotech. Ils ont ensuite été purifiés sur gel de polyacrylamide dénaturant et récupérés par électroélution.
Les marquages radioactifs sont réalisés en utilisant 10 pmoles de chaque oligonucléotide, 15 pmoles de γ^{32}P-ATP (Amersham Biosciences) et 2 unités de T4 polynucleotide kinase (Promega) dans un volume de réaction de 20µl dans les conditions recommandées par le fournisseur. Après marquage, les oligonucléotides sont précipités à l'éthanol.
Les hybridations se font sur 5 pmoles d'ADN marqué auquelles on ajoute 45 pmoles du même brin froid et 50 pmoles de brin complémentaire froid également dans un tampon d'hybridation (20 mM Tris pH8, 50 mM NaCl). L'hybridation est réalisée par chauffage à 80°C pendant 5 min puis par refroidissement lent jusqu'à température ambiante.
.

Liste des oligonucléotides utilisés pour les expériences de gel retard :

dsT4 = m3T4a + m3T4b
m3T4A
ATCGTCCTAGCAAGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGGGCTGCTACCGGCAC
m3T4b2
GTGCCGGTAGCAGCCCCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCTTGCTAGGACGAT

dsT8 = T8A + T8B
T8A
AGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGGGC
T8B
GCCCCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCT

Jonction m2T2 = m2T2a + m2T2b + m2T2c + m2T2d
m2T2a
GGAATCATCGTCCTAGCAAGGTTAGGGTTAGGGGGCTGCTACCGGCACTGCGTT
m2T2b
AACGCAGTGCCGGTAGCAGCCCCCTAACCCTAATGAGCGGTGGTTATCCAGGTT
m2T2c
AACCTGGATAACCACCGCTCATTAGGGTTAGGGACTCAACTGCAGTCGCTTGCG
m2T2d
CGCAAGCGACTGCAGTTGAGTCCCTAACCCTAACCTTGCTAGGACGATGATTCC

DLT4 = DL1 + DL2T4 + DL3T4
DL1
CGTGACCAGGACGTGAGTCTCGAGTGCAGACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTACAATCATCCTGACTGCAGACCGAGCTTGA
DL2T4
TCAAGCTCGGTCTGCAGTCAGGATGATTGTCCCTAACCCTAACCCTAACCCTAA**G**
TTAACGAGTCTGCACTCGAGACTCACGTCCTGGTCACG
DL3T4
CACCATCCAGTTCTCTTTTGAGAACTGGATGGTGCTC**GTTAAC**TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGG
G

Liste des oligonucléotides utilisés en invasion :

T15A :
CAAGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTT
AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGGGCTG
T15B :
CAGCCCCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACC
CTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCTAACCTTG
Y15A :
CAAGGTGGTGTGTGGGTGTGGTGTGGGTGTGGTGTGTGTGGGTGTGGTGTGTGGG
TGTGTGGGTGTGGTGTGTGGGTGTGGTGTGTGGGTGTGGGGGCTG
Blapuc19 (BP19)
ACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCC
TTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTA

Liste des oligonucléotides utilisés pour l'étude d'Apollon :

dsTelT = ssTelT + sstelB

ssTelT
ATCGTCCTAGCAAGGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGGTTAGGGTTAGGGT
TAGGGTTAG
ssTelB
CTAACCCTAACCCTAACCCTAACCCCTTGCTAGGACGAT

Plasmides

Ptélo2 est un plasmide issu de pUC19 contenant une séquence télomérique humaine d'environ 650 paires de bases clonée entre les sites BamHI et EcoRI.
Le plasmide linéaire est obtenu par digestion par HindIII (NEB).
Ptel270 est un plasmide contenant des répétitions de levures (TG_{1-3}) (Gilson et al., 1994).

Production des protéines et purification

Les séquences des gènes *TRF1* et *TRF2* ont été obtenus à partir des plasmides pflagTRF1 et pBSKTRF2 et insérés dans ptrcHisB (Invitrogen). Tous les mutants ont été construits par PCR en utilisant pTrcHisB TRF1 ou pTrcHisB TRF2 et ont été insérés dans ptrcHisB. Le peptide TRF2B a été synthétisé par Eurogentec.
Les protéines obtenues sont les suivantes : TRF2 (3-500), $TRF2^{\Delta B}$ (47-500), $TRF2^{\Delta M}$ (3-437), $TRF2^{\Delta L \Delta M}$ (3-247), $TRF2^{\Delta B \Delta M}$ (47-437), TRF2 Bpeptide (1-45), TRF1 (2-439), $TRF2^{MI}$ (TRF2 3-437 ; TRF1 371-439), $TRF2^{A \Delta B}$ (TRF1 2-67 ; TRF2 47-500).
Toutes ces protéines sont fusionnées à une étiquette contenant six histidines en position N-terminale. Les protéines ont été exprimées dans des bactéries DH5α cultivées dans du milieu LB. L'induction a été réalisée par ajout d'IPTG. Les purifications ont été réalisées par chromatographie d'affinité au Nickel (Ni-NTA Qiagen). Les concentrations ont été déterminées par la méthode de Bradford en utilisant la BSA comme contrôle. Les concentrations sont données en dimères.

Expérience de gel retard : EMSA (Electromobility Shift Assay) :

Les protéines sont incubées pendant 15min à 20°C avec l'ADN à 5nM dans un volume total de 10µL dans un tampon 50mM hépès pH8, 0,1mg/ml BSA, 1mMdTT, 100 mM KCl et 2% glycérol. Les concentrations en protéines sont indiquées. A la fin de l'incubation, du ficoll est ajouté à une concentration finale de 3% (w/v) et les échantillons sont chargés sur un gel d'agarose 1% ou sur un gel de polyacrylamide 6% dans 0,5X TBE. La migration est réalisée à 4.5V/cm dans 0,5X TBE pendant 30min pour les gels d'agarose et pendant 45min ou 1h pour les gels de polyacrylamide. Les gels sont ensuite séchés et les bandes sont révélées avec un STORM phosphorimager et analysées avec le logiciel Image Quant.
Les expériences de compétition ont été réalisées dans les même conditions que les expériences de gel retard, en utilisant TRF2 à 50nM, m2T2 à 5 nM et des concentrations croissantes en compétiteur : m2T2, m2NSP (jonction réalisée sur le même modèle que m2T2, mais la région correspondant aux 2 répétitions télomériques est remplacée par une séquence aléatoire composée des même nucléotides) ou dsT2 (substrat double brin de 54 pdb avec 2 répétitions télomériques au centre).

Réaction d'invasion :

200ng de plasmides sont incubés avec les protéines aux concentrations indiquées dans 10µl de 50 mM HEPES (pH 8), 0,1 mg ml–1 BSA, 1 mM DTT, 100 mM NaCl et 2% (v/v) glycérol (tampon d'invasion) pendant 10 min à 20°C. L'oligonucléotide radiomarqué à 13.5nM est ensuite ajouté et après 15min d'incubation à 20°C, la réaction est arrêtée par ajout de SDS (1% final) et 6µg de protéinase K. Au bout de 30min à 20°C, le ficoll est ajouté et les échantillons sont chargés sur un gel d'agarose 1,5% dans 0.5X TBE. La migration est réalisée à 4.5V/cm dans 0.5X TBE à 20°C pendant 1h30. Après la migration, les gels sont séchés puis exposés sur un écran phosphorimager STORM et les images obtenus sont analysées avec le logiciel ImageQuant.
L'effet relatif sur l'invasion est calculé comme la différence entre l'efficacité maximum d'invasion obtenue pour chaque protéine par rapport à la valeur obtenue pour une expérience sans protéine. Cette valeur est ensuite normalisée par rapport à la valeur obtenue avec TRF2 prise comme référence.
Pour les expériences réalisées avec les protéines POT1, RPA et SSB, un excès (15X) de brin C est ajouté avant le traitement SDS/PK.
Pour les expériences avec la nucléase de « Mung Bean » (NEB), 5U d'enzymes sont ajoutées à la fin de la réaction et l'incubation est réalisée pendant 2h à 30°C avant le traitement SDS/PK.
Pour les expériences avec la télomestatine, l'oligonucléotide est incubé 15 minutes à 20°C avec différentes concentrations en télomestatine avant d'effectuer la réaction d'invasion.
Pour les expériences de pontage par irradiation au laser, les réactions ont été réalisées comme précédemment, mais en utilisant 800ng de plasmide relâché ou linéaire purifié par gel. Juste avant le traitement SDS/PK, les échantillons ont été soumis à un pulse de 5ns à une longueur d'onde de 266nm (0.1 J cm–2) avec le quatrième harmonique d'un laser Nd :YAG.

Expérience de modification de la topologie :

Dans un volume final de 10µl, 100ng de plasmide ptélo2 relâché est incubé avec 2U de Topoisomérase I de germe de blé et différentes concentrations de protéines dans le tampon d'invasion, pendant 15min à 37°C. La réaction est arrêtée par un traitement SDS/PK. Les

échantillons sont ensuite chargés sur un gel d'agarose 1% dans 1XTBE. La migration est effectuée à 5V/cm à 20°C dans 1X TBE pendant 16h.
Dans les expériences avec la chloroquine, la drogue est ajoutée dans le gel et dans le tampon de migration aux concentrations indiquées. Les bandes sont ensuite révélées grâce au Bromure d'éthidium.

Test d'activité d'Apollon :

Les oligonucléotides sont radiomarqués avec la polynucléotide kinase (Promega) et du γ^{32}P-ATP pour les marquages en 5' et avec la terminale transférase deoxynucleotidyl (New England Biolabs) et du α^{32}P-ddATP pour les marquages en 3'. L'étiquette histidine est éliminée par clivage à la protéase TEV (0.1U/ng de protéine), en incubant 1h dans les conditions recommandées par le fournisseur. Les différents substrats sont incubés avec différentes concentration d'Apollon pendant 1h à 37°C dans un volume final de 10µl dans 50 mM Tris-Cl (pH 8), 0.5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10mM MgCl2, et 10% glycérol. A la fin de l'incubation, 15µl de formamide sont ajoutés aux échantillons qui sont ensuite chauffés à 80°C pendant 3min puis chargés sur un gel dénaturant de polyacrylamide 12% (19:1,acryl:bis-acryl). La migration est effectuée pendant 1h30 à 70W. Les gels sont ensuite séchés et les bandes sont détectées avec un STORM phosphorimager et quantifiées avec le logiciel Image Quant.
Pour les expériences de stimulation d'activité avec TRF2 et les mutants, les protéines sont pré-incubées 15 min avant d'être ajoutées à l'ADN.
L'activité d'Apollon est définie par le pourcentage de fraction coupée. La stimulation est déterminée en calculant le rapport à l'activité obtenue en présence des deux protéines et l'activité obtenue en présence d'Apollon seule.

BIBLIOGRAPHIE

1- Ambrus, A., et al. (2006). "Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution." Nucleic Acids Res **34**(9): 2723-35.

2- Ancelin, K., et al. (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**(10): 3474-87.

3- Artandi, S. E. and L. D. Attardi (2005). "Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer." Biochem Biophys Res Commun **331**(3): 881-90.

4- Bachand, F., et al. (2001). "Human telomerase RNA-protein interactions." Nucleic Acids Res **29**(16): 3385-93.

5- Bailey, S. M., et al. (1999). "DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 14899-904.

6- Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan (2003). "DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation." Nature **421**(6922): 499-506.

7- Banik, S. S. and C. M. Counter (2004). "Characterization of interactions between PinX1 and human telomerase subunits hTERT and hTR." J Biol Chem **279**(50): 51745-8.

8- Bankhead, T., et al. (2006). "Unexpected twist: harnessing the energy in positive supercoils to control telomere resolution." Mol Microbiol **62**(3): 895-905.

9- Baumann, P. and T. R. Cech (2001). "Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans." Science **292**(5519): 1171-5.

10- Baumann, P., et al. (2002). "Human Pot1 (protection of telomeres) protein: cytolocalization, gene structure, and alternative splicing." Mol Cell Biol **22**(22): 8079-87.

11- Baur, J. A., et al. (2001). "Telomere position effect in human cells." Science **292**(5524): 2075-7.

12- Beattie, T. L., et al. (2001). "Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase." Mol Cell Biol **21**(18): 6151-60.

13- Ben-Porath, I. and R. A. Weinberg (2005). "The signals and pathways activating cellular senescence." Int J Biochem Cell Biol **37**(5): 961-76.

14- Bianchi, A. and T. de Lange (1999). "Ku binds telomeric DNA in vitro." J Biol Chem **274**(30): 21223-7.

15- Bianchi, A., et al. (1997). "TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA." Embo J **16**(7): 1785-94.

16- Bianco, P. R., et al. (1998). "DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison." Front Biosci **3**: D570-603.

17- Bilaud, T., et al. (1997). "Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein." Nat Genet **17**(2): 236-9.

18- Bilaud, T., et al. (1996). "The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human." Nucleic Acids Res **24**(7): 1294-303.

19- Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes Dev **16**(1): 6-21.

20- Blackburn, E. H. (2005). "Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions." FEBS Lett **579**(4): 859-62.

21- Blackburn, E. H. and J. G. Gall (1978). "A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena." J Mol Biol **120**(1): 33-53.

22- Blasco, M. A. (2005). "Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond." Nat Rev Genet **6**(8): 611-22.

23- Bradshaw, P. S., et al. (2005). "Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage." Nat Genet **37**(2): 193-7.

24- Broccoli, D., et al. (1997). "Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2." Nat Genet **17**(2): 231-5.

25- Brunori, M., et al. (2006). "TRF2 inhibition promotes anchorage-independent growth of telomerase-positive human fibroblasts." Oncogene **25**(7): 990-7.

26- Bryan, T. M., et al. (1997). "Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines." Nat Med **3**(11): 1271-4.

27- Bryan, T. M., et al. (1997). "The telomere lengthening mechanism in telomerase-negative immortal human cells does not involve the telomerase RNA subunit." Hum Mol Genet **6**(6): 921-6.

28- Buck, S. W. and D. Shore (1995). "Action of a RAP1 carboxy-terminal silencing domain reveals an underlying competition between HMR and telomeres in yeast." Genes Dev **9**(3): 370-84.

29- Budarf, M. and E. Blackburn (1987). "S1 nuclease sensitivity of a double-stranded telomeric DNA sequence." Nucleic Acids Res **15**(15): 6273-92.

30- Burge, S., et al. (2006). "Quadruplex DNA: sequence, topology and structure." Nucleic Acids Res **34**(19): 5402-15.

31- Campisi, J. (2003). "Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes." Exp Gerontol **38**(1-2): 5-11.

32- Celli, G. B. and T. de Lange (2005). "DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion." Nat Cell Biol **7**(7): 712-8.

33- Celli, G. B., et al. (2006). "Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination." Nat Cell Biol **8**(8): 885-90.

34- Cervantes, R. B. and V. Lundblad (2002). "Mechanisms of chromosome-end protection." Curr Opin Cell Biol **14**(3): 351-6.

35- Cesare, A. J. and J. D. Griffith (2004). "Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops." Mol Cell Biol **24**(22): 9948-57.

36- Cesare, A. J., et al. (2003). "Telomere looping in P. sativum (common garden pea)." Plant J **36**(2): 271-9.

37- Chai, W., et al. (2006). "Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands." Mol Cell **21**(3): 427-35.

38- Chai, W., et al. (2006). "The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres." EMBO Rep **7**(2): 225-30.

39- Chen, H. J., et al. (2000). "Implication of telomerase activity and alternations of telomere length in the histologic characteristics of intracranial meningiomas." Cancer **89**(10): 2092-8.

40- Chen, J. L., et al. (2000). "Secondary structure of vertebrate telomerase RNA." Cell **100**(5): 503-14.

41- Chong, L., et al. (1995). "A human telomeric protein." Science **270**(5242): 1663-7.

42- Cimino-Reale, G., et al. (2001). "The length of telomeric G-rich strand 3'-overhang measured by oligonucleotide ligation assay." Nucleic Acids Res **29**(7): E35.

43- Cohen, S. B., et al. (2007). "Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells." Science **315**(5820): 1850-3.

44- Colgin, L. M., et al. (2003). "Human POT1 facilitates telomere elongation by telomerase." Curr Biol **13**(11): 942-6.

45- Collins, K. (2006). "The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(7): 484-94.

46- Cong, Y. S., et al. (2002). "Human telomerase and its regulation." Microbiol Mol Biol Rev **66**(3): 407-25, table of contents.

47- Counter, C. M., et al. (1995). "Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies." Blood **85**(9): 2315-20.

48- Court, R., et al. (2005). "How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: a view from high-resolution crystal structures." EMBO Rep **6**(1): 39-45.

49- Crabbe, L., et al. (2004). "Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity." Science **306**(5703): 1951-3.

50- Crnugelj, M., et al. (2002). "The solution structure of d(G(4)T(4)G(3))(2): a bimolecular G-quadruplex with a novel fold." J Mol Biol **320**(5): 911-24.

51- d'Adda di Fagagna, F., et al. (2003). "A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence." Nature **426**(6963): 194-8.

52- Dantzer, F., et al. (2004). "Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2." Mol Cell Biol **24**(4): 1595-607.

53- de Lange, T. (2002). "Protection of mammalian telomeres." Oncogene **21**(4): 532-40.

54- de Lange, T. (2004). "T-loops and the origin of telomeres." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(4): 323-9.

55- de Lange, T. (2005). "Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres." Genes Dev **19**(18): 2100-10.

56- De Semir, D., et al. (2007). "Telomerase: going beyond the ends." Cell Cycle **6**(5): 546-9.

57- de Vries, F. A., et al. (1972). "An analysis of replication errors made by a defective T4 DNA polymerase." Mol Gen Genet **117**(1): 60-71.

58- Demuth, I., et al. (2004). "Human SNM1B is required for normal cellular response to both DNA interstrand crosslink-inducing agents and ionizing radiation." Oncogene **23**(53): 8611-8.

59- Deng, Z., et al. (2003). "Telomere repeat binding factors TRF1, TRF2, and hRAP1 modulate replication of Epstein-Barr virus OriP." J Virol **77**(22): 11992-2001.

60- Deng, Z., et al. (2002). "Telomeric proteins regulate episomal maintenance of Epstein-Barr virus origin of plasmid replication." Mol Cell **9**(3): 493-503.

61- Dionne, I. and R. J. Wellinger (1996). "Cell cycle-regulated generation of single-stranded G-rich DNA in the absence of telomerase." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13902-7.

62- Dokal, I. (2000). "Dyskeratosis congenita in all its forms." Br J Haematol **110**(4): 768-79.

63- Dronkert, M. L., et al. (2000). "Disruption of mouse SNM1 causes increased sensitivity to the DNA interstrand cross-linking agent mitomycin C." Mol Cell Biol **20**(13): 4553-61.

64- Dronkert, M. L. and R. Kanaar (2001). "Repair of DNA interstrand cross-links." Mutat Res **486**(4): 217-47.

65- Dunham, M. A., et al. (2000). "Telomere maintenance by recombination in human cells." Nat Genet **26**(4): 447-50.

66- Duquette, M. L., et al. (2004). "Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA." Genes Dev **18**(13): 1618-29.

67- Dynek, J. N. and S. Smith (2004). "Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis." Science **304**(5667): 97-100.

68- Ellis, N. A., et al. (1995). "The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases." Cell **83**(4): 655-66.

69- Fairall, L., et al. (2001). "Structure of the TRFH dimerization domain of the human telomeric proteins TRF1 and TRF2." Mol Cell **8**(2): 351-61.

70- Fanning, E., et al. (2006). "A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways." Nucleic Acids Res **34**(15): 4126-37.

71- Fasching, C. L., et al. (2005). "Telomerase-independent telomere length maintenance in the absence of alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia bodies." Cancer Res **65**(7): 2722-9.

72- Feng, J., et al. (1995). "The RNA component of human telomerase." Science **269**(5228): 1236-41.

73- Forterre, P., et al. (2007). "Origin and evolution of DNA topoisomerases." Biochimie.

74- Fotiadou, P., et al. (2004). "DNA polymerase beta interacts with TRF2 and induces telomere dysfunction in a murine mammary cell line." Cancer Res **64**(11): 3830-7.

75- Fouche, N., et al. (2006). "The Basic Domain of TRF2 Directs Binding to DNA Junctions Irrespective of the Presence of TTAGGG Repeats." J Biol Chem **281**(49): 37486-37495.

76- Fourel, G., et al. (1999). "Cohabitation of insulators and silencing elements in yeast subtelomeric regions." Embo J **18**(9): 2522-37.

77- Freibaum, B. D. and C. M. Counter (2006). "hSnm1B is a novel telomere-associated protein." J Biol Chem **281**(22): 15033-6.

78- Gaillard, P. H., et al. (2003). "The endogenous Mus81-Eme1 complex resolves Holliday junctions by a nick and counternick mechanism." Mol Cell **12**(3): 747-59.

79- Gehring, K., et al. (1993). "A tetrameric DNA structure with protonated cytosine.cytosine base pairs." Nature **363**(6429): 561-5.

80- Gilley, D., et al. (2005). "Telomere dysfunction in aging and cancer." Int J Biochem Cell Biol **37**(5): 1000-13.

81- Gilson, E., et al. (1994). "RAP1 stimulates single- to double-strand association of yeast telomeric DNA: implications for telomere-telomere interactions." Nucleic Acids Res **22**(24): 5310-20.

82- Gomez, D., et al. (2004). "Interaction of telomestatin with the telomeric single-strand overhang." J Biol Chem **279**(40): 41487-94.

83- Gomez, D., et al. (2006) -a. "Telomestatin-induced Telomere Uncapping Is Modulated by POT1 through G-overhang Extension in HT1080 Human Tumor Cells." J Biol Chem **281**(50): 38721-38729.

84- Gomez, M., et al. (2006) -b. "PARP1 Is a TRF2-associated poly(ADP-ribose)polymerase and protects eroded telomeres." Mol Biol Cell **17**(4): 1686-96.

85- Gonda, T. J., et al. (1985). "Nucleotide sequence of cDNA clones of the murine myb proto-oncogene." Embo J **4**(8): 2003-8.

86- Gottschling, D. E. and V. A. Zakian (1986). "Telomere proteins: specific recognition and protection of the natural termini of Oxytricha macronuclear DNA." Cell **47**(2): 195-205.

87- Granotier, C., et al. (2005). "Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends." Nucleic Acids Res **33**(13): 4182-90.

88- Greider, C. W. (1999). "Telomeres do D-loop-T-loop." Cell **97**(4): 419-22.

89- Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1985). "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts." Cell **43**(2 Pt 1): 405-13.

90- Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1987). "The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity." Cell **51**(6): 887-98.

91- Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1996). "Telomeres, telomerase and cancer." Sci Am **274**(2): 92-7.

92- Griffith, J., et al. (1998). "TRF1 promotes parallel pairing of telomeric tracts in vitro." J Mol Biol **278**(1): 79-88.

93- Griffith, J. D., et al. (1999). "Mammalian telomeres end in a large duplex loop." Cell **97**(4): 503-14.

94- Hahn, W. C., et al. (1999). "Creation of human tumour cells with defined genetic elements." Nature **400**(6743): 464-8.

95- Hanaoka, S., et al. (2005). "Comparison between TRF2 and TRF1 of their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities." Protein Sci **14**(1): 119-30.

96- Hanaoka, S., et al. (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**(1): 167-75.

97- Harle-Bachor, C. and P. Boukamp (1996). "Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis inhuman skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(13): 6476-81.

98- Harley, C. B., et al. (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." Nature **345**(6274): 458-60.

99- Hastie, N. D. and R. C. Allshire (1989). "Human telomeres: fusion and interstitial sites." Trends Genet **5**(10): 326-31.

100- Haussmann, M. F., et al. (2003). "Telomeres shorten more slowly in long-lived birds and mammals than in short-lived ones." Proc Biol Sci **270**(1522): 1387-92.

101- Hemann, M. T. and C. W. Greider (1999). "G-strand overhangs on telomeres in telomerase-deficient mouse cells." Nucleic Acids Res **27**(20): 3964-9.

102- Hemann, M. T. and C. W. Greider (2000). "Wild-derived inbred mouse strains have short telomeres." Nucleic Acids Res **28**(22): 4474-8.

103- Henderson, E., et al. (1987). "Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs." Cell **51**(6): 899-908.

104- Henson, J. D., et al. (2002). "Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells." Oncogene **21**(4): 598-610.

105- Herbig, U., et al. (2004). "Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a)." Mol Cell **14**(4): 501-13.

106- Herrera, E., et al. (2000). "Impaired germinal center reaction in mice with short telomeres." Embo J **19**(3): 472-81.

107- Hockemeyer, D., et al. (2006). "Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres." Cell **126**(1): 63-77.

108- Hockemeyer, D., et al. (2005). "POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end." Embo J **24**(14): 2667-78.

109- Holliday, R. (1964). "The Induction Of Mitotic Recombination By Mitomycin C In Ustilago And Saccharomyces." Genetics **50**: 323-35.

110- Houghtaling, B. R., et al. (2004). "A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2." Curr Biol **14**(18): 1621-31.

111- Hovring, I., et al. (1994). "DNA-binding domain and recognition sequence of the yeast BAS1 protein, a divergent member of the Myb family of transcription factors." J Biol Chem **269**(26): 17663-9.

112- Hsu, H. L., et al. (1999). "Ku is associated with the telomere in mammals." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12454-8.

113- Hsu, H. L., et al. (2000). "Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining." Genes Dev **14**(22): 2807-12.

114- Huertas, D., et al. (1994). "Characterization of the structural conformation adopted by (TTAGGG)n telomeric DNA repeats of different length in closed circular DNA." J Biomol Struct Dyn **12**(1): 079-90.

115- Itahana, K., et al. (2004). "Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells." Biogerontology **5**(1): 1-10.

116- Iwano, T., et al. (2004). "Importance of TRF1 for functional telomere structure." J Biol Chem **279**(2): 1442-8.

117- Jaco, I., et al. (2004). "Role of human Ku86 in telomere length maintenance and telomere capping." Cancer Res **64**(20): 7271-8.

118- Jacob, N. K., et al. (2003). "Generation of telomeric G strand overhangs involves both G and C strand cleavage." Mol Cell **11**(4): 1021-32.

119- Jacob, N. K., et al. (2001). "G-overhang dynamics at Tetrahymena telomeres." Embo J **20**(15): 4299-308.

120- Jalal, S. M., et al. (2003). "Utility of subtelomeric fluorescent DNA probes for detection of chromosome anomalies in 425 patients." Genet Med **5**(1): 28-34.

121- Kakuo, S., et al. (1999). "Human is a unique species among primates in terms of telomere length." Biochem Biophys Res Commun **263**(2): 308-14.

122- Kanaori, K., et al. (2001). "Multiple four-stranded conformations of human telomere sequence d(CCCTAA) in solution." Nucleic Acids Res **29**(3): 831-40.

123- Kanaya, T., et al. (2000). "Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription." Clin Cancer Res **6**(4): 1239-47.

124- Karlseder, J., et al. (1999). "p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2." Science **283**(5406): 1321-5.

125- Karlseder, J., et al. (2004). "The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response." PLoS Biol **2**(8): E240.

126- Karlseder, J., et al. (2002). "Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss." Science **295**(5564): 2446-9.

127- Kelleher, C., et al. (2005). "Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro." Mol Cell Biol **25**(2): 808-18.

128- Kerwin, S. M. (2000). "G-Quadruplex DNA as a target for drug design." Curr Pharm Des **6**(4): 441-78.

129- Khakhar, R. R., et al. (2003). "RecQ helicases: multiple roles in genome maintenance." Trends Cell Biol **13**(9): 493-501.

130- Kim, M. Y., et al. (2002). "Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex." J Am Chem Soc **124**(10): 2098-9.

131- Kim, N. W., et al. (1994). "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer." Science **266**(5193): 2011-5.

132- Kim, S. H., et al. (2004). "TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres." J Biol Chem **279**(42): 43799-804.

133- Kim, S. H., et al. (1999). "TIN2, a new regulator of telomere length in human cells." Nat Genet **23**(4): 405-12.

134- Kishi, S. and K. P. Lu (2002). "A critical role for Pin2/TRF1 in ATM-dependent regulation. Inhibition of Pin2/TRF1 function complements telomere shortening, radiosensitivity, and the G(2)/M checkpoint defect of ataxia-telangiectasia cells." J Biol Chem **277**(9): 7420-9.

135- Kishi, S., et al. (2001). "Telomeric protein Pin2/TRF1 as an important ATM target in response to double strand DNA breaks." J Biol Chem **276**(31): 29282-91.

136- Konig, P., et al. (1998). "Sequence-specific DNA recognition by the myb-like domain of the human telomere binding protein TRF1: a model for the protein-DNA complex." Nucleic Acids Res **26**(7): 1731-40.

137- Konig, P., et al. (1996). "The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA." Cell **85**(1): 125-36.

138- Kowalczykowski, S. C., et al. (1994). "Biochemistry of homologous recombination in Escherichia coli." Microbiol Rev **58**(3): 401-65.

139- Kurumizaka, H., et al. (2002). "Homologous pairing and ring and filament structure formation activities of the human Xrcc2*Rad51D complex." J Biol Chem **277**(16): 14315-20.

140- Lacroix, L., et al. (2000). "Identification of two human nuclear proteins that recognise the cytosine-rich strand of human telomeres in vitro." Nucleic Acids Res **28**(7): 1564-75.

141- Lee, H. W., et al. (1998). "Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs." Nature **392**(6676): 569-74.

142- Lee, J. Y., et al. (2005). "Extreme conformational diversity in human telomeric DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 18938-43.

143- Legassie, J. D. and M. B. Jarstfer (2006). "The unmasking of telomerase." Structure **14**(11): 1603-9.

144- Lei, M., et al. (2004). "Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection." Nat Struct Mol Biol **11**(12): 1223-9.

145- Lei, M., et al. (2005). "Switching human telomerase on and off with hPOT1 protein in vitro." J Biol Chem **280**(21): 20449-56.

146- Leroy, J. L., et al. (1993). "Acid multimers of oligodeoxycytidine strands: stoichiometry, base-pair characterization, and proton exchange properties." Biochemistry **32**(23): 6019-31.

147- Li, B. and T. de Lange (2003). "Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres." Mol Biol Cell **14**(12): 5060-8.

148- Li, B., et al. (2000). "Identification of human Rap1: implications for telomere evolution." Cell **101**(5): 471-83.

149- Li, X., et al. (2005). "The yeast Snm1 protein is a DNA 5'-exonuclease." DNA Repair (Amst) **4**(2): 163-70.

150- Lingner, J., et al. (1995). "Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem?" Science **269**(5230): 1533-4.

151- Lingner, J., et al. (1997). "Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase." Science **276**(5312): 561-7.

152- Liu, D., et al. (2004). "Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins." J Biol Chem **279**(49): 51338-42.

153- Liu, D., et al. (2004). "PTOP interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres." Nat Cell Biol **6**(7): 673-80.

154- Liu, Y., et al. (2004). "RAD51C is required for Holliday junction processing in mammalian cells." Science **303**(5655): 243-6.

155- Liu, Y., et al. (2007). "Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair." J Biol Chem **282**(3): 1973-9.

156- Loayza, D. and T. De Lange (2003). "POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control." Nature **423**(6943): 1013-8.

157- Loayza, D. and T. de Lange (2004). "Telomerase regulation at the telomere: a binary switch." Cell **117**(3): 279-80.

158- Loayza, D., et al. (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**(13): 13241-8.

159- Lombard, D. B. and L. Guarente (2000). "Nijmegen breakage syndrome disease protein and MRE11 at PML nuclear bodies and meiotic telomeres." Cancer Res **60**(9): 2331-4.

160- Londono-Vallejo, J. A., et al. (2004). "Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange." Cancer Res **64**(7): 2324-7.

161- Lundblad, V. (2003). "Telomere replication: an Est fest." Curr Biol **13**(11): R439-41.

162- Lundblad, V. (2003). "Telomeres: taking the measure." Nature **423**(6943): 926-7.

163- Luu, K. N., et al. (2006). "Structure of the human telomere in K+ solution: an intramolecular (3 + 1) G-quadruplex scaffold." J Am Chem Soc **128**(30): 9963-70.

164- Lyamichev, V. I., et al. (1989). "An unusual DNA structure detected in a telomeric sequence under superhelical stress and at low pH." Nature **339**(6226): 634-7.

165- Ma, Y., et al. (2002). "Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination." Cell **108**(6): 781-94.

166- Ma, Y., et al. (2005). "The Artemis:DNA-PKcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps." DNA Repair (Amst) **4**(7): 845-51.

167- Makarov, V. L., et al. (1997). "Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening." Cell **88**(5): 657-66.

168- Malkov, V. A., et al. (1993). "Protonated pyrimidine-purine-purine triplex." Nucleic Acids Res **21**(1): 105-11.

169- Marsich, E., et al. (1996). "Evidence for a HeLa nuclear protein that binds specifically to the single-stranded d(CCCTAA)n telomeric motif." Nucleic Acids Res **24**(20): 4029-33.

170- Marsich, E., et al. (1998). "Widespread presence in mammals and high binding specificity of a nuclear protein that recognises the single-stranded telomeric motif (CCCTAA)n." Eur J Biochem **258**(1): 93-9.

171- Mattern, K. A., et al. (2004). "Dynamics of protein binding to telomeres in living cells: implications for telomere structure and function." Mol Cell Biol **24**(12): 5587-94.

172- Mazin, A. V., et al. (2000). "Tailed duplex DNA is the preferred substrate for Rad51 protein-mediated homologous pairing." Embo J **19**(5): 1148-56.

173- McClintock, B. (1939). "The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis." Proc Natl Acad Sci U S A **25**(8): 405-416.

174- McEachern, M. J. and E. H. Blackburn (1996). "Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in Kluyveromyces lactis lacking telomerase." Genes Dev **10**(14): 1822-34.

175- McElligott, R. and R. J. Wellinger (1997). "The terminal DNA structure of mammalian chromosomes." Embo J **16**(12): 3705-14.

176- McIlwraith, M. J. and S. C. West (2001). "The efficiency of strand invasion by Escherichia coli RecA is dependent upon the length and polarity of ssDNA tails." J Mol Biol **305**(1): 23-31.

177- Menzel, R. and M. Gellert (1983). "Regulation of the genes for E. coli DNA gyrase: homeostatic control of DNA supercoiling." Cell **34**(1): 105-13.

178- Mergny, J. L. and C. Helene (1998). "G-quadruplex DNA: a target for drug design." Nat Med **4**(12): 1366-7.

179- Miller, K. M., et al. (2006). "Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1." Nature **440**(7085): 824-8.

180- Mitchell, J. R. and K. Collins (2000). "Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase." Mol Cell **6**(2): 361-71.

181- Morin, G. B. (1989). "The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats." Cell **59**(3): 521-9.

182- Morrison, S. J., et al. (1996). "Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential." Immunity **5**(3): 207-16.

183- Moshous, D., et al. (2001). "Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency." Cell **105**(2): 177-86.

184- Muftuoglu, M., et al. (2006). "Telomere repeat binding factor 2 interacts with base excision repair proteins and stimulates DNA synthesis by DNA polymerase beta." Cancer Res **66**(1): 113-24.

185- Muller, H. J. (1938). "The remaking of chromosomes." Collecting net **8**: 182-198.

186- Munoz-Jordan, J. L., et al. (2001). "t-loops at trypanosome telomeres." Embo J **20**(3): 579-88.

187- Munoz, P., et al. (2006). "Role of the TRF2 telomeric protein in cancer and ageing." Cell Cycle **5**(7): 718-21.

188- Munoz, P., et al. (2005). "XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer." Nat Genet **37**(10): 1063-71.

189- Murti, K. G. and D. M. Prescott (1999). "Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14436-9.

190- Myung, K., et al. (2004). "Regulation of telomere length and suppression of genomic instability in human somatic cells by Ku86." Mol Cell Biol **24**(11): 5050-9.

191- Nabetani, A., et al. (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**(24): 25849-57.

192- Nakamura, M., et al. (2001). "A specific interaction between the telomeric protein Pin2/TRF1 and the mitotic spindle." Curr Biol **11**(19): 1512-6.

193- Nakamura, T. M., et al. (1997). "Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human." Science **277**(5328): 955-9.

194- Natarajan, S. and M. J. McEachern (2002). "Recombinational telomere elongation promoted by DNA circles." Mol Cell Biol **22**(13): 4512-21.

195- Neidle, S. and G. N. Parkinson (2003). "The structure of telomeric DNA." Curr Opin Struct Biol **13**(3): 275-83.

196- Neumann, A. A. and R. R. Reddel (2002). "Telomere maintenance and cancer -- look, no telomerase." Nat Rev Cancer **2**(11): 879-84.

197- Nikitina, T. and C. L. Woodcock (2004). "Closed chromatin loops at the ends of chromosomes." J Cell Biol **166**(2): 161-5.

198- Ning, Y., et al. (2003). "Telomere length and the expression of natural telomeric genes in human fibroblasts." Hum Mol Genet **12**(11): 1329-36.

199- Nishikawa, T., et al. (1998). "Solution structure of the DNA-binding domain of human telomeric protein, hTRF1." Structure **6**(8): 1057-65.

200- Nishikawa, T., et al. (2001). "Structure of the DNA-binding domain of human telomeric protein, TRF1 and its interaction with telomeric DNA." Nucleic Acids Res Suppl(1): 273-4.

201- Noirot, P. and R. D. Kolodner (1998). "DNA strand invasion promoted by Escherichia coli RecT protein." J Biol Chem **273**(20): 12274-80.

202- Nugent, C. I. and V. Lundblad (1998). "The telomerase reverse transcriptase: components and regulation." Genes Dev **12**(8): 1073-85.

203- O'Connor, M. S., et al. (2004). "The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length." J Biol Chem **279**(27): 28585-91.

204- O'Connor, M. S., et al. (2006). "A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(32): 11874-9.

205- Oganesian, L. and T. M. Bryan (2007). "Physiological relevance of telomeric G-quadruplex formation: a potential drug target." Bioessays **29**(2): 155-65.

206- Ohi, R., et al. (1994). "The Schizosaccharomyces pombe cdc5+ gene encodes an essential protein with homology to c-Myb." Embo J **13**(2): 471-83.

207- Ohki, R. and F. Ishikawa (2004). "Telomere-bound TRF1 and TRF2 stall the replication fork at telomeric repeats." Nucleic Acids Res **32**(5): 1627-37.

208- Ohki, R., et al. (2001). "In vitro reconstitution of the end replication problem." Mol Cell Biol **21**(17): 5753-66.

209- Okabe, J., et al. (2000). "TRF1 is a critical trans-acting factor required for de novo telomere formation in human cells." Hum Mol Genet **9**(18): 2639-50.

210- 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**(1): 181-90.

211- Opresko, P. L., et al. (2004). "Junction of RecQ helicase biochemistry and human disease." J Biol Chem **279**(18): 18099-102.

212- Opresko, P. L., et al. (2005). "Oxidative damage in telomeric DNA disrupts recognition by TRF1 and TRF2." Nucleic Acids Res **33**(4): 1230-9.

213- Opresko, P. L., et al. (2004). "The Werner syndrome helicase and exonuclease cooperate to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2." Mol Cell **14**(6): 763-74.

214- Opresko, P. L., et al. (2002). "Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases." J Biol Chem **277**(43): 41110-9.

215- Ourliac-Garnier, I., et al. (2005). "Cross-links of quadruplex structures from human telomeric DNA by dinuclear platinum complexes show the flexibility of both structures." Biochemistry **44**(31): 10620-34.

216- Paeschke, K., et al. (2005). "Telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures in vivo." Nat Struct Mol Biol **12**(10): 847-54.

217- Pannicke, U., et al. (2004). "Functional and biochemical dissection of the structure-specific nuclease ARTEMIS." Embo J **23**(9): 1987-97.

218- Panyutin, I. G. and P. Hsieh (1994). "The kinetics of spontaneous DNA branch migration." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 2021-5.

219- Pardue, M. L., et al. (2005). "Two retrotransposons maintain telomeres in Drosophila." Chromosome Res **13**(5): 443-53.

220- Parkinson, G. N., et al. (2002). "Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA." Nature **417**(6891): 876-80.

221- Patel, D. J. (2002). "Structural biology: a molecular propeller." Nature **417**(6891): 807-8.

222- Paull, T. T. and M. Gellert (1998). "The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks." Mol Cell **1**(7): 969-79.

223- Pennarun, G., et al. (2005). "Apoptosis related to telomere instability and cell cycle alterations in human glioma cells treated by new highly selective G-quadruplex ligands." Oncogene **24**(18): 2917-28.

224- Phan, A. T., et al. (2000). "The solution structure and internal motions of a fragment of the cytidine-rich strand of the human telomere." J Mol Biol **299**(1): 123-44.

225- Poinsignon, C., et al. (2004). "The metallo-beta-lactamase/beta-CASP domain of Artemis constitutes the catalytic core for V(D)J recombination." J Exp Med **199**(3): 315-21.

226- Polonskaya, Z., et al. (2004). "Role for a region of helically unstable DNA within the Epstein-Barr virus latent cycle origin of DNA replication oriP in origin function." Virology **328**(2): 282-91.

227- Postow, L., et al. (2001). "Topological challenges to DNA replication: conformations at the fork." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8219-26.

228- Riballo, E., et al. (2004). "A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci." Mol Cell **16**(5): 715-24.

229- Riha, K., et al. (2006). "The role of the nonhomologous end-joining DNA double-strand break repair pathway in telomere biology." Annu Rev Genet **40**: 237-77.

230- Riou, J. F., et al. (2003). "[G-quadruplex DNA: myth or reality?]." Bull Cancer **90**(4): 305-13.

231- Rodier, F., et al. (2005). "Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance." Int J Biochem Cell Biol **37**(5): 977-90.

232- Rooney, S., et al. (2003). "Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells." J Exp Med **197**(5): 553-65.

233- Rosu, F., et al. (2003). "Telomestatin-induced stabilization of the human telomeric DNA quadruplex monitored by electrospray mass spectrometry." Chem Commun (Camb)(21): 2702-3.

234- Rujan, I. N., et al. (2005). "Vertebrate telomere repeat DNAs favor external loop propeller quadruplex structures in the presence of high concentrations of potassium." Nucleic Acids Res **33**(6): 2022-31.

235- Samper, E., et al. (2000). "Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang." EMBO Rep **1**(3): 244-52.

236- Sarin, K. Y., et al. (2005). "Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells." Nature **436**(7053): 1048-52.

237- Schaffitzel, C., et al. (2001). "In vitro generated antibodies specific for telomeric guanine-quadruplex DNA react with Stylonychia lemnae macronuclei." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(15): 8572-7.

238- Schramke, V., et al. (2004). "RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends." Nat Genet **36**(1): 46-54.

239- Seeler, J. S. and A. Dejean (1999). "The PML nuclear bodies: actors or extras?" Curr Opin Genet Dev **9**(3): 362-7.

240- Sfeir, A. J., et al. (2005). "Telomere-end processing the terminal nucleotides of human chromosomes." Mol Cell **18**(1): 131-8.

241- Sfeir, A. J., et al. (2005). "Fine-tuning the chromosome ends: the last base of human telomeres." Cell Cycle **4**(11): 1467-70.

242- Shammas, M. A., et al. (2004). "Telomerase inhibition and cell growth arrest after telomestatin treatment in multiple myeloma." Clin Cancer Res **10**(2): 770-6.

243- Shay, J. W. and W. E. Wright (2007). "Hallmarks of telomeres in ageing research." J Pathol **211**(2): 114-23.

244- Smith, S. and T. de Lange (2000). "Tankyrase promotes telomere elongation in human cells." Curr Biol **10**(20): 1299-302.

245- Smith, S., et al. (1998). "Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres." Science **282**(5393): 1484-7.

246- Smogorzewska, A. and T. de Lange (2004). "Regulation of telomerase by telomeric proteins." Annu Rev Biochem **73**: 177-208.

247- Smogorzewska, A., et al. (2002). "DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2." Curr Biol **12**(19): 1635-44.

248- Smogorzewska, A., et al. (2000). "Control of human telomere length by TRF1 and TRF2." Mol Cell Biol **20**(5): 1659-68.

249- Song, K., et al. (2000). "Interaction of human Ku70 with TRF2." FEBS Lett **481**(1): 81-5.

250- Stansel, R. M., et al. (2001). "T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang." Embo J **20**(19): 5532-40.

251- Steinert, S., et al. (2002). "Telomere biology and cellular aging in nonhuman primate cells." Exp Cell Res **272**(2): 146-52.

252- Stewart, S. A., et al. (2003). "Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence." Nat Genet **33**(4): 492-6.

253- Stewart, S. A., et al. (2002). "Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 12606-11.

254- Sun, H., et al. (2001). "A human nuclease specific for G4 DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12444-9.

255- Sundquist, W. I. and A. Klug (1989). "Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops." Nature **342**(6251): 825-9.

256- Tahara, H., et al. (1995). "Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions." Clin Cancer Res **1**(11): 1245-51.

257- Tahara, H., et al. (2006). "G-Quadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells." Oncogene **25**(13): 1955-66.

258- Takai, H., et al. (2003). "DNA damage foci at dysfunctional telomeres." Curr Biol **13**(17): 1549-56.

259- Takakura, M., et al. (1999). "Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells." Cancer Res **59**(3): 551-7.

260- Tanaka, H., et al. (2005). "DNA damage-induced phosphorylation of the human telomere-associated protein TRF2." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(43): 15539-44.

261- Tarsounas, M., et al. (2004). "Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein." Cell **117**(3): 337-47.

262- Taylor, R. S., et al. (1996). "Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin conditions." J Invest Dermatol **106**(4): 759-65.

263- Teixeira, M. T., et al. (2004). "Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states." Cell **117**(3): 323-35.

264- Ten Hagen, K. G., et al. (1990). "Replication timing of DNA sequences associated with human centromeres and telomeres." Mol Cell Biol **10**(12): 6348-55.

265- Tesmer, V. M., et al. (1999). "Two inactive fragments of the integral RNA cooperate to assemble active telomerase with the human protein catalytic subunit (hTERT) in vitro." Mol Cell Biol **19**(9): 6207-16.

266- Tokutake, Y., et al. (1998). "Extra-chromosomal telomere repeat DNA in telomerase-negative immortalized cell lines." Biochem Biophys Res Commun **247**(3): 765-72.

267- Tomaska, L., et al. (2004). "Taz1 binding to a fission yeast model telomere: formation of telomeric loops and higher order structures." J Biol Chem **279**(49): 50764-72.

268- Tomita, K., et al. (2003). "Competition between the Rad50 complex and the Ku heterodimer reveals a role for Exo1 in processing double-strand breaks but not telomeres." Mol Cell Biol **23**(15): 5186-97.

269- Tse-Dinh, Y. C. (1985). "Regulation of the Escherichia coli DNA topoisomerase I gene by DNA supercoiling." Nucleic Acids Res **13**(13): 4751-63.

270- Valenzuela, M. S. and R. B. Inman (1975). "Visualization of a novel junction in bacteriophage lambda DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(8): 3024-8.

271- van Karnebeek, C. D., et al. (2002). "Further delineation of the chromosome 14q terminal deletion syndrome." Am J Med Genet **110**(1): 65-72.

272- van Overbeek, M. and T. de Lange (2006). "Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase." Curr Biol **16**(13): 1295-302.

273- van Steensel, B. and T. de Lange (1997). "Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1." Nature **385**(6618): 740-3.

274- van Steensel, B., et al. (1998). "TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions." Cell **92**(3): 401-13.

275- Veldman, T., et al. (2004). "Loss of hPot1 function leads to telomere instability and a cut-like phenotype." Curr Biol **14**(24): 2264-70.

276- Venkatesan, R. N. and C. Price (1998). "Telomerase expression in chickens: constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14763-8.

277- Verdun, R. E. and J. Karlseder (2006). "The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres." Cell **127**(4): 709-20.

278- Vinograd, J., et al. (1965). "The twisted circular form of polyoma viral DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **53**(5): 1104-11.

279- Vleck, C. M., et al. (2003). "The natural history of telomeres: tools for aging animals and exploring the aging process." Exp Gerontol **38**(7): 791-5.

280- Voloshin, O. N., et al. (1992). "An eclectic DNA structure adopted by human telomeric sequence under superhelical stress and low pH." J Biomol Struct Dyn **9**(4): 643-52.

281- von Zglinicki, T. (2002). "Oxidative stress shortens telomeres." Trends Biochem Sci **27**(7): 339-44.

282- Vorlickova, M., et al. (2005). "Guanine tetraplex topology of human telomere DNA is governed by the number of (TTAGGG) repeats." Nucleic Acids Res **33**(18): 5851-60.

283- Wang, F., et al. (2007). "The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor." Nature **445**(7127): 506-10.

284- Wang, J., et al. (2005). "Artemis deficiency confers a DNA double-strand break repair defect and Artemis phosphorylation status is altered by DNA damage and cell cycle progression." DNA Repair (Amst) **4**(5): 556-70.

285- Wang, R. C., et al. (2004). "Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres." Cell **119**(3): 355-68.

286- Wang, Y. and D. J. Patel (1993). "Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex." Structure **1**(4): 263-82.

287- Watson, J. D. (1972). "Origin of concatemeric T7 DNA." Nat New Biol **239**(94): 197-201.

288- Wellinger, R. J. and D. Sen (1997). "The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes." Eur J Cancer **33**(5): 735-49.

289- Weng, N. P., et al. (1997). "Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(20): 10827-32.

290- Wenz, C., et al. (2001). "Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules." Embo J **20**(13): 3526-34.

291- White, M. F., et al. (1997). "Recognition and manipulation of branched DNA structure by junction-resolving enzymes." J Mol Biol **269**(5): 647-64.

292- Wick, M., et al. (1999). "Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT)." Gene **232**(1): 97-106.

293- Williamson, J. R., et al. (1989). "Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model." Cell **59**(5): 871-80.

294- Wong, K. K., et al. (2003). "Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing." Nature **421**(6923): 643-8.

295- Wood, J. G. and D. A. Sinclair (2002). "TPE or not TPE? It's no longer a question." Trends Pharmacol Sci **23**(1): 1-4.

296- Wright, W. E., et al. (1997). "Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end." Genes Dev **11**(21): 2801-9.

297- Wu, G., et al. (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**(39): 30618-22.

298- Wu, L., et al. (2006). "Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres." Cell **126**(1): 49-62.

299- Wu, Y., et al. (2007). "XPF with mutations in its conserved nuclease domain is defective in DNA repair but functions in TRF2-mediated telomere shortening." DNA Repair (Amst) **6**(2): 157-66.

300- Xin, H., et al. (2007). "TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase." Nature **445**(7127): 559-62.

301- Xu, D., et al. (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**(7): 3826-31.

302- Yanez, G. H., et al. (2005). "DNA structure-dependent recruitment of telomeric proteins to single-stranded/double-stranded DNA junctions." Biochem Biophys Res Commun **328**(1): 49-56.

303- Yang, Q., et al. (2005). "POT1 and TRF2 cooperate to maintain telomeric integrity." Mol Cell Biol **25**(3): 1070-80.

304- Yasumoto, S., et al. (1996). "Telomerase activity in normal human epithelial cells." Oncogene **13**(2): 433-9.

305- Ye, J. Z. and T. de Lange (2004). "TIN2 is a tankyrase 1 PARP modulator in the TRF1 telomere length control complex." Nat Genet **36**(6): 618-23.

306- Ye, J. Z., et al. (2004). "TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres." J Biol Chem **279**(45): 47264-71.

307- Ye, J. Z., et al. (2004). "POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex." Genes Dev **18**(14): 1649-54.

308- Yeager, T. R., et al. (1999). "Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body." Cancer Res **59**(17): 4175-9.

309- Yi, X., et al. (1999). "Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels." Mol Cell Biol **19**(6): 3989-97.

310- Yoshimura, S. H., et al. (2004). "Molecular mechanisms of DNA end-loop formation by TRF2." Genes Cells **9**(3): 205-18.

311- Yuan, X., et al. (1999). "Presence of telomeric G-strand tails in the telomerase catalytic subunit TERT knockout mice." Genes Cells **4**(10): 563-72.

312- Zaug, A. J., et al. (2005). "Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(31): 10864-9.

313- Zein, S. S. and S. D. Levene (2005). "Structural aspects of RecA-dependent homologous strand exchange involving human telomeric DNA." Biochemistry **44**(12): 4817-28.

314- Zhang, H. (2007). "Molecular signaling and genetic pathways of senescence: Its role in tumorigenesis and aging." J Cell Physiol **210**(3): 567-74.

315- Zhou, X. Z. and K. P. Lu (2001). "The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor." Cell **107**(3): 347-59.

316- Zhou, X. Z., et al. (2003). "Role of Pin2/TRF1 in telomere maintenance and cell cycle control." J Cell Biochem **89**(1): 19-37.

317- Zhu, X. D., et al. (2000). "Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres." Nat Genet **25**(3): 347-52.

318- Zhu, X. D., et al. (2003). "ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes." Mol Cell **12**(6): 1489-98.

319- Zimmermann, S. and U. M. Martens (2007). "Telomeres and telomerase as targets for cancer therapy." Cell Mol Life Sci.

Dynamique et régulation des assemblages nucléoprotéiques des télomères humains : Fonctions de la protéine TRF2.

RESUME en français :
La protéine TRF2 est une protéine clé dans la dynamique des télomères, ces structures nucléoprotéiques présentes à l'extrémité des chromosomes linéaires et responsables de leur protection. Bien que la manière dont les télomères s'organisent pour protéger l'ADN soit encore méconnue, il a été montré récemment que TRF2 est à l'origine de la formation d'une structure en boucle, ou boucle télomérique qui empêcherait les extrémités télomériques d'être reconnus comme des coupures double brin. Un modèle propose que TRF2 permette la formation de cette boucle en induisant l'invasion du simple brin télomérique terminal à l'intérieur de la séquence double brin après repliement du télomère sur lui même. Les études réalisées lors de cette thèse montrent que TRF2 est en mesure de stimuler l'invasion télomérique de manière indirecte facilitant l'ouverture de la double hélice grâce à des modifications d'ordre topologique de l'ADN cible. Par ailleurs, les travaux réalisés mettent également en évidence un second mode de fixation à l'ADN de TRF2, par l'intermédiaire de son domaine N-terminal qui possède une affinité remarquable pour la structure des jonctions de Holliday. La dernière partie de cette thèse met en évidence l'activité 5' exonucléase d'une nouvelle protéine télomérique, la protéine Apollon, qui serait impliquée dans la protection des télomères. Tous ces résultats participent à une meilleure compréhension du fonctionnement de TRF2 sur les télomères et en particulier de son rôle dans la formation de la boucle télomérique.
Mots-clés : Télomères, TRF2, boucle T, invasion télomérique, topologie, jonction de Holliday, Apollon.

Function of TRF2 in the assembly of human telomere

RESUME en anglais
TRF2 is a key protein in the dynamic of telomere, these regions at the end of linear chromosomes that protect and stabilize chromosome ends. Telomeres can fold into t-loops that were proposed to result from the invasion of the 3' overhang of telomeres into duplex DNA. Their formation is facilitated in vitro by the telomeric protein TRF2, but very little is known regarding the mechanisms involved. We reveal that TRF2 generates positive supercoiling and condenses DNA. Using a variety of TRF2 mutants, we demonstrated a strong correlation between this topological activity and the ability to stimulate strand invasion. We propose that TRF2 complexes, by wrapping DNA around themselves in a right-handed manner induce untwisting of the neighboring DNA, thereby favoring strand invasion. In addition, we demonstrate that the N-terminal domain of TRF2 is a second DNA binding domain which posesses a strong affinity a the Holliday Junction structure. The last part of this thesis reports the identification of the 5' exonuclease activity of Apollo, a new telomeric protein involved in telomeric protection. The results presented give fresh insight in new TRF2 functions that have many implications in telomere biology and in particular the role of TRF2 in t-loop formation.
KEY Words: Telomere, TRF2, t-loop, telomeric invasion, topology, Holliday junction, Apollo.

DISCIPLINE - SPECIALITE DOCTORALE : Aspect moléculaire et cellulaire de la biologie.

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE :
- Centre de Biophysique Moléculaire - CNRS Rue Charles-Sadron 45071 Orleans Cedex 2.
- Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule **UMR 5239** – ENS Lyon, 46 Allée d'Italie 69364 Lyon cedex 07
- Laboratoire Joliot-Curie - E.N.S Lyon, 46, allée d'Italie 69364 Lyon Cedex 07