



HAL
open science

Rôle de protéines de la réparation des cassures double brin dans l'homéostasie télomérique chez *Arabidopsis thaliana*

Jean-Baptiste Vannier

► **To cite this version:**

Jean-Baptiste Vannier. Rôle de protéines de la réparation des cassures double brin dans l'homéostasie télomérique chez *Arabidopsis thaliana*. Génétique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2009. Français. NNT : 2009CLF21911 . tel-00725958

HAL Id: tel-00725958

<https://theses.hal.science/tel-00725958>

Submitted on 28 Aug 2012

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.

ÉCOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
Numéro d'ordre : E.D.495

Thèse

Présentée à l'Université Blaise Pascal
pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITÉ
(Spécialité : Physiologie et Génétique Moléculaires)

Soutenue le 23 janvier 2009

Jean-Baptiste VANNIER

**RÔLE DE PROTÉINES DE LA RÉPARATION
DES CASSURES DOUBLE BRIN
DANS L'HOMÉOSTASIE TÉLOMÉRIQUE
CHEZ *ARABIDOPSIS THALIANA***

Président : Pr. Georges Picard, Université Blaise Pascale, Aubière

Rapporteurs : Dr. Marie-Josèphe Giraud-Panis, Ecole Normale Supérieure, Lyon
Dr. J. Arturo Londoño-Vallejo, Institut Curie, Paris

Membres : Dr. Karel Riha, Gregor Mendel Institute, Vienne (Autriche)
Pr. Maria Eugenia Gallego, Université Blaise Pascale, Aubière

Génétique, Reproduction et Développement
U.M.R. C.N.R.S. 6247 – Clermont Université – I.N.S.E.R.M. U931
24, avenue des Landais 63177 Aubière Cedex

Remerciements

Une thèse est une longue partie de football de trois-quatre ans dans laquelle le travail en équipe va permettre de conclure de belles occasions et de gagner le match 2-0. Il y a forcément une équipe type avec un entraîneur et un capitaine mais cette équipe va être renforcée grâce aux transferts de nouveaux joueurs. Il ne faut surtout pas oublier les supporters toujours là pour encourager leur équipe ainsi que les idoles qui permettent de donner envie de jouer à ce jeu. Je tiens particulièrement à remercier chacune de ces personnes.

Tout d'abord les "arbitres" membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter l'évaluation de ce travail de thèse: José-Arturo Londono-Vallejo, Karel Riha et Marie-Josèphe Giraud-Panis.

*M. Georges Picard pour m'avoir donné envie de faire de la génétique. Je me souviendrai toujours de ce cours sur le changement de type sexuel chez *S. cerevisiae* qui m'a permis de rechercher mon premier stage en laboratoire au cours de l'année de Master I chez Benoît Arcangioli sur la dynamique du changement de type sexuel chez *S. pombe* par une approche de peignage moléculaire.*

C'est par ce geste technique "double roulette pointue" que Maria E Gallego, capitaine de l'équipe recombinaison, va m'inciter à travailler sur les télomères. Capitaine, je te remercie énormément pour ce soutien infailible pendant presque quatre ans, d'avoir eu confiance en moi et de m'avoir laissé beaucoup d'autonomie tout en étant toujours présente pour les discussions. Merci également de m'avoir laissé une grande liberté pour la vie en dehors de l'équipe et d'avoir été heureuse que je devienne Papa.

Une bonne équipe de football ne peut être coachée que par un bon entraîneur et je tiens à remercier Charles pour son soutien, sa confiance et sa disponibilité que ce soit pour les discussions et les articles. Merci de m'avoir financé pendant la rédaction du manuscrit et également d'avoir été ouvert à ma vie extra-professionnelle. Merci encore à tous les deux qui dirigez très bien votre équipe, ne changez rien.

Merci également à tous les autres joueurs de l'équipe: Annie, Fabienne, Elisabeth, Chantal, Nicole, Sam et plus particulièrement à deux recrues de choix qui sont Cyril "le Steven Gerard" de la réparation des

CDB et Simon malgré le fait qu'il vienne d'une petite équipe connue sous le nom d'OL.

Je finirai en remerciant les supporters et notamment les fans qui sont Julien, Sebich..., Punkie, Elo. Merci pour toutes ces heures de rigolades autour d'une bonne olive et d'un café-clopes, de vos doigtés délicats. Merci aux autres supporters composant les ULTRAS de BIOMOVE, ceux qui sont trop rapidement passés comme Bertrand, Bastien et Carlito et ceux qui sont encore là.

Enfin, merci à toi Calou, ma première supportrice et quand je dis supportrice c'est surtout de supporter mon caractère et notamment ces dernières semaines lors de l'écriture de la thèse. Merci de nous avoir donné cet adorable pti'bout de choux qui nous occupe bien et dont nous continuerons encore longtemps à nous occuper.

Résumé

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques spécialisées dont l'un des rôles est d'empêcher le raccourcissement progressif de l'extrémité des chromosomes suite à la réplication et l'instabilité génomique due à la recombinaison de l'extrémité de chromosomes. Malgré, le rôle des télomères dans la protection de l'extrémité des chromosomes contre les mécanismes de réparation de l'ADN et de recombinaison, de nombreuses protéines de ces voies jouent des rôles essentiels dans l'homéostasie des télomères et la stabilité des chromosomes. Parmi-elles, la protéine RAD50 appartenant au complexe MRE11/RAD50/XRS2(NBS1) et l'endonucléase structure spécifique XPF/ERCC1 sont localisées aux télomères; ces deux complexes connus pour leur rôle dans les voies de réparation de l'ADN ainsi que dans les études sur la recombinaison.

Nous avons identifié deux rôles différents pour la protéine RAD50 dans la maintenance télomérique et dans la protection des extrémités des chromosomes, en contexte de présence et absence de la télomérase. L'absence d'AtRAD50 augmente significativement le nombre de fusions chromosomiques impliquant des télomères raccourcis. Nous proposons que ce rôle protecteur des télomères raccourcis de RAD50 est le résultat de sa fonction de contraindre la recombinaison entre chromatides soeurs et ainsi d'éviter les événements de fusions par les extrémités. Nous avons recherché le ou les mécanismes impliqué(s) dans ces événements de fusions chromosomiques chez les mutants *atrad50* en réalisant des croisements entre des plantes déficientes pour *ATRAD50* et des plantes déficientes pour des gènes codant des protéines des voies de réparation par recombinaison non-homologue et homologue.

Au contraire de la situation en cellules de mammifères, nous n'avons pas observé d'instabilité chromosomique chez les plantes mutantes correspondantes pour *XPF* (*AtRAD1*) or *ERCC1* (*AtERCC1*). Cependant, en absence de la télomérase, la mutation de l'un de ces deux gènes entraîne une augmentation précoce et significative de l'instabilité chromosomique sans accélération générale de la perte des répétitions télomériques, mais associée à la présence de fragments ADN extrachromosomiques visibles en cytologie. Une analyse intensive par FISH a permis d'identifier ces ADN comme des bras entiers spécifiques de deux chromosomes. Nos données indiquent un rôle protecteur de RAD1/ERCC1 contre l'invasion de l'ADN simple brin télomérique dans des séquences télomériques interstitielles. Le fait que les mutations de *rad1* (ou *ercc1*) augmentent dramatiquement l'instabilité chromosomique des mutants télomérase a des implications très importantes pour les modèles des rôles de la recombinaison aux télomères.

Abstract

Telomeres are the specialised nucleoprotein structures evolved to avoid progressive replicative shortening and recombinational instability of the ends of linear chromosomes. Notwithstanding this role of telomeres in "hiding" chromosome ends from DNA repair and recombination, many repair and recombination proteins play essential roles in telomere function and chromosome stability. Among these are RAD50 from MRE11/RAD50/XRS2(NBS1) complex and XPF/ERCC1 structure-specific endonuclease; both known for their essential role in DNA repair pathways and the subject of considerable interest in studies of recombination.

We identified two roles for the RAD50 protein in telomere maintenance and the protection of chromosome ends both in the presence and absence of telomerase. Absence of AtRAD50 significantly increases chromosomal fusions involving shortened telomeres. We proposed that this protective role of RAD50 protein on shortened telomeres results from its action in constraining recombination to sister chromatids and thus avoiding end-to-end interactions. We have research the mechanisms involved in chromosomal fusions in *atrad50* mutants by crosses between *ATRAD50* and different NHEJ or HR DNA repair mutants.

In contrast to the situation in mammalian cells, we observe no chromosomal instability in the corresponding plants mutated for either *XPF* (*AtRAD1*) or *ERCC1* (*AtERCC1*) orthologs. However in the absence of telomerase, mutation of either of these two genes induces a significantly earlier onset of chromosomal instability without general acceleration of telomeric repeat loss, but associated with the presence of cytologically visible extrachromosomal DNA fragments. Extensive FISH analyses show that these DNAs are broken chromosomes from two specific chromosome arms. Our data thus indicate a protective role of RAD1/ERCC1 against 3' G-strand overhang invasion of interstitial telomeric repeats. The fact that the *rad1* (or *ercc1*) mutants dramatically potentiate levels of chromosome instability in telomerase mutants has important implications for models of the roles of recombination at telomeres.

Mots-clés:

Télomères, Réparation de l'ADN, Stabilité des génomes, XPF/ERCC1, MRE11/RAD50/XRS2(NBS1), *Arabidopsis thaliana*

Table des matières

RESUME	4
TABLE DES MATIERES	5
LISTE DES ABREVIATIONS	7
TABLE DES ILLUSTRATIONS	9
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	11
INTRODUCTION.....	12
CHAPITRE I.....
GENERALITES SUR LES TELOMERES	15
I.1 HISTORIQUE.....	16
I.2 L'ADN TELOMERIQUE.....	18
I.3 MECANISME DE FORMATION DE L'ADN SIMPLE BRIN TELOMERIQUE	19
I.4 STRUCTURES SECONDAIRES DES TELOMERES	21
I.4.1 La structure en boucle ou « T-loop »	21
I.4.2 Les G-quadruplex.....	23
I.5 L'ARCHITECTURE PROTEIQUE DES TELOMERES	25
I.5.1 TRF1 et TRF2	25
I.5.2 POT1/TPP1.....	29
I.5.3 TIN2.....	33
I.5.4 RAP1.....	33
I.6 LA TELOMERASE.....	34
I.6.1 TERT.....	35
I.6.2 TER.....	36
I.6.3 Différents partenaires de la télomérase.....	38
I.6.3.a EST1.....	38
I.6.3.b Dyskerin.....	39
I.6.4 Régulation de la télomérase et de la longueur des télomères.....	40
I.6.5 La télomérase et son implication dans le bien être de la cellule.....	42
I.6.5.a Vieillesse.....	42
I.6.5.b Cancer.....	44
I.6.5.c ALT.....	44
CHAPITRE II.....
TELOMERES ET MECANISMES DE REPARATION DE L'ADN	39
II.1 LES VOIES DE REPARATION DES LESIONS DE L'ADN	47
II.1.1 La recombinaison non homologue.....	47
II.1.1.a La jonction d'extrémités non-homologue (Non-Homologous End Joining, NHEJ).....	47
II.1.1.b La jonction d'extrémités dirigée par micro-homologie (Micro-homology Mediated End Joining, MMEJ).....	49
II.1.1.c La réparation des cassures simple brins (Single Strand Break Repair, SSB).....	50
II.1.2 La recombinaison homologue.....	51
II.1.2.a Les différentes voies de réparation par recombinaison homologue.....	51
II.1.2.b Les protéines identifiées dans les mécanismes de recombinaison homologue.....	53
II.2 TELOMERES NON FONCTIONNELS ET MECANISME DE REPARATION DES CDB	54
II.2.1 Signalisation de la cassure aux télomères.....	54
II.2.2 Télomères non fonctionnels.....	56
II.2.2.a Devenir des télomères déprotégés suite à la perte de la coiffe.....	57
II.2.2.b Devenir des télomères déprotégés suite à leur raccourcissement.....	59
CHAPITRE III
LES PROTEINES DE LA REPOSE AUX DOMMAGES DE L'ADN ET LEUR ROLE DANS L'HOMEOSTASIE TELOMERIQUE.....	58
III.1 LES PROTEINES DE LA SIGNALISATION DES CASSURES.....	67
III.1.1 ATM.....	67
III.1.2 RAD9.....	68
III.1.3 FANCA « Fanconi ANaemia Complementation group A »	68
III.2 LES PROTEINES DE MODIFICATION DE LA TOPOLOGIE DE L'ADN	68

III.2.1 WRN/BLM	68
III.3 LES PROTEINES DE LA RECOMBINAISON HOMOLOGUE	69
III.3.1 RAD54	69
III.3.2 RAD51D	69
III.3.3 BRCA1	70
III.4 LES PROTEINES DE LA RECOMBINAISON NON-HOMOLOGUE	70
III.4.1 Les protéines du NHEJ.....	70
III.4.1.a Hétérodimère KU	70
III.4.1.a.α Dans la régulation de la longueur des télomères.....	71
III.4.1.a.β Dans la protection des télomères.....	72
III.4.1.b ADN-PKcs	72
III.4.1.b.α Dans la régulation de la longueur des télomères.....	72
III.4.1.b.β Dans la protection des télomères.....	73
III.4.2 Les protéines du SSBR (PARP-1 et PARP-2)	73
III.5 LE COMPLEXE MRX(N) ET SON ROLE DANS L’HOMEOSTASIE TELOMERIQUE	74
III.5.1 Les protéines du complexe MRX(N).....	74
III.5.1.a Mre11	74
III.5.1.b Rad50	75
III.5.1.c Xrs2 (NBS1)	75
III.5.2 Interactions entre les différents composants du complexe MRX(N)	75
III.5.2.a Les propriétés de fixation à l'ADN du complexe MRX(N).....	76
III.5.2.b Les propriétés biochimiques du complexe MRX(N).....	76
III.5.3 Les rôles du complexe MRX.....	76
III.5.3.a Dans la réponse cellulaire suite à une CDB.....	76
III.5.3.a.α La signalisation des CDB	76
III.5.3.a.β Activation des points de contrôle du cycle cellulaire.....	78
III.5.3.b Dans les mécanismes de recombinaison.....	78
III.5.3.b.α Dans les mécanismes de recombinaison homologue.....	79
III.5.3.b.β Dans les mécanismes de recombinaison non-homologue.....	81
III.5.3.c Dans le contrôle de l’homéostasie télomérique.....	82
III.5.3.c.α De la longueur des télomères.....	82
III.5.3.c.β De la stabilité des télomères	83
III.6 LE COMPLEXE ERCC1/XPF ET SON ROLE DANS L’HOMEOSTASIE TELOMERIQUE	85
III.6.1 Les protéines du complexe ERCC1/XPF.....	85
III.6.2 Les activités biochimiques du complexe XPF/ERCC1	86
III.6.3 Les rôles du complexe XPF/ERCC1.....	87
III.6.3.a Dans la réparation par excision de nucléotides (NER).....	87
III.6.3.b Dans la recombinaison homologue	88
III.6.3.c Dans le vieillissement.....	89
III.6.3.d Dans l’homéostasie télomérique	90
DESCRIPTION DU PROJET DE THESE.....	92
RESULTATS	98
ARTICLE 1.....	99
« TWO ROLES FOR RAD50 IN TELOMERE MAINTENANCE ».....	99
RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	109
ARTICLE 2.....	116
« ERCC1/XPF PROTECTS SHORT TELOMERES FROM HOMOLOGOUS RECOMBINATION IN ARABIDOPSIS THALIANA »	116
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	152
I. LA PROTEINE ATRAD50 PROTEGE LES TELOMERES NORMAUX ET DEPROTEGES PAR DEUX MECANISMES DIFFERENTS	153
II. LE COMPLEXE ATRAD1/ERCC1 EST IMPLIQUEE DANS LA PROTECTION DES TELOMERES COURTS.....	156
III. LES PROTEINES ET LES COMPLEXES PROTEIQUES DE LA RECOMBINAISON AU NIVEAU DES TELOMERES	161
ANNEXE	163
DESCRIPTION DU PEIGNAGE MOLECULAIRE.....	163
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	167

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADN-T : ADN de Transfert
ADP : Adénosine diphosphate
ALT : « Alternative Lengthening of Telomeres »
APB : « ALT associated Promyelotic leukemia Bodies »
ARN : Acide ribonucléique
ATLD : « Ataxia Telangiectasia-Like Disorder »
ATP : Adénosine triphosphate
BER : « Base Excision repair »
BFB : « Breakage-Fusion-Bridge »
BIR : « Break Induce Replication »
CDB : Cassure Double Brin
CO-FISH : « Chromosome Orientation-Fluorescent In Situ Hybridization »
CR : « Conserved Region »
CSB : Cassure Simple Brin
D-loop : « Displacement loop »
dNTP : déoxyriboNucléotides Tri-Phosphate
DSBR : « Double Strand Break repair »
FA : *Fanconia Anemia*
GG : « Global Genome »
HhH : « Helix-haipin-Helix »
HML : « Hidden MAT Left »
HMR : « Hidden MAT Right »
HR : Homologous Recombination »
kb : kilobase
kDa : kiloDalton
L : « Lower »
MAT : « MAting Type »
MEF : « Mouse Embryonic Fibroblast »
MMEJ : « Microhomology Mediated End Joining »
NBS : « Nijmegen breakage syndrom »
NER : « Nucleotide Excision Repair »
NHEJ : « Non Homologous End Joining »
OB fold : « Oligonucleotide Binding fold »
pb : paire de bases
PCR : « Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction »
PML : « Promyelocytic leukemia »
RMN : Résonance Magnétique nucléaire
SDSA : « Synthesis Dependant Strand Annealing »
SMC : « Structural Maintenance of Chromosomes »
SMH : « Single Myb Histone »
SSA : « Single Strand Annealing »
SSBR : « Single Strand Break repair »
TIF : « Telomere Dysfunction Induced Foci »
T-loop : « Telomere-loop »
TPE : « Telomeric Position Effect »
TCR : « Transcription Coupled Repair »
TRD : « Telomere Rapid Deletion »

TRF : « Telomere Restriction Fragment »
T-SCE : « Telomere Sister Chromatid Exchange »
U : « Upper »
UV : UltraViolet
XP : *Xeroderma Pigmentosum*

Notations

Les allèles sauvages des gènes sont indiqués en caractères majuscules et en italique (*ATRAD50*).
Les allèles mutants des gènes sont indiqués en caractères minuscules et en italique (*atrad50*).
Les protéines de mammifères sont indiquées en caractères majuscules (RAD50).
Les protéines de levures sont indiquées par la première lettre en caractère majuscule (Rad50).
Les protéines d'*A. thaliana* sont indiquées par At et la première lettre de la protéine est en caractère majuscule (AtRad50).

Table des illustrations

Figures

1 : Localisation des télomères à l'extrémité des chromosomes.....	13
2 : La réplication des extrémités des chromosomes provoque le raccourcissement des télomères.....	13
3 : Modèle de formation du "G-overhang" par résection du brin C chez l'Homme.....	17
4 : Modèle de l'organisation des télomères en boucle télomérique chez l'Homme.....	18
5 : Modèle schématique d'un G-quadruplex hybride (à droite) composé de trois G-quartet.....	20
6 : Composition protéique du complexe "Shelterin" au niveau des télomères chez l'Homme et organisation des domaines de TRF1 et TRF2.....	22
7 : Organisation de la sous-unité hTERT et structure du complexe télomérase chez l'Homme.....	31
8 : Modèle de régulation du recrutement de la télomérase aux télomères par TRF1 et POT1/TPP1.....	37
9 : La sénescence et la crise sont des barrières à la prolifération cellulaire illimitée.....	40
10 : Modèle de réparation des CDB par recombinaison non homologue NHEJ chez l'Homme.....	44
11 : Modèle de réparation des CDB par recombinaison non homologue MMEJ chez <i>S. cerevisiae</i>	46
12 : Modèle de réparation des CSB par recombinaison non homologue SSBR chez les mammifères.....	47
13 : Principales voies de la recombinaison homologue.....	49
14 : Invasion d'une molécule d'ADN homologue par le nucléofilament Rad51/ADN.....	50
15 : Modèle d'activation de la voie de signalisation des dommages à l'ADN au niveau des télomères non fonctionnels.....	51
16 : Schéma de division mitotique dans une cellule présentant des télomères déprotégés et fusionnés.....	53
17 : Modèle du traitement des télomères déprotégés par l'inhibition de TRF2.....	54
18 : Modèle de résolution des T-loop par recombinaison homologue dans des cellules TRF2 Δ B.....	55
19 : Evènements de recombinaison homologue aux télomères.....	59
20 : Organisation structurale et propriétés biochimiques du complexe MRX(N).....	72
21 : Schéma des premières étapes de la signalisation des cassures à l'ADN chez la levure.....	74
22 : Changement de type sexuel chez <i>S. cerevisiae</i>	77
23 : Organisation et activité biochimique des complexes de la famille XPF/MUS81.....	82

24 : Types de substrats susceptibles d'être couper par les complexes Rad1/Rad10 de levure <i>S. cerevisiae</i> et XPF/ERCC1 chez l'Homme.....	84
25 : Schéma de la voie de réparation par excision de nucléotides (NER) chez les mammifères.....	85
26 : Modèle d'action du complexe XPF/ERCC1 au niveau des télomères.....	87
27 : Protéines impliquées dans les différentes voies de réparation des cassures de l'ADN.....	108
28 : Principe du peignage moléculaire.....	161

Tableaux

1 : Séquences des répétitions et taille des télomères chez différents organismes modèles.....	15
2 : Protéines impliquées dans la voie de réparation par NHEJ chez différents organismes modèles....	45
3 : Protéines du groupe épistatique rad52 et leurs fonctions.....	50
4 : Protéines impliquées dans la voie de réponse aux dommages de l'ADN.....	70
5 : Protéines impliquées dans la voie de réparation par excision de nucléotides (NER) chez l'Homme	84
6 : Implication de la voie NHEJ dans les fusions chromosomiques des mutants <i>atrad50</i>	108
7 : Implication des voies MMEJ (et/ou SSA) et SSBR dans les fusions chromomiques des mutants <i>atrad50</i>	109
8 : Implication des voies NHEJ/MMEJ et NHEJ/SSBR dans les fusions chromosomiques des mutants <i>atrad50</i>	110
9 : Implication des voies HR et NHEJ/SSBR/HR dans les fusions chromosomiques des mutants <i>atrad50</i>	111

Synthèse bibliographique

Introduction

Les facteurs environnementaux et les produits génotoxiques issus du métabolisme cellulaire forment une menace constante pour l'intégrité du génome. Ces produits peuvent générer des centaines de milliers de modifications sur l'ADN, dans chaque cellule et chaque jour. Parmi ces modifications, les cassures double brins (CDB) sont les plus délétères car une seule de ces lésions peut entraîner un arrêt du cycle cellulaire. Pour faire face à ces altérations, la cellule a développé de nombreux systèmes de réparation par des mécanismes de recombinaison homologue et illégitime (non homologue).

Les génomes linéaires des eucaryotes présentent une énigme très intéressante, qui est de savoir comment les extrémités des télomères ne sont pas pris en charge par les machineries de réparation des CDB. Les télomères présentent une architecture nucléotidique et protéique spécifique. Ces deux thèmes seront détaillés dans une première partie.

La désorganisation des télomères conduit à la reconnaissance des télomères non fonctionnels comme des CDB. Une deuxième partie présentera les différentes voies de réparation par recombinaison ainsi que leur implication dans la reconnaissance des télomères dysfonctionnels.

Enfin, de nombreuses protéines de ces voies de recombinaison sont elles-mêmes présentes aux télomères et aussi impliquées dans leurs régulations et leurs protections. Dans une troisième partie, le rôle de certaines de ces protéines de la reconnaissance des CDB dans l'homéostasie télomérique sera présenté. Les principaux rôles de deux complexes majeurs de la réparation par recombinaison ainsi que les quelques informations bibliographiques de leur implication dans la maintenance des télomères seront également détaillés.

L'objectif de mes travaux de thèse est donc de mieux comprendre le rôle des protéines de la recombinaison dans la régulation et la protection des télomères. Pour cela, je me suis intéressé au rôle de la protéine Rad50 du complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) ainsi qu'à

l'implication du complexe Rad1/Ercc1 dans l'homéostasie télomérique chez la plante modèle *A. thaliana* dans des contextes de télomères normaux et non fonctionnels.

Chapitre I

Généralités sur les télomères

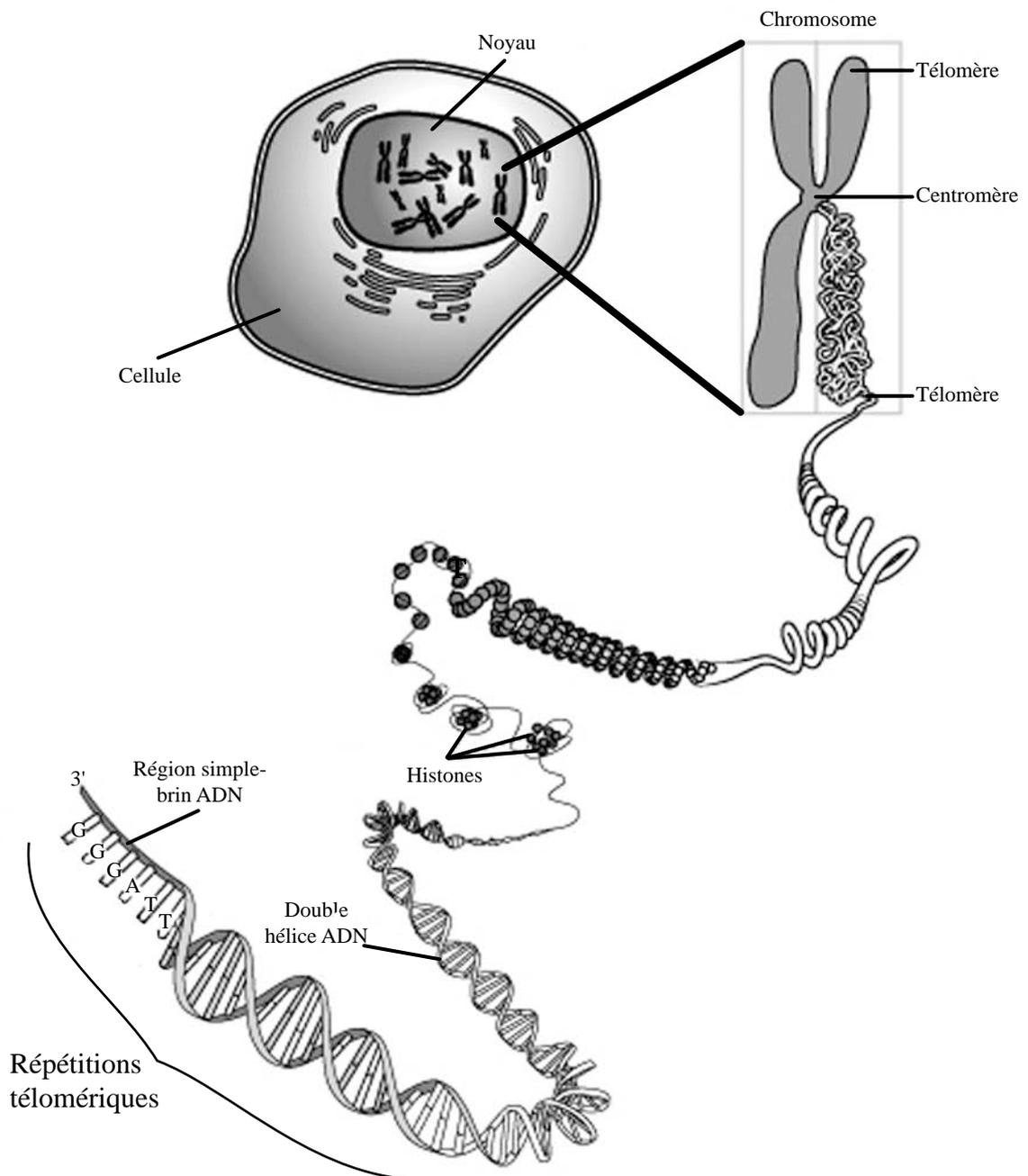


Figure 1 : Localisation des télomères à l'extrémité des chromosomes

I.1 Historique

Les extrémités des chromosomes ont été identifiées, pour la première fois dans les années 30 par Barbara McClintock (chez *Zea mays* ; McClintock, 1939) et Hermann Muller (chez *Drosophila melanogaster* ; Muller, 1938), comme étant des structures spécifiques nécessaires à la stabilité des chromosomes. Muller nomme ces structures : *telomeres*, du grec *telos* pour *fin* et *meros* pour *partie*. McClintock montre que la délétion de la partie terminale d'un chromosome entraîne des fusions chromosomiques. Il est maintenant admis que ces fusions sont au cœur d'un cycle de cassures-fusions-ponts pendant les divisions cellulaires suivantes provoquant une instabilité chromosomique délétère pour les cellules. Ces pionniers ont établi que les télomères sont essentiels pour protéger les extrémités des chromosomes (Figure 1), préserver leur stabilité et assurer la complète ségrégation du matériel génétique aux cellules filles à travers les divisions cellulaires.

Dans les années 60, Leonard Hayflick a observé que les cellules humaines en culture arrêtent de proliférer après un nombre limité de divisions cellulaires (Hayflick, 1965; Hayflick & Moorhead, 1961). Le lien entre les télomères et les observations de Hayflick a été suggéré par Alexei Olovnikov en 1973 (Olovnikov, 1973). L'auteur propose que les cellules somatiques humaines ne sont pas capables de compenser le raccourcissement progressif des chromosomes observés lors de la réplication (Figure 2), et que les cellules arrêtent de se diviser lorsque la taille des télomères devient trop petite. En effet, l'unidirectionnalité de la réplication de l'ADN impose une réplication incomplète de la fin des chromosomes, phénomène déjà observé par Watson en 1972. Olovnikov émet l'hypothèse que les télomères agiraient comme un tampon pour protéger les gènes situés en amont et que la longueur des télomères est en relation directe avec le nombre de fois que l'ADN peut être répliqué.

E. Blackburn fut la première à déterminer la séquence nucléotidique des télomères. L'analyse a été réalisée chez le cilié protozoaire *Tetrahymena termophila* dans lequel les

télomères sont composés de la répétition en tandem de la séquence CCCCAA/GGGGTT (Blackburn & Gall, 1978). Plus tard, son équipe a mis en évidence une protéine capable de synthétiser des répétitions télomériques à l'extrémité d'un plasmide linéaire : la télomérase (Greider & Blackburn, 1985).

Suite à cette découverte, Cooke et Smith ont montré que les télomères de chromosomes sexuels étaient plus longs dans des cellules germinales que dans des cellules somatiques. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que les cellules somatiques pourraient être déficientes pour la télomérase et que le raccourcissement télomérique induirait un arrêt de prolifération cellulaire : mécanisme appelé sénescence réplivative (Cooke & Smith, 1986). Le lien entre la réduction de la longueur des télomères, l'arrêt des divisions cellulaires (Counter *et al*, 1992; Harley *et al*, 1990) et "l'âge" des cellules somatiques a alors été mis en évidence (Hastie *et al*, 1990). L'augmentation artificielle et le maintien de la longueur des télomères dans des fibroblastes humains, par la surexpression de la télomérase, ont montré que ces cellules pouvaient continuer de se diviser indéfiniment (Bodnar *et al*, 1998; Vaziri & Benchimol, 1998).

Cependant, malgré ces découvertes importantes, il n'en demeure pas moins que de nombreux mystères autour des télomères et de leurs fonctions persistent. Il est envisageable à l'heure actuelle de considérer les télomères comme des structures nucléoprotéiques très importantes pour le vivant qui sont, en plus de leur fonction de protection, impliqués dans le bon fonctionnement de nombreux processus cellulaires comme la réponse aux dommages de l'ADN, la réplication et le vieillissement.

Organismes	Séquence télomérique	Taille des séquences télomériques
Unicellulaires		
<i>Tetrahymena thermophila</i>	TTGGG	250-350 pb
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TG ₍₁₋₃₎	250-350 pb
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	TTAACG ₍₁₋₈₎	250-350 pb
Pluricellulaires		
<i>Caenorhabditis elegans</i>	TTAGGC	1250-2050 pb
<i>Arabidopsis thaliana</i>	TTTAGGG	2000-9000 pb
Mammifères	TTAGGG	10-50 Kb

Tableau 1 : Séquences des répétitions et taille des télomères chez différents organismes modèles

I.2 L'ADN télomérique

Chez la plupart des eukaryotes, l'ADN télomérique est composé de blocs de séquences répétées G/C double brin qui se terminent par une courte extrémité 3' sortante simple brin appelé "G-overhang". La longueur de l'ADN télomérique varie largement d'un organisme à l'autre.

Chez les Mammifères, l'ADN télomérique est composé de blocs répétés de séquence TTAGGG couvrant environ 10 à 15 Kilobases (kb) chez l'Homme et de taille supérieure à 40 kb chez la souris (Blasco, 2005; Kim *et al*, 2002). La longueur de l'ADN simple brin sortant varie entre 50 et 200 bases (Tableau 1; McElligott & Wellinger, 1997; Wright *et al*, 1997).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la séquence d'ADN télomérique est composée d'environ 300 pb de répétitions irrégulières TG₁₋₃ avec une extrémité 3' sortante de 12 à 14 nucléotides (Larrivee *et al*, 2004).

Chez les plantes, les télomères ont été initialement caractérisés chez *Arabidopsis thaliana* et ont pour la plupart la séquence TTTAGGG (Richards & Ausubel, 1988). La longueur des télomères des plantes varie de 0,5 kb chez *Calluna Vulgaris* à 150 kb chez *Nicotiana tobacum* (Fajkus *et al*, 1995). Les télomères de plantes les plus étudiés sont ceux d'*A. thaliana*. Leur longueur varie entre 2 et 5 kb pour l'écotype Columbia, jusqu'à 9 kb pour l'écotype Cape Verde Islands (Maillet *et al*, 2006; Richards & Ausubel, 1988; Shakirov & Shippen, 2004). Certains genres de plantes ne possèdent pas la séquence type d'*A. thaliana* comme *Allium spp* (Pich *et al*, 1996; Pich & Schubert, 1998), *Aloe spp* (Adams *et al*, 2000) et *Cestrum* (Sykorova *et al*, 2003). Parmi ces plantes, *Aloe*, *Othocallis* et *Hyacinthella* présentent des télomères de séquence TTAGGG comme les vertébrés (Puizina *et al*, 2003; Weiss & Scherthan, 2002; Weiss-Schneeweiss *et al*, 2004). La séquence découverte chez *A. thaliana* n'est donc pas universelle chez les plantes et pose la question de la co-évolution entre séquence ADN et complexes protéiques pour la protection et le maintien des télomères.

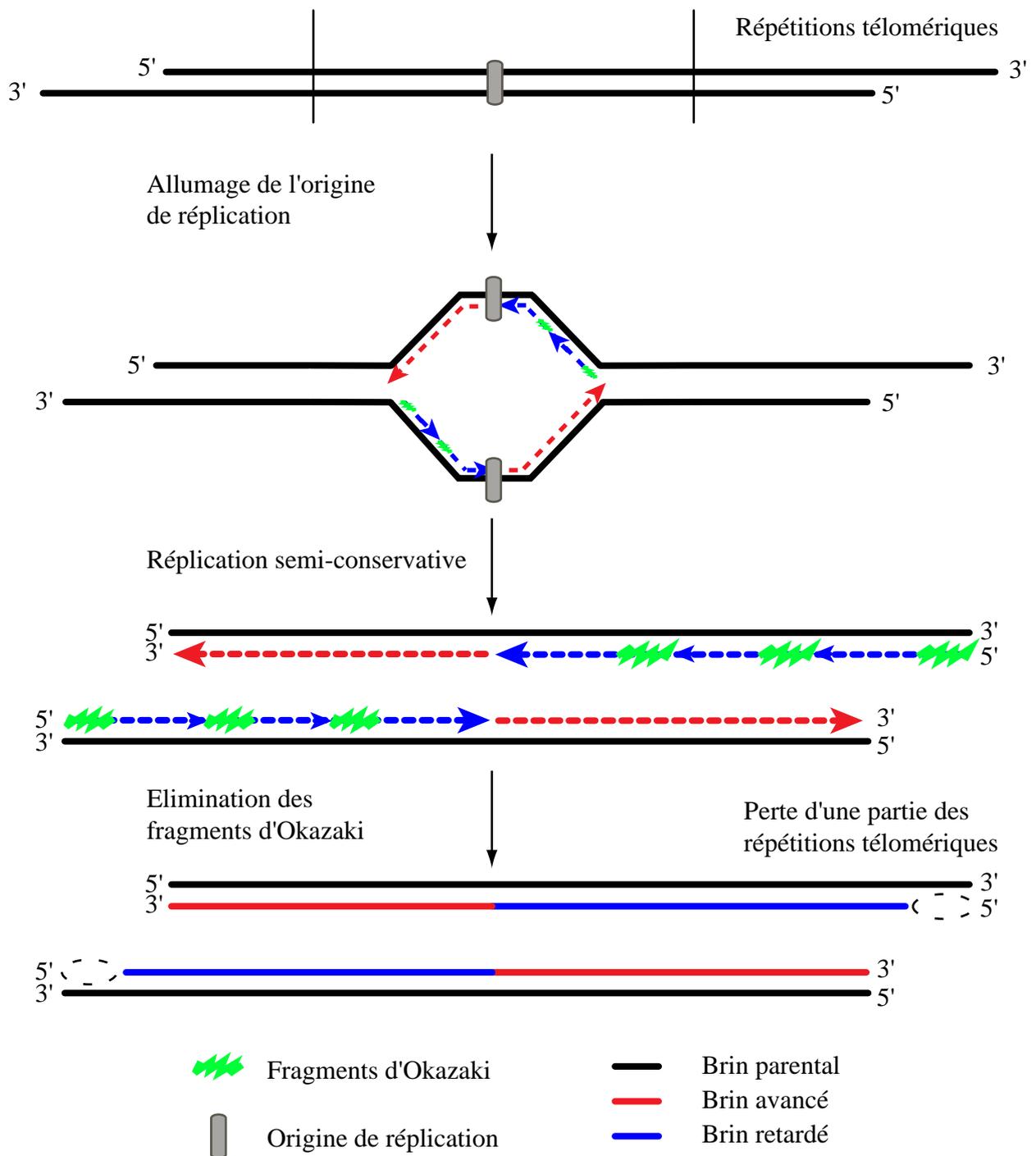


Figure 2 : La réplication des extrémités des chromosomes provoque le raccourcissement des télomères. La réplication de l'ADN commence à l'origine de réplication. Les fourches de réplication progressent par des ADN polymérase 5'→3' et contiennent un brin avancé et un brin retardé. Le brin retardé est synthétisé grâce à des matrices ARN (fragments d'Okazaki) qui seront dégradées. Le fragment ARN situé à l'extrémité du chromosome est dégradé mais non remplacé par la synthèse d'ADN car le brin parental 5' contenant la séquence homologue est trop court (d'après Hug & Lingner, 2006).

Les télomères d'*A. thaliana* et *Silene latifolia* présentent des « G-overhang » de 20 à 30 nucléotides uniquement présents sur la moitié des extrémités des chromosomes chez *S. latifolia* (Riha *et al*, 2000; Riha & Shippen, 2003b). Ceci est en accord avec le modèle conventionnel de la réplication incomplète des brins retardés selon lequel la dégradation du dernier fragment d'Okasaki produit une extrémité simple brin sur la moitié des extrémités des chromosomes (Figure 2). Très récemment le groupe de K. Riha a présenté des résultats suggérant que l'autre moitié des chromosomes se terminerait par une extrémité franche (Riha, communication oral, congrès « Telomeres and the DNA damage response 2008 »). Le nématode *Caenorhabditis elegans* présente également la particularité de posséder la moitié d'extrémités 3' simple brin sortantes (G-overhang) mais l'autre moitié étant constituée de 5' sortant (C-overhang ; Raices *et al*, 2008).

Contrairement aux autres espèces de plantes, les régions adjacentes des télomères chez *A. thaliana* ne sont pas composées de larges blocs de séquences télomériques dégénérées mais de séquences subtélomériques uniques pour 8 des 10 extrémités de chromosomes (Heacock *et al*, 2004). En ce qui concerne les deux autres régions subtélomériques, celles-ci sont composées de répétitions en tandem des gènes d'ARN ribosomique (Copenhaver & Pikaard, 1996).

I.3 Mécanisme de formation de l'ADN simple brin télomérique

Le modèle conventionnel de la réplication incomplète des brins retardés explique pourquoi la moitié des extrémités des chromosomes présentent une extrémité 3' sortante. Cependant, il a été montré que dans différentes lignées cellulaires, 80 à 100% des télomères possédaient une extrémité sortante riche en G. Les auteurs ont alors proposés un modèle dans lequel les brins 5' seraient dégradés par un mécanisme actif dépendant d'une exonucléase 5'→3' impliquée dans la dégradation de l'ADN aussi bien que des fragments ARN du brin

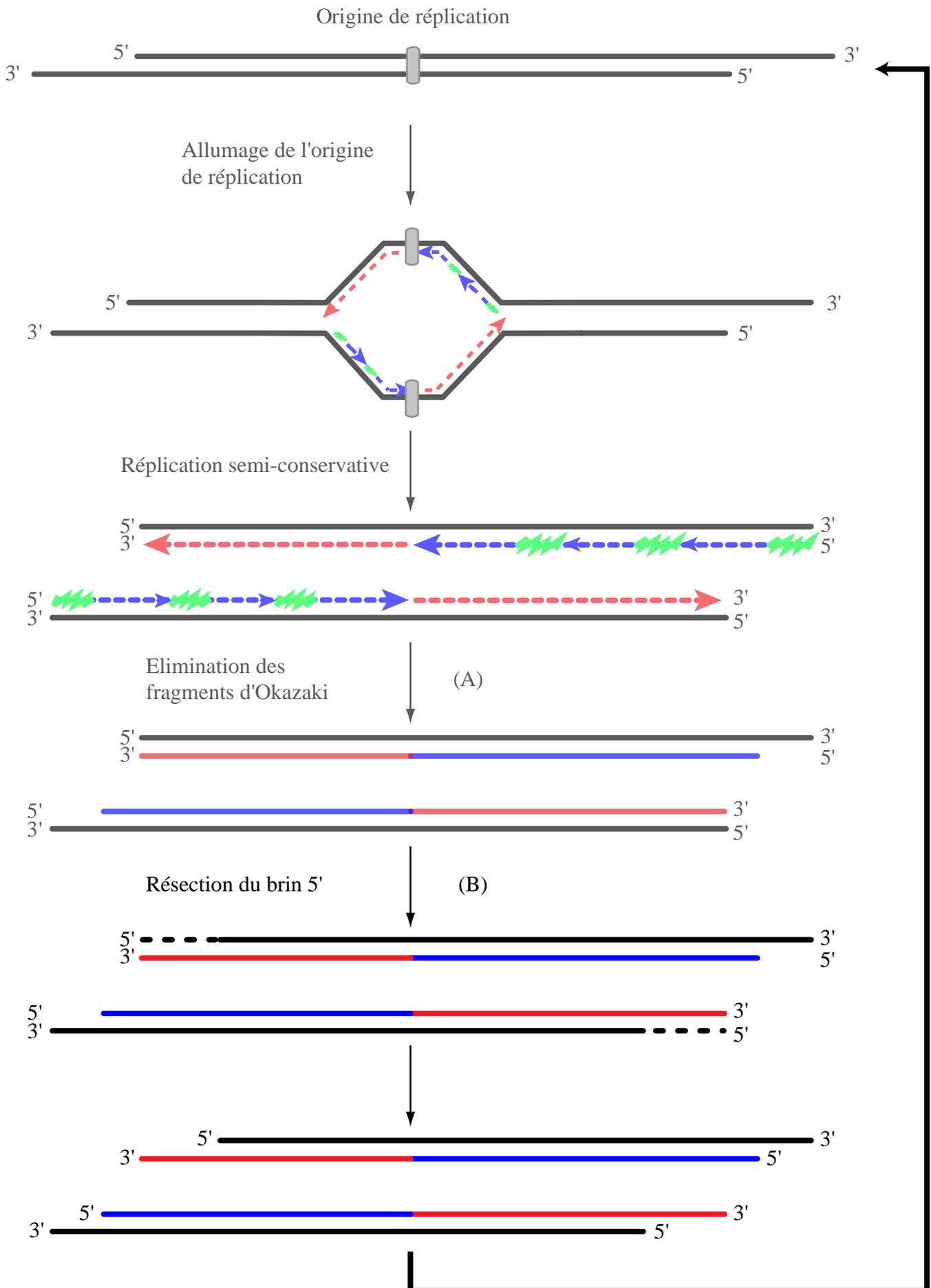


Figure 3 : Modèle de formation du "G-overhang" par résection du brin C chez l'Homme
 (A) : Selon le modèle conventionnel de raccourcissement des télomères par réplication incomplète des télomères, seul 50% des extrémités présentent un 3' sortant.
 (B) : Un mécanisme de résection en 5' des brins a été suggéré pour expliquer la présence d'une extrémité 3' sortante sur 80 à 100% des chromosomes. (d'après Hug & Lingner, 2006).

retardé (Figure 3 ; Makarov *et al*, 1997; Siegal *et al*, 1992). Le mécanisme de formation du brin 3' sortant reste actuellement incertain. Il est cependant exclu que ce soit un produit de l'action de la télomérase puisque chez *S. cerevisiae*, dans les cellules humaines et de souris, l'absence de cette protéine n'entraîne pas de variation dans la longueur de la queue sortante. Ces résultats supposent qu'un mécanisme indépendant de la télomérase entre en jeu pour générer le « G-overhang » (Hemann & Greider, 1999; Wellinger *et al*, 1996).

De plus chez l'Homme, les brins 3' riches en G sont variables en longueur (35 à 600 nucléotides) et dans la nature du dernier nucléotide alors que la majorité (80%) des brins 5' des télomères se termine par la séquence CCAATC-5'. Ces résultats suggèrent également qu'une exonucléase 5'→3' à haute spécificité pourrait agir après répllication sur la résection du brin C formant le simple brin riche en G (Jacob *et al*, 2001; Sfeir *et al*, 2005).

Récemment, il a été montré en cellules humaines que la protéine hSNM1B renommée Apollo était physiquement présente au niveau des télomères par son interaction avec TRF2, protéine se liant spécifiquement à l'ADN télomérique double brin. Apollo possède une activité exonucléasique 5'→3' et coopère avec TRF2 pour protéger les télomères contre leur reconnaissance et prise en charge par la machinerie de réparation. Apollo semble donc être un bon candidat pour contribuer à la résection du brin C (Lenain *et al*, 2006; van Overbeek & de Lange, 2006).

Une autre protéine susceptible d'être impliquée dans ce mécanisme est la protéine Exo1. En effet, cette exonucléase 5'→3' est nécessaire pour générer des ADN simples brins aux télomères déprotégés, par la perte de Ku70 chez *Schizosaccharomyces pombe* et *S. cerevisiae* et par l'absence de Cdc13 chez *S. pombe*. (Bertuch & Lundblad, 2004; Maringele & Lydall, 2002). La protéine Exo1 stimule la réponse aux dommages de l'ADN, participe à l'arrêt du cycle cellulaire et à la sénescence dans les levures déficientes pour les gènes *KU70*, *KU80*, *CDC13* et télomérase (Bertuch & Lundblad, 2004; Maringele & Lydall, 2002; Zubko

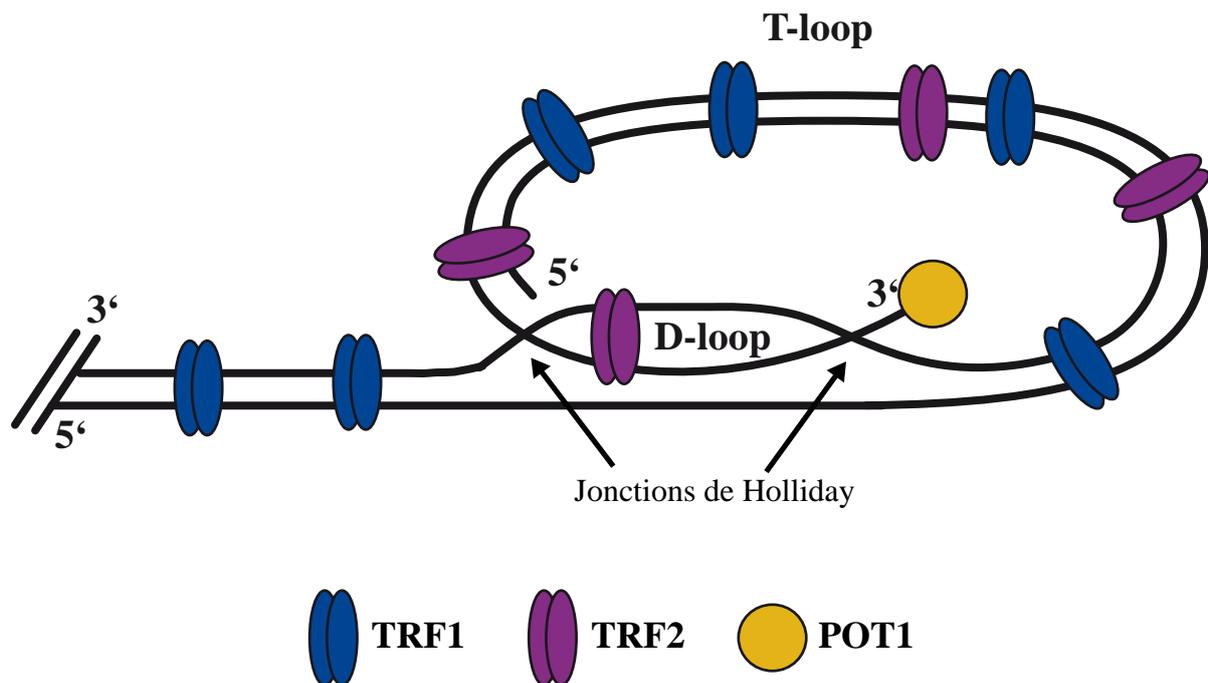


Figure 4 : Modèle de l'organisation des télomères en boucle télomérique chez l'Homme. La région double brin des télomères est recouverte des protéines TRF1 et TRF2. La protéine POT1 se fixe spécifiquement à l'extrémité simple brin. Le repliement de l'ADN sur lui-même ainsi que la présence de TRF2 permettent l'invasion de l'extrémité simple brin dans l'ADN duplex télomérique pour former la structure en boucle "T-loop". Cette invasion crée deux jonctions de Holliday produisant une boucle de déplacement "D-loop". (d'après Riha & Shippen, 2003)

et al, 2004). Ce résultat a également été observé chez la souris en contexte de télomères non fonctionnels (organisme mutant pour la télomérase ; Schaetzlein *et al*, 2007). Il est donc concevable d'imputer à EXO1 un rôle dans la physiologie des télomères bien que les mutants *exo1* présentent des télomères normaux, ceci pouvant être expliqué par la redondance génétique des exonucléases (Tsubouchi & Ogawa, 2000).

Il semblerait donc que la véritable exonucléase 5'→3' responsable de la résection du brin C pour générer les « G-overhang » reste à découvrir.

I.4 Structures secondaires des télomères

La fonction principale des télomères est la protection des extrémités des chromosomes en les empêchant d'être reconnues par la machinerie de réparation de l'ADN ou d'être dégradées par des nucléases. Des hypothèses proposant des conformations particulières de l'ADN télomérique ont été avancées pour expliquer comment cette protection pourrait être mise en place.

I.4.1 La structure en boucle ou « T-loop »

L'organisation des télomères consiste en la formation d'une boucle terminale en lasso appelé boucle télomérique « Telomere loop ou T-loop » (Figure 4). Après repliement du télomère sur lui-même, le simple brin 3' riche en G serait capable d'envahir l'ADN télomérique double brin en amont. Ces structures ont été mises en évidence par microscopie électronique d'ADN télomérique (Griffith *et al*, 1999; van Steensel *et al*, 1998). La protéine TRF2 est suffisante et nécessaire pour la formation de cette boucle. Elle favoriserait l'ouverture du double brin puis son invasion par le simple brin et stabiliserait la boucle T en se concentrant au niveau de la jonction double brin/simple brin (Amiard *et al*, 2007).

Chez l'Homme et la souris, la taille de ces boucles varie selon la taille des télomères allant de 3 kb en moyenne pour des télomères d'environ 7 kb de cellules lymphocytaires humaines à 18 kb en moyenne pour des télomères d'environ 25 kb en cellules murines (Griffith *et al*, 1999).

Ces boucles télomériques ont également été identifiées chez le cilié *Oxytrichia fallax*. Chez cet organisme les « T-loop » font entre 4,6 et 10 kb correspondant à la longueur des répétitions télomériques de ce cilié (entre 3 et 20 kb ; Murti & Prescott, 1999). Ces boucles apparaissent donc être très conservées entre les espèces au cours de l'évolution, du trypanosome (Munoz-Jordan *et al*, 2001) à l'Homme ainsi que chez le nématode *C. elegans* où ces structures secondaires, d'environ 1,7 kb pour des télomères de 10-12 kb, ont également été récemment identifiées (Raices *et al*, 2008).

En ce qui concerne le règne des végétaux, la recherche de ces boucles télomériques a été réalisée sur *Pisum sativum*. Chez cette plante, les télomères ont une taille moyenne d'environ 32,6 kb de répétitions télomériques de séquence TTTAGGG avec des boucles télomériques de 22 kb en moyenne (Cesare *et al*, 2003). La fréquence de ces boucles télomériques est faible, environ 10%, soit trois fois plus faible que dans les cellules de mammifères (Griffith *et al*, 1999). Les auteurs expliquent ce résultat par des problèmes techniques tels que l'utilisation de tissus de méristèmes apicaux et racinaires dans lesquels les cellules sont en division active. Dans ces conditions, la boucle serait relâchée pour permettre aux fourches de réplication de passer dans la région télomérique. De plus, leurs préparations de noyaux et de « T-loop » sont moins pures que celles qui sont faites à partir de cellules humaines à cause de contaminations de débris cellulaires et d'ADN non télomérique. Enfin, l'invasion de l'ADN télomérique double brin pour former la « T-loop » nécessite un simple brin 3' sortant. Or, si le pois possède la même particularité que *S. latifolia* alors seulement

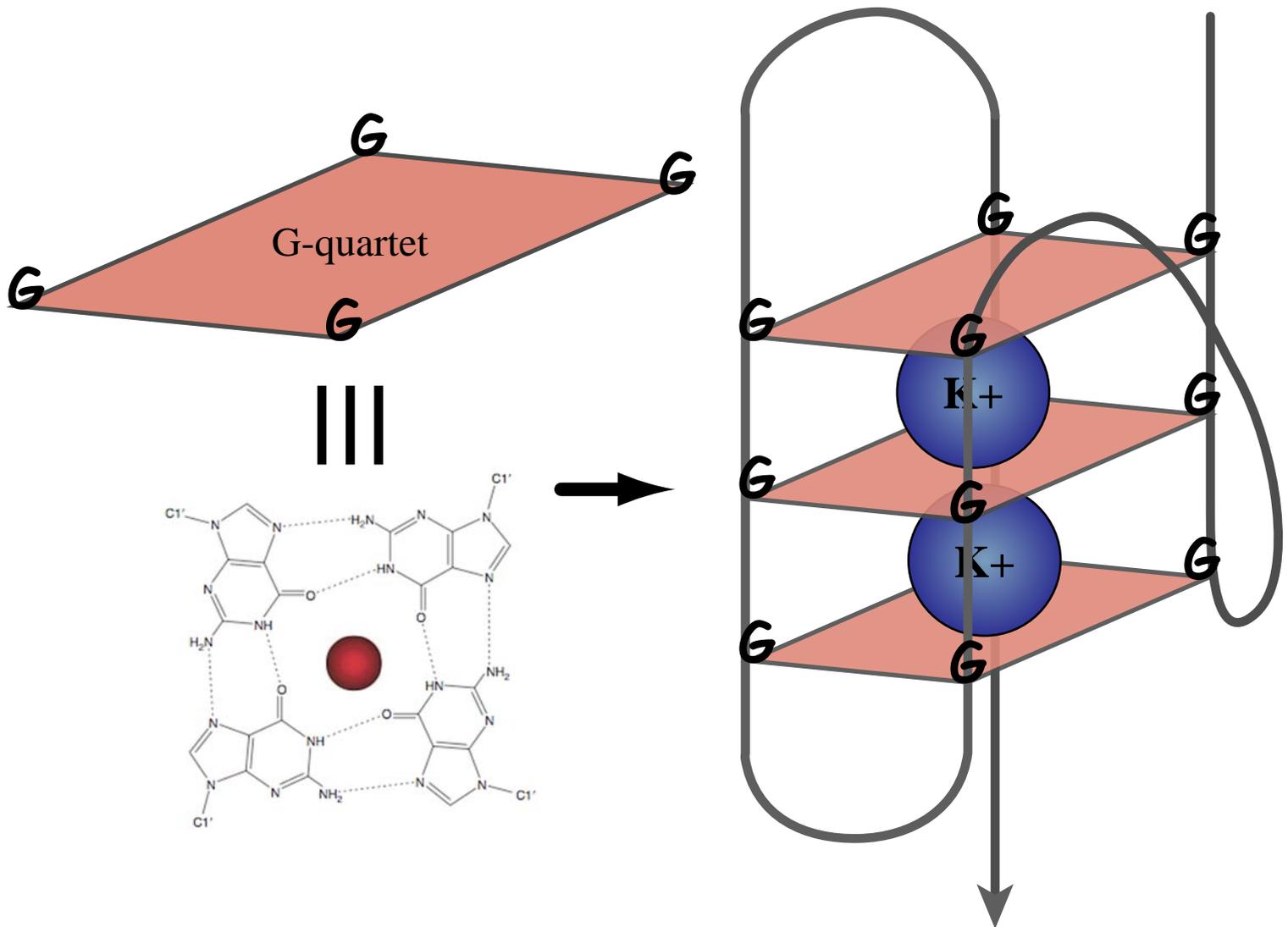


Figure 5 : Modèle schématique d'un G-quadruplex hybride (à droite) composé de trois G-quartet. L'extrémité simple brin télomérique riche en guanine peut prendre la forme d'un G-quadruplex qui consiste en un empilement de trois G-quartet stabilisé par un cation monovalent (ici K⁺). Les quatre guanines formant un G-quartet sont liées par des liaisons hydrogènes de type Hoogsteen (à gauche). (d'après Dai *et al*, 2008)

50% des extrémités présentent ce « G-overhang » ce qui réduit considérablement la présence de boucles télomériques à la fin des chromosomes.

Cette structure en boucle formée par l'invasion du 3' simple brin dans l'ADN télomérique double brin semble être bien conservée entre des organismes très éloignés sur l'échelle de l'évolution. Ces structures permettraient la protection de l'extrémité des chromosomes contre des attaques nucléasiques ou leur reconnaissance comme des CDB. Le maintien de ces boucles télomériques nécessite la présence de nombreuses interactions protéines-ADN et protéines-protéines spécifiques des télomères qui seront évoquées dans le Chapitre I.5.

I.4.2 Les G-quadruplex

Les ADN simple brin au niveau des télomères, riches en guanine, peuvent adopter une structure secondaire appelé G quadruplex (Figure 5). Celle-ci a été observée pour la première fois *in vitro*, sur des séquences télomériques humaines (Sundquist & Klug, 1989; Williamson *et al*, 1989) et par RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) d'un oligonucléotide ayant pour séquence quatre répétitions télomériques humaines (TTAGGG)₄ (Wang & Patel, 1993). Ces « G quadruplex » ou « G4 » consistent en un empilement de plusieurs G-quartets. Ceux-ci sont composés de quatre guanines organisées dans un plan cyclique et reliées par des liaisons hydrogènes de type Hoogsteen. Cette structure secondaire est stabilisée par la présence de cations potassium ou sodium (Neidle & Parkinson, 2003; Riou *et al*, 2003).

Les séquences télomériques humaines peuvent adopter *in vitro* différentes conformations en G4 en fonction de l'orientation des brins : anti-parallèle (Wang & Patel, 1993), parallèle (Parkinson *et al*, 2002) et hybride (Ambrus *et al*, 2006). De nombreux indices indirects nous indiquent que ce type de structure secondaire peut exister *in vivo* :

- la concentration physiologique intracellulaire riche en potassium,
- des protéines pouvant les couper comme la nucléase GQN1 (Sun *et al*, 2001),
- des protéines pouvant les résoudre comme les hélicases (de la famille RecQ) WRN et BLM (Riou *et al*, 2003) et
- des protéines pouvant fixer ces G quadruplex (formés à partir d'ADN ribosomal) comme la nucléoline (Hanakahi *et al*, 1999).

Enfin différents ligands pour les G-quadruplex ont été synthétisés pour inhiber l'action de la télomérase. Ils se basent sur l'effet du ligand naturel, la télomestatine, isolé chez *Streptomyces anulatus*, capable de piéger les ADN simple brin sous la forme de G-quadruplex et donc de bloquer l'accès de la télomérase à l'ADN 3' sortant (Gowan *et al*, 2001; Kim *et al*, 2002).

Chez *Escherichia coli*, la microscopie électronique a permis d'identifier une conformation en G quadruplex pendant la transcription de séquences télomériques humaines contenues sur un plasmide (Duquette *et al*, 2004). De même, l'utilisation des ligands radiomarqués stabilisant les G quadruplex aux extrémités des chromosomes humains a permis de confirmer *in vivo* l'existence de ces structures au sein des télomères (Granotier *et al*, 2005).

Ces structures secondaires en « T-loop » ou en G-quadruplex pourraient jouer un rôle dans la protection de l'extrémité des chromosomes en séquestrant le simple brin dans l'ADN télomérique double brin ou dans une conformation structurale. Aucune donnée ne permet de penser que ces deux structures ne pourraient pas coexister au sein du noyau ou apparaître en fonction du cycle cellulaire.

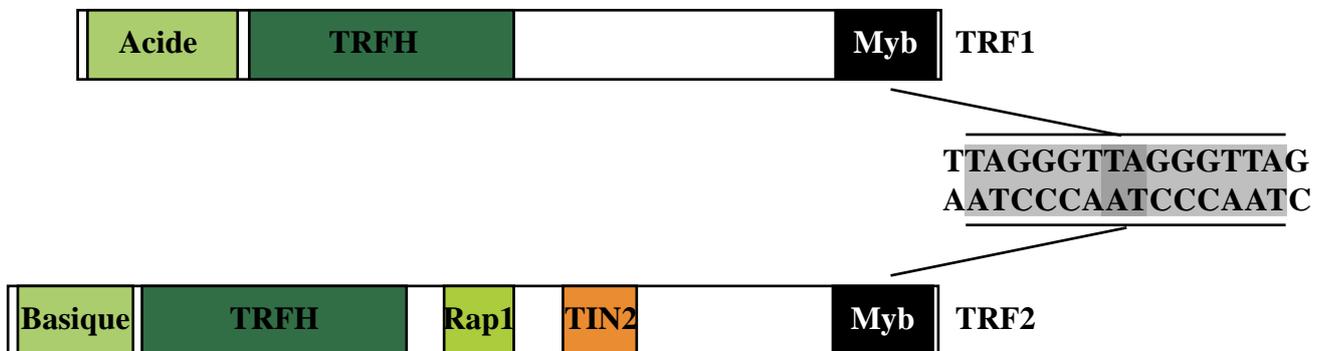
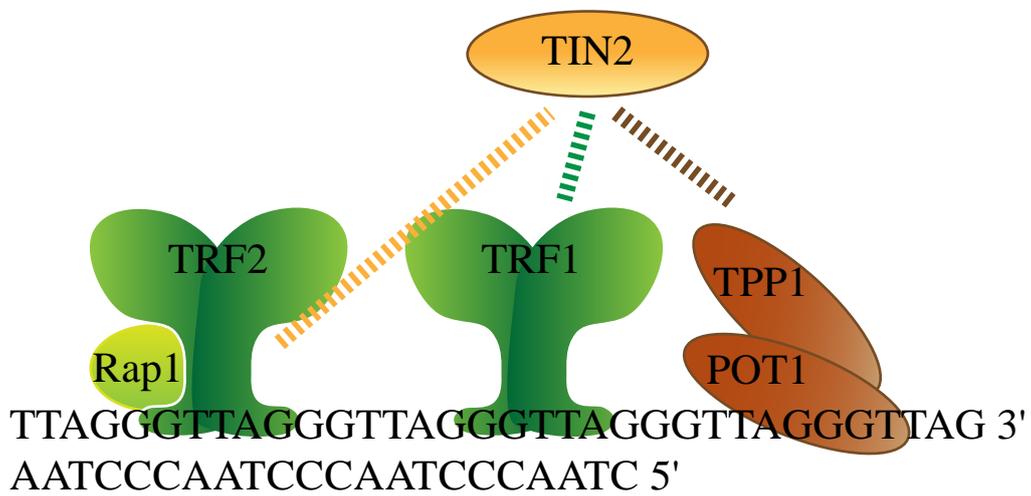


Figure 6 : Composition protéique du complexe "Shelterin" au niveau des télomères chez l'Homme et organisation des domaines de TRF1 et TRF2.
TRFH : domaine d'homodimérisation et d'interaction (d'après Palm *et de* Lange, 2008)

I.5 L'architecture protéique des télomères

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques indispensables à la protection des extrémités des chromosomes. Chez l'Homme, six protéines spécifiques des télomères ont été identifiées. TRF1 et TRF2 se lient à l'ADN télomérique double brin alors que POT1 se fixe à l'ADN télomérique simple brin. Ces protéines permettent le recrutement de TIN2, TPP1 et hRap1 au niveau des télomères par des interactions spécifiques. L'ensemble de ces protéines forme un complexe appelé Télosome (Liu *et al*, 2004) ou « Shelterin » (Figure 6 ; de Lange, 2005).

I.5.1 TRF1 et TRF2

Les protéines TRF1 et TRF2 pour « TTAGGG Repeat binding Factor 1 et 2 » ont été identifiées en cellules humaines pour leur capacité à se fixer à l'ADN télomérique double brin de manière très spécifique (Bilaud *et al*, 1997; Broccoli *et al*, 1997). Ces protéines sont composées de quatre domaines distincts. Un domaine N-terminal, acide pour TRF1 et basique pour TRF2, permet notamment de recruter différents partenaires. Les trois autres étant des domaines de dimérisation, de charnière et de liaison à l'ADN (Myb) en position C-terminale (Figure 6 ; Bilaud *et al*, 1996; Chong *et al*, 1995).

Les protéines TRF1 et TRF2 régulent toutes les deux négativement la longueur des télomères puisque la surexpression des deux (de manière indépendante) entraîne une diminution de leur longueur (Ancelin *et al*, 2002; van Steensel & de Lange, 1997). Cependant, la régulation négative, faite par ces deux protéines, est réalisée de manière différente (Chapitre I.6.4).

Par ailleurs, TRF1 apparaît nécessaire au développement normal des cellules souches embryonnaires, au maintien de la structure des télomères et à la stabilité chromosomique (Iwano *et al*, 2004). Ces observations, en contexte TRF1 mutant, semblent être dépendants de

l'absence de localisation de TIN2 et d'autres protéines du « Shelterin » au niveau des télomères (Okamoto *et al*, 2008).

TRF1 est impliquée dans la résolution des chromatides lors de la réplication des télomères (Dynek & Smith, 2004) et semble être un facteur clé de la formation de nouveaux télomères à un site de coupure non télomérique mais contenant des répétitions (Okabe *et al*, 2000).

Quant à TRF2, cette protéine est impliquée dans la protection des télomères contre différents mécanismes de réparation de l'ADN puisque l'un de ses rôles majeurs est le remodelage des télomères en boucle (Griffith *et al*, 1999; Yoshimura *et al*, 2004). Son inhibition entraîne la formation de fusions télomériques dépendantes de la protéine ADN Ligase IV et du complexe ERCC1/XPF (Dimitrova *et al*, 2008; Smogorzewska *et al*, 2002; Zhu *et al*, 2003). TRF2 inhibe la recombinaison homologue (Celli *et al*, 2006; Wang *et al*, 2004) ainsi que la voie de réponse aux dommages de l'ADN au niveau des télomères puisque son inhibition résulte en l'apoptose de ces cellules déficientes, dépendant de p53 et ATM (Celli & de Lange, 2005; Denchi & de Lange, 2007).

TRF2 pourrait être indirectement impliquée dans de nombreuses pathologies du fait de son interaction avec différents complexes (qui en sont responsables), comme ERCC1/XPF (*Xeroderma pigmentosum* ; Munoz *et al*, 2005), ATM/ATR (*Ataxia telangiectasia*), MRE11/RAD50/NBS1 (« Nijmegen Breakage Syndrom ») ou WRN et BLM (syndromes de Werner et Bloom ; Ellis *et al*, 1995; Opresko *et al*, 2002).

TRF2 interagit avec différents partenaires du mécanisme de réparation par excision de base (BER) comme PARP2 (Dantzer *et al*, 2004), PARP1 (Gomez *et al*, 2006) ou encore pol β et FEN-1 (Muftuoglu *et al*, 2006). Le BER jouerait donc un rôle dans l'homéostasie télomérique à travers TRF2.

Chez les plantes, la première implication *in vivo* de protéines contenant un domaine de type Myb (avec la séquence consensus « telobox » : VDLKDKWRT) dans l'homéostasie télomérique a été faite chez le tabac. La protéine de tabac TRF1 interagit spécifiquement avec l'ADN télomérique double brin à travers ses domaines de type Myb et d'extension (voir groupe 3). La surexpression de cette protéine conduit à un raccourcissement des télomères de 15-65 kb à 10-45 kb, à une diminution de la prolifération cellulaire et à une augmentation de la mort cellulaire. Enfin, la diminution de la quantité de protéine TRF1 par ARN interférence provoque une augmentation de la longueur des télomères et une faible diminution de la croissance cellulaire. Il semblerait donc que TRF1 chez le tabac régule négativement la longueur des télomères comme chez les mammifères (Yang *et al*, 2004).

Chez le riz et *A. thaliana*, le séquençage complet de leur génome a permis d'identifier de nombreux homologues de TRF1 et TRF2. Ces protéines ont été classifiées en trois groupes en fonction de la localisation de l'unique domaine de type Myb.

Le premier groupe incluant de petites protéines (30-35 kDa) avec un domaine de type Myb en position N-terminale a été nommé SMH pour « Single Myb Histone » après la découverte des protéines SMH1 à 6 chez le maïs dont SMH1 qui se lie à l'ADN télomérique double brin spécifiquement (Marian *et al*, 2003).

Chez *A. thaliana*, trois protéines AtTrb1 à 3 peuvent interagir entre elles ou avec elles-mêmes comme cela a été montré dans des expériences de double hybride. AtTrb2 et 3 se fixent à l'ADN double brin télomérique *in vitro* alors que AtTrb1 s'associe avec AtPot2 (Kuchar & Fajkus, 2004; Schrupfova *et al*, 2004).

Très récemment chez le riz, trois protéines ont été identifiées par la présence d'un domaine de type Myb en position N-terminale. Ces protéines TRBF1 à 3 se lient à l'ADN télomérique double brin de plantes. De plus, des expériences de double hybride ont montré que TRBF1 et

2 peuvent agir en homo ou hétérodimère alors que TRBF3 semble fonctionner en monomère (Byun *et al*, 2008).

Le deuxième groupe est composé de protéines présentant un unique domaine de type Myb en position C-terminale. Cette famille inclut le facteur de transcription AID1 chez le riz (Zhu *et al*, 2004) et les protéines AtTrfl3 à 8 et 10 chez *A. thaliana* (Karamysheva *et al*, 2004). Cependant ces protéines AtTrfl ne forment pas d'homodimère et n'interagissent pas avec l'ADN double brin télomérique dans des expériences de gel retard (Karamysheva *et al*, 2004). Ceci n'exclut pas complètement que ce groupe puisse avoir un rôle dans la structure et l'homéostasie des télomères, par le biais d'interactions avec d'autres composants liant l'ADN télomérique double brin.

Le troisième groupe est caractérisé par un domaine de type Myb en position C-terminale et possède en plus une extension de 40 acides aminés (groupe auquel appartient la protéine TRF1 de tabac). Le premier membre de ce groupe, RTBP1 pour « Rice telomere binding protein 1 » a été identifié chez le riz, par gel retard et sensibilité à la DNase1, comme fixant spécifiquement deux répétitions télomériques double brin en homodimère (Yu *et al*, 2000). Des plantes mutantes pour RTBP1 présentent des télomères plus longs ainsi que des défauts du développement corrélés à des fusions chromosomiques contenant des répétitions télomériques (Hong *et al*, 2007).

Six protéines de ce groupe ont été identifiées chez *A. thaliana* : AtTbp1, AtTrp1, AtTrfl1, 2, 4 et 9 (Chen *et al*, 2001a; Hwang & Cho, 2007; Karamysheva *et al*, 2004). Toutes ces protéines se fixent à l'ADN télomérique double brin et s'homodimérisent. Le domaine supplémentaire de 40 acides aminés est nécessaire pour l'interaction avec l'ADN. Des expériences de fusions des domaines de type Myb de protéines du groupe 2 avec ce domaine d'extension permet leur liaison à l'ADN (Karamysheva *et al*, 2004).

L'analyse des simple mutants *attrp1*, *attrfl1*, 2 et 4 n'a pas permis d'identifier de phénotype particulier au niveau des télomères indiquant soit que ces protéines n'agissent pas aux télomères, soit qu'il existe une redondance génétique (Karamysheva *et al*, 2004). Par contre, l'analyse du mutant *attbp1* a permis de mettre en évidence un rôle de cette protéine dans la régulation négative de la longueur des télomères (Hwang & Cho, 2007).

I.5.2 POT1/TPP1

Le simple brin riche en G à l'extrémité des télomères joue un rôle crucial dans la régulation de l'accessibilité aux télomères par la télomérase. La protéine spécifique de ce «G-overhang» chez *S. cerevisiae* est Cdc13 (Nugent *et al*, 1996). Cette protéine se lie à l'ADN télomérique simple brin par un domaine «oligonucléotide/oligosaccharide binding fold» (OB-fold ; Mitton-Fry *et al*, 2002). Cdc13 est une protéine multifonctionnelle (Lustig, 2001) qui interagit avec d'autres constituants de la coiffe télomérique et contribue à la régulation positive et négative de la télomérase.

Chez *S.pombe* et les eukaryotes supérieurs, l'orthologue potentiel de Cdc13 est POT1 pour « Protection of Telomeres 1 » (Baumann & Cech, 2001). POT1 a été découverte grâce à sa similarité de séquence avec la partie N-terminale de la sous-unité alpha du complexe TEBP α/β capable de se lier à l'ADN télomérique simple brin du cilié *Oxytrichia nova* (Baumann & Cech, 2001). Comme TEBP α , POT1 contient deux domaines de fixation OB-fold lui permettant de fixer l'ADN simple brin riche en G (Lei *et al*, 2004). POT1 se lie à l'ADN télomérique *in vitro* (Baumann & Cech, 2001) mais son maintien à l'extrémité du chromosome *in vivo* est dépendant de son interaction avec des protéines du complexe « Shelterin » (de Lange, 2005; Loayza & De Lange, 2003). Des études récentes indiquent que POT1 n'assure sa fonction que si elle est associée avec TPP1 (Figure 6), une autre protéine

contenant un domaine OB-fold et appartenant à ce complexe (Wang *et al*, 2007; Xin *et al*, 2007).

TPP1 est l'homologue de TEBP β qui s'hétérodimérise avec TEBP α (homologue de POT1 chez *Oxytrichia nova* ; Wang *et al*, 2007; Xin *et al*, 2007). Cet hétérodimère TPP1/POT1 est indispensable à l'organisation du complexe télomérique (O'Connor *et al*, 2006). La perte de la fonction de TPP1 conduit à la déprotection des télomères et à la perte des répétitions télomériques en cellules humaines (Xin *et al*, 2007). TPP1 semble donc nécessaire au recrutement de la télomérase et donc à l'élongation des télomères, mais permet aussi d'augmenter l'affinité de POT1 pour le simple brin télomérique. Le complexe TPP1-POT1 est également impliquée dans l'augmentation de la processivité de la télomérase (Wang *et al*, 2007). Les fonctions de TPP1 semblent être conservées chez la levure *S. pombe* (Miyoshi *et al*, 2008).

La structure, du co-complexe humain POT1-ADN, obtenue par cristallographie de rayon X suggère que les derniers nucléotides de l'ADN 3' simple brin sont séquestrés dans une "poche" de la protéine. Ceci permettrait à POT1 de protéger l'extrémité contre l'action de nucléases et limiterait l'accès de la télomérase à l'extrémité 3' sortante (Lei *et al*, 2004). En accord avec ces prédictions structurelles, POT1 régule négativement l'activité télomérase *in vitro* et cette inhibition semble être dépendante de sa capacité à se lier à l'ADN simple brin (Kelleher *et al*, 2005; Lei *et al*, 2005). En réalité, cette régulation s'avère plus complexe puisque d'autres études *in vitro* suggèrent que POT1 pourrait promouvoir l'action de la télomérase à l'extrémité des chromosomes en éliminant des structures en G-quadruplex adoptées par le simple brin (Zaug *et al*, 2005) ou en stimulant le relâchement de l'ADN télomérique par les hélicases WRN et BLM (Opresko *et al*, 2005).

POT1 se révèle être une protéine dont la fonction est complexe au niveau de la régulation de la longueur des télomères puisque certains résultats obtenus chez *S. pombe* et les

vertébrés s'avèrent contradictoires. La diminution de la quantité de protéine POT1, par ARN interférence, entraîne une augmentation de la longueur des télomères dans différentes lignées cellulaires humaines (Veldman *et al*, 2004; Yang *et al*, 2005; Ye *et al*, 2004b). De même, une augmentation de la taille des télomères a été observée dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) déficients pour POT1a (Wu *et al*, 2006). Il semblerait donc que POT1 agisse comme un régulateur négatif de la télomérase chez les vertébrés.

Par contre chez *S. pombe*, une surexpression de la partie C-terminale de Pot1 (dominant négatif) entraîne une élongation des télomères (Bunch *et al*, 2005) alors que la mutation de *POT1* provoque la perte des répétitions télomériques (Baumann & Cech, 2001). Il semblerait donc que Pot1 contribue aussi bien à la régulation positive que négative de la longueur des télomères chez *S. pombe* comme Cdc13 chez *S.cerevisiae* (Evans & Lundblad, 2002).

Pot1 est également nécessaire pour la protection de l'extrémité du chromosome puisque les mutants *pot1* chez *S. pombe* présentent des fusions chromosomiques et une mauvaise ségrégation des chromosomes (Baumann & Cech, 2001). La perte de POT1 chez les vertébrés conduit à une stimulation de la voie de réponse aux dommages de l'ADN au niveau des télomères (Churikov *et al*, 2006; Hockemeyer *et al*, 2005). D'autres études en cellules de mammifères indiquent que la perte de POT1 entraîne une instabilité génomique qui conduit à la sénescence et/ou l'apoptose de ces cellules (Veldman *et al*, 2004; Yang *et al*, 2005).

Bien que la plupart des organismes ne présentent qu'une seule copie du gène *POT1*, les souris et *A. thaliana* en possèdent deux (Hockemeyer *et al*, 2006; Shakirov *et al*, 2005; Wu *et al*, 2006).

Chez la souris, POT1a et b possèdent 72% d'homologie de séquence et semblent être partiellement redondantes pour la protection de l'extrémité des chromosomes. Alors que les mutants *pot1b* sont viables, les mutants *pot1a* présentent quant à eux une létalité

embryonnaire (Hockemeyer *et al*, 2006; Wu *et al*, 2006). L'utilisation de mutants conditionnels simple ou double a permis d'identifier le rôle de chacune des protéines dans l'homéostasie télomérique. POT1b jouerait un rôle dans la régulation de la longueur de l'ADN simple brin (Hockemeyer *et al*, 2006). POT1a et POT1b sont impliquées dans la répression au niveau des télomères des voies de réparation par recombinaison homologue et non-homologue (He *et al*, 2006; Wu *et al*, 2006).

A. thaliana présente deux protéines homologues à POT1, AtPot1 et AtPot2 (Shakirov *et al*, 2005). Les protéines AtPot de cette plante sont légèrement divergentes et ne présentent que 49% d'homologie de séquence entre elles. La surexpression de la partie N-terminale d'AtPot2 (contenant les motifs OB-fold) entraîne d'importants défauts de croissance et du développement des plantes, un raccourcissement des télomères, des fusions chromosomiques observées par des ponts anaphasiques, ainsi qu'une mauvaise ségrégation des chromosomes. AtPot2 semble donc être impliquée dans la protection de l'extrémité des chromosomes.

La surexpression de la partie C-terminale d'AtPot1 ne contenant pas les motifs OB-fold entraîne un faible raccourcissement des télomères mais les plantes ne présentent pas de phénotype particulier ni d'instabilité génomique. Les plantes mutantes *atpot1* présentent un raccourcissement progressif des télomères semblable à celui observé chez les plantes mutantes pour la télomérase. L'activité de la télomérase, mesurée *in vitro*, est réduite chez les plantes mutantes *atpot1* mais pas abolie. AtPot1 s'associe physiquement à la télomérase et est enrichie au niveau des télomères pendant la phase S (Surovtseva *et al*, 2007).

Il semblerait donc qu'AtPot1 contribue à la régulation positive de la longueur des télomères alors qu'AtPot2 participe à la protection de l'extrémité des chromosomes et/ou de la stabilité du génome (Shakirov *et al*, 2005).

I.5.3 TIN2

La protéine TIN2 a été mise en évidence pour la première fois par criblage d'une banque d'ADNc de fibroblaste humain chez la levure, en utilisant la technique de double hybride avec TRF1 comme appât (Figure 6 ; Kim *et al*, 1999). TIN2 contribue à l'accumulation de TRF1 au niveau des télomères en empêchant sa poly(ADP-ribosyl)ation par la protéine Tankyrase1 (Ye *et al*, 2004a). TIN2 interagit avec les protéines TRF1 et TRF2 par l'intermédiaire de deux domaines TBD1 et TBD2 pour «TRF1 ou TRF2 binding domain». Des mutants *tin2* ne pouvant pas lier TRF1 ou TRF2, ou la surexpression de dominants négatifs entraînent des destabilisations importantes du complexe «Shelterin». TIN2 interagit également avec POT1 par l'intermédiaire de TPP1 et permet ainsi de faire le lien entre différents composants du complexe «Shelterin» qui lient l'ADN simple et double brins des télomères (Kim *et al*, 2004; Ye *et al*, 2004a).

I.5.4 RAP1

RAP1 est un partenaire essentiel de TRF2 découvert par criblage d'une banque chez la levure d'ADNc de cellules Hela en utilisant la technique de double hybride et une version tronquée de TRF2 comme appât (Figure 6 ; Li *et al*, 2000). RAP1 forme un complexe 1:1 avec TRF2 (Zhu *et al*, 2000) et est dépendant de TRF2 pour sa localisation et sa stabilité télomérique puisqu'en absence de TRF2, une délocalisation majeure de cette protéine est observée (Celli & de Lange, 2005). RAP1 possède un domaine de type Myb mais semble incapable de se lier à l'ADN télomérique. Sa localisation aux télomères dépend donc de sa liaison à TRF2 contrairement à son homologue chez la levure *S. cerevisiae* qui possède un domaine supplémentaire de liaison à l'ADN (Hanaoka *et al*, 2001; Li & de Lange, 2003). RAP1 est capable de recruter des éléments de la réparation tels que le complexe MRE11/RAD50/NBS1, KU86/KU70 et PARP1 (O'Connor *et al*, 2004). D'autre part, cette

TERT

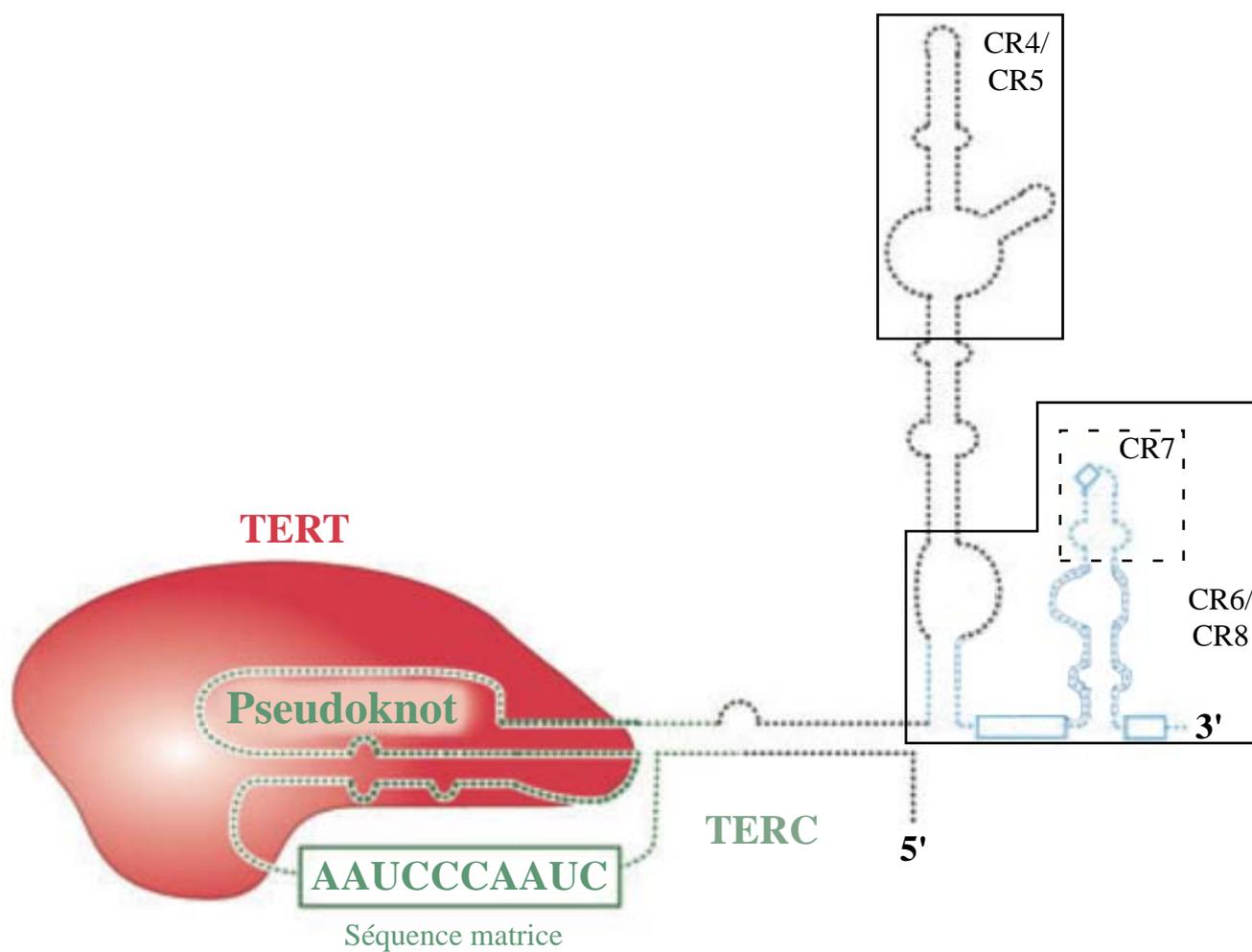


Figure 7 : Organisation de la sous-unité hTERT et structure du complexe télomérase chez l'Homme (d'après Collins, 2006 - Palm et de Lange, 2008)

protéine semble impliquée dans la régulation de la taille et l'hétérogénéité des télomères impliquant donc soit un contrôle de l'élongation des télomères en régulant l'activité de la télomérase, soit la régulation du mécanisme de délétion rapide des télomères « TRD » (Li & de Lange, 2003; O'Connor *et al*, 2004).

I.6 La télomérase

Bien que la nature exacte de la séquence des télomères varie entre les organismes, leur rôle principal dans la protection des extrémités des chromosomes est conservé. Dès les années 80, il a été montré qu'un plasmide linéaire contenant des séquences télomériques de ciliés était reconnu comme télomère chez la levure puis maintenu par transfert terminal de répétitions télomériques de levure (Shampay *et al*, 1984; Szostak & Blackburn, 1982). C'est chez le cilié *T. thermophila* qui présente environ 20000 télomères que fut isolée, pour la première fois dans des extraits nucléaires, une enzyme capable de rajouter des répétitions télomériques à un ADN télomérique double brin (Greider & Blackburn, 1985). Cette enzyme qui transfère en position terminale des répétitions télomériques fut baptisée : télomérase.

Des expériences de digestion d'extraits nucléaires à la RNase ont montré l'abolition de l'activité de la télomérase. Cette enzyme apparaissait donc être une ribonucléoprotéine (Greider & Blackburn, 1987) et fut mise en évidence chez l'Homme peu de temps après (Morin, 1989). La télomérase est une transcriptase inverse à matrice ARN spécialisée dans l'ajout de répétitions télomériques au niveau des télomères et composée : d'une sous-unité ARN (TR, TERC ou TER) et d'une sous-unité catalytique (TERT). Ces deux sous-unités sont essentielles pour reconstituer *in vitro* l'activité télomérase humaine (Figure 7 ; Beattie *et al*, 1998; Weinrich *et al*, 1997).

I.6.1 TERT

Le clonage et le séquençage du gène codant la sous-unité TERT (TElomerase Reverse Transcriptase] ont été réalisés chez différents organismes comme *Euplotes aediculatus*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, la souris et l'Homme (Blasco *et al*, 1997; Lingner *et al*, 1997; Nakamura *et al*, 1997; Nugent & Lundblad, 1998). Chez l'Homme, TERT est composée de quatre domaines :

- un domaine N-terminal de liaison à l'ADN simple brin,
- un domaine de liaison à la sous-unité ARN,
- un domaine catalytique contenant un motif télomérase spécifique en plus des motifs conservés entre les transcriptases inverses et
- un domaine de régulation de l'enzyme en position C-terminale (Figure 7 ; Collins, 2006).

La télomérase n'est pas fonctionnelle dans la plupart des cellules somatiques de mammifères, hormis la souris dont la plupart des tissus présente une activité télomérase (Counter *et al*, 1992; Yasumoto *et al*, 1996). Ceci pourrait expliquer le raccourcissement progressif observé dans ces cellules, d'une vitesse de 50 à 150 pb par extrémité et par division cellulaire (Blasco *et al*, 1997; Niida *et al*, 1998). Cependant, la télomérase est active dans les cellules germinales (Fujisawa *et al*, 1998; Kim *et al*, 1994) ainsi que dans certaines cellules somatiques à forte prolifération comme les cellules épithéliales de peau (Harle-Bachor & Boukamp, 1996), les cellules du système immunitaire (Weng *et al*, 1997) ou les cellules du tissu colorectal (Tahara *et al*, 1995). L'expression exogène de *TERT* dans des cellules primaires de fibroblastes est suffisante pour reconstituer une activité télomérase capable d'agir contre le raccourcissement des télomères et d'induire une immortalisation de ces cellules humaines (Bodnar *et al*, 1998; Ramirez *et al*, 2001).

Chez les plantes, l'analyse de la séquence des génomes d'*A. thaliana* et du riz a permis d'identifier le gène *TERT* (Fitzgerald *et al*, 1999; Oguchi *et al*, 1999; Heller-Uszynska *et al*,

2002). L'analyse des conséquences de l'absence de la télomérase chez *A. thaliana* a été réalisée en étudiant des plantes dont le gène *ATERT* a été interrompu par l'insertion d'un ADN de transfert (T-DNA ; Riha *et al*, 2001).

Les plantes mutantes sont viables et perdent 250 à 500 pb de répétitions télomériques par génération. Les premières générations de plantes mutantes pour *ATERT* ne semblent pas être affectées au niveau de leur phénotype. À partir de la génération 6, des défauts du développement apparaissent sous la forme d'une désorganisation de la disposition des siliques sur la hampe principale, de la forme des feuilles et une diminution de la fertilité.

Toute cette désorganisation phénotypique s'aggrave au fur et à mesure des générations jusqu'à ce que les plantes atteignent un stade terminal où elles sont petites, difformes et stériles à la génération 10. Des analyses cytogénétiques ont révélé une instabilité chromosomique massive pour les dernières générations de plantes mutantes *ATERT* qui est directement corrélée avec l'apparition de fusions chromosomiques perpétuées par l'entrée de ces cellules dans un cycle de cassure-fusions-ponts (Riha *et al*, 2001; Siroky *et al*, 2003).

I.6.2 TER

La sous-unité ARN de la télomérase a été clonée et séquencée pour la première fois chez *T. thermophila* à la fin des années 80. Elle est constituée de 159 nucléotides, dont la séquence AACCCCAAC à la fin de l'ARN qui est complémentaire des répétitions télomériques de *T. thermophila* (Greider & Blackburn, 1989; Shippen-Lentz & Blackburn, 1990).

Chez l'Homme, la sous-unité ARN mature est produite par l'ARN polymérase II et est composée de 451 nucléotides (Feng *et al*, 1995). Elle contient la séquence nucléotidique CUAACCCUAAC complémentaire de l'extrémité simple brin des télomères. Elle comporte différents motifs structurels dont deux régions permettent la fixation de la sous-unité

catalytique TERT, le domaine « Pseudoknot », très conservé entre les espèces, et le domaine CR4-CR5 essentiel à l'assemblage *in vivo* de la télomérase (Figure 7 ; Autexier *et al*, 1996; Tesmer *et al*, 1999). Les domaines CR7, CR6-CR8 sont quant à eux impliqués dans l'accumulation, la maturation et la stabilité de l'ARN *in vivo* (Mitchell & Collins, 2000). TR est capable non seulement de réguler les étapes d'alignements et d'élongation mais aussi de contrôler l'assemblage fonctionnel de la télomérase par son interaction avec TERT (Chen *et al*, 2000).

Chez les souris déficientes pour la sous-unité ARN de la télomérase (TERC), les télomères raccourcissent à une vitesse de 5 kb par génération. Les souris des premières générations sont en bonne santé et fertiles mais après cinq générations, des défauts du développement apparaissent dans les organes qui présentent une forte régénération cellulaire et les tissus des lignées germinales mâles et femelles. Les souris de la génération 6 ne peuvent pas produire de descendance et présentent une forte proportion de fusions chromosomiques et d'aneuploïdie (Blasco *et al*, 1997; Lee *et al*, 1998).

Chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, les sous-unités ARN (respectivement Tlc1 et Ter1) sont plus grandes (respectivement 1300 et 1200 pb) et leurs séquences présentent peu d'homologie avec celles des autres organismes (Leonardi *et al*, 2008; Singer & Gottschling, 1994). L'absence de Ter1 ou de certaines parties de Tlc1 entraînent un raccourcissement des télomères, l'entrée en sénescence et la circularisation des chromosomes par fusions (Leonardi *et al*, 2008; Zappulla & Cech, 2004). L'interaction entre Est1 et Trt1 (TERT) semble être dépendante de la sous-unité ARN Ter1, lui suggérant un rôle de lien dans l'assemblage du complexe (Leonardi *et al*, 2008; Webb & Zakian, 2008).

Très récemment le groupe de D.Shippen a identifié deux sous-unités ARN (AtTer) de 748 et 784 nucléotides chez *A. thaliana*. Ces ARN auraient des profils d'expression, des

interactions protéiques et des rôles différents dans la maintenance télomérique (communication orale, congrès « Telomeres and the DNA damage response 2008 »).

I.6.3 Différents partenaires de la télomérase

Le complexe télomérase est susceptible de recruter des protéines qui ne sont pas nécessaires pour son activité catalytique mais importantes dans la formation de ce complexe. Ainsi de nombreuses protéines chaperonnes telles que HSP70, HSP90, P23 (Forsythe *et al*, 2001; Holt *et al*, 1999) ou EST1 pour « Ever Short Telomere » (Cohn & Blackburn, 1995) et Dyskerin (Mitchell *et al*, 1999) ont été décrites pour interagir avec la télomérase, essentiellement chez les mammifères et *S. cerevisiae*. La liste des partenaires de la télomérase, présentée ci-dessus, est loin d'être exhaustive et de nombreuses autres protéines peuvent interagir avec la télomérase (Collins, 2006).

I.6.3.a EST1

La majorité des travaux sur les partenaires de TERT a été réalisée chez *S. cerevisiae*. La télomérase est constituée des sous-unités Est2 pour la partie catalytique et de Tlc1 pour la sous-unité ARN. Les partenaires sont Est1 qui se lie à Tlc1 et Est3 qui se fixe à la partie catalytique (Lendvay *et al*, 1996; Lundblad & Szostak, 1989; Seto *et al*, 2002). Bien qu'Est1 et 3 ne soient pas nécessaires à l'activité télomérase *in vitro* (Cohn & Blackburn, 1995; Lingner *et al*, 1997), les mutants présentent un raccourcissement des télomères identique et épistatique à celui provoqué par l'absence de Tlc1. Les auteurs suggèrent un rôle de régulateur positif de l'activité télomérase pour ces protéines (Lendvay *et al*, 1996; Lundblad & Szostak, 1989).

Chez l'Homme, il existe trois orthologues d'EST1, dont EST1A et B pour lesquels il a été montré leur association à TERT et dont le rôle est de réguler l'activité télomérase (Reichenbach *et al*, 2003; Snow *et al*, 2003).

I.6.3.b Dyskerin

La Dyskerin est une enzyme de la maturation des ARN ribosomiques par modification des uridines (pseudo-uridylation ; Luzzatto & Karadimitris, 1998). Chez les vertébrés, la sous-unité ARN de la télomérase contient un motif H/ACA qui correspond au domaine de liaison à l'ARN de la Dyskerin (Chen *et al*, 2000; Mitchell *et al*, 1999). La mise en évidence du lien fonctionnel entre Dyskerin et TR provient de l'analyse de patients atteints d'une maladie génétique rare qui est la dyskératose congénitale provoquée par une mutation dans les gènes de la Dyskerin ou de *TR*. Les patients présentent cinq fois moins de TR, impliquant de ce fait la Dyskerin dans la maturation ou la stabilité de l'ARN de la télomérase. L'activité de la télomérase est diminuée chez ces patients, ceci étant corrélé avec des télomères plus courts et des fusions chromosomiques (Dokal, 2000; Mitchell *et al*, 1999).

Très récemment, le groupe de D. Shippen a identifié l'homologue de Dyskerin chez *A. thaliana*, la protéine AtNap57 déjà connue comme homologue de la Pseudo-uridine synthase chez la levure pouvant se lier à un motif H/ACA (Lermontova *et al*, 2007; Maceluch *et al*, 2001). *In vivo*, les protéines AtNap57 et AtTert co-localisent dans le nucléole et s'associent à la télomérase de manière dépendante de l'ARN. Chez les plantes, la mutation de Dyskerin est létale à l'état homozygote et les hétérozygotes ne présentent pas d'effet sur la longueur des télomères. Par contre, la mutation non-sens T66A induisant chez l'Homme des défauts de la maintenance télomérique (Mitchell *et al*, 1999) a pu être testée chez *A. thaliana* du fait de la conservation de cette thréonine. Les mutants présentent une diminution de l'activité télomérase *in vitro* et *in vivo* et des télomères plus courts mais stables. Il semblerait donc que

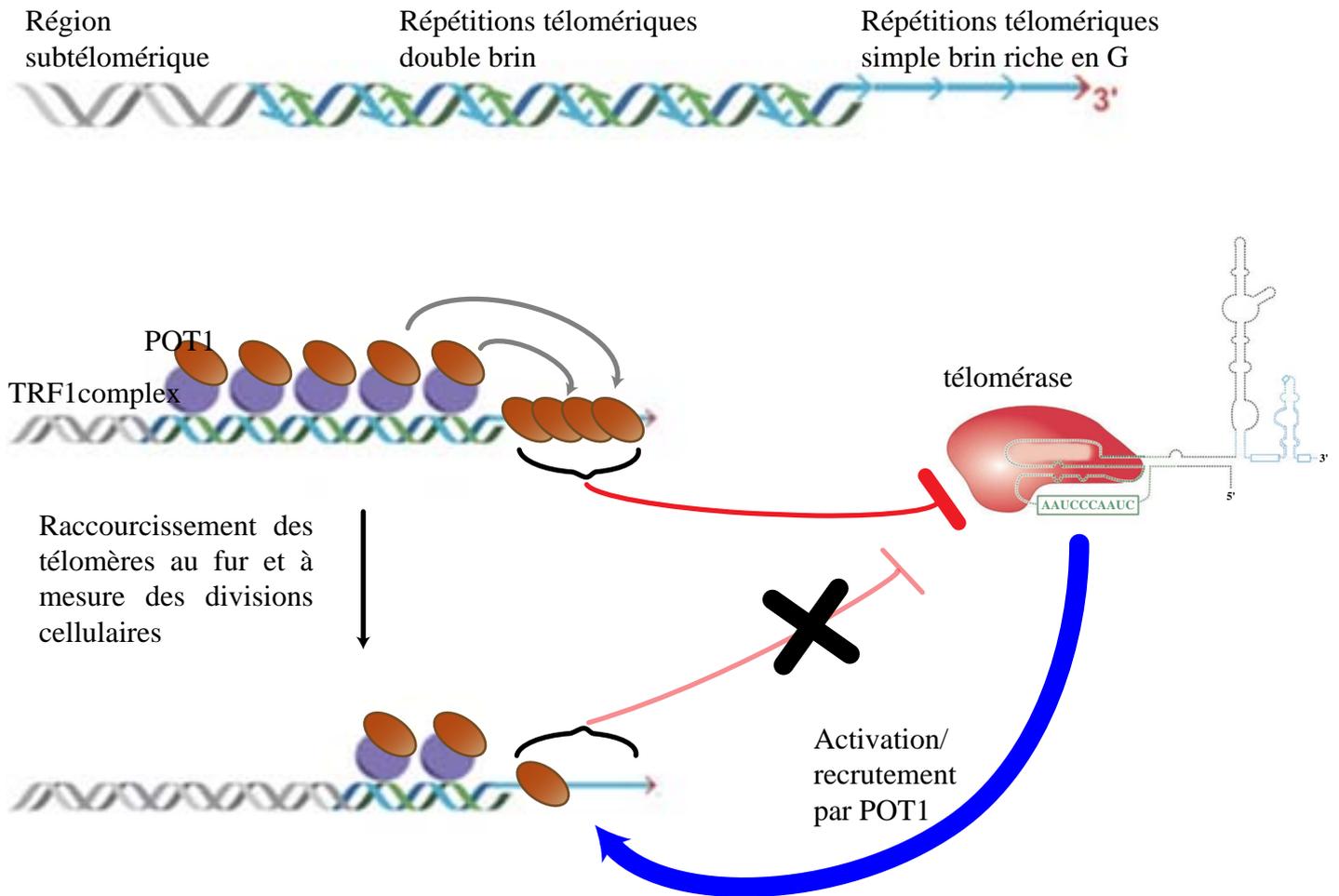


Figure 8 : Modèle de régulation du recrutement de la télomérase aux télomères par TRF1 et POT1/TTP1

Le raccourcissement progressif des télomères entraîne une diminution du nombre d'interactions entre le complexe TRF1-POT1 et les répétitions télomériques. La diminution du nombre de POT1 provoque une levée de l'inhibition sur la télomérase qui est alors recrutée par les quelques POT1 restantes au niveau de l'extrémité simple brin. Ce mécanisme permet l'élongation des télomères les plus courts. (d'après Palm *et de* Lange, 2008 - Bianchi & Shore, 2008)

cette protéine soit conservée chez les organismes multicellulaires et nécessaire à la maintenance télomérique (Kannan *et al.*, 2008).

I.6.4 Régulation de la télomérase et de la longueur des télomères

L'ADN simple brin semble être un composant clé de la régulation de l'accès de la télomérase aux télomères. Il est envisageable d'avoir différents niveaux de régulation de la télomérase comme son recrutement aux télomères, l'initiation de l'élongation ou encore son efficacité de terminale transférase.

Chez *S. cerevisiae*, le recrutement de la télomérase aux télomères va être dépendant de la protéine Cdc13 (homologue de POT1) qui ont toutes les deux une très forte affinité pour les ADN simple brin riches en G. Le modèle actuel suggère que Cdc13 interagirait avec Est1 pour recruter la télomérase à l'extrémité du simple brin (Evans & Lundblad, 1999; Pennock *et al.*, 2001). L'association de Cdc13 avec l'ADN simple brin est maximale pendant la phase S au moment où les « G overhang » sont les plus longs et quand la télomérase possède sa plus forte activité (Taggart *et al.*, 2002).

Chez les mammifères comme chez *S. cerevisiae*, il existe un modèle de régulation de la télomérase par les protéines TRF appelé : « Protein-counting model » (Figure 8). TRF1 aurait un rôle dans la régulation de l'élongation des télomères en fonction du nombre de protéines TRF1 liées à l'ADN télomérique double brin. Des télomères courts fixeraient moins de TRF1, ce qui lèverait l'inhibition de TRF1 sur la télomérase et induirait leurs élongations (Loayza & De Lange, 2003; Marcand *et al.*, 1997; Smogorzewska *et al.*, 2000). Cette régulation serait également dépendante de POT1 puisque la surexpression d'un dominant négatif POT1^{ΔB}, ne se liant pas à l'ADN simple brin, lève l'inhibition de TRF1 sur la télomérase (Loayza & De Lange, 2003). Ce mécanisme a été proposé pour la régulation individuelle de chaque télomère par la télomérase (van Steensel & de Lange, 1997). Plus

récemment, l'interaction directe entre TPP1 et la télomérase a été observée. Alors que POT1 inhibe le recrutement de la télomérase à l'extrémité 3' du télomère, son association avec TPP1 plus à l'intérieur du télomère favorise l'activité de la télomérase, *in vitro* (Xin *et al*, 2007).

D'autre part, TRF1 interagit avec la protéine PINX1 qui possède un domaine d'interaction avec la télomérase appelé TID pour « Telomerase Inhibitory Domain » et dont le rôle est d'inhiber la télomérase en se fixant aux sous-unités TERT et TR (Banik & Counter, 2004).

Une autre régulation de la longueur des télomères serait effectuée par TRF2, de manière indirecte puisque cette protéine favorise l'invasion de l'ADN simple brin dans les répétitions télomériques double brin, formant la « T-loop ». L'extrémité 3' sortante est alors dissimulée dans la « D-loop », ce qui empêcherait la télomérase de s'associer avec le « G-overhang » (Figure 4).

Un autre niveau de régulation de la longueur des télomères s'effectue par le complexe endonucléasique ERCC1/XPF, physiquement présent aux télomères par son interaction avec TRF2 (Zhu *et al*, 2003). Ce complexe est impliqué dans le raccourcissement des télomères suite à la surexpression de TRF2, chez la souris (Munoz *et al*, 2005). Ce résultat a été confirmé en cellules humaines mais de manière indépendante de l'activité nucléase de ERCC1/XPF (Wu *et al*, 2007b).

La longueur des télomères est régulée de différentes manières par la télomérase car elle même est régulée à des niveaux différents. Soit par le niveau de son expression, soit par son recrutement aux télomères soit par des mécanismes impliquant de nombreux complexes et protéines, dont seulement quelques uns ont été cités.

I.6.5 La télomérase et son implication dans le bien être de la cellule

I.6.5.a Vieillesse

L'une des principales causes du raccourcissement des télomères, au niveau cellulaire, est liée à la réplication incomplète de l'extrémité des chromosomes (Olovnikov, 1973). D'autres causes de la perte d'ADN télomérique ont été suggérées comme le traitement de ces extrémités après passage des fourches de réplication (Lingner *et al*, 1995; Makarov *et al*, 1997), la sensibilité de l'ADN télomérique riche en Guanine aux attaques oxydatives (Oikawa *et al*, 2001), les erreurs de traitement des structures secondaires de l'ADN télomérique (Crabbe *et al*, 2004; Ding *et al*, 2004) et des délétions de la « T-loop » par recombinaison homologue (Wang *et al*, 2004). Cependant, à l'échelle du tissu ou de l'organisme entier, la question qui se pose est : quel est l'impact du raccourcissement des télomères ? Est-ce que le vieillissement cause le raccourcissement des télomères ou est-ce l'inverse ? (Hornsby, 2006).

Pour étudier les conséquences de l'absence de la télomérase sur le vieillissement de l'Homme, des études ont été réalisées sur différents organismes modèles comme la souris de laboratoire, *S. cerevisiae*, *A. thaliana* ou *C.elegans* (Blasco *et al*, 1997; Cheung *et al*, 2006; Lundblad & Blackburn, 1990; Riha *et al*, 2001). Cependant, les effets de l'absence de la télomérase dans ces organismes sont tolérés sur plusieurs générations alors que son haplo-insuffisance chez l'Homme est connue pour provoquer de nombreux symptômes cliniques dès la première génération tels que des déficiences immunitaires, insuffisances médullaires, fibrose pulmonaire et cancer (Vulliamy *et al*, 2006). Des corrélations entre le raccourcissement des télomères et la diminution de la longévité d'érythrocytes d'oiseaux et de mammifères ont été mises en évidence (Hausmann *et al*, 2003; Vleck *et al*, 2003). Des expressions ectopiques de la télomérase dans des cellules humaines saines entraînent une augmentation de la longévité des cellules jusqu'à une immortalisation (Harley, 2002) alors que des mutations dans les gènes codant les sous-unités TR ou TERT sont associées à des

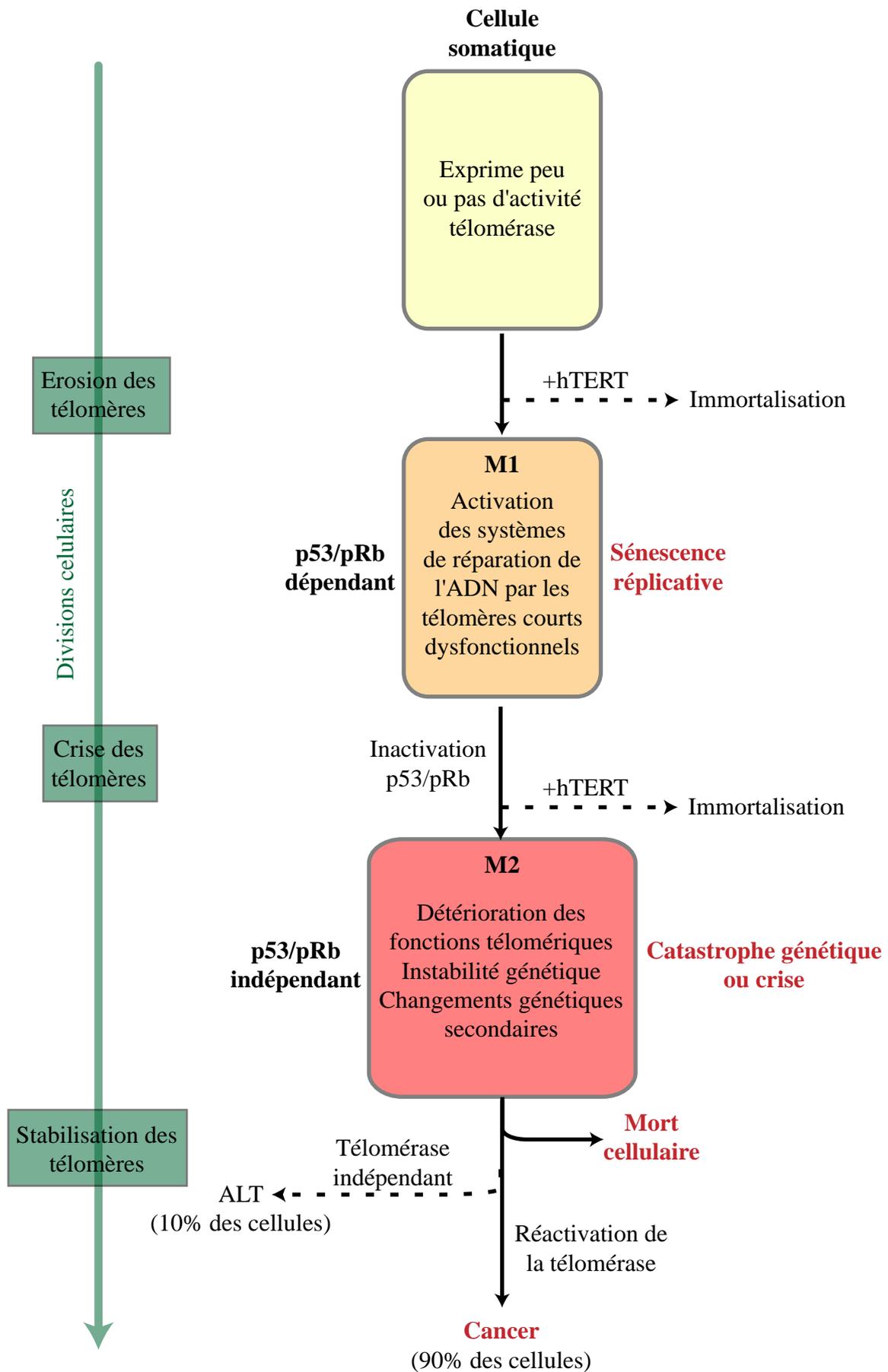


Figure 9 : La sénescence et la crise sont des barrières à la prolifération cellulaire illimitée

phénotypes de vieillissements précoces entraînant des maladies (Artandi, 2006; Tsakiri *et al*, 2007).

En accord avec ces données, des souris dépourvues de télomérase ont permis de mettre en évidence le rôle de cette protéine dans leur vieillissement (Blasco, 2005). Le lien entre vieillissement et raccourcissement des télomères reste cependant incertain puisque des données de rapport de taille des télomères par rapport à l'espérance de vie semblent contradictoires. Ainsi l'Homme, qui présente une grande espérance de vie, possède les télomères les plus courts parmi les primates (Kakuo *et al*, 1999; Steinert *et al*, 2002) alors que la souris, dont la taille des télomères est très élevée, n'a qu'une courte espérance de vie (Venkatesan & Price, 1998). La taille des télomères ne semble donc pas être le seul critère de la longévité des organismes. D'autres facteurs comme la vitesse de perte des répétitions télomériques par cycle cellulaire, due à l'absence d'activité de la télomérase dans certaines cellules somatiques, pourraient déterminer la durée de vie des cellules.

La perte progressive des répétitions télomériques au fur et à mesure des divisions cellulaires dans les cellules somatiques humaines entraîne l'arrêt de leur division par activation des points de contrôles du cycle cellulaire (étape M1, activation de p53/p21 ; Figure 9 ; Herbig *et al*, 2004).

Ces cellules sénescentes ne se divisent plus mais ne meurent pas. Elles conservent une activité métabolique (mesurée par l'activité β -galactosidase) et des changements dans la morphologie de la cellule (augmentation de la taille et aplatissement). L'expression génique de ces cellules est perturbée et serait due au raccourcissement des télomères. En effet, il a été proposé que les gènes localisés en amont des télomères pourraient avoir une expression modifiée, ce mécanisme a été appelé : « Telomere Position Effect ou TPE » (Gottschling *et al*, 1990). Lors du raccourcissement des télomères, le TPE pourrait être diminué par une réorganisation de la chromatine télomérique (décondensation), à l'origine de l'expression de certains gènes en

position subtélomérique (Baur *et al*, 2001; Koering *et al*, 2002). Chez les mammifères, la perte du TPE a été proposée comme étant un mécanisme permettant l'entrée des cellules en sénescence (Harley *et al*, 1990).

Certaines cellules peuvent néanmoins contourner cette sénescence (absence de p53 et/ou p16/pRB) pour aboutir à un raccourcissement encore plus important des télomères et leur entrée en crise (étape M2 ; Figure 9 ; Wright & Shay, 1992). Cette étape est caractérisée par des télomères devenus non fonctionnels, des fusions chromosomiques, une mauvaise ségrégation des chromosomes et l'apoptose de nombreuses cellules. La restauration de p53 (gène suppresseur de tumeurs) dans ces cellules permet de les rediriger vers la sénescence (Ventura *et al*, 2007).

1.6.5.b Cancer

Très rarement, (10^{-5} – 10^{-7}) des cellules M2 présentent une réactivation ou une dérégulation positive de la télomérase provoquant une prolifération non contrôlée et indéfinie de ces cellules (Figure 9). Cette immortalisation des cellules est une étape clé de la carcinogénèse (Shay, 2005). En effet, 90% des cellules cancéreuses présentent une activité télomérase (Greider & Blackburn, 1996; Kim *et al*, 1994). Les expressions de trois gènes : *TERT*, antigène grand T de SV40 et l'oncogène Ras dans des fibroblastes humains ont permis d'immortaliser ces cellules (Hahn *et al*, 1999). Alors que l'inhibition de la télomérase, par la surexpression du gène muté pour *TERT*, dans des cellules humaines cancéreuses entraîne la mort cellulaire (Hahn *et al*, 1999).

1.6.5.c ALT

Dans les autres cellules cancéreuses (10%), les cellules échappent à la sénescence et à la crise en maintenant la longueur de leurs télomères par un mécanisme indépendant de la

télomérase et impliquant la recombinaison homologue appelé ALT pour « Alternative Lengthening of Telomeres » (Figure 9 ; Henson *et al*, 2002). Les cellules positives pour le mécanisme ALT sont caractérisées par la présence simultanée de télomères plus longs et hétérogènes et par l'accumulation de structures spécifiques appelées APB pour « ALT associated PML bodies » qui contiennent entre autre la protéine ProMyelocytic Leukemia (coactivateur de p53), de l'ADN télomérique et les protéines TRF1 et TRF2 (Bryan *et al*, 1997; Dunham *et al*, 2000). Les mécanismes du ALT seront plus amplement détaillés dans le Chapitre II.2.2.b.

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques très complexes, extrêmement bien protégés et contrôlés au niveau de leur longueur. De nombreuses protéines ont été découvertes comme étant très importantes pour la stabilité de ces structures et régulièrement de nouvelles interactions sont identifiées avec ces protéines télomériques ou avec l'ADN. Les télomères sont des structures très sensibles à l'absence d'une ou plusieurs de ces protéines, conduisant à des phénotypes de maladie ou de mort dans de nombreux organismes différents, qui seront plus amplement détaillés dans le chapitre suivant.

Chapitre II

Télomères et mécanismes de réparation de l'ADN

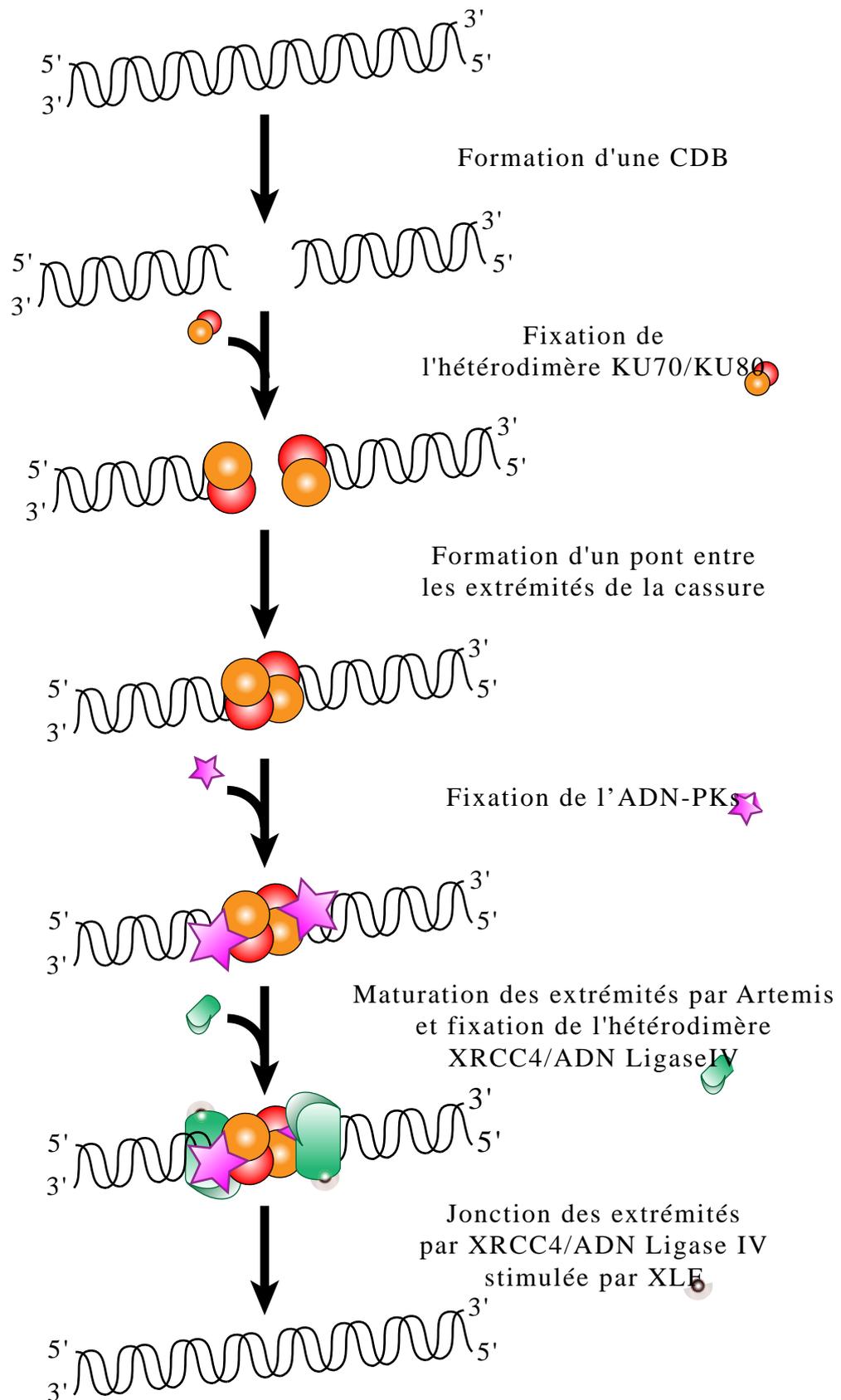


Figure 10 : Modèle de réparation des CDB par recombinaison non homologue NHEJ chez l'Homme (d'après Lees-Miller & Meek, 2003)

Les cellules eucaryotes ont la capacité de faire la différence entre des extrémités de chromosomes fonctionnels (télomères) et des cassures double brins de l'ADN. La protection des télomères contre les mécanismes de réparation des cassures est assurée par des protéines du complexe « Shelterin » ainsi que par la télomérase. En effet, la désorganisation de la coiffe télomérique après la perte d'une de ces protéines fait que les télomères deviennent non fonctionnels. Les télomères déprotégés activent alors la voie de réponse aux dommages de l'ADN (signalisation) entraînant l'arrêt du cycle cellulaire et permettant la "réparation" de ces dommages par les machineries de recombinaison homologue et/ou non homologue. Dans un premier temps, il convient de détailler les différentes voies de réparation des CDB de l'ADN puis dans un deuxième temps de s'intéresser à leurs rôles au niveau des télomères non fonctionnels et reconnus comme des cassures.

II.1 Les voies de réparation des lésions de l'ADN

II.1.1 La recombinaison non homologue

II.1.1.a La jonction d'extrémités non-homologue (*Non-Homologous End Joining, NHEJ*)

La voie de recombinaison par NHEJ est la principale voie de réparation des CDB par recombinaison non-homologue chez les eucaryotes supérieurs (Figure 10 ; Lees-Miller & Meek, 2003; Meek *et al*, 2004). La première étape de cette voie fait intervenir le complexe DNA-PK (protéine kinase dépendante de l'ADN), composé de l'hétérodimère KU et de la sous-unité catalytique DNA-PKcs.

L'hétérodimère KU est composé de deux sous-unités KU70 et KU80 (Francoeur *et al*, 1986; Mimori *et al*, 1986) qui reconnaissent les extrémités d'ADN produits après une CDB (Blier *et al*, 1993; Mimori & Hardin, 1986). La fixation de l'hétérodimère KU au niveau de la

Organismes	Mammifères	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	KU70	+	AtKu70
	KU80	+	AtKu80
	ADN-PKcs	-	-
	Artemis	-	ND
	ADN Ligase IV	Dnl4	AtLig4
	XRCC4	Lif1	AtXrcc4
	XLJ/Cernunnos	Nej1	ND
	MRE11	+	AtMre11
	RAD50	+	AtRad50
	NBS1	Xrs2	AtNbs1

Tableau 2 : Protéines impliquées dans la voie de réparation par NHEJ chez différents organismes modèles (ND : non déterminé; + : présent; - : absent sur la base de la séquence)

cassure permet la juxtaposition et la formation d'un "pont" entre les deux extrémités (Jones *et al*, 2001; Walker *et al*, 2001).

D'autres protéines sont alors recrutées par le complexe KU/ADN, telles que la DNA-PKcs (de la famille des PI3 kinases) dont le rôle est de phosphoryler les protéines KU70, KU80, Artemis, XRCC4 et la DNA-PKcs elle-même ainsi que de contribuer au rapprochement des extrémités de la cassure (Gottlieb & Jackson, 1993; Hammarsten & Chu, 1998; Yoo & Dynan, 1999; Weterings *et al*, 2003).

Alors qu'Artémis intervient dans la maturation des extrémités de la CDB par ses activités exo- et endonucléasique (Ma *et al*, 2002), le complexe XRCC4/ADN Ligase IV catalyse ensuite, la jonction des extrémités de la cassure (Kanaar *et al*, 1998 ; Lees-Miller & Meek, 2003; Meek *et al*, 2004).

La protéine XRCC4-Like Factor (XLF) ou Cernunnos est le composant du NHEJ le plus récemment identifié (Ahnesorg *et al*, 2006; Buck *et al*, 2006). XLF se lie à l'ADN et à Xrcc4/ADN Ligase IV (Ahnesorg *et al*, 2006; Hentges *et al*, 2006 ; Lu *et al*, 2007) et stimule l'activité ligase du complexe (Hentges *et al*, 2006; Yano & Chen, 2008).

La réparation des CDB par les mécanismes du NHEJ fait également intervenir le complexe MRN. Ce complexe, composé des protéines MRE11, RAD50 et NBS1, stimule *in vitro* l'activité ligase de l'hétérodimère XRCC4/ADN Ligase IV et semble impliqué dans la juxtaposition des extrémités de la cassure (Huang & Dynan, 2002; Udayakumar *et al*, 2003).

À l'exception de la DNA-PKcs et d'Artemis, qui semblent spécifiques des vertébrés, les protéines impliquées dans le mécanisme du NHEJ sont très conservées chez les eucaryotes (Tableau 2). Des homologues des protéines KU70, KU80, XRCC4, de l'ADN Ligase IV, ainsi que du complexe MRN ont ainsi pu être identifiés chez de nombreux eucaryotes, dont *S.*

cerevisiae (Milne *et al*, 1996) et *A. thaliana* (Tamura *et al*, 2002; West *et al*, 2000; West *et al*, 2002).

II.1.1.b La jonction d'extrémités dirigée par micro-homologie (Micro-homology Mediated End Joining, MMEJ)

Des études récentes menées chez *S. cerevisiae*, les mammifères et *A. thaliana* ont permis de définir une seconde voie de jonction d'extrémités, indépendante de l'hétérodimère KU (Figure 11 ; Guirouilh-Barbat *et al*, 2004; Heacock *et al*, 2004; Ma *et al*, 2003). En effet, l'absence de l'hétérodimère KU chez la levure, les mammifères ou les plantes réduit l'efficacité de réparation par jonction d'extrémités ou modifie la nature des événements de réparation, mais ne l'élimine pas (Gallego *et al*, 2003a; Gu *et al*, 1997; Kabotyanski *et al*, 1998; Liang & Jasin, 1996; Yu & Gabriel, 2003). Les protéines impliquées dans cette voie indépendante de KU n'ont été identifiées que récemment.

Chez *S. cerevisiae*, des études génétiques ont démontré que ce mécanisme de MMEJ nécessitait la présence des protéines Mre11 et Rad50. Le complexe MRX possède des activités exo- et endonucléasique ainsi que des propriétés structurales lui permettant de maintenir ensemble les extrémités d'une cassure (Chapitre III.2). Ce complexe pourrait intervenir dans la maturation des extrémités pour former des régions d'ADN simple-brin, présentant de courtes homologies de séquence d'une dizaine de bases (micro-homologie), qui pourraient s'hybrider (Ma *et al*, 2003).

Le complexe Rad1/Rad10 serait impliqué dans l'élimination des régions simple-brin sortantes (mécanisme de SSA chapitre II.1.2) avant que la protéine Dnl4 ne catalyse la jonction des extrémités (Chen *et al*, 2001b; Paques & Haber, 1997). Des travaux similaires réalisés chez les mammifères ont également montré l'existence d'une voie de jonction

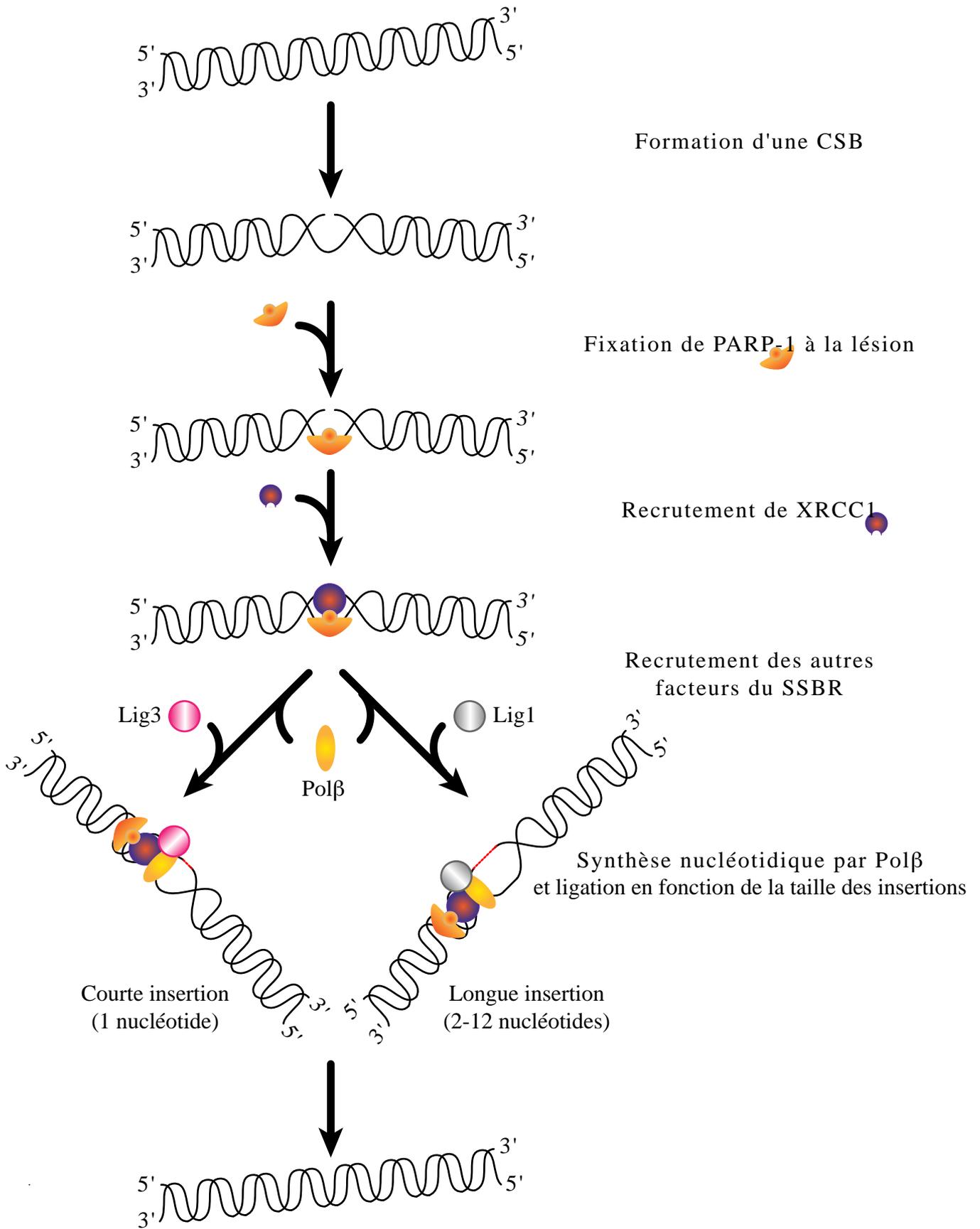


Figure 12 : Modèle de réparation des CSB par recombinaison non homologue SSBR chez les mammifères (d'après Caldecott, 2008)

d'extrémités par micro-homologie de séquence, indépendante de l'hétérodimère KU (Guirouilh-Barbat *et al*, 2004; Zhong *et al*, 2002).

Chez *A. thaliana*, des lignées mutantes peuvent être obtenues par l'intégration d'un ADN de transfert (ADN-T) au hasard dans le génome en utilisant les propriétés de l'agent phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens* (Hooykaas & Schilperoort, 1992). De plus, le mécanisme d'intégration de l'ADN-T par recombinaison non homologue a été observé comme étant très efficace (Vergunst *et al*, 2000). Or cette intégration peut s'effectuer en l'absence de l'hétérodimère AtKu et l'efficacité de réparation par jonction d'extrémités est réduite chez des plantes mutantes *atku80*, mais pas abolie (Gallego *et al*, 2003a; van Attikum *et al*, 2003). Ces résultats suggèrent, chez *A. thaliana*, l'existence d'une voie de jonction d'extrémités indépendante de l'hétérodimère AtKu.

II.1.1.c La réparation des cassures simple brins (Single Strand Break Repair, SSBR)

Une troisième voie de la recombinaison non homologue est la voie SSBR, PARP1/LIG3 dépendante (Figure 12). Elle a été, à l'origine, caractérisée pour son rôle dans la réparation des cassures simple brin (CSB ; Cantoni *et al*, 1987) puis, dans la réparation des CDB (vanAnkeren *et al*, 1988).

Les CSB sont reconnues par PARP-1 qui est le véritable senseur de la voie de réparation des CSB. PARP-1 peut fonctionner soit en homodimère soit en hétérodimère avec PARP-2 (Schreiber *et al*, 2002). La fixation de PARP-1 à l'ADN se fait de manière très rapide, permettant de signaler la cassure et d'initier la réparation en recrutant d'autres protéines dont XRCC1 (Caldecott *et al*, 1996; Masson *et al*, 1998). Cette protéine n'a pas d'activité enzymatique connue à ce jour mais son rôle est de permettre le recrutement de pol β , de PARP-1 et 2 et de l'ADN ligase 3 sur le site de la lésion (Caldecott, 2003; Caldecott, 2008). La réparation est alors assurée par la jonction des extrémités, par insertion de

nucléotides puis ligation. Cette étape est réalisée par pol β puis par l'ADN Ligase 3 pour les courtes insertions (1 nucléotide) ou par pol β , pol δ et/ou pol ϵ puis par l'ADN Ligase 1 pour les longues insertions (2-12 nucléotides ; Caldecott, 2008).

Cette voie, PARP1/LIG3 dépendante, pourrait donc être une alternative à la réparation non homologue des dommages à l'ADN puisqu'elle a été décrite chez les mammifères comme réalisant la jonction d'extrémité simple ou double brins (Audebert *et al*, 2004). Chez *A. thaliana*, il existe deux orthologues de PARP-1 et PARP-2 (Doucet-Chabeaud *et al*, 2001) ainsi qu'un homologue de XRCC1 (caractérisation non publiée) mais le gène *ATLIG3* semble être absent du génome. Néanmoins, la protéine AtLig6 est une ligase spécifique d'*A. thaliana* dont la fonction est inconnue et pourrait peut-être se substituer à celle d'AtLig3 (Bonatto *et al*, 2005).

Les protéines AtKu80 et AtLig4 impliquées dans la recombinaison non-homologue NHEJ, le complexe AtRad1/Ercc1 (homologue de Rad1/Rad10 ; MMEJ) et la protéine AtXrcc1 (SSBR) ont fait l'objet de mon attention au cours de ma thèse afin de déterminer les voies de réparation responsables des fusions chromosomiques chez certains mutants d'*A. thaliana* (Résultats complémentaires).

II.1.2 La recombinaison homologue

II.1.2.a Les différentes voies de réparation par recombinaison homologue

Comme mentionné précédemment, il existe plusieurs mécanismes permettant la réparation des CDB en entraînant une perte d'information génétique (recombinaison non homologue). Cependant les organismes ont développé un autre mécanisme permettant la réparation des CDB en préservant l'intégrité du matériel génétique (recombinaison

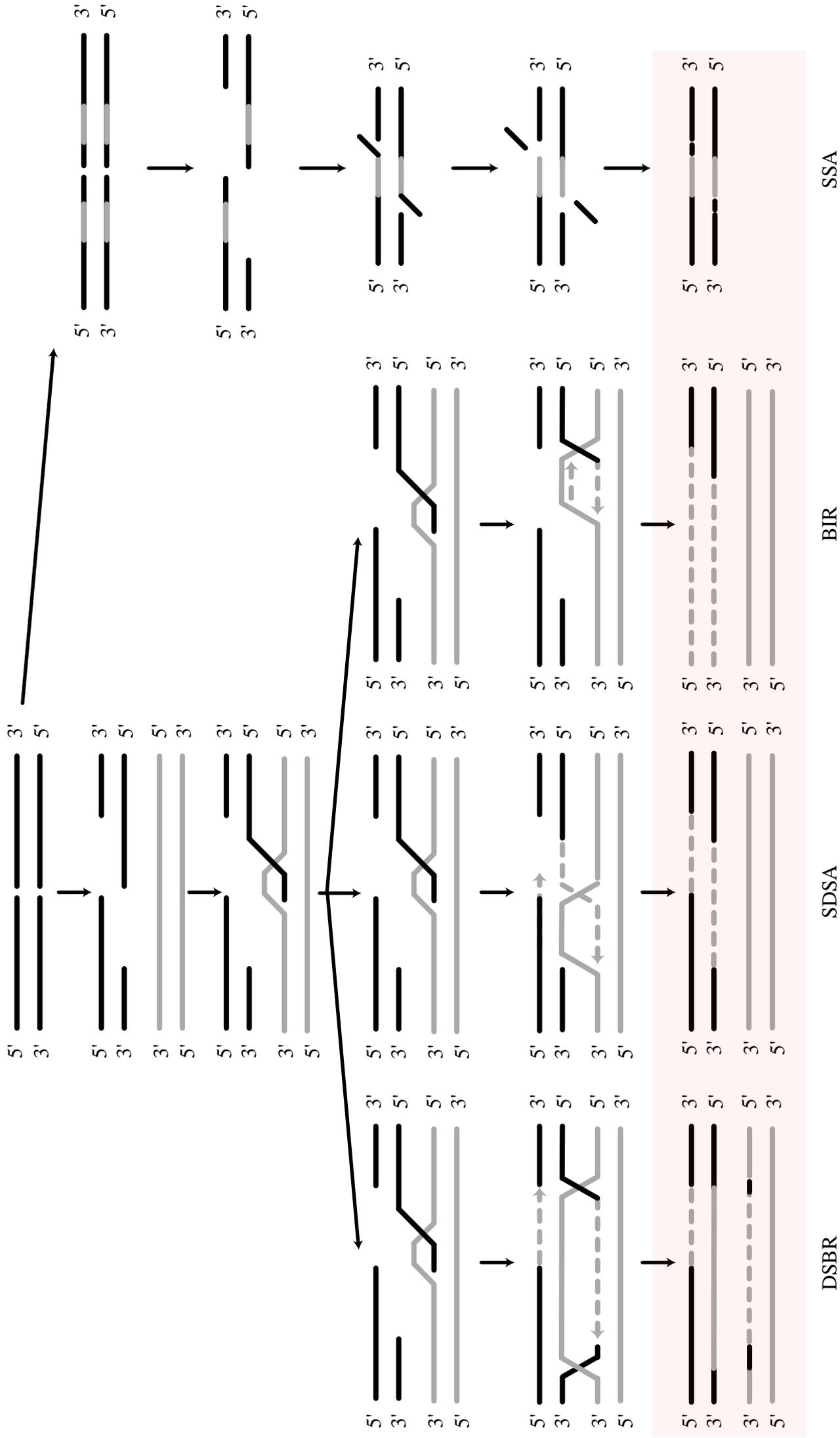


Figure 13 : Principales voies de la recombinaison homologue
 Les produits résultant des différentes voies de recombinaison
 homologue sont différents.

homologue). L'étude des mécanismes de recombinaison homologue a révélé une grande diversité de voies suivant la nature des événements de cassures (Figure 13).

Le premier modèle de réparation des CDB par recombinaison homologue a été défini comme le modèle de réparation des cassures double brin ou DSBR (« Double-Strand Break Repair » ; Szostak *et al*, 1983). Ce modèle de Szostak permet d'expliquer de nombreuses observations liées à la recombinaison méiotique mais pas celles liées à la recombinaison mitotique.

Un second modèle nommé la synthèse dépendante de l'hybridation de brin ou SDSA (« Synthesis Dependant Strand Annealing ») a alors été proposé (Nassif *et al*, 1994).

Parfois une CDB est générée dans une région entourée de répétitions directes. Cette organisation génétique oriente le mécanisme de réparation des CDB vers la voie de réparation par hybridation d'ADN simple-brin ou SSA (« Single-Strand Annealing »). Ce mécanisme de SSA entraîne la perte de l'une des deux répétitions et de l'ensemble de la région située entre les deux répétitions. Le modèle de recombinaison par SSA conserve les premières étapes d'invasion et de résection des modèles DSBR et SDSA mais la résection des extrémités de la cassure va se poursuivre jusqu'à la formation de deux régions simple-brin complémentaires.

Certaines CDB, comme celles qui peuvent survenir aux télomères déprotégés ou par un arrêt de la réplication, se terminent par un ADN simple brin (Garvik *et al*, 1995; Lundblad & Blackburn, 1993). Ces dommages peuvent être pris en charge par le mécanisme de réplication induite par la recombinaison ou BIR pour « Break Induced Replication » (Lydeard *et al*, 2007). L'extrémité 3'-OH de la région simple-brin va envahir la séquence homologue (chromatide sœur, chromosome homologue ou une séquence répétée sur un autre chromosome) et servir d'amorce au redémarrage de la réplication. Ce mécanisme permet de restaurer une molécule d'ADN duplex intacte (Barbour & Xiao, 2003).

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mammifères	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Fonction
Rad50	+	+	Maturation des extrémités
Rad51	+	+	Transfert de brin
Rad52	+	-	Favorise l'activité de Rad51
Rad54	+	+	Favorise l'activité de Rad51
Rad55	-	-	Favorise l'activité de Rad51
Rad57	-	-	Favorise l'activité de Rad51
Rad59	-	-	Favorise l'activité de Rad51
Mre11	+	+	Maturation des extrémités
Xrs2	NBS1	AtNbs1	Maturation des extrémités
Rad51B	+	+	Favorise l'activité de Rad51
Rad51C	+	+	Favorise l'activité de Rad51
Rad51D	+	+	ND
Xrcc2	+	+	ND
Xrcc3	+	+	Résolution de jonction de Holliday ?

Tableau 3 : Protéines du groupe épistatique Rad52 et leurs fonctions
(ND : non déterminé; + : présent; - : absent sur la base de la séquence)

II.1.2.b Les protéines identifiées dans les mécanismes de recombinaison homologue

Des études génétiques (test de sensibilité aux agents mutagènes, analyses épistatiques des mutants, complémentation de phénotypes) ont permis d'identifier de nombreux facteurs nécessaires aux différentes étapes des mécanismes de recombinaison homologue.

La plupart des protéines de la recombinaison homologue ont été identifiées pour la première fois chez *S. cerevisiae*. Les gènes codant pour ces protéines appartiennent au groupe épistatique Rad52, qui se compose des gènes *RAD50*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD54*, *RAD55*, *RAD57*, *RAD59*, *MRE11* et *XRS2* (Tableau 3). L'absence de l'un ou l'autre de ces gènes est à l'origine de déficiences dans les mécanismes de recombinaison homologue, de réparation des CDB et de la méiose (Paques & Haber, 1999; Symington, 2002).

L'étape initiale de la recombinaison homologue est la formation d'une extrémité simple brin 3' sortante. Ce mécanisme serait attribué au complexe MRX, composé des protéines Mre11, Rad50 et Xrs2 (Nairz & Klein, 1997). Les propriétés et les fonctions du complexe MRX sont plus amplement détaillées dans le chapitre III.2.

La formation du nucléofilament Rad51/ADN au niveau de la région simple-brin est dépendante de la protéine Rad52 et de l'hétérodimère Rad55/Rad57. La protéine Rad54 favorise l'invasion du nucléofilament dans une molécule d'ADN double-brin homologue (Figure 14 ; San Filippo *et al*, 2008).

Dans la voie SSA, la protéine Rad52 catalyserait l'hybridation des régions complémentaires en se fixant aux extrémités de la cassure (Sugiyama *et al*, 1998; Van Dyck *et al*, 1999). Le complexe Rad1/Rad10, portant l'activité endonucléasique, est nécessaire pour éliminer les régions 3' simple-brin non-homologue avant la synthèse d'ADN permettant de combler les brèches occasionnées par l'étape de résection (Adair *et al*, 2000; Fishman-Lobell & Haber, 1992).

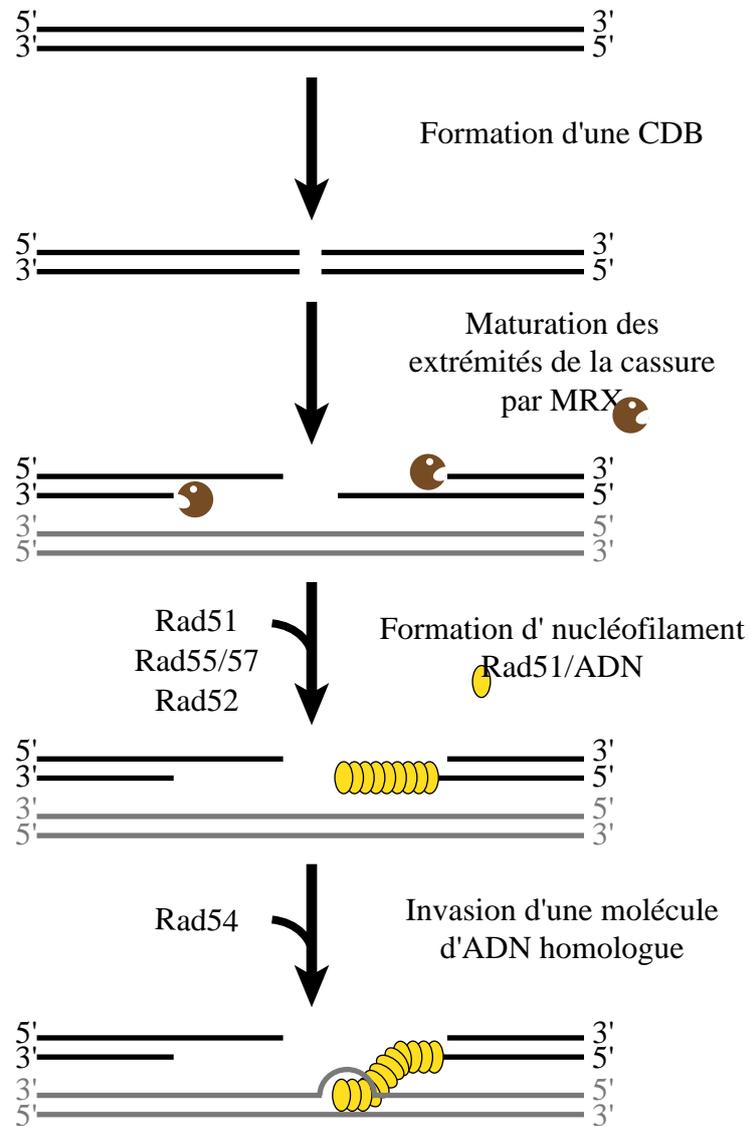


Figure 14 : Invasion d'une molécule d'ADN homologue par le nucléofilament Rad51/ADN

Alors que la protéine homologue à Rad52 de *S. cerevisiae* n'a été retrouvée que chez les vertébrés, les protéines homologues à Rad50, Mre11, Xrs2, Rad51 et Rad54 ont été retrouvées à la fois chez les vertébrés et *A. thaliana*. De plus chez ces organismes, cinq paralogues de la protéine RAD51 : RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 et XRCC3 ont été décrits dans les mécanismes de la recombinaison homologue (Tableau 3 ; Bleuyard *et al*, 2005; Bleuyard & White, 2004; Thacker, 2005).

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé au rôle de deux protéines des paralogues d'AtRad51 : AtRad51D, AtXrcc2 dans le but d'identifier le ou les mécanismes responsables des fusions chromosomiques de certains mutants (Résultats complémentaires).

II.2 Télomères non fonctionnels et mécanisme de réparation des CDB

II.2.1 Signalisation de la cassure aux télomères

Dans les cellules humaines, la déprotection des télomères peut-être induite par la perte de TRF2, en surexprimant un dominant négatif, par l'inhibition de POT1 par ARN interférence ou par la génération de télomères trop courts en contexte de sénescence ou de mutation pour la télomérase. Ceci va conduire à l'activation d'une réponse de dommages à l'ADN au niveau des télomères (Figure 15 ; d'Adda di Fagagna *et al*, 2003; Hockemeyer *et al*, 2005). En effet, de nombreuses protéines de la signalisation des cassures comme 53BP1, NBS1, ATM, ATR (Ataxia Telangiectasia/Rad3-related), RAD17, RIF1 et MDC1 se retrouvent associées aux télomères dysfonctionnels (d'Adda di Fagagna *et al*, 2003; Takai *et al*, 2003). Ces structures, retrouvées au niveau des télomères non fonctionnels, ont été nommées TIF pour « Telomere dysfunction-Induced Foci » (Takai *et al*, 2003).

La signalisation des dommages aux télomères est médiée par les protéines Kinase ATM ou ATR, en fonction de la nature de la lésion (Denchi & de Lange, 2007; Guo *et al*,

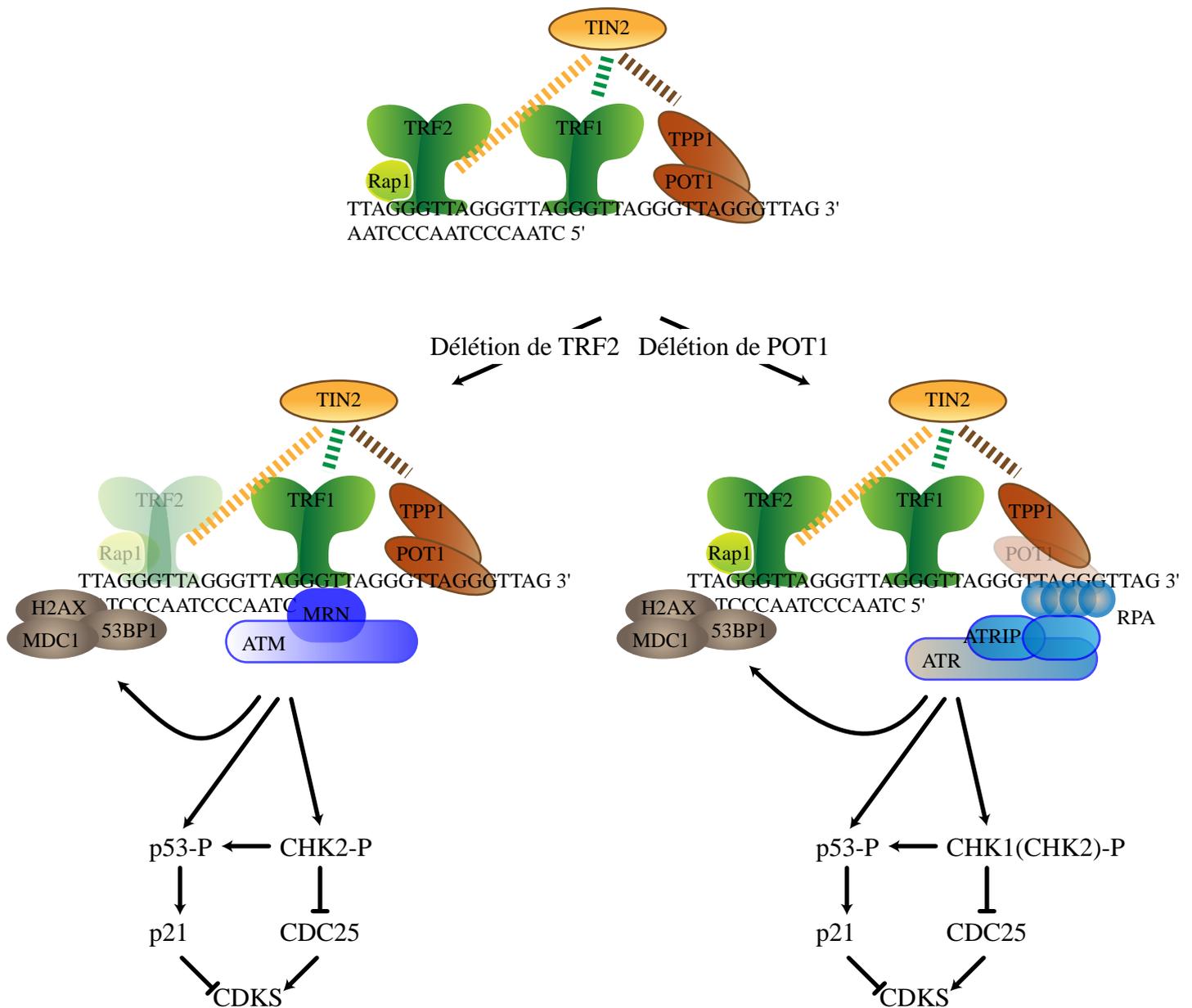


Figure 15 : Modèle d'activation de la voie de signalisation des dommages à l'ADN au niveau des télomères non fonctionnels

Les pertes des protéines TRF2 et POT1 au niveau des télomères conduisent à la mise en place de deux voies de réponse différentes (respectivement ATM et ATR) par phosphorylation de nombreux acteurs protéiques permettant dans les deux cas l'arrêt du cycle cellulaire. (d'après Palm & de Lange, 2008)

2007; Takai *et al*, 2003). Ainsi, il est suggéré que la voie ATM serait induite après une lésion de type CDB alors que la voie ATR serait activée par la présence d'un ADN simple brin libre (Palm & de Lange, 2008). Dans les deux cas, ces kinases vont phosphoryler l'histone H2AX (gamma-H2AX), marqueur des sites de cassures, sur plusieurs centaines de kb autour de la lésion (d'Adda di Fagagna *et al*, 2003).

La génération de télomères non fonctionnels par la délétion (en cellules murines) ou l'inhibition (par un dominant négatif ou par ARN interférence en cellules humaines) de TRF2 entraîne l'activation de la voie ATM dépendante (Celli & de Lange, 2005; Karlseder *et al*, 1999). L'activation d'ATM va permettre la phosphorylation des protéines NBS1, p53 et CHK2, et entraîner l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la sénescence (dépendant du type cellulaire ; d'Adda di Fagagna *et al*, 2003; Karlseder *et al*, 1999; Takai *et al*, 2003; van Steensel *et al*, 1998). L'arrêt du cycle cellulaire est initié par la stabilisation et l'activation de p53. Ceci va induire une augmentation de la quantité de p21 inhibant la cycline CDK2 et entraînant l'arrêt du cycle cellulaire avant la phase S. Cette voie peut être amplifiée en parallèle par p16 (Karlseder *et al*, 1999; Smogorzewska *et al*, 2002).

La délétion de POT1 dans des cellules murines produit des télomères non fonctionnels. Ceci entraîne la formation de TIF au niveau des télomères et l'arrêt du cycle cellulaire. La signalisation des dommages aux télomères n'est pas dépendante d'ATM mais d'ATR par son interaction avec ATRIP pour « ATR interacting Protein » (Denchi & de Lange, 2007). ATR va permettre la phosphorylation des protéines du point de contrôle du cycle cellulaire CHK1 et CHK2 afin de bloquer le cycle cellulaire.

Le raccourcissement programmé des télomères, dans les cellules somatiques dû à l'absence d'activité télomérase, entraîne éventuellement une réponse de dommages à l'ADN avec la présence des protéines 53BP1, γ -H2AX, MDC1 et NBS1 au niveau des télomères

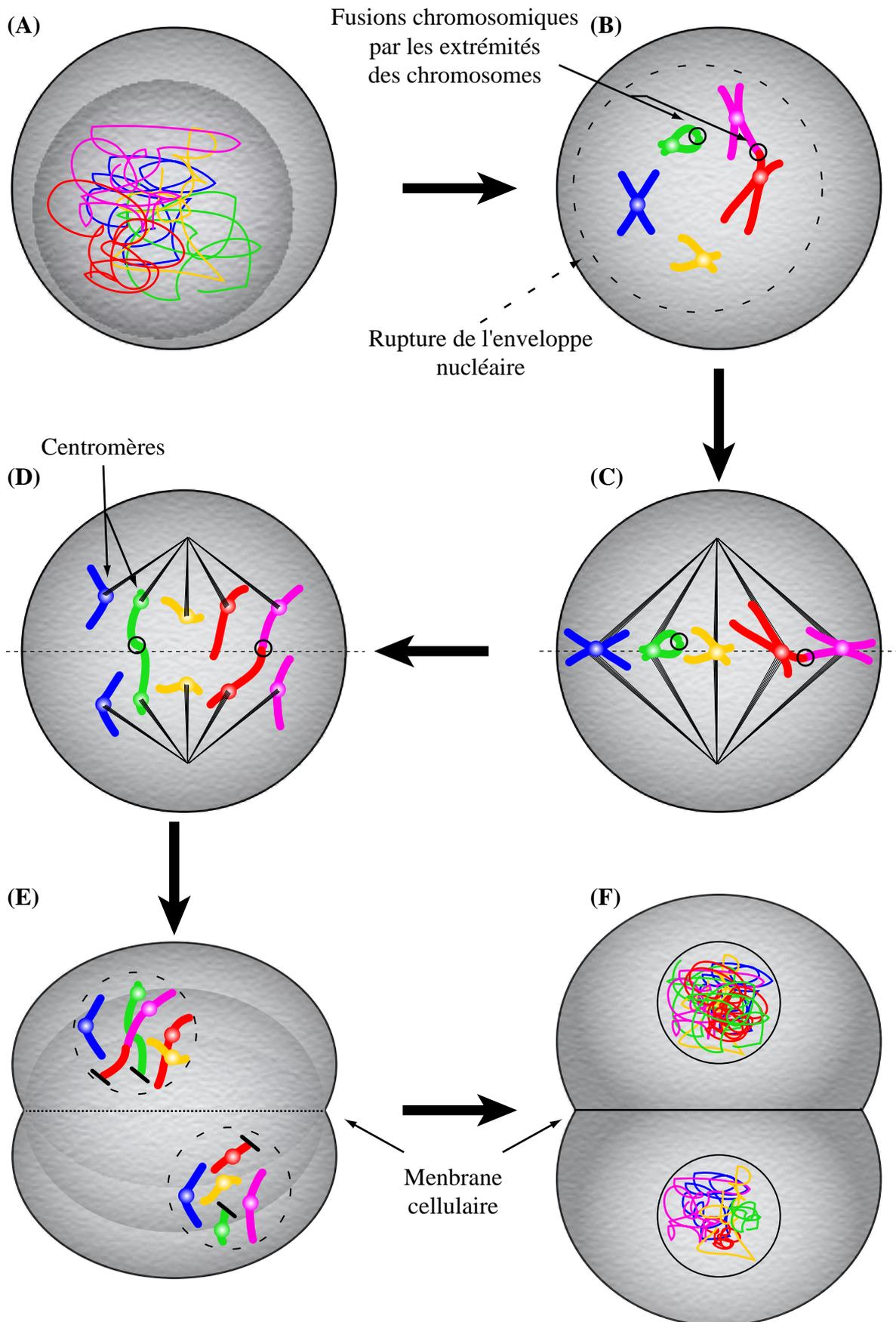


Figure 16 : Schéma de division mitotique dans une cellule présentant des télomères déprotégés et fusionnés

(A) : interphase, (B) : prophase et condensation des chromosomes, (C) : métaphase et alignement des chromosomes à l'équateur de la cellule, (D) : anaphase et séparation des chromatides soeurs, les chromosomes fusionnés vont se casser aléatoirement, (E) : télophase et reformation de l'enveloppe nucléaire, (F) : séparation des cellules filles dont l'une aura gagné de l'information génétique et l'autre en aura perdu.

raccourcis. De plus dans cette signalisation, les protéines CHK1 et CHK2 sont phosphorylées suggérant l'implication des voies ATM et/ou ATR dans la signalisation de la lésion, ceci s'accompagnant de l'arrêt de la croissance des cellules. Des souris déficientes pour la télomérase et ATM ont permis de montrer que la signalisation des lésions n'étaient pas complètement abolie, suggérant une autre voie de signalisation telle que celle médiée par ATR (Qi *et al*, 2003; Wong *et al*, 2003).

Cette signalisation des dommages de l'ADN au niveau des télomères va donc induire le blocage du cycle cellulaire en G1/S ou G2/M, ce qui pourrait permettre à la cellule de réparer ces lésions.

II.2.2 Télomères non fonctionnels

Les télomères non fonctionnels vont ainsi être pris en charge par les voies de réparation de l'ADN. Chez la plupart des organismes, cette prise en charge des extrémités des chromosomes reconnus comme lésion de l'ADN va aboutir à la formation de chromosomes dicentriques.

L'observation de ces fusions chromosomiques par les extrémités (sous la forme de ponts anaphasiques) a été réalisée pour la première fois par B. McClintock en 1938, en utilisant une approche cytologique. Elle formulera le modèle « BFB cycle » pour cycle de cassure-fusion-pont expliquant comment la rupture d'un chromosome dicentrique, généré par la fusion de deux extrémités cassées pendant l'anaphase entraîne des désordres cytologiques et génétiques pour les chromosomes (Figure 16 ; McClintock, 1939; McClintock, 1941). Les mécanismes de formation de ces chromosomes dicentriques restent cependant assez confus. Leur étude a pu être abordée grâce à l'obtention de simple et double mutants portant à la fois sur des gènes impliqués dans les voies de "réparation" ainsi que sur des gènes codant des protéines de

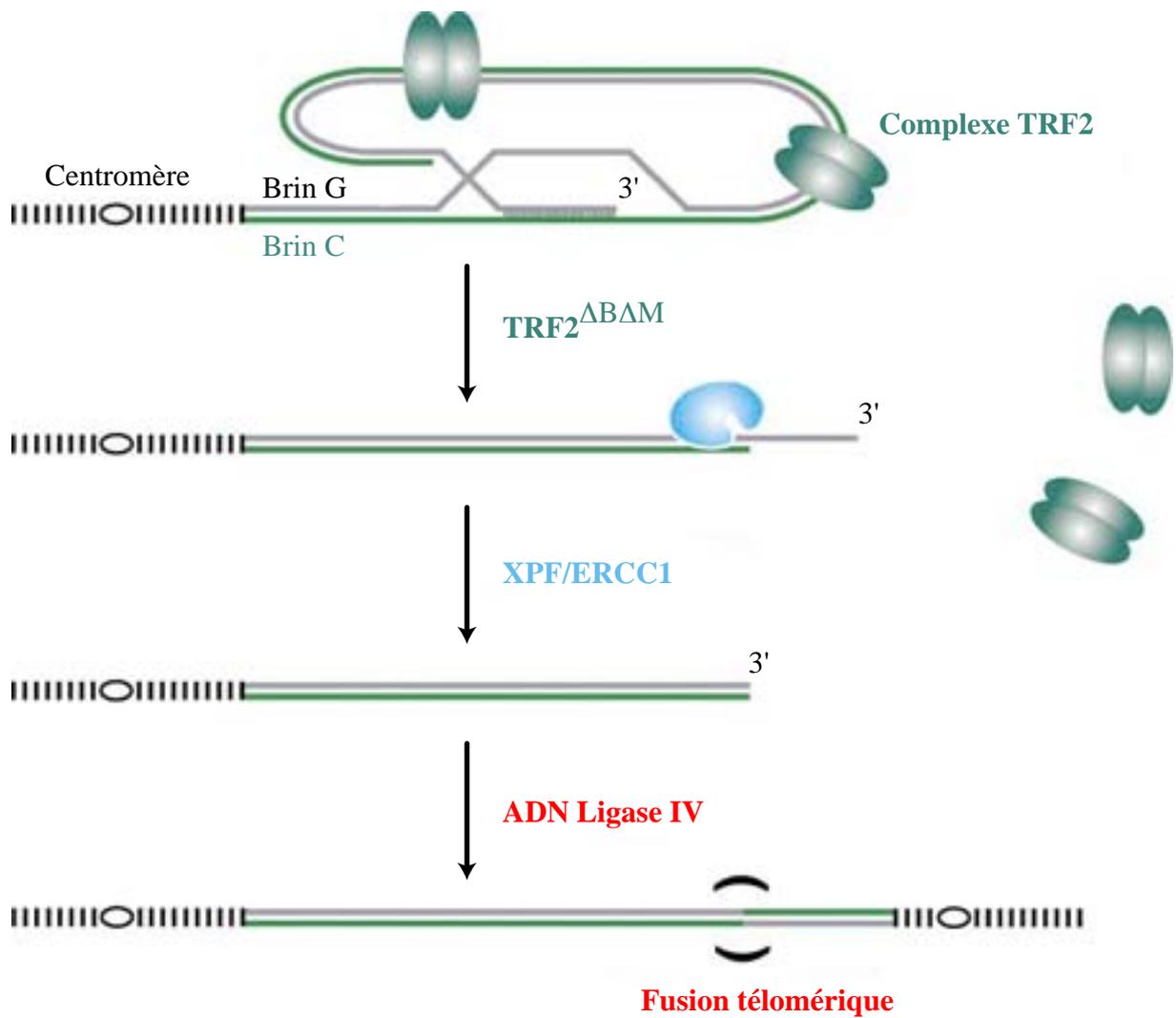


Figure 17 : Modèle du traitement des télomères déprotégés par l'inhibition de TRF2
 La surexpression de TRF2^{ΔBAM} entraînerait le relachement de forme "T-loop" en une structure linéaire dont l'extrémité 3' simple brin serait un substrat pour le complexe XPF/ERCC1. L'extrémité franche ainsi créée serait susceptible d'être prise en charge par la voie de réparation NHEJ. (d'après Zhu *et al.*, 2003)

l'organisation ou de la maintenance télomérique, telles que certains composants du « Shelterin » et la télomérase.

II.2.2.a Devenir des télomères déprotégés suite à la perte de la coiffe

La surexpression du dominant négatif TRF2^{ABΔM} (protéine ne pouvant ni se lier à l'ADN télomérique ni recruter de partenaires) dans des lignées cellulaires de mammifères, entraînerait la formation d'un hétérodimère non fonctionnel avec la protéine TRF2 endogène, ce qui permettrait de déplacer TRF2 des télomères. L'inhibition de TRF2 entraîne l'apparition de nombreuses fusions chromosomiques impliquant les télomères (Smogorzewska *et al*, 2002; van Steensel *et al*, 1998). Le mécanisme de réparation par recombinaison non homologue NHEJ serait responsable de la formation de ces fusions. En effet, celles-ci sont significativement réduites dans des cellules de souris dépourvues de l'ADN Ligase IV (Celli & de Lange, 2005; Smogorzewska *et al*, 2002). De plus, il a été montré que la protéine XPF (homologue de Rad1 et Rad16 chez la levure) coopère avec les facteurs protéiques du NHEJ pour promouvoir les fusions chromosomiques après délétion de TRF2 aux télomères (Zhu *et al*, 2003). En effet, le complexe endonucléasique XPF/ERCC1 est nécessaire pour couper l'extrémité 3' sortante afin de permettre à l'hétérodimère KU et à l'ADN Ligase IV d'effectuer la jonction des extrémités (Figure 17). Par contre, ces mêmes expériences chez *S. pombe* ont permis de conclure que la protéine Rad16 n'était pas nécessaire aux fusions chromosomiques générées par le NHEJ dans les souches déficientes pour Taz1 (orthologue de TRF1 et TRF2 ; Wang & Baumann, 2008).

En parallèle à ces observations, la surexpression d'un autre dominant négatif, TRF2^{AB}, dans les cellules de mammifères conduit à la production de cercles télomériques dépendant de la recombinaison homologue (Wang *et al*, 2004). La perte de NBS1 ou XRCC3, dans ce contexte, inhibe cette délétion rapide des télomères. L'absence du domaine basique de TRF2

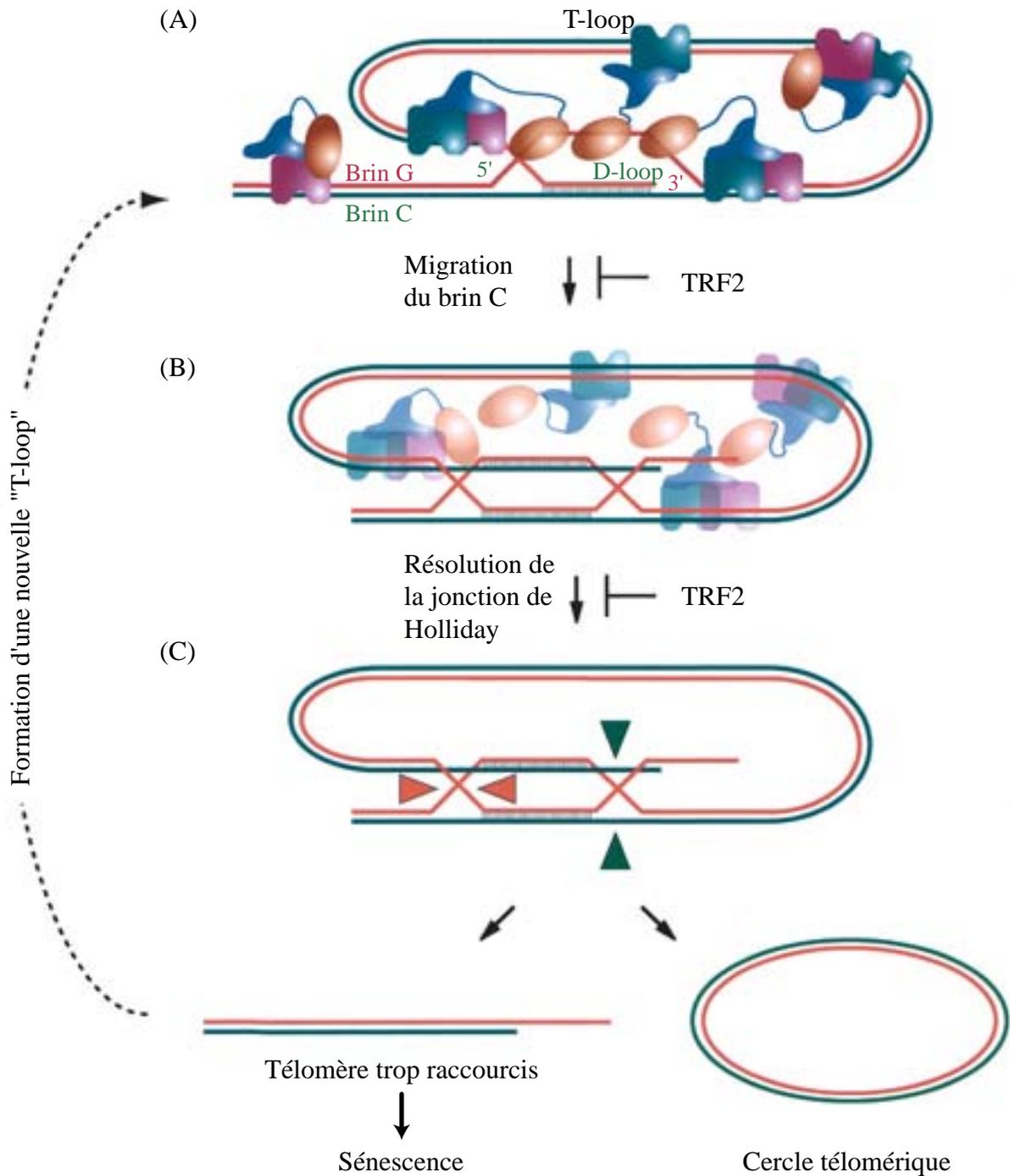


Figure 18 : Modèle de résolution des "T-loop" par recombinaison homologue dans des cellules TRF2 Δ B

(A) : Structure supposée de la "T-loop" ; (B) : Migration du brin C formant une jonction de Holliday ; (C) : Clivage du brin C par une resolvase de jonctions de Holliday (flèche verte, Xrcc3?) et coupure par une nucléase à déterminer de la "D-loop" (flèche rouge, ?). Il en résulte la formation de cercles télomériques et de télomères raccourcis susceptibles d'être reconnus comme des dommages s'ils sont trop courts ou de reformer une "T-loop" si ce n'est pas le cas. (d'après de Lange, 2005)

aboutirait à la résolution de la jonction de Holliday par recombinaison homologue, apparemment similaire au mécanisme de délétion rapide des télomères chez *S. cerevisiae* (Figure 18 ; Bucholc *et al*, 2001; Lustig, 2003). Ce mécanisme TRD pour « Telomere Rapid Deletion » est détecté chez des levures normales et serait impliqué dans la régulation négative des télomères devenus trop longs (Li & Lustig, 1996). Ce mécanisme permettrait d'éliminer en une seule étape un ADN linéaire télomérique par coupure au niveau de la boucle télomérique, si cette structure existe bien *in vivo*. Le TRD est dépendant de la recombinaison homologue et le complexe MRX semble être nécessaire à ce processus (Bucholc *et al*, 2001).

Chez *S. pombe*, l'absence de Taz1 ou de son partenaire Rap1, entraîne l'arrêt du cycle cellulaire en G1 ainsi que l'apparition de nombreuses fusions télomériques. Les fusions chromosomiques nécessitent la présence des protéines Ku70 et Lig4. L'analyse des points de jonctions dans ces fusions montrent que la majorité d'entre elles présente des répétitions télomériques (Ferreira & Cooper, 2001; Miller *et al*, 2005). Ces résultats ont été confirmés chez *S. cerevisiae* en utilisant un mutant conditionnel de Rap1 produisant des fusions chromosomiques dont l'analyse par PCR a permis d'identifier la totalité des télomères aux points de jonctions. D'autre part, l'analyse génétique a permis de montrer que l'ensemble des protéines du NHEJ (Ku70 et 80, Lig4, Lif1, Nej1, Mre11, Rad50 et Xrs2) étaient impliquées dans la formation de ces fusions (Pardo & Marcand, 2005).

Les mutants *pot1* présentent également, chez *S.pombe*, *A. thaliana* et la souris, des fusions chromosomiques (Baumann & Cech, 2001; Hockemeyer *et al*, 2006; Shakirov *et al*, 2005). L'implication des voies de réparation dans ces fusions n'a pour l'instant été étudiée que chez *S. pombe* (Wang & Baumann, 2008). Ces levures possèdent un mécanisme de survie en cas de télomères non fonctionnels qui est la circularisation de leurs trois chromosomes (Baumann & Cech, 2001).

Très récemment, le groupe de P. Baumann s'est intéressé au mécanisme génétique permettant cette survie. Les auteurs ont obtenu des double mutants entre *POT1* et de nombreux gènes impliqués dans la recombinaison homologe et non homologe. La recombinase Rad51 (rhp51), la protéine Rad54 (rhp54) et les trois composants du complexe MRX n'interviendraient pas dans la circularisation des chromosomes, de même que la voie de réparation NHEJ (Ku70 et Lig4). Par contre, les délétions de Rad52 (rad22), Rad1 (rad16) ou Rad10 (swi10) dans des souches mutantes pour *POT1* entraînent la mort des cellules. Ces observations conduisent à penser que la voie SSA pourrait être impliquée dans ce mécanisme. En effet, le SSA a été caractérisé, chez *S. cerevisiae*, comme faisant intervenir les protéines Rad52, Rad1/Rad10, Rpa et l'hélicase Srs2 mais pas les protéines Rad54, Rad55 et Rad57 (Paques & Haber, 1997; Sugawara *et al*, 2000; Umezu *et al*, 1998). Les double mutants entre *POT1* et *RPA* ou *SRS2* ont permis de confirmer l'implication de cette voie. L'analyse des points de jonctions des chromosomes circulaires dans les souches mutantes *pot1* a révélé la présence de régions à forte homologie de séquence en orientation directe lorsque les chromosomes sont orientés en tête à tête. Cette analyse permet de confirmer l'implication de la voie de SSA dans la circularisation des chromosomes.

II.2.2.b Devenir des télomères déprotégés suite à leur raccourcissement

L'étude de l'influence du NHEJ dans les fusions chromosomiques générées par l'absence de la télomérase, en cellules de souris, est compliquée par le fait que les mutants pour l'ADN ligase IV ne sont pas viables et que les mutants pour KU80 et la DNA-PKcs présentent eux mêmes de fortes proportions de fusions télomériques (Chapitre III.4.1 ; d'Adda di Fagagna *et al*, 2001; Hsu *et al*, 2000; Samper *et al*, 2000). Cependant, l'inactivation de KU80 ou de la DNA-PKcs chez des souris mutantes pour la télomérase, sur trois ou quatre générations, supprime les fusions chromosomiques sans répétitions télomériques (dues au

raccourcissement des télomères ; Espejel *et al*, 2002a; Espejel *et al*, 2002b). Par contre, d'autres résultats tendent à contredire l'implication de la voie NHEJ dans la génération des fusions chromosomiques liées au raccourcissement progressif des télomères (Maser *et al*, 2007).

Chez *S. pombe*, la circularisation des chromosomes par ligation intramoléculaire intervient également pour générer des survivants en absence de la télomérase (Nakamura *et al*, 1998). Le raccourcissement des télomères est assez lent chez les levures déficientes pour la sous-unité catalytique de la télomérase (Trt1), de l'ordre de 2 pb par génération (Baumann & Cech, 2000). Après plusieurs générations, les colonies *trt1* présentent un phénotype caractéristique de la formation de survivants, par circularisation des chromosomes indépendante du mécanisme de réparation par NHEJ (Ku70 ou Lig4 ; Baumann & Cech, 2000).

Afin de tester le rôle éventuel de la voie SSA dans cette circularisation des chromosomes, Wang *et al*. (2008) ont obtenu des double mutants entre *TRT1* et *RAD16*. Ces derniers présentent une accélération de l'apparition des défauts de croissance par rapport au simple mutant *trt1* et ceci de manière indépendante du raccourcissement des télomères. De plus, les double mutants ne parviennent pas à produire de survivants. Il semblerait donc que la voie de réparation par SSA soit nécessaire pour la circularisation des chromosomes chez *S. pombe*, en absence de la télomérase (Wang & Baumann, 2008).

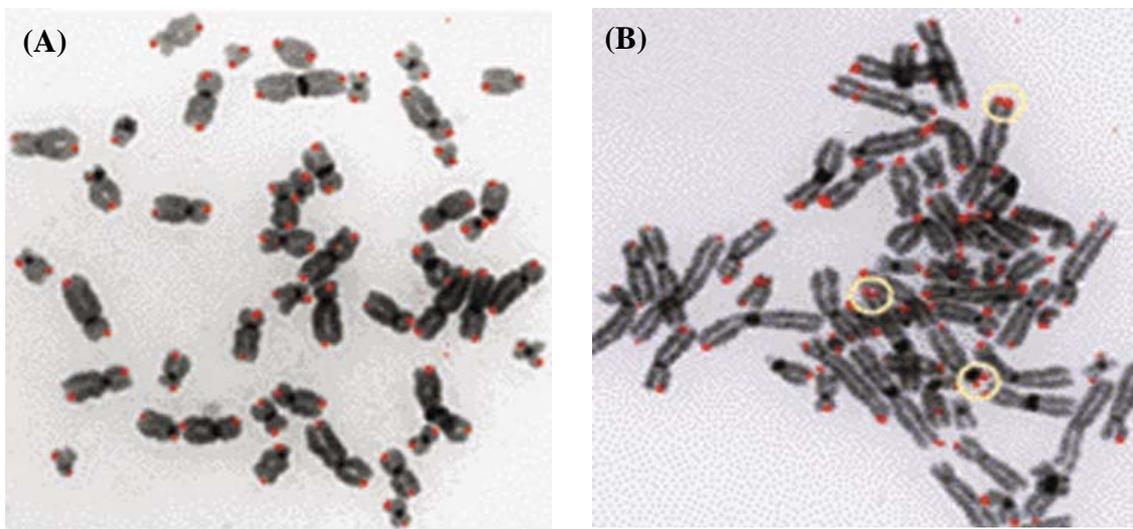
Les mécanismes impliqués dans la génération des fusions chromosomiques ont également été étudiés chez les plantes *A. thaliana*, mutantes pour le gène codant la sous unité catalytique de la télomérase (*ATTERT*). L'analyse des points de jonctions des fusions chromosomiques par PCR, dans des générations tardives de plantes mutantes pour la télomérase, a permis de mettre en évidence des délétions de répétitions télomériques sur plusieurs centaines de pb et même de régions subtélomériques (Heacock *et al*, 2004). Des

résultats identiques ont été observés chez *C. elegans* (Cheung *et al*, 2006) et *S. cerevisiae* (Hackett *et al*, 2001). Les absences d'AtKu70 et d'AtLig4 chez les plantes mutantes pour la télomérase ne sont pas suffisantes pour supprimer les fusions chromosomiques (Heacock *et al*, 2007; Riha & Shippen, 2003a).

L'analyse de la nature des évènements de fusions télomériques dans un double mutant *attert/ku* a révélé que 80% des fusions impliquait des micro-homologies de séquence, alors que dans un triple mutant *attert/ku/mre11* seulement 50% des fusions impliquait de telles micro-homologies de séquence (Heacock *et al*, 2004). En accord avec ces résultats, le triple mutant *attert/ku/lig4* a révélé que la moitié des fusions impliquait des micro-homologies de séquence par rapport au double mutant *attert/ku* (Heacock *et al*, 2004). Ces résultats suggèrent donc que les protéines AtMre11 et AtLig4 pourraient intervenir dans la voie AtKu-indépendante (MMEJ pour « Micro-homology Mediated End Joining ») chez *A. thaliana* tout comme chez *S. cerevisiae* (Ma *et al*, 2003). Néanmoins, ces deux triple mutants présentent des taux de fusions chromosomiques qui ne sont pas diminués, impliquant donc une ou plusieurs autres voies responsables de ces fusions. Les auteurs émettent l'hypothèse de l'implication de la voie SSBR impliquant PARP1 et XRCC1/ADN Ligase 3.

Les cellules somatiques n'expriment pas la télomérase et présentent un raccourcissement continu de leurs télomères. Quand ils sont trop courts, les cellules entrent en sénescence et les télomères non fonctionnels sont signalés comme des lésions de l'ADN et pris en charge par les voies de réparation qui ne sont pas de vrais mécanismes de survie (Shay & Wright, 2004).

Certaines de ces cellules parviennent à échapper à la sénescence et à devenir immortelles. Ce processus constitue une des premières étapes de la tumorigenèse. (Wright & Shay, 2001). Les cellules cancéreuses ont développé deux voies de survie: une voie



(C)

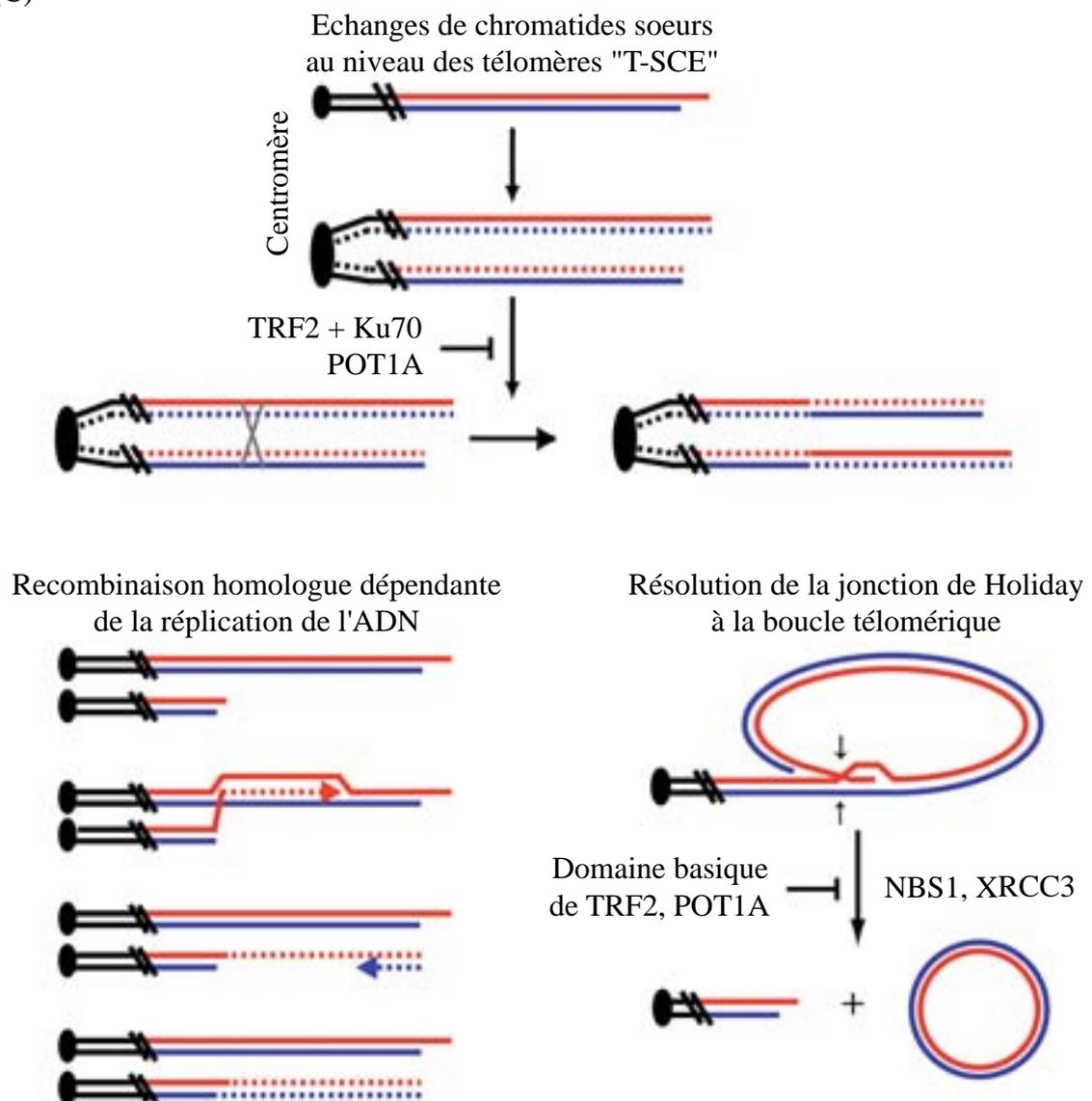


Figure 19 : Evènements de recombinaison homologue aux télomères

(A) : métaphase d'une cellule normale dont tous les chromosomes présentent un seul signal des répétitions télomériques (rouge) de chaque côté du centromère.

(B) : métaphase d'une cellule ayant mis en place le mécanisme ALT dont certaines extrémités de chromosomes présentent deux signaux rouges impliquant donc un mécanisme d'échange des répétitions télomériques utilisant la chromatide soeur.

(C) : description des trois types de recombinaison homologue aux télomères.

(d'après Londono-Vallejo *et al*, 2004 ; Cesare & Reddel, 2008)

impliquant l'immortalisation des cellules en réactivant la télomérase et ceci dans 90% des cancers et une autre voie faisant intervenir un mécanisme minoritaire (10%) basé sur l'élongation des télomères sans réactivation de la télomérase appelé ALT.

Cette voie minoritaire permet l'élongation des télomères par recombinaison. Le phénotype a été identifié dans une lignée cellulaire positive pour le ALT en utilisant un ADN marqué, inséré dans des répétitions télomériques (Dunham *et al*, 2000). En effet, les auteurs ont pu identifier la copie de cet ADN marqué sur d'autres télomères, dans des cellules ALT mais pas dans des cellules où la télomérase a été réactivée. Ce mécanisme de recombinaison homologue a alors été suggéré dépendant de la réplication. Afin de vérifier cette hypothèse, la technique de CO-FISH, permettant d'orienter les chromosomes en métaphase du fait de l'asymétrie de séquence des télomères (un brin riche en C et un riche en G), a été adaptée pour étudier la réplication aux télomères (Meyne & Moyzis, 1994). Après une seule réplication des cellules, le CO-FISH permet de détecter un seul signal par extrémité de chromosome dans des cellules normales (Figure 19A). Or, dans les cellules ALT, cette technique a permis d'identifier des extrémités de chromosomes avec deux signaux impliquant un échange télomérique après la réplication (Figure 19B ; Bechter *et al*, 2004; Londono-Vallejo *et al*, 2004). Ces évènements ont été nommés T-SCE pour « Telomere-Sister Chromatide Exchange » bien que l'on ne puisse pas exclure que certains de ces évènements utilisent d'autres chromosomes ou des éléments extrachromosomiques contenant des répétitions télomériques. L'observation par microscopie électronique des cellules ALT a permis de visualiser des cercles extrachromosomiques contenant des répétitions télomériques de taille similaire aux « T-loop », générés par un mécanisme dépendant des protéines XRCC3 et NBS1 (Cesare & Griffith, 2004; Compton *et al*, 2007). Ceci suggère que ces structures secondaires pourraient être produites par la résolution de la jonction de Holliday de la « T-loop » (Cesare & Griffith, 2004). Cependant, seule la protéine NBS1 semblerait nécessaire

pour maintenir le mécanisme ALT dans des cellules humaines. L'absence de cette protéine par ARN interférence entraîne une inhibition de la maintenance télomérique dépendante du ALT par diminution du nombre de « APB » (Chapitre I.6.5.c) et de la longueur des télomères (Zhong *et al*, 2007).

Les cellules ALT présentent donc trois types de recombinaison homologue susceptible de se produire au niveau des télomères (Figure 19C) :

- le premier est basé sur les échanges télomériques post-réplicatifs (« T-SCE »),
- le deuxième est un mécanisme de copie des répétitions télomériques lié à la réplication (BIR, Figure 13) et
- le troisième nécessite la résolution des jonctions de Holliday des « T-loop ».

Actuellement, aucune donnée ne permet d'établir de liens directs entre ces différents évènements de recombinaison homologue.

Les levures *S. cerevisiae* présentent également un mécanisme d'élongation des télomères en absence de la télomérase. En effet, de nombreuses levures mutantes pour la télomérase meurent, mais des survivants sont obtenus. Ces derniers maintiendraient l'intégrité de l'extrémité de leurs chromosomes par l'amplification de parties subtélomériques ou des répétitions télomériques (Lundblad & Blackburn, 1993) et par un mécanisme de « rolling circle replication », faisant intervenir des petits cercles extrachromosomiques d'ADN télomérique (Natarajan *et al*, 2003; Natarajan & McEachern, 2002). La voie de réparation par recombinaison homologue, dépendante de Rad52, semble impliquée dans l'élongation des télomères en absence de la télomérase (Lundblad & Blackburn, 1993; Teng & Zakian, 1999). Cependant il est possible de distinguer deux voies différentes, dans la nature des substrats et au niveau génétique (Le *et al*, 1999; Teng *et al*, 2000). Certaines levures ont été classées de type I dépendant de Rad51 et survivent par recombinaison entre séquences répétées subtélomériques. Les autres sont dites de type II indépendant de Rad51 mais dépendant de

Rad50 et Rad59 et survivent par recombinaison avec des cercles extrachromosomiques de séquences télomériques TG₁₋₃ imparfaites (Le *et al.*, 1999; Teng *et al.*, 2000; Teng & Zakian, 1999). Ces évènements ont été suggérés dépendants de la réplication de l'ADN par un mécanisme d'amplification de cercle nécessitant une ADN polymérase (McEachern & Haber, 2006).

Récemment, Lydeard *et al.* (2007) ont produit des souches de levures délétées pour *TLC1* (gène codant la sous unité ARN de la télomérase) et pour *POL32* (gène codant une sous unité de POL δ : principale ADN polymérase répliquative). Alors que les levures déficientes pour la télomérase sont capables de générer des survivants, les double mutants *tlc1/pol32* en sont incapables tout comme les double mutants *tlc1/rad52* (Le *et al.*, 1999). Ces résultats mettent en avant le rôle important de la voie Pol32 dépendante. Celle-ci générerait des survivants de types I et II en utilisant comme substrats les séquences répétées subtélomériques ou des cercles extrachromosomiques de séquences télomériques TG₁₋₃ imparfaites. Il semblerait donc que les deux voies de recombinaison produisant des survivants soient dépendantes de la réplication (BIR, Figure 13 ; Lydeard *et al.*, 2007).

Chez *A. thaliana*, l'hétérodimère AtKu (complexe majeur de la voie NHEJ) pourrait être impliqué dans l'inhibition du mécanisme ALT chez les plantes mutantes pour la télomérase. En effet, les plantes mutantes *atku70* et les double mutants *attert/ku70* présentent des cercles télomériques. De plus, les cals (cultures *in vitro* d'amas cellulaires indifférenciés et dérivés de jeunes feuilles) dérivés de ce double mutant présentent des télomères plus longs et hétérogènes que ceux dérivés des plantes mutantes pour la télomérase (Zellinger *et al.*, 2007).

D'autre part, les plantes mutantes pour la télomérase présentent un taux de raccourcissement très lent des télomères par génération, environ 250 à 500 pb, (Fitzgerald *et al.*, 1999) qui ne correspond pas à la perte estimée des répétitions télomériques due à la réplication partielle des

extrémités des chromosomes (environ 5000 à 10000 nucléotides). Pour expliquer cette différence, le groupe de J. Fajkus a analysé la longueur des télomères entre des plantes provenant de graines dans des siliques du haut (lignées U pour « Upper ») et du bas de la hampe florale (lignées L pour « Lower »). En effet, il est attendu environ une trentaine de divisions d'écart entre les lignées U et L. L'analyse de la longueur des télomères entre les lignées U et L et entre générations successives a permis aux auteurs de suggérer un possible mécanisme ALT chez les plantes *A. thaliana* (Ruckova *et al*, 2008).

Lorsque les télomères deviennent non fonctionnels, après la perte de la télomérase, d'un des constituants du complexe « Shelterin » ou par une longueur critique des télomères, ceux-ci sont signalés comme étant des cassures de l'ADN, permettant l'arrêt du cycle cellulaire et donc la prise en charge de ces dommages. Différents mécanismes peuvent alors se mettre en place du fait des très nombreuses interactions protéiques qui existent entre les constituants du « Shelterin » et les protéines de la réparation. La prise en charge des télomères non fonctionnels par les machineries de réparation n'est donc pas un système de survie parfait puisqu'il génère et amplifie l'instabilité génétiques chez ces organismes. Néanmoins, chez les plantes, ce mécanisme permet un développement suffisant pour pouvoir générer des descendants. De manière surprenante, des télomères normaux qui ne doivent pas être reconnus comme des CDB sont associés à de nombreux complexes de la réparation des CDB (hétérodimère KU, MRN, ERCC1/XPF,...). Certains d'entre eux semblent jouer eux-mêmes des rôles dans la maintenance et la stabilité des télomères qui seront évoqués dans le prochain chapitre.

Chapitre III

Les protéines de la réponse aux dommages de l'ADN et leur rôle dans l'homéostasie télomérique

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques où se retrouvent associés une trentaine de protéines et complexes de la maintenance télomérique et de la signalisation-réparation des CDB (ATM/ATR, WRN/BLM, hétérodimère KU, MRN, XPF/ERCC1,...). Certains d'entre eux jouent directement un rôle dans la maintenance et/ou la stabilité des télomères qui sera rapidement évoqué. Par contre, les complexes MRN et XPF/ERCC1 seront plus amplement détaillés, en particulier du point de vue de leur action dans l'homéostasie télomérique.

III.1 Les protéines de la signalisation des cassures

III.1.1 ATM

ATM est une protéine très importante de la signalisation des dommages de l'ADN (Chapitre II.2.1). Les cellules des patients atteints de la maladie *Ataxia Telangiectasia*, déficientes pour ATM, présentent une forte instabilité chromosomique avec des fusions télomériques ainsi qu'une accélération du raccourcissement des télomères. Ces phénotypes de l'altération de l'homéostasie télomérique sont indépendants de l'activité de la télomérase. Les mêmes observations ont été réalisées chez les levures déficientes pour son homologue Tel1 (Berthiau *et al*, 2006; Greenwell *et al*, 1995; Lustig & Petes, 1986). Très récemment, il a été montré que ces phénotypes de l'homéostasie télomérique étaient dépendants du motif TAN pour « Tel1/ ATM N-Terminal motif » présent dans ces protéines (Seidel *et al*, 2008). Chez *A. thaliana*, il semblerait qu'ATM participe à la protection des télomères mais uniquement dans un contexte de télomères non fonctionnels (plantes mutantes pour la télomérase ; Vespa *et al*, 2005; Vespa *et al*, 2007).

III.1.2 RAD9

En réponse aux dommages de l'ADN, la protéine humaine RAD9 est phosphorylée par ATM. RAD9 forme un complexe avec les protéines RAD1 et HUS1, complexe appelé «9-1-1». Il est impliqué dans les points de contrôle du cycle cellulaire et a été suggéré comme senseur des lésions de l'ADN (Chen *et al*, 2001c; St Onge *et al*, 1999). De plus, les souches de levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* mutantes pour ces gènes présentent un raccourcissement des télomères (Longhese *et al*, 2000; Nakamura *et al*, 2002) tout comme les cellules de mammifères déficientes pour *RAD9* (Pandita *et al*, 2006).

III.1.3 FANCA « Fanconi ANaemia Complementation group A »

La protéine FANCA est impliquée dans la maladie génétique *Fanconia Anemia* (FA) caractérisée par une instabilité chromosomique et une fréquence élevée de cancers. FANCA est également une protéine agissant en complexe avec d'autres protéines de la famille FA et pourrait agir dans la signalisation des lésions de l'ADN (Garcia-Higuera *et al*, 2001). Les patients atteints de FA présentent un raccourcissement accéléré des télomères avec la présence d'ADN extrachromosomique contenant des répétitions télomériques (Ball *et al*, 1998; Callen *et al*, 2002; Hanson *et al*, 2001).

Ainsi, de nombreuses protéines de la signalisation des cassures de l'ADN sont présentes aux télomères et jouent un rôle important dans leur homéostasie.

III.2 Les protéines de modification de la topologie de l'ADN

III.2.1 WRN/BLM

Les syndromes de Werner et Bloom sont des maladies génétiques associées à une augmentation de la fréquence des risques de cancers, au vieillissement et à une forte

instabilité chromosomique. Ces protéines appartiennent à la famille des hélicases RecQ et sont impliquées dans la résolution des structures topologiques particulières de l'ADN (exemples : G-quadruplex, jonctions de Holliday ; Thompson & Schild, 2002). Les protéines WRN et BLM ont été montrées comme étant physiquement associées à TRF2 (Opresko *et al*, 2002). De plus, des fibroblastes humains de patients atteints du syndrome de Werner présentent une accélération du raccourcissement de leurs télomères (Schulz *et al*, 1996).

III.3 Les protéines de la recombinaison homologue

III.3.1 RAD54

Des études en cellules MEF, dérivées de souris déficientes pour *RAD54*, ont permis d'observer un raccourcissement de la longueur des télomères sans modification de l'activité de la télomérase ainsi que des fusions chromosomiques impliquant les télomères (Jaco *et al*, 2003).

III.3.2 RAD51D

La protéine RAD51D, appartenant au groupe de paralogues de RAD51 (Chapitre I.1.2.b), est physiquement présente au niveau des télomères, comme cela a été montré par des expériences de co-localisation avec TRF2, de microscopie électronique et d'immunoprécipitation de la chromatine dans des cellules humaines. D'autre part des cellules MEF dérivées de souris déficientes pour *RAD51D* présentent un raccourcissement de la longueur des télomères indépendant de la télomérase ainsi que des fusions chromosomiques impliquant les télomères (Tarsounas *et al*, 2004).

III.3.3 BRCA1

La protéine BRCA1 est un suppresseur de la carcinogenèse du sein et des ovaires (Welsh *et al*, 2000). Cette protéine a été impliquée dans la maintenance de l'intégrité du génome, la régulation transcriptionnelle ainsi que le remodelage de la chromatine (Starita & Parvin, 2003; Welsh *et al*, 2000). Des études récentes en cellules de mammifères, ont décrit que cette protéine était physiquement présente aux télomères (co-localisation avec TRF1 et TRF2). De plus, BRCA1 est impliquée dans la régulation négative de la longueur des télomères ainsi que dans leur protection (Al-Wahiby & Slijepcevic, 2005; French *et al*, 2006; McPherson *et al*, 2006).

Le rôle de la recombinaison homologue au niveau des télomères concernant le mécanisme de ALT chez les cellules humaines et la levure a déjà été discuté, mais il semblerait que certaines protéines de la recombinaison homologue soient directement impliquées dans l'homéostasie télomérique en régulant la longueur des télomères ainsi qu'en les protégeant.

III.4 Les protéines de la recombinaison non-homologue

III.4.1 Les protéines du NHEJ

III.4.1.a Hétérodimère KU

Chez la plupart des eucaryotes, l'hétérodimère KU (composé des sous-unités KU70 et KU80) est physiquement présent aux télomères de manière indépendante de l'ADN-PKcs (d'Adda di Fagagna *et al*, 2001; Hsu *et al*, 1999) et ceci à travers des interactions avec TRF1 et TRF2 chez les mammifères (Hsu *et al*, 2000; Song *et al*, 2000) et à travers Rap1 chez la levure (Martin *et al*, 1999). De part sa localisation aux télomères, l'hétérodimère KU est très

fortement impliqué dans l'homéostasie télomérique que ce soit dans la régulation de leur longueur ainsi que dans leur protection.

III.4.1.a.α Dans la régulation de la longueur des télomères

Chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* déficientes pour l'hétérodimère Ku, la longueur des télomères diminue plus rapidement que chez des levures sauvages (Boulton & Jackson, 1998; Nugent *et al*, 1998; Porter *et al*, 1996). Il semblerait donc que l'hétérodimère Ku agisse comme un régulateur positif de la longueur des télomères chez des organismes unicellulaires.

Au contraire, chez *A. thaliana* et la drosophile, l'absence de Ku70 ou Ku80 entraîne une augmentation de la longueur des télomères. Le processus impliqué dépend de l'activité télomérase uniquement chez *A. thaliana* (Bundock *et al*, 2002; Gallego *et al*, 2003b; Melnikova *et al*, 2005; Riha *et al*, 2002).

Chez les mammifères, la contribution de l'hétérodimère KU dans la maintenance télomérique est bien moins claire puisque des résultats contradictoires d'élongation et de raccourcissement des télomères ont été observés entre différentes lignées de MEF dérivées de souris déficientes pour KU70 ou KU80 (d'Adda di Fagagna *et al*, 2001; Samper *et al*, 2000) et entre différentes lignées de cellules humaines hétérozygotes pour KU80 (Jaco *et al*, 2004; Myung *et al*, 2004; Uegaki *et al*, 2006). Ces résultats contradictoires pourraient provenir des niveaux différents de l'activité de la télomérase dans ces lignées cellulaires.

La régulation de l'activité de la télomérase par l'hétérodimère Ku a été suggérée par des observations d'interaction entre la sous-unité Ku80 et une structure en boucle de la sous-unité ARN de la télomérase chez *S. cerevisiae* (Stellwagen *et al*, 2003) ainsi que chez l'Homme (Ting *et al*, 2005). De plus chez l'Homme, une autre étude a montré que l'hétérodimère KU est capable d'interagir directement avec la sous-unité catalytique de la télomérase indépendamment de la partie ARN ou de l'ADN télomérique (Chai *et al*, 2002).

III.4.1.a.β Dans la protection des télomères

Des études en cellules de mammifères ont révélé le rôle de l'hétérodimère KU dans la protection de l'extrémité des chromosomes puisque son absence, chez des souris et des lignées cellulaires humaines, entraîne une instabilité chromosomique dont des fusions télomériques (d'Adda di Fagagna *et al*, 2001; Jaco *et al*, 2004; Samper *et al*, 2000). Par contre, aucune instabilité chromosomique avec ou sans fusions télomériques n'a été détectée pour les mutants Ku chez *A. thaliana*, la drosophile et *S. cerevisiae* (Gallego *et al*, 2003a; Melnikova *et al*, 2005; Riha *et al*, 2002).

III.4.1.b ADN-PKcs

III.4.1.b.α Dans la régulation de la longueur des télomères

Chez les mammifères, comme pour les mutants *ku*, la contribution de cette protéine n'est pas claire puisque des résultats contradictoires ont montré un raccourcissement de la longueur des télomères (Espejel *et al*, 2004) alors qu'une autre équipe a montré une élongation (Hande *et al*, 1999) et enfin un dernier article mentionne que les auteurs n'ont pas identifié de différence dans la longueur des télomères (Gilley *et al*, 2001). Bien que le rôle de la protéine ADN-PKcs dans l'homéostasie télomérique ne soit pas établi avec certitude, un rôle dans la régulation de l'activité de la télomérase a été suggéré. En effet, l'ADN-PKcs est capable d'interagir avec la protéine KIP, pour « Kinase Interacting Protein », s'associant directement avec la sous-unité catalytique TERT de la télomérase. Cette interaction semble être dépendante de la sous-unité ARN de la télomérase ainsi que de l'ADN télomérique (Lee *et al*, 2004). De plus, la surexpression de cette protéine KIP entraîne une augmentation de l'activité télomérase ainsi que de la longueur des télomères.

Protéines	Organismes	Fonction	Homéostasie télomérique		Interactions avec complexe "Shelterin"	
			Longueur	Protection		
ATM	Homme	Signalisation	Courte	+	+	
	Souris				ND	
	<i>S. cerevisiae</i>				-	
	<i>A. thaliana</i>				-	
RAD9	Homme	Signalisation	ND	+	+	
	Souris					
	<i>S. cerevisiae</i>					
FANCA	Homme	Signalisation	Courte	+	ND	
WRN/ BLM	Homme	Hélicase	Courte	ND	+	
RAD54	Souris	HR	Courte	+	ND	
RAD51D	Homme		Courte	+	+	
	Souris					
BRCA1	Homme	HR	Longue	+	+	
	Souris		ND		ND	
Hétérodimère KU	Homme	NHEJ	Courte et Longue	+	+	
	Souris					
	<i>S. cerevisiae</i>				Courte	ND
	<i>A. thaliana</i>				Longue	-
ADN-PKcs	Homme	NHEJ	Courte et Longue	+	+	
	Souris					
PARP-1	Homme	SSBR	Normale	-	+	
PARP-2	Homme		Normale	+	+	

Tableau 4 : Protéines impliquées dans la voie de réponse aux dommages de l'ADN et leur rôle dans la maintenance télomérique chez différents organismes modèles (ND : non déterminé; (+) : la protéine est impliquée; (-) : la protéine n'est pas impliquée (d'après Slijepcevic, 2006)

III.4.1.b.β Dans la protection des télomères

De même que pour l'hétérodimère KU, l'ADN-PKcs est impliquée dans la protection de l'extrémité du chromosome, chez les mammifères. Que ce soit en cellules humaines ou chez des souris déficientes pour le gène codant cette protéine, les modèles présentent une importante instabilité chromosomique liée à des fusions chromosomiques contenant les répétitions télomériques au point de jonction (Espejel *et al*, 2004; Gilley *et al*, 2001; Zhang *et al*, 2005).

III.4.2 Les protéines du SSBR (PARP-1 et PARP-2)

Les protéines PARP-1 et PARP-2 s'associent avec TRF2 et sont capables d'agir sur sa fixation à l'ADN télomérique par poly(ADP-ribosyl)ation de TRF2. Des expériences d'immunolocalisation ont montré que PARP-1 est physiquement présent au niveau des télomères et est enrichi en contexte de télomères non fonctionnels comme dans le cas de cellules murines déficientes pour la télomérase ou suite à des dommages provoqués par des agents mutagènes. PARP-1 est nécessaire pour protéger les télomères non fonctionnels des fusions télomériques alors que PARP-2 semble directement intervenir dans la protection des télomères (Dantzer *et al*, 2004; Gomez *et al*, 2006).

Ainsi, de nombreux composants des voies de réponse aux dommages de l'ADN apparaissent être physiquement présents au niveau des télomères et nécessaires à l'homéostasie télomérique. Ceux-ci interviennent en régulant la longueur des télomères ainsi que leur protection (Tableau 4). Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressé plus particulièrement au rôle de deux complexes majeurs dans l'homéostasie télomérique. Le complexe AtMre11/Rad50/Nbs1 impliqué dans plusieurs voies telles que la signalisation et les réparations par recombinaison ainsi que le complexe AtRad1/Ercc1 intervenant lui aussi dans la réparation des dommages à l'ADN.

III.5 Le complexe MRX(N) et son rôle dans l'homéostasie télomérique

Le complexe MRX(N) (Mre11/Rad50/Xrs2 ou NBS1) est un complexe impliqué dans de nombreux mécanismes tels que la maturation des extrémités lors de la recombinaison et la réparation des cassures double-brin, la signalisation de ces dernières ainsi que dans le contrôle de l'homéostasie télomérique.

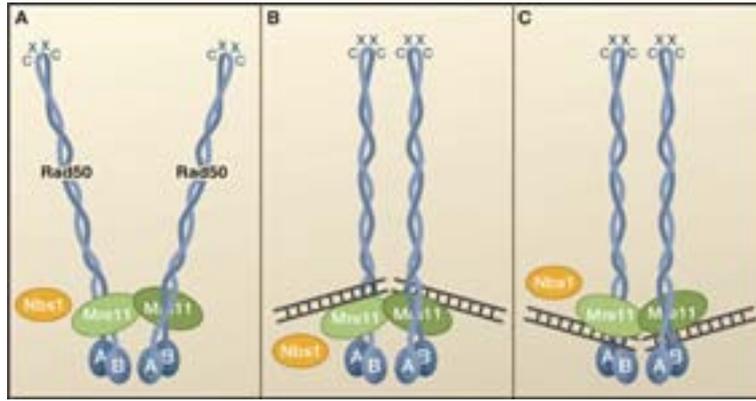
III.5.1 Les protéines du complexe MRX(N)

Le complexe MRX, chez les eucaryotes inférieurs ou MRN chez les eucaryotes supérieurs, est donc un complexe multifonction composé des protéines Mre11, Rad50 et Xrs2 ou NBS1. Ces protéines ont été identifiées par l'hypersensibilité des mutants aux agents inducteurs de cassures de l'ADN chez différents eucaryotes aussi bien chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, que chez les vertébrés, les insectes ou encore les plantes (D'Amours & Jackson, 2002; Gallego *et al*, 2001; Waterworth *et al*, 2007).

III.5.1.a Mre11

Chez *S. cerevisiae* et en cellules humaines, la protéine Mre11 est capable de se fixer à des ADN simple-brin, comme à des ADN double-brin (de Jager *et al*, 2001a; Furuse *et al*, 1998; Paull & Gellert, 1999; Usui *et al*, 1998). De plus, la protéine Mre11 présente une activité exonucléasique 3'→5', capable *in vitro* de dégrader une molécule d'ADN simple-brin ou double brin linéaire (Paull & Gellert, 1998). Cette activité exonucléasique est dépendante du manganèse sous forme de cations bivalents Mn²⁺, mais indépendante de l'ATP (Furuse *et al*, 1998; Paull & Gellert, 1998; Usui *et al*, 1998). Cette protéine présente également une activité endonucléasique, structure spécifique, capable de couper les molécules d'ADN structurées en G-quadruplex, en Y au niveau de la jonction simple- double-brin, et également

(A)



(A) : Le complexe MRN, (A et B : domaines ATPase Walker)
(B et C) : Deux possibilités de fixation de MRE11 sur l'ADN

(B)

Substrats	Activité Exonucléase 3'→ 5'
	Extrémité 5' sortante +
	Extrémité franche +
	Extrémité 3' sortante +
Activité Endonucléase	
	Extrémité 3' sortante +
	Structure G-quadruplex +
	Molécule d'ADN en Y +
	Épingle à cheveux avec mésappariement +
	Épingle à cheveux sans mésappariement +

Figure 20 : Organisation structurale et propriétés biochimiques du complexe MRX(N)
(d'après Kanaar & Wyman, 2008 - D'Amours & Jackson, 2002)

les structures en épingle à cheveux avec et sans mésappariement, au niveau simple-brin en 3' de la boucle (Figure 20A ; Ghosal & Muniyappa, 2005; Paull & Gellert, 1998).

III.5.1.b Rad50

La protéine Rad50 est une protéine possédant la plupart des caractéristiques tridimensionnelles des protéines de l'entretien structural des chromosomes (Structural Maintenance of Chromosomes, SMC). Ces protéines sont impliquées dans la condensation des chromosomes et la cohésion des chromatides sœurs au cours des divisions cellulaires (Hirano, 2002; Strunnikov & Jessberger, 1999). Chez la levure *S. cerevisiae* et l'archéobactérie *Pyrococcus furiosus*, la protéine Rad50 purifiée est capable de se fixer à des ADN simple- ou double-brin *in vitro* et nécessite la présence d'ATP comme cofacteur (Hopfner *et al*, 2000; Raymond & Kleckner, 1993).

III.5.1.c Xrs2 (NBS1)

Xrs2 est la protéine dont l'activité de fixation à l'ADN a été mise en évidence le plus récemment (Trujillo *et al*, 2003). De façon similaire à Rad50 et Mre11, la protéine Xrs2 est capable de se fixer à des molécules d'ADN simple- ou double-brin mais préférentiellement à des molécules d'ADN présentant une transition entre une région simple- et double-brin. Les protéines Xrs2 ou NBS1 semblent avoir un rôle très important dans la localisation intranucléaire de Mre11 (Carney *et al*, 1998; Tauchi *et al*, 2001).

III.5.2 Interactions entre les différents composants du complexe MRX(N)

Les interactions entre les trois constituants du complexe MRX(N) ont été identifiées par des expériences de double-hybride et de co-immunoprécipitation. Chez les levures, l'homme et *A. thaliana*, Mre11 est capable d'interagir avec les protéines Rad50, Xrs2 (NBS1),

ainsi que de s'homodimériser, pour former deux complexes différents : le complexe MRX(N) ainsi que le complexe MR, uniquement montré chez *S. cerevisiae* et l'Homme (D'Amours & Jackson, 2002; Waterworth *et al*, 2007).

III.5.2.a Les propriétés de fixation à l'ADN du complexe MRX(N)

Chez l'Homme, le complexe MRN est capable de se fixer à des ADN double-brin linéaires *in vitro* (Paull & Gellert, 1999). D'autre part, l'ATP est un cofacteur essentiel pour la fixation du complexe MRN à l'ADN et la séparation du co-complexe MRN-ADN est dépendant de l'hydrolyse de l'ATP (de Jager *et al*, 2002). Le complexe MRX de levure se fixe préférentiellement aux extrémités des molécules d'ADN en établissant des ponts entre des molécules d'ADN double-brin linéaires (Figure 20A ; Chen *et al*, 2001b; de Jager *et al*, 2002; Trujillo *et al*, 2003).

III.5.2.b Les propriétés biochimiques du complexe MRX(N)

Chez l'Homme, le complexe MRN est capable de couper la partie 3'-sortante au niveau de la jonction simple-/double-brin générant une extrémité franche qui est un substrat pour son activité exonucléasique 3'→5' (Figure 20B ; Paull & Gellert, 1999; Trujillo *et al*, 1998). Ces activités sont dépendantes du manganèse (Mn²⁺) et de l'hydrolyse de l'ATP par la protéine Rad50.

III.5.3 Les rôles du complexe MRX

III.5.3.a Dans la réponse cellulaire suite à une CDB

III.5.3.a.α La signalisation des CDB

Comme mentionné précédemment dans le Chapitre II.2.1, le recrutement du complexe MRN aux sites de cassures de l'ADN se fait de manière très rapide tout comme l'activation

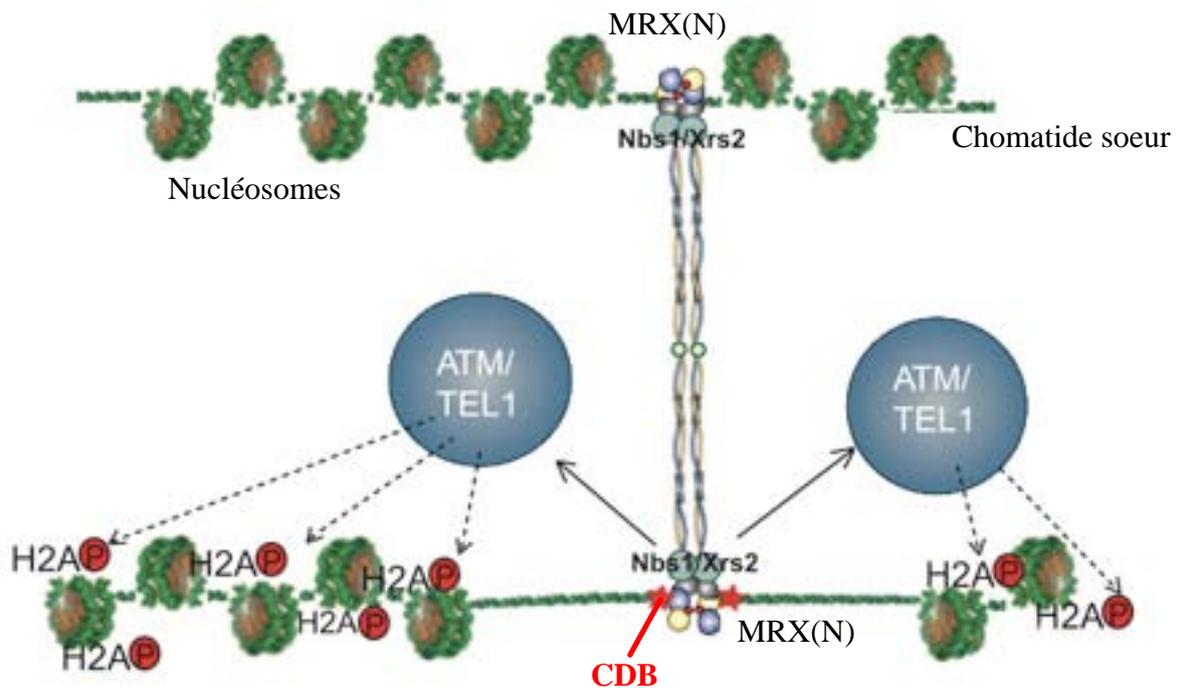


Figure 21 : Schéma des premières étapes de la signalisation des cassures à l'ADN

Le complexe MRX(N) se lie aux extrémités de la cassure et permet le recrutement et l'activation de Tel1 (ATM). Cette dernière phosphoryle l'histone H2A (variant H2AX chez métazoaires). La phosphorylation se propage sur plusieurs centaines de Kb. L'ouverture de la chromatine permet ensuite au complexe MRX(N) de recruter les différents acteurs de la réparation des CDB.

(p) : phosphorylation, (d'après Williams *et al.*, 2007)

d'ATM ce qui complique l'étude de la cinétique (Figure 21 ; Bakkenist & Kastan, 2003; Kozlov *et al*, 2003).

Un certain nombre d'observations suggèrent que le complexe MRN serait le véritable senseur des cassures de l'ADN. En effet, l'activation d'ATM est retardée dans des cellules de personnes atteintes de la maladie ATLD pour «*Ataxia Telangiectasia-Like Disorder*», présentant un faible niveau de complexe MRN ainsi que dans les cellules de personnes atteintes de NBS pour «*Nijmegen Breakage Syndrome*» (Uziel *et al*, 2003). Ces maladies génétiques sont caractérisées par une immunodéficience, une sensibilité accrue aux radiations, des défauts des points de contrôle du cycle cellulaire et une fréquence élevée de tumorigenèse. D'autre part, Cersaletti & Concannon (2004) ont montré que MRE11/RAD50 stimulait l'activation d'ATM après de faibles doses d'irradiation (Cersaletti & Concannon, 2004) et que le domaine d'interaction de NBS1 avec ATM était important pour l'activation directe d'ATM (Cersaletti *et al*, 2006).

Chez la souris des résultats contradictoires ont été observés entre des souris déficientes pour NBS1 qui ne présentaient pas de véritable diminution du recrutement et d'activation d'ATM (Difilippantonio *et al*, 2007) alors que des délétions conditionnelles de NBS1 inhibaient complètement l'activation d'ATM (Difilippantonio *et al*, 2005). Il semblerait que le recrutement d'ATM ne soit pas uniquement dépendant de NBS1, ce qui suggère qu'ATM serait capable d'interagir avec les autres protéines du complexe MRN (Lee & Paull, 2004; Stracker *et al*, 2007). Très récemment, il a été démontré dans des cellules MEF, le rôle majeur de ce complexe dans l'activation d'ATM aux télomères non fonctionnels, et ceci de manière indépendante de l'activité nucléase de MRE11 (Buis *et al*, 2008).

Chez *S. cerevisiae*, l'activation de la protéine kinase Tel1 (homologue d'ATM) est dépendante du complexe MRX (D'Amours & Jackson, 2001; Grenon *et al*, 2001). De plus

chez la levure, le complexe MRX se fixe aux extrémités des CDB de façon indépendante de Tel1 et son recrutement aux CDB est dépendant de la protéine Xrs2 (Nakada *et al*, 2003).

En plus de son rôle de senseur, le complexe MRX(N) semble intervenir en aval d'ATM. En effet, les protéines NBS1/Xrs2 et Mre11 sont respectivement des cibles de phosphorylation des protéines kinases ATM et Tel1. L'absence de phosphorylation de NBS1/Xrs2 ne permet pas aux cellules d'activer les points de contrôle du cycle cellulaire après irradiation ou exposition à un agent chimique inducteur de CDB (D'Amours & Jackson, 2001; Nakada *et al*, 2003).

III.5.3.a.β Activation des points de contrôle du cycle cellulaire

Le complexe MRN est également impliqué dans l'activation des points de contrôle aux transitions entre les phases G1/S et G2/M (D'Amours & Jackson, 2002). Des résultats équivalents ont été obtenus chez *S. cerevisiae* et *S. pombe* montrant que le complexe MRX fait partie d'une voie de contrôle du cycle cellulaire en réponse à la formation de CDB (Usui *et al*, 2001). La protéine Mre11 est nécessaire à l'activation des points de contrôles G1/S, intra-S et G2/M après irradiation, alors que les trois composants du complexe MRX sont requis pour activer le point de contrôle intra-S après traitement à l'hydroxyurée (inhibiteur de la synthèse des dNTP entraînant la formation de CDB ; Chahwan *et al*, 2003; D'Amours & Jackson, 2001; Grenon *et al*, 2001).

L'ensemble de ces observations montre que le complexe MRX est un composant essentiel de la réponse cellulaire à la survenue de CDB.

III.5.3.b Dans les mécanismes de recombinaison

Les mécanismes de recombinaison homologue et non homologue font intervenir le complexe MRX(N). Son implication dans ces voies est concordant avec ses fonctions biochimiques de liaison et son rôle dans la maturation des extrémités de l'ADN. De plus, les

différents mutants (de délétion ou conditionnels) des gènes codant pour les protéines de ce complexe présentent des phénotypes d'hypersensibilité aux agents inducteurs de CDB, une instabilité chromosomique ainsi qu'un phénotype de létalité chez les mammifères, les plantes et la drosophile (Buis *et al*, 2008; Bundock *et al*, 2002; Gallego *et al*, 2001; Gorski *et al*, 2004; Luo *et al*, 1999).

III.5.3.b.α Dans les mécanismes de recombinaison homologue

Chez *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. elegans* et *A. thaliana*, le complexe MRX(N) est essentiel dans les mécanismes de recombinaison méiotique puisque les délétions de gènes *MRE11*, *RAD50* ou *XRS2 (NBS1)* entraînent une stérilité totale chez ces organismes (Assenmacher & Hopfner, 2004; Bleuyard & White, 2004; Puizina *et al*, 2004; Waterworth *et al*, 2007).

Par contre, les délétions de ces mêmes gènes conduisent, de manière surprenante, à un phénotype hyper-recombinant pour la recombinaison mitotique chez *S. cerevisiae* (Assenmacher & Hopfner, 2004), *S. pombe* (Hartsuiker *et al*, 2001) ou encore *A. thaliana* (Gherbi *et al*, 2001). Ces résultats contradictoires entre recombinaison méiotique et mitotique suggèrent deux rôles différents pour le complexe MRX(N) dans les mécanismes de recombinaison homologue qui n'ont à ce jour pas été identifiés.

Chez les levures *S. cerevisiae* mutantes *rad50s* (bloquant la méiose en prophase ; Alani *et al*, 1990) ou déficientes pour *MRE11S* et *MRE11-ND* (sans activité nucléase ; Furuse *et al*, 1998; Usui *et al*, 1998; Young *et al*, 2002), des défauts de maturation des CDB (pas de dégradations 5'→3') ont été observés pendant la recombinaison méiotique. Ces résultats, également obtenus chez *S. pombe* pour des souches *rad50s* (Young *et al*, 2002), suggèrent un rôle majeur pour ces protéines dans la liaison et la maturation des extrémités des CDB pendant la recombinaison homologue méiotique.

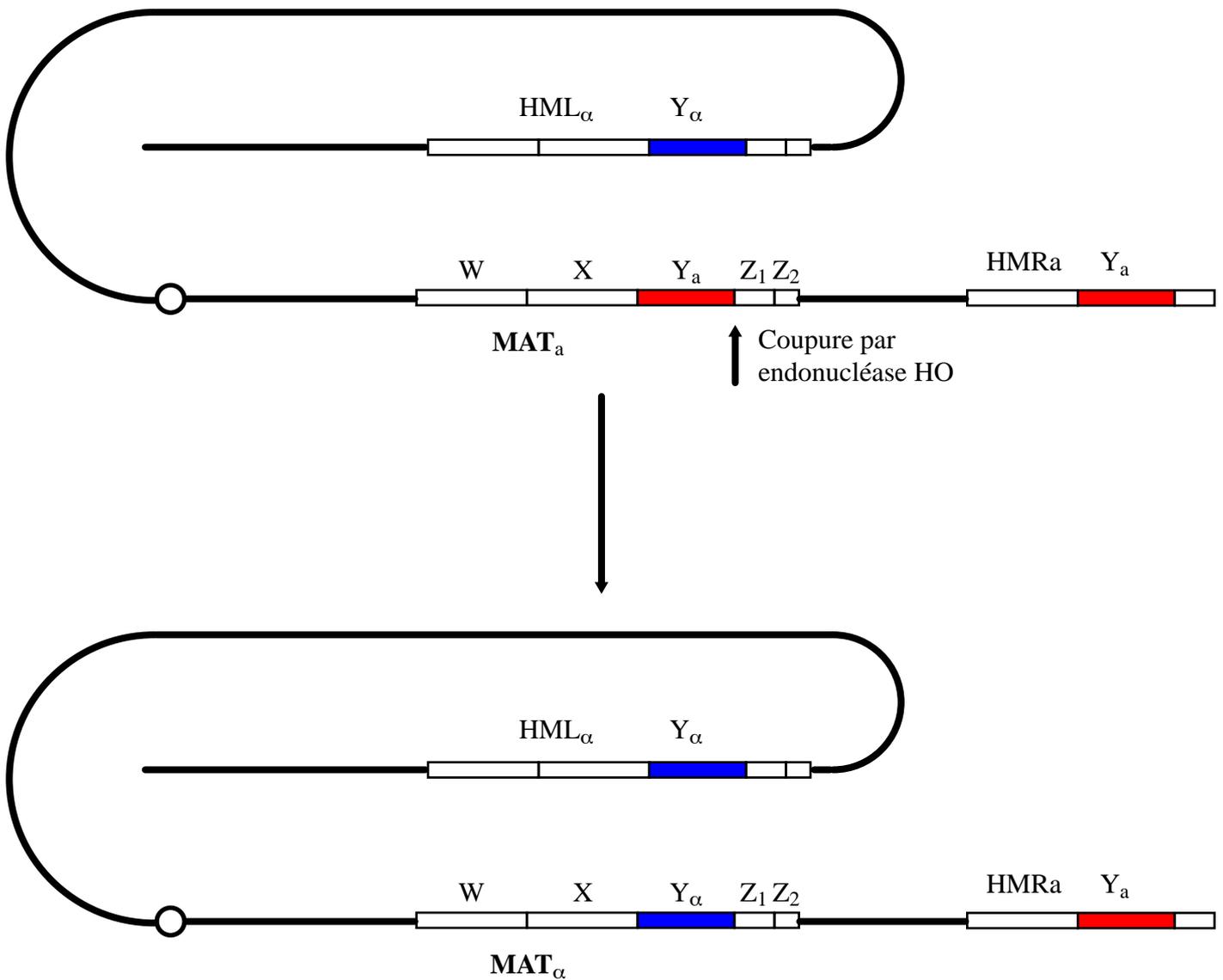


Figure 22 : Changement de type sexuel chez *S. cerevisiae*

L'endonucléase HO réalise une cassure double-brin entre les régions Y et Z₁ au locus MAT. Après maturation des extrémités de la cassure, la région simple brin envahit le locus donneur HML, dans l'exemple, et amorce une synthèse d'ADN qui permet de remplacer entièrement la région Y du locus MAT. (d'après Haber, 2007)

Le complexe MRX a également été impliqué dans cette maturation des extrémités des CDB au cours de la recombinaison mitotique. Pour cette étude, le changement de type sexuel chez *S. cerevisiae* peut être utilisé comme un outil afin d'étudier les mécanismes de réparation des CDB. En effet, le type sexuel des levures est déterminé par le locus MAT pour « Mating Type locus ». Une endonucléase séquence spécifique (HO) va créer une CDB à ce locus afin d'induire la recombinaison avec un des deux loci silencieux HMR ou HML, portant respectivement un type sexuel (Figure 22).

Des expériences de réparation suite à l'induction de CDB par l'endonucléase HO et d'analyse de la fréquence de changement du type sexuel des levures ont été analysées dans des souches déficientes pour *MRE11*, *RAD50* et *XRS2*. La maturation des extrémités des CDB (génération d'une extrémité simple brin) est déficiente pour ces deux expériences (Ivanov *et al*, 1994; Sugawara & Haber, 1992; Tsubouchi & Ogawa, 1998). Ces résultats suggèrent donc un rôle important mais pas essentiel, pour ce complexe, dans la formation des extrémités 3' sortantes. D'autre part, l'activité exonucléasique de ce complexe est 3'→5' ce qui est donc l'inverse de l'activité nécessaire à la maturation des extrémités des CDB (5'→3' ; Furuse *et al*, 1998; Paull & Gellert, 1998; Trujillo *et al*, 1998; Usui *et al*, 1998). Le complexe MRX pourrait donc être nécessaire au recrutement d'autres exonucléases comme Exo1 pour la maturation des extrémités des CDB (Lewis *et al*, 2002; Moreau *et al*, 2001; Tomita *et al*, 2003; Tsubouchi & Ogawa, 2000).

Grâce à toutes ces données, le modèle selon lequel le complexe MRX serait nécessaire pour “nettoyer” les extrémités des CDB a alors été émis (Krogh & Symington, 2004). En effet au cours de la recombinaison méiotique, la protéine Spo11 introduit les CDB et reste liée de façon covalente aux extrémités 5' (Borde, 2007), ce qui aurait pour conséquence de créer des extrémités de CDB “sales” susceptibles d'être un substrat pour le complexe MRX dont le rôle serait de les rendre accessibles à d'autres exonucléases (Krogh & Symington, 2004).

Très récemment, Williams *et al.* (2008) ont montré, chez *S. pombe*, que les levures déficientes pour l'activité exonucléasique de Mre11 étaient très peu sensibles aux agents inducteurs de cassures contrairement aux levures doublement déficientes pour les activités exo- et endonucléasique de Mre11 (Williams *et al.*, 2008). Il semblerait donc que l'activité endonucléasique de Mre11 soit nécessaire pour éliminer les extrémités "sales" avant la maturation 5'→3' des CDB (Kanaar & Wyman, 2008).

III.5.3.b.β Dans les mécanismes de recombinaison non-homologue

L'implication du complexe MRX dans les mécanismes de recombinaison non-homologue a été suggéré pour la première fois chez *S. cerevisiae* par la mesure et la comparaison des fréquences de recombinaison homologue et non homologue de différents mutants (Schiestl *et al.*, 1994; Tsukamoto *et al.*, 1996).

L'utilisation, d'une souche de *S. cerevisiae* dont les loci HMR et HML ont été délétés et donc ne permettant pas la réparation par recombinaison homologue de la CDB au locus MAT, a montré que cette CDB pouvait être réparée par recombinaison non-homologue et ceci de manière dépendante des protéines du complexe MRX (Figure 22 ; Moore & Haber, 1996). En effet, les mutants *mre11*, *rad50* et *xrs2* présentent une réparation de la CDB diminuée de 70 à 100 fois. D'autre part, ces mêmes mutants présentent également une efficacité de recircularisation d'un plasmide, préalablement digéré par une enzyme de restriction, réduite de 12 à 40 fois (Boulton & Jackson, 1998; Milne *et al.*, 1996). Des études génétiques ont montré que les gènes codants pour les protéines du complexe MRX sont épistatiques avec les gènes *KU70* et *DNL4* de *S. cerevisiae* (Boulton & Jackson, 1998; Milne *et al.*, 1996). De plus, l'activité ADN ligase de Lif1/Dln4, sur la circularisation d'une molécule d'ADN double brin linéaire, est stimulée en présence du complexe MRX, *in vitro* (Chen *et al.*, 2001b).

De même chez les eucaryotes supérieurs, des expériences *in vitro*, en cellules humaines, ont montré que le complexe MRN était impliqué dans la stimulation de l'activité

ADN ligase du complexe XRCC4/ADN Ligase IV et donc nécessaire au mécanisme de recombinaison non-homologue (Huang & Dynan, 2002; Udayakumar *et al*, 2003). De plus, tout comme l'hétérodimère KU et la DNA-PK, les complexes MRX(N) sont capables de créer des ponts entre des molécules d'ADN linéaires et donc de maintenir ensemble les deux extrémités d'une CDB afin de favoriser la réparation par recombinaison non homologue (Chen *et al*, 2001b; de Jager *et al*, 2001b; Trujillo *et al*, 2003).

III.5.3.c Dans le contrôle de l'homéostasie télomérique

III.5.3.c.α De la longueur des télomères

Chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*, l'absence de l'un des composants du complexe MRX se traduit par une diminution de la taille des télomères et du « G-overhang » (Boulton & Jackson, 1998; Hartsuiker *et al*, 2001; Nugent *et al*, 1998; Takata *et al*, 2005). Le raccourcissement des télomères chez les mutants *mre11*, *rad50* et *xrs2* n'est pas accéléré en absence de la sous-unité catalytique de la télomérase (Est2), ce qui suggère que le rôle du complexe MRX dans l'homéostasie télomérique est lié à l'activité télomérase (Boulton & Jackson, 1998; Nugent *et al*, 1998). Ces observations suggèrent que le complexe MRX serait un effecteur positif de la télomérase. De plus, il a été montré que MRX était nécessaire pour générer l'ADN simple brin télomérique ainsi que pour recruter Cdc13 sur ces extrémités 3' sortantes (Diede & Gottschling, 2001). L'absence de ce complexe conduit à une diminution d'interaction entre Cdc13-Est1 et les télomères pendant la phase S, entraînant un défaut de recrutement de la télomérase aux télomères et donc le raccourcissement observé (Diede & Gottschling, 2001; Takata *et al*, 2005).

Des études utilisant la technique d'ARN interférence ont montré dans des fibroblastes humains déficients pour chacun des composants du complexe MRN, un raccourcissement des « G-overhang ». Ce raccourcissement de l'extrémité 3' sortante est dépendant de la télomérase et n'affecte ni la longueur des télomères ni leur structure. Il semblerait que la

déficiences d'une de ces protéines entraîne un effet indirect sur la formation du «G-overhang» en agissant sur le recrutement de la télomérase au niveau des télomères comme chez *S. cerevisiae* (Chai *et al*, 2006).

Des études cytologiques ont montré que chez les mammifères, les protéines du complexe MRN s'associent au niveau des télomères par l'intermédiaire de TRF2 (Zhu *et al*, 2000). Les cellules murines portant la mutation hypomorphique *rad50^{ss}* (analogue à l'allèle *rad50s* de *S. cerevisiae*) présentent des fusions chromosomiques faisant intervenir les télomères (Bender *et al*, 2002). D'autre part, des expériences en cellules humaines ont montré récemment une autre régulation positive de la télomérase par le complexe MRN. Des expériences *in vitro* suggèrent que MRN, favorisant le recrutement d'ATM au niveau des télomères, permettrait la phosphorylation de TRF1 qui se dissocierait des télomères et donc faciliterait l'accès de la télomérase aux télomères (Wu *et al*, 2007a). De plus, des défauts de régulation de la taille des télomères ont été observés dans des lignées cellulaires dérivées de personnes atteintes du syndrome NBS (Bai & Murnane, 2003; Ranganathan *et al*, 2001).

L'ensemble de ces résultats indique clairement chez les mammifères la conservation du rôle du complexe MRN dans l'homéostasie télomérique, probablement comme effecteur positif de la télomérase.

III.5.3.c.β De la stabilité des télomères

Chez certains organismes comme la drosophile ou *A. thaliana*, le complexe MRN ne semble pas avoir de rôle dans la régulation de la longueur des télomères mais plutôt dans leur protection. En effet, chez la drosophile, les mutants déficients pour les gènes *MRE11*, *RAD50* ou *NBS* présentent un nombre élevé de fusions télomériques et des défauts de recrutement de protéines impliquées dans la mise en place des structures télomériques (Ciapponi *et al*, 2006; Purdy & Su, 2004).

Chez *A. thaliana*, l'inactivation des gènes *ATRAD50* et *ATMRE11* s'accompagne d'une dérégulation de l'homéostasie télomérique, ainsi que de sévères défauts morphologiques (Bundock *et al*, 2002; Gallego *et al*, 2001; Gallego & White, 2001; Puizina *et al*, 2004). En effet, les cals dérivés de plantes mutantes *atrad50* présentent un raccourcissement de la longueur des télomères sans modification de l'activité de la télomérase, qui n'est pas observé dans les plantes entières, bien que ces plantes présentent des défauts du développement (Gallego & White, 2001). L'analyse cytologique des plantes mutantes pour *atmre11* a permis d'identifier des fusions chromosomiques, détectées par des ponts anaphasiques en cellules mitotiques (Puizina *et al*, 2004).

Chez cette plante modèle et d'autres organismes, très peu de données ont été produites quant au mécanisme de contrôle de l'homéostasie télomérique par le complexe MRN ainsi que le mécanisme générant les fusions chromosomiques. Les résultats que j'ai obtenu au cours de ma thèse sur ce sujet seront présentés dans l'Article 1 et dans la partie Résultats complémentaires.

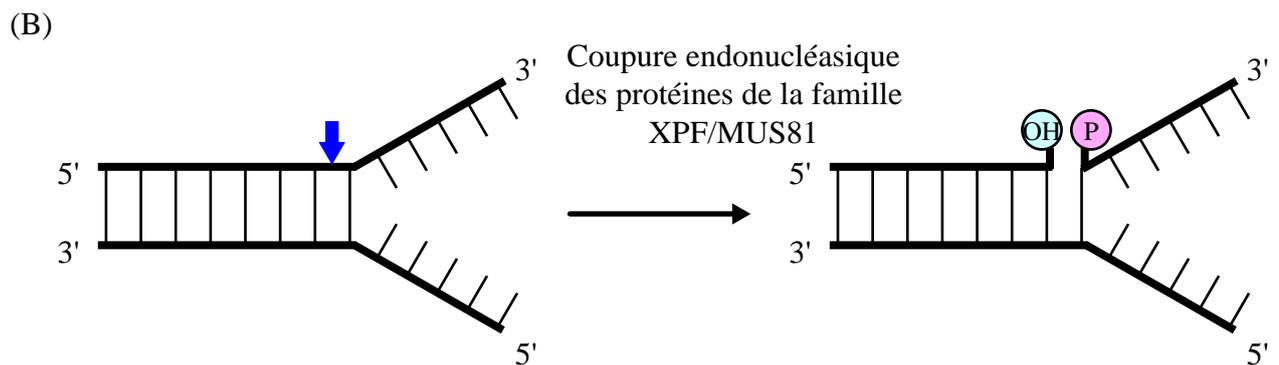
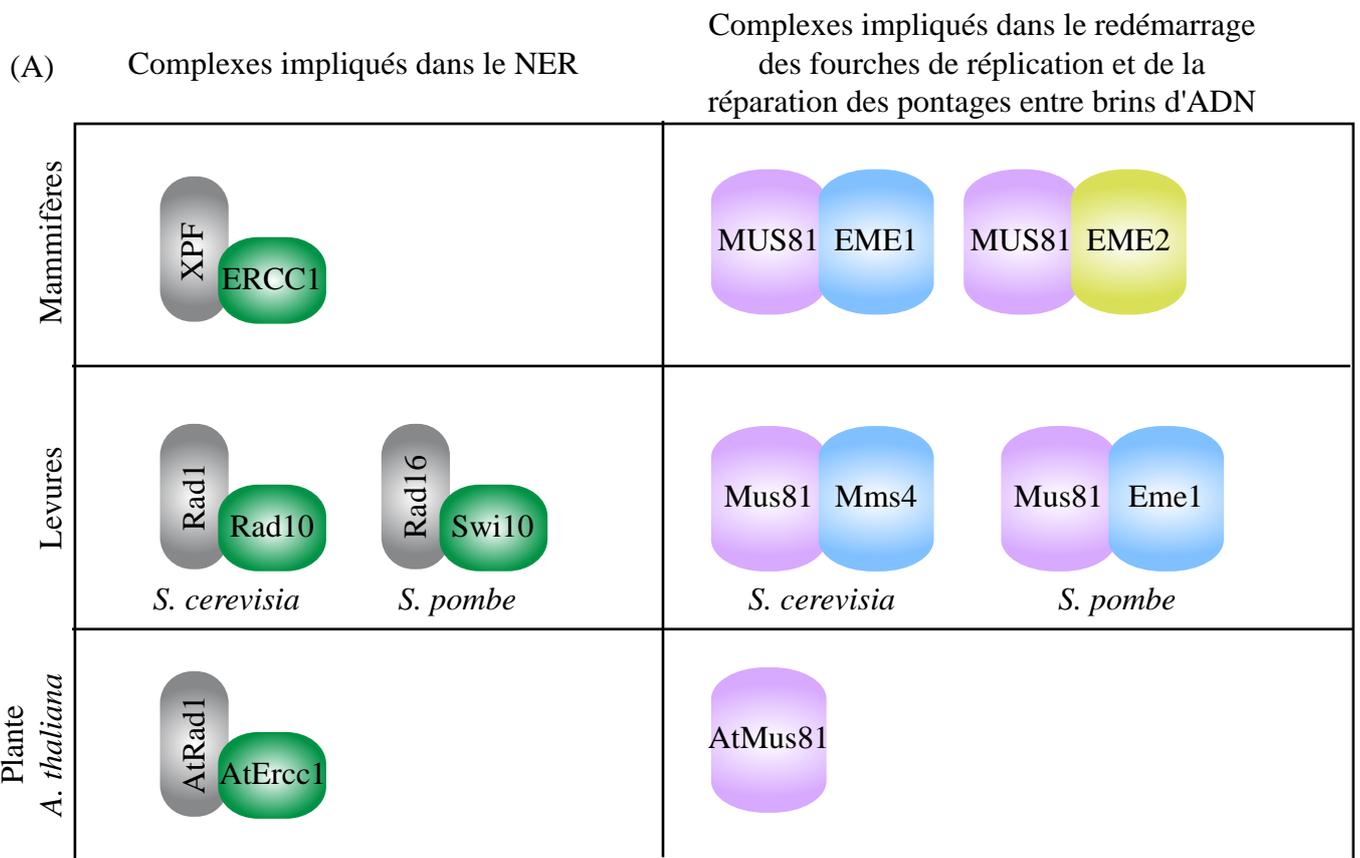


Figure 23 : Organisation et activité biochimique des complexes de la famille XPF/MUS81 (d'après Ciccia *et al*, 2008)

III.6 Le complexe ERCC1/XPF et son rôle dans l'homéostasie télomérique

Le complexe ERCC1/XPF est un complexe multifonction principalement impliqué dans la réparation des lésions de l'ADN. Ce complexe joue effectivement un rôle dans différentes voies de réparation comme le mécanisme du NER pour « Nucleotide Excision Repair » mais aussi dans la réparation des CDB par recombinaison homologue SSA et dans l'homéostasie télomérique (Ciccina *et al*, 2008).

III.6.1 Les protéines du complexe ERCC1/XPF

Ce complexe appartient à la famille XPF/MUS81 présent chez les eucaryotes et les archaebactéries mais pas chez les procaryotes (White, 2003). Les cellules humaines présentent trois complexes endonucléasiques fonctionnant en hétérodimère : XPF/ERCC1, MUS81/EME1 et MUS81/EME2 dont les premières sous unités citées possèdent l'activité catalytique (Figure 23A ; Ciccina *et al*, 2008). Des orthologues du complexe XPF/ERCC1 ont été caractérisés chez *S. cerevisiae* (Rad1/Rad10 ; Bailly *et al*, 1992; Bardwell *et al*), *S. pombe* (Rad16/Swi10 ; Carr *et al*, 1994) et chez *A. thaliana* (AtRad1/Ercc1 ; Dubest *et al*, 2004; Fidantsef *et al*, 2000).

Les sous-unités endonucléasiques présentent toutes un domaine caractéristique ERCC4 pour « Excision Repair Cross Complementation group 4 » et un domaine (HhH)₂ hélice-feuillet-hélice (Shao & Grishin, 2000). Ces deux domaines sont suffisants pour cibler et couper les structures ADN possédant une jonction simple-double-brin (Figure 23B ; Nishino *et al*, 2003; Tsodikov *et al*, 2005). Le domaine ERCC4 se présente en deux éléments ; un sous-domaine comportant l'activité endonucléase de restriction de type II et un motif de dimérisation hélice-β-hélice (Pingoud *et al*, 2005). Le motif GDX_nERKX₃D du

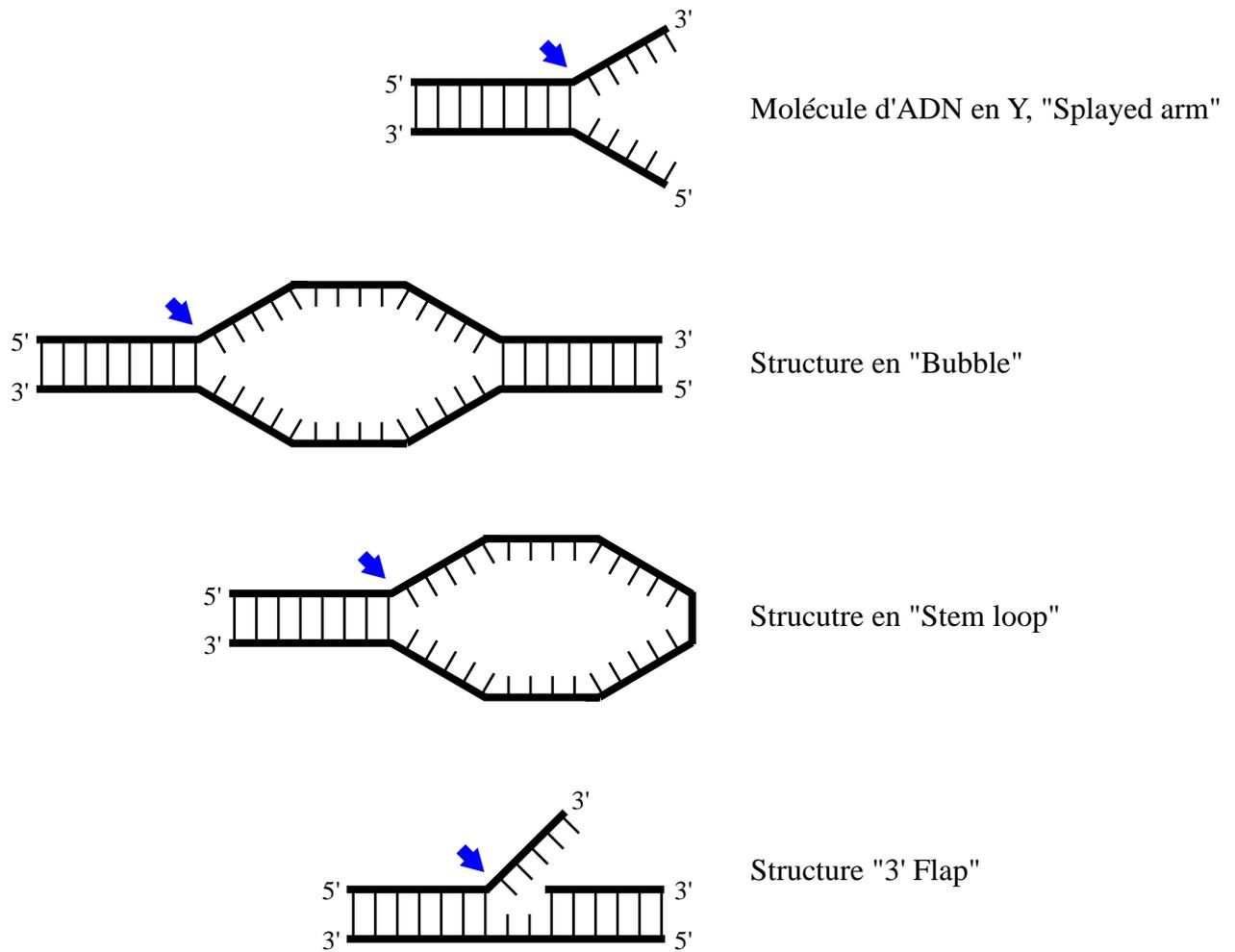


Figure 24 : Types de substrats susceptibles d'être clivés par les complexes Rad1/Rad10 de levure *S. cerevisiae* et XPF/ERCC1 chez l'Homme (d'après Ciccina *et al*, 2008)

domaine ERCC4 de XPF est essentiel pour l'activité endonucléase métallo-dépendante (ion divalent) mais pas pour la liaison à l'ADN (Nishino *et al*, 2003).

Le domaine globulaire (HhH)₂ consiste en deux motifs HhH indépendants pour la liaison à l'ADN (Shao & Grishin, 2000). Ce domaine est nécessaire à la reconnaissance des jonctions ADN simple-double-brins mais également à la dimérisation et à la stabilité de l'interaction entre XPF et ERCC1.

Les sous-unités non catalytiques présentent la même organisation structurale mais leur domaine ERCC4 a largement divergé et donc perdu l'activité endonucléase. Ces sous-unités contribuent à la spécification des fonctions moléculaires et à la reconnaissance des substrats (Ciccia *et al*, 2008).

Des études cristallographiques ont montré que ce complexe lie l'ADN uniquement par ERCC1 impliquant un rôle pour cette protéine dans le ciblage des substrats (Tsodikov *et al*, 2005). Il semblerait donc qu'il y ait une séparation des fonctions : liaison à l'ADN - activité nucléasique sur chacune des deux sous-unités du complexe XPF/ERCC1.

III.6.2 Les activités biochimiques du complexe XPF/ERCC1

Les activités biochimiques du complexe XPF/ERCC1 ont été très étudiées chez *S. cerevisiae* (Rad1/Rad10). Ce complexe joue de nombreux rôles dans la réparation des lésions à l'ADN par excision de nucléotides (NER), dans la recombinaison homologue (SSA) ainsi que dans l'homéostasie télomérique.

Chez *S. cerevisiae*, les premières études biochimiques, à partir de complexe Rad1/Rad10 purifié, ont permis de montrer que celui-ci possède une activité endonucléasique, spécifique des ADN simple brin (Sung *et al*, 1993; Tomkinson *et al*, 1993). La coupure endonucléasique nécessite la formation du complexe Rad1/Rad10 et dépend des parties C-terminale de Rad1 et de Rad10 (domaines d'interaction ; Bardwell *et al*, 1993; Tomkinson *et*

Protéines du NER	Activité	Partenaires
XPA	Vérification des dommages à l'ADN	p36
XPB	Modification de la topologie de l'ADN, hélicase	TFIIH
XPC	Reconnaissance des dommages à l'ADN	hHR23B/centrin-2
XPD	Modification de la topologie de l'ADN, hélicase	TFIIH
XPE	Reconnaissance des dommages à l'ADN	DDB1/DDB2
XPF	Élimination de la lésion par incision en 5'	ERCC1
XPG	Élimination de la lésion par incision en 3'	
RPA	Reconnaissance des dommages à l'ADN, synthèse d'ADN	p70/p34/p14

Tableau 5 : Protéines impliquées dans la voie de réparation par excision de nucléotides (NER) chez l'Homme (d'après Shuck *et al*, 2008)

al, 1993). Chez la levure et les vertébrés, ce complexe est capable de reconnaître différents substrats tels que les structures d'ADN en Y, « splayed-arm » (Bardwell *et al*, 1994), « bubble » (Davies *et al*, 1995) et « 3'-flap » (Rodriguez *et al*, 1996). La coupure s'effectue sur la partie double brin à proximité de la jonction ADN entre le simple- et double brin (Figure 24 ; de Laat *et al*, 1998; Park *et al*, 1995; Sijbers *et al*, 1996).

III.6.3 Les rôles du complexe XPF/ERCC1

III.6.3.a Dans la réparation par excision de nucléotides (NER)

Chez *S. cerevisiae*, des radiations aux UltraVioletes ont permis de mettre en évidence le rôle important de Rad1/Rad10 dans la réparation par excision des lésions de l'ADN (Reynolds & Friedberg, 1981). De manière identique à la levure, les protéines XPF et ERCC1 de mammifères sont nécessaires pour la réparation des lésions suite à l'irradiation aux UV (Kondo *et al*, 1989).

Chez l'Homme, des mutations du gène *XPF* ont été identifiées chez des patients atteints de la maladie génétique héritable connue sous le nom de *Xeroderma Pigmentosum* (XP ; Sijbers *et al*, 1996). XP est caractérisée par un désordre génétique causé par la mutation de l'un des huit gènes XP A→G et XPV (Tableau 5 ; Hoeijmakers, 2001), les patients présentent une sensibilité accrue aux radiations UV et une fréquence d'apparition de cancers de la peau (dus au soleil) augmentée de 1000 fois (Cleaver, 2005). Toutes ces protéines XP, sauf XPV, sont impliquées dans la voie de réparation NER nécessaire pour éliminer les lésions causées par les radiations UV, par les agents de pontage entre brins d'ADN et par les autres agents chimiques provoquant une distorsion de la double hélice d'ADN. La réparation par le mécanisme de NER peut être séparée en deux sous voies : la voie « Global-Genome » (GG) pour la réparation sur le génome entier et la voie « Transcription-coupled-repair »

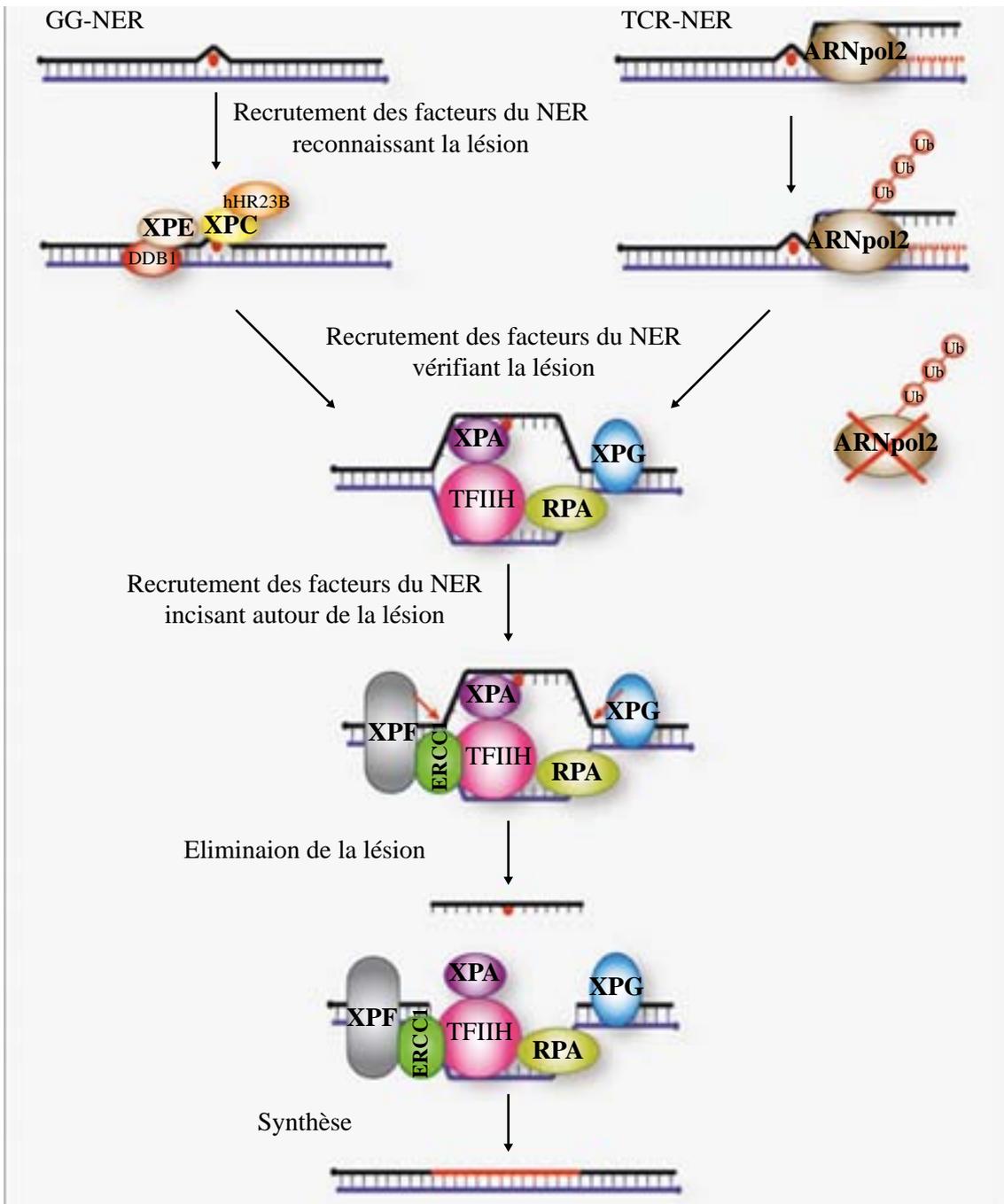


Figure 25 : Schéma de la voie de réparation par excision de nucléotides (NER) chez les mammifères
 (GG : Global Genome; TCR : Transcription Coupled Repair; Ub : Ubiquitination; d'après Ciccia *et al*, 2008)

(TCR) pour la réparation couplée à la transcription lorsque l'ARN polymérase se bloque sur une lésion (Figure 25).

A partir d'une structure ADN en bulle formée par les protéines XPB et XPD, la voie du NER fait intervenir le complexe XPF/ERCC1 dont le rôle est de couper en 5' de la lésion alors que XPG coupe en 3' de la même lésion (Sijbers *et al*, 1996). De cette manière, XPF/ERCC1 agit comme une endonucléase «3'-flap» et va permettre, avec XPG, la libération d'un fragment d'ADN simple brin d'environ 30 nucléotides contenant la lésion. Pour finir, des étapes de synthèse et de ligation sont nécessaires pour achever la réparation.

III.6.3.b Dans la recombinaison homologue

Comme mentionné dans le chapitre II.1.2.a, les complexes Rad1/Rad10 et XPF/ERCC1 sont impliqués dans certains types de réparation par recombinaison homologue (Sargent *et al*, 1997; Schiestl & Prakash, 1988). Lorsqu'une CDB intervient dans une région de l'ADN contenant des séquences répétées (exemple : loci de l'ADNr), le mécanisme de réparation par hybridation d'ADN simple-brin ou SSA (« Single-Strand Annealing ») est susceptible de réparer la lésion. Les complexes Rad1/Rad10, ou XPF/ERCC1 selon l'organisme considéré, interviennent dans l'élimination des structures «3'-flap» générées par l'hybridation des séquences répétées homologues après résection par une exonucléase 3'→5' (Figure 13 p49 ; Fishman-Lobell & Haber, 1992; Ivanov & Haber, 1995; Paques & Haber, 1997). De plus, des études génétiques ont permis de montrer que l'intégration de molécules d'ADN linéaires dans des loci homologues du génome de *S. cerevisiae* et de mammifères était dépendante des protéines Rad1, Rad10 et ERCC1 (Adair *et al*, 2000; Sargent *et al*, 1997).

D'autre part, les protéines XPF et ERCC1 sont fortement exprimées dans les tissus de la lignée germinale chez la souris et ERCC1 est nécessaire pour le bon déroulement de la spermatogenèse et de l'ovogenèse (Hsia *et al*, 2003; Shannon *et al*, 1999). Ces observations

suggèrent un rôle de ces protéines dans la recombinaison méiotique, sans évidence directe. De plus, chez la drosophile, l'orthologue de XPF, MEI-9 est nécessaire pour le fonctionnement du NER et des mécanismes de la recombinaison méiotique (Yildiz *et al*, 2004).

III.6.3.c Dans le vieillissement

Le lien entre le vieillissement et le complexe XPF/ERCC1 a été mis en évidence par l'observation phénotypique des souris mutantes pour les gènes codant ces protéines. Ces souris présentent un vieillissement accéléré avec un affaiblissement profond de l'organisme (perte de poids, atrophie musculaire), des anomalies au niveau de leur foie, de leurs reins et une dégénération neuronale conduisant à une atrophie cérébrale (Prasher *et al*, 2005; Weeda *et al*, 1997). Les patients atteints du syndrome XFE lié à des mutations hypomorphes de *XPF* (sans délétion complète de la fonction de XPF) présentent des phénotypes similaires à ces souris (Niedernhofer *et al*, 2006). Récemment, le premier patient ayant une mutation du gène *ERCC1* a été identifié (Jaspers *et al*, 2007). Celui-ci possède un phénotype similaire aux souris déficientes pour *ERCC1* avec des défauts du développement, des anomalies au niveau du cerveau, du squelette et des yeux ainsi qu'une durée de vie très courte (environ un an pour l'Homme).

L'ensemble de ces phénotypes semble être lié à une accumulation de dommages de l'ADN non réparés notamment des pontages inter-brins de l'ADN ainsi que des CSB et CDB produits par l'oxydation des bases de l'ADN due à l'accumulation de radicaux libres (Lombard *et al*, 2005; Niedernhofer *et al*, 2006). De plus chez la levure, la réparation des lésions oxydatives de l'ADN génèrent des structures « 3'-flap » susceptibles d'être coupées par le complexe Rad1/Rad10. Les phénotypes observés chez les mammifères déficients pour l'homologue de ce complexe pourraient être dus à l'accumulation de ces structures « 3'-flap ». La coupure de ces structures est indépendant de la fonction du complexe XPF/ERCC1

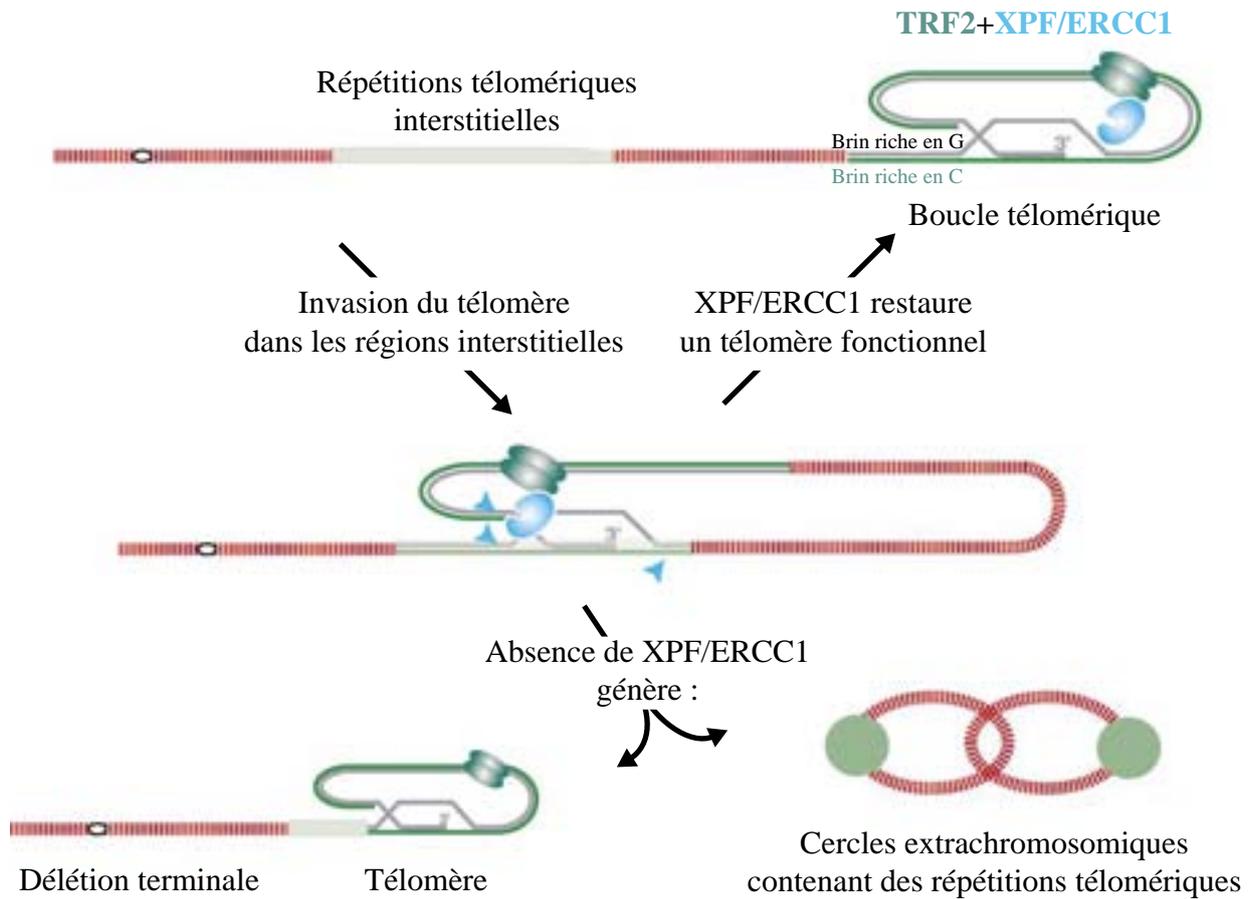


Figure 26 : Modèle d'action du complexe XPF/ERCC1 au niveau des télomères

XPF/ERCC1 serait capable de cliver des structures liées l'invasion de l'extrémité des télomères dans des régions interstitielles composées de séquences télomériques dégénérées. L'absence de XPF/ERCC1 provoque la reconnaissance de cette structure de recombinaison, dont la résolution produit un chromosome cassé et un chromosome acentrique circulaire contenant des répétitions télomériques. (d'après Zhu *et al*, 2003)

dans le NER puisque d'autres mutants de levures pour les protéines homologues à XPA, XPC et XPG (spécifiques du NER) ne présentent pas de sensibilité aux lésions oxydatives de l'ADN (Guillet & Boiteux, 2002; Guzder *et al*, 2004).

III.6.3.d Dans l'homéostasie télomérique

Dans les cellules de mammifères, le complexe XPF/ERCC1 est impliqué dans la maintenance télomérique (Zhu *et al*, 2003). Des expériences d'immunoprécipitation en cellules humaines ont permis de mettre en évidence que le complexe XPF/ERCC1 est physiquement associé à TRF2, indépendamment de ses domaines basique et de liaison à l'ADN (Zhu *et al*, 2003). Afin de vérifier la présence de ce complexe au niveau des télomères, Zhu *et al*. (2003) ont réalisé des expériences d'immunofluorescence permettant de co-localiser les signaux de détection de XPF et ERCC1 avec TRF1 (marqueur des télomères; Chong *et al*, 1995; van Steensel & de Lange, 1997). D'autre part, ces auteurs ont analysé, dans des MEF dérivées de souris mutantes *ercc1*, la longueur des télomères ainsi que des extrémités 3' sortantes. Les résultats n'ont pas révélé de changement significatif dans la longueur des télomères, ni même de fusions chromosomiques par les extrémités. Par contre, l'analyse cytologique a permis d'identifier des cercles extrachromosomiques contenant des répétitions télomériques. Ces structures semblent être indépendantes du rôle de ERCC1 dans le mécanisme du NER puisque les MEF dérivées de souris mutantes *xpc* (gène codant une protéine exclusive du NER) ne présentent pas ces structures.

Il semblerait donc que le complexe XPF/ERCC1 ait un rôle très important dans l'homéostasie télomérique et peut-être par sa fonction dans la recombinaison homologe. Les auteurs ont alors proposé un modèle dans lequel, en condition normale, les télomères seraient capables d'envahir des séquences télomériques interstitielles mais de manière transitoire et non stable (Figure 26). La présence du complexe XPF/ERCC1 au niveau des télomères

permettrait le retour à une configuration structurelle plus classique. Par contre l'absence de ce complexe favoriserait cette invasion ainsi que la résolution de cette structure nouvellement formée par recombinaison générant ainsi ces cercles extrachromosomiques contenant des répétitions télomériques.

Très récemment, Wu *et al.* (2008) ont montré, en cellules humaines, que la surexpression de XPF entraîne un raccourcissement progressif de la longueur des télomères indépendamment de son domaine nucléase et de l'activité télomérase. Ces résultats suggèrent un rôle de régulateur négatif de XPF/ERCC1 dans la maintenance télomérique. De plus, *in vitro*, la protéine XPF régule négativement l'association de TRF2 avec l'ADN télomérique et ceci de manière dépendante de son activité nucléase. Cette observation suggère deux rôles distincts au niveau des télomères pour le complexe XPF/ERCC1 par rapport à son domaine nucléase. L'un est de participer à la régulation de la longueur des télomères et l'autre est de contrôler l'association de TRF2 avec l'ADN télomérique (Wu *et al.*, 2008). Néanmoins les mécanismes permettant ces deux régulations restent à déterminer mais il semblerait qu'il existe un lien très étroit entre TRF2 et le complexe XPF/ERCC1. En effet, en cellules de mammifères, le raccourcissement des télomères dû à la surexpression de TRF2 est dépendant du complexe XPF/ERCC1 mais de manière indépendante de son domaine nucléase (Wu *et al.*, 2007b).

Le rôle de ce complexe dans l'homéostasie télomérique n'est donc pas encore bien défini et reste peu étudié dans les organismes modèles autres que *S. pombe* et les cellules de mammifères. Les résultats obtenus au cours de ma thèse sur l'implication du complexe AtRad1/Ercc1 dans la maintenance télomérique chez *A. thaliana* seront présentés dans l'Article 2.

Description du projet de thèse

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques très complexes, dont l'organisation structurale et protéique paraît être bien conservée entre des organismes très éloignés sur l'échelle de l'évolution. La fonction principale des télomères est la protection des extrémités des chromosomes en les empêchant d'être reconnues par la machinerie de réparation de l'ADN ou d'être dégradées par des nucléases. Les télomères ont donc un rôle très important dans la maintenance de l'intégrité du génome. Ce sont donc des structures qui ne doivent pas être raccourcies et/ou altérées dans leur organisation structurale.

Cependant, des altérations de l'ADN par des agents inducteurs de lésions peuvent entraîner un changement dans l'homéostasie télomérique. La cellule va alors induire une réaction de défense en mettant en place des voies de réponse aux dommages de l'ADN qui vont permettre la "réparation" de ces lésions. Les connaissances accumulées ces dernières années laissent penser que ces "réparations" ne sont pas un véritable mécanisme de préservation de l'intégrité du génome. Bien au contraire, elles engendrent de l'instabilité génomique telle que des fusions chromosomiques entraînant des cycles de cassures-fusions-ponts. Il est donc surprenant d'avoir identifié de nombreuses protéines et complexes de la signalisation et des voies de réparation de l'ADN physiquement présents au niveau de télomères normaux.

Avant ces quatre à cinq dernières années, peu de données concernant le rôle des protéines de la réparation de l'ADN dans l'homéostasie télomérique n'avaient été publiées. Les rares informations concernaient la fonction de l'hétérodimère KU dans la protection et la régulation de la longueur des télomères chez la levure (Boulton & Jackson, 1998; Porter *et al*, 1996) et les mammifères (d'Adda di Fagagna *et al*, 2001; Espejel *et al*, 2002a; Samper *et al*, 2000) ainsi que chez *A. thaliana* (Gallego *et al*, 2003b; Riha *et al*, 2002).

Le rôle du complexe MRX(N) au niveau des télomères, comme facilitant le recrutement de la télomérase, n'avait été identifiée que chez la levure (Nugent *et al*, 1998).

Chez les mammifères, le complexe MRN avait été localisé aux télomères et permettait leur protection mais le mécanisme d'action de ce complexe reste à déterminer (Bender *et al*, 2002; Zhu *et al*, 2000).

Un autre rôle de ces complexes de la réparation des dommages de l'ADN au niveau des télomères seraient d'intervenir dans la reconnaissance de ceux-ci lorsqu'ils sont non fonctionnels (exemple : trop courts dans le cas d'une mutation pour la télomérase). En effet, l'absence de la télomérase dans les organismes de levure, mammifères et plantes, après quelques générations, entraînent la présence de fusions chromosomiques (Espejel *et al*, 2002a; Nakamura *et al*, 1998; Riha *et al*, 2001). L'étude des mécanismes responsables de ces fusions n'a pas alors permis d'identifier une voie précise. En effet, chez la levure *S. pombe* et la plante *A. thaliana* les fusions chromosomiques ne sont pas dépendantes de la voie de réparation par recombinaison non homologue NHEJ (Baumann & Cech, 2000; Riha & Shippen, 2003a), contrairement aux mammifères où l'inhibition de cette même voie réduit les fusions chromosomiques dues à l'absence la télomérase (Espejel *et al*, 2002a).

Chez la plante modèle *A. thaliana*, la majorité des homologues des protéines de la signalisation et de la réparation des cassures de l'ADN (Atm, MRN, Ku, Lig4, Rad1/Ercc1, protéines du groupe épistatique Rad52) ont été identifiées. Leurs fonctions semblent également être conservées chez cet organisme. Nous nous sommes donc intéressés au rôle de ces complexes dans la protection et la maintenance des télomères, ainsi que dans la reconnaissance des télomères déprotégés (trop courts) en contexte de plantes mutantes pour le gène codant la sous-unité catalytique AtTert de la télomérase.

Dans cette optique, *A. thaliana* représente un modèle de choix puisque la majorité des mutants impliquant les gènes de la réparation des cassures de l'ADN ne sont pas létaux

contrairement à ce qui a été observé chez les mammifères et les levures. Les phénotypes les plus graves aboutissent à une stérilité complète mais le développement végétatif de la plante n'est peu ou pas altéré, permettant ainsi la plupart des expériences de biologie moléculaire. De plus, *A. thaliana* est une plante qui ne mesure que quelques dizaines de centimètres de haut et se développe parfaitement en serre ou en chambre climatique, ce qui permet de travailler avec des populations relativement importantes. *A. thaliana* possède un temps de génération court, d'environ 6 semaines entre la germination et la production de la génération suivante. Le génome d'*A. thaliana* est entièrement séquencé (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) et présente une taille d'environ 120 Mb pour \approx 25000 gènes répartis sur cinq chromosomes. La communauté scientifique bénéficie de banques de lignées mutantes, étiquetées par des insertions d'ADN de transfert (ADN-T) ou d'éléments transposables, riches de plusieurs centaines de milliers de lignées, permettant l'analyse de plantes affectées pour l'expression de nombreux gènes.

Dans ce cadre, il a été caractérisé au sein de l'équipe de nombreux mutants des voies de réparation par recombinaison non homologues tels que : *atku80* (Gallego *et al*, 2003a), *atlig4* (Kozak, accepté dans DNA repair), *atxrc1* (non publié) ou par recombinaison homologues tels qu'*atrad50* (Gallego *et al*, 2001), *atxrc3* (Bleuyard & White, 2004), *atxrc2* (Bleuyard *et al*, 2005), *atrad51D* (non publié), *atercc1* (Dubest *et al*, 2004). D'autres mutants tels que *attert* (Fitzgerald *et al*, 1999) et *atrad1* (Fidantsef *et al*, 2000) caractérisés par d'autres équipes nous ont été transmis.

Préalablement à mes travaux de thèse, l'inactivation des gènes *ATRAD50* et *ATMRE11* a montré une dérégulation de l'homéostasie télomérique. En effet, les cals dérivés de plantes mutantes *atrad50* présentent un raccourcissement de la longueur des télomères, non observé dans l'analyse de plantes entières bien que ces plantes présentent un phénotype altéré

(Gallego *et al*, 2001). Les plantes mutantes pour *ATMRE11* présentent une élévation de la longueur des télomères ainsi que des fusions chromosomiques (Bundock *et al*, 2002; Puizina *et al*, 2004). Il apparaît donc que ces résultats sont soit contradictoires pour la régulation de la longueur des télomères, soit les protéines AtRad50 et AtMre11 joueraient des rôles différents dans l'homéostasie télomérique.

La première partie de ma thèse a donc consisté à clarifier le rôle de la protéine AtRad50 dans l'homéostasie télomérique que ce soit dans la protection ou dans l'analyse de la longueur des télomères (TRF pour « Terminal Restriction Fragment »). Pour cela, nous avons été amené à développer et à améliorer des techniques de cytologie telles que le « Fiber-FISH » (peignage moléculaire associé à l'Hybridation *In Situ* en Fluorescence ; description dans l'annexe) et le « FISH » sur des noyaux de cellules fixées, d'*A. thaliana* (Article 1). Des résultats complémentaires seront présentés à la suite de cet article concernant les voies de reconnaissance des télomères non fonctionnels, en contexte de plantes mutantes pour *ATRAD50*.

La deuxième partie de ma thèse a consisté à identifier le rôle du complexe AtRad1/Ercc1 dans l'homéostasie télomérique puisque le complexe homologue (XPF/ERCC1) chez les mammifères a été impliqué dans la protection des télomères. En effet, il a été observé que les souris déficientes pour *ERCC1* meurent rapidement après la naissance (Nunez *et al*, 2000) et que les cellules dérivées de ces souris présentent des cercles extrachromosomiques contenant des répétitions télomériques (Zhu *et al*, 2003). Or, l'analyse phénotypique des mutants pour *ATRADI* et *ATERCCI* n'a pas déterminé de défauts du développement des plantes, suggérant un effet moins apparent et moins important de ces mutations chez *A. thaliana* (Dubest *et al*, 2004; Fidantsef *et al*, 2000). Nous nous sommes donc intéressés au rôle éventuel des voies de réparation par homologie de séquence MMEJ et

SSA (faisant intervenir le complexe Rad1/Rad10 chez la levure ; Ma *et al*, 2003) dans la génération des fusions chromosomiques dues à la perte de la télomérase. Pour cela, nous avons utilisé comme technique l'analyse phénotypique des mutants ainsi que la cytologie chez la plante modèle *A. thaliana*. En effet, l'inhibition de la voie NHEJ (dans un double mutant *atert/ku70*) n'ayant pas permis d'empêcher les fusions chromosomiques générées par l'absence de la télomérase (Riha & Shippen, 2003a). La présence d'une ou plusieurs autres voies de reconnaissance des télomères non fonctionnels restent à caractériser (Article 2).

Résultats

Article 1

« Two roles for Rad50 in telomere maintenance »

**Jean-Baptiste Vannier, Annie Depeiges, Charles
White et Maria Eugenia Gallego**

The EMBO Journal (2006) 25, 4577-4585

Two roles for Rad50 in telomere maintenance

Jean-Baptiste Vannier, Annie Depeiges,
Charles White and Maria Eugenia Gallego*

UMR 6547 CNRS/Université Blaise Pascal, Aubière cedex, France

We describe two roles for the Rad50 protein in telomere maintenance and the protection of chromosome ends. Using fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) and fibre-FISH analyses, we show that absence of AtRad50 protein leads to rapid shortening of a subpopulation of chromosome ends and subsequently chromosome-end fusions lacking telomeric repeats. In the absence of telomerase, mutation of *atrad50* has a synergistic effect on the number of chromosome end fusions. Surprisingly, this ‘deprotection’ of the shortened telomeres does not result in increased exonucleolytic degradation, but in a higher proportion of anaphase bridges containing telomeric repeats in *atrad50/tert* plants, compared to *tert* mutant plants. Absence of AtRad50 thus facilitates the action of recombination on these shortened telomeres. We propose that this protective role of Rad50 protein on shortened telomeres results from its action in constraining recombination to sister chromatids and thus avoiding end-to-end interactions.

The EMBO Journal (2006) 25, 4577–4585. doi:10.1038/sj.emboj.7601345; Published online 21 September 2006

Subject Categories: genome stability & dynamics

Keywords: chromosome fusion; MRN; telomerase; telomere; Rad50

Introduction

Telomeres, the nucleoprotein structures of the ends of linear chromosomes, play essential roles in chromosome stability. In general, telomeres are composed of tandem repeats of a short sequence, (TTAGGG)_n in vertebrates (Moyzis *et al*, 1988) and (TTTAGGG)_n in *Arabidopsis* (Richards and Ausubel, 1988), although this does not hold for all organisms studied (reviews by Cech, 2004; Tomaska *et al*, 2004; Fajkus *et al*, 2005). Notwithstanding the role of telomeres in ‘hiding’ chromosome ends from DNA double-strand break repair (DSBR) and recombination, many DSBR proteins play essential roles in the maintenance and function of telomeres (reviews by d’Adda di Fagagna *et al*, 2004; Gallego and White, 2005; Slijepcevic and Al-Wahiby, 2005).

The Rad50 protein, with Mre11 and Xrs2/Nbs1, forms part of the highly conserved MRN complex, which plays key roles in the metabolism and repair of DNA breaks (Connelly and

Leach, 2002; D’Amours and Jackson, 2002; Lisby and Rothstein, 2004; Stracker *et al*, 2004), as well as in telomere structure and function (d’Adda di Fagagna *et al*, 2004; Gallego and White, 2005; Zhang *et al*, 2006). The Rad50 protein consists of a globular head with nucleotide binding domains and a long coiled-coil tail, which has been shown to bridge DNA molecules (Anderson *et al*, 2001; de Jager *et al*, 2001; Hopfner *et al*, 2001) via interactions between two Rad50 tails through their zinc-hook domains (Hopfner *et al*, 2002; Wiltzius *et al*, 2005). Rad50 is required both for telomere length homeostasis and telomere capping in yeast cells (Nugent *et al*, 1998; Mieczkowski *et al*, 2003) and in mammals the Rad50 protein is present at telomeres through its interaction with TRF2 (Zhu *et al*, 2000). It has recently been shown that MRN is essential for capping *Drosophila* telomeres (Bi *et al*, 2004; Ciapponi *et al*, 2004), showing that the role of this complex is not specific to telomerase-mediated telomere structures.

The results presented here concern the role of the AtRad50 protein in telomere metabolism in *Arabidopsis* plants. By using fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) and fibre-FISH in preparations from dividing cells, we found that *atrad50* mutant plants present frequent end-to-end chromosome fusions lacking telomeric repeats. In the absence of telomerase, mutation of *atrad50* has a synergistic effect on the number and type of chromosome end fusions. Surprisingly, FISH analyses show a higher proportion of anaphase bridges containing telomeric repeats in *atrad50/tert* plants, as compared to the single *tert* mutant plants. We conclude that the AtRad50 protein plays an essential role in telomere capping through mechanisms that differ between normal and shortened telomeres.

Results

High frequencies of mitotic anaphase bridges in *atrad50* mutant plants

Meiotic defects result in the complete sterility of *atrad50* mutant plants (Gallego *et al*, 2001; Bleuyard *et al*, 2004). Mutant plants are thus always first generation and it is not possible to follow the effects of the absence of the AtRad50 protein across multiple generations. In order to get around this constraint, we have previously worked with cell-suspension cultures and shown that absence of AtRad50 leads to rapid loss of telomeric DNA (Gallego and White, 2001). Notwithstanding the rapidity of this loss in mutant cell cultures, this effect is not detectable by telomere restriction fragment (TRF) analyses on genomic DNA from (first generation) *atrad50* mutant plants, presumably owing to the presence of a mixed population of degraded and normal telomeres for each individual chromosome end in the different cells of the plant (Gallego and White, 2001). Such loss is, however, expected to result in chromosome and chromatid fusions and these should be detectable in mitotic cells of mutant plants as anaphase bridges.

*Corresponding author. UMR 6547 CNRS/Université Blaise Pascal, 24, avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France.
Tel.: +33 473 407 978; Fax: +33 473 407 777;
E-mail: megalleg@univ-bpclermont.fr

Received: 16 June 2006; accepted: 21 August 2006; published online: 21 September 2006

Table I Quantification of mitotic anaphases with visible chromosome bridges in 12 wild-type and 12 *atrad50* mutant plants

Plant No.	Wild type		Plant No.	<i>atrad50</i>		Fraction
	Anaphases	With bridges		Anaphases	With bridges	
1	340	0	1	340	38	0.11
2	300	0	2	300	34	0.11
3	250	0	3	100	14	0.14
4	165	0	4	300	57	0.19
5	300	0	5	300	28	0.09
6	200	0	6	100	15	0.15
7	200	0	7	200	23	0.12
8	200	0	8	300	34	0.11
9	200	0	9	247	23	0.09
10	200	0	10	80	13	0.16
11	200	0	11	300	36	0.12
12	200	0	12	300	39	0.11
Total	2755	0	Total	2867	354	0.13 (0.03)
					Mean	

The mean (standard deviation) fraction observed is given at bottom left.

Screening of mitotic anaphases shows significantly higher levels of chromosome bridges in *atrad50* mutant plants compared to wild-type controls. Mitotic figures were analysed from pistil cells of 12 different *atrad50* mutant plants. Of 2867 anaphases, 354 showed visible chromosome bridges (12.35%), with a mean percentage of bridge-containing anaphases in each plant of 12.75% (s.d. = 2.75%). No anaphase bridges were detected in 2755 anaphases from 12 wild-type plants (Table I). These results are in agreement with the data recently published by the Riha laboratory showing high levels of such bridges in the *Arabidopsis atmre11-3* mutant (Puizina *et al*, 2004) and with our previous report of rapid telomere shortening in *atrad50* mutant cell cultures (Gallego and White, 2001).

Loss of telomeric DNA in *atrad50* chromosome fusions

The effect of absence of AtRad50 (or AtMre11) is far more drastic than that of the absence of telomerase, with such levels of anaphase bridges only observed after the sixth or seventh generation *tert* mutants (Riha *et al*, 2001). What is the origin of these fusions, given the absence of observable telomere shortening in the *atrad50* mutant plants by TRF analyses? On the hypothesis that a subpopulation of chromosome ends has undergone drastic shortening, it is to be expected that these shortened chromosome ends will be overrepresented in the population of fused chromosomes. As the microscope permits us to observe individual fusions in individual cells, we quantitated the presence or absence of telomeric DNA in chromosome bridges in mitoses using FISH on mitotic cells from *atrad50* mutant plants.

Two sorts of probes were used for FISH analyses: a telomeric DNA repeat probe consisting of a tetramer of the TTTAGGG *Arabidopsis* telomeric repeat sequence (the same probe as that used for TRF analyses) and mixture of nine chromosome-end-specific subtelomeric BAC probes identified from the *Arabidopsis* genome resource, TAIR (<http://www.arabidopsis.org>). The BAC probes permit identification of nine of the 10 chromosome ends of *Arabidopsis* (the 10th has a long stretch of subtelomeric rDNA repeats and is thus not suited to this approach). FISH analysis of mitoses in *atrad50* mutant plants showed hybridisation to subtelomeric probes in 34 of 64 anaphase bridges analysed (Figure 1).

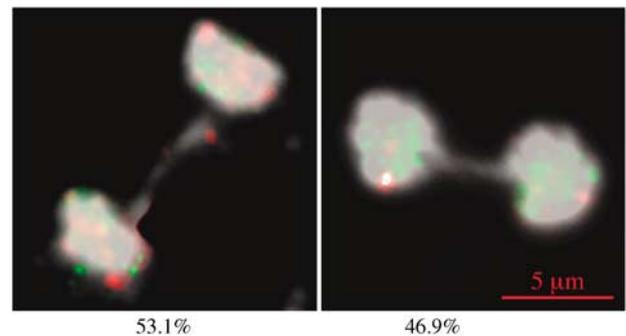


Figure 1 End-to-end chromosome fusions in *atrad50* plants. DAPI-stained mitotic nuclei from *atrad50* plants analysed by FISH using telomeric repeat (green) and the nine subtelomeric (red) fluorescent probes. 53.1% (34/64) of chromosomal bridges showed hybridisation with the subtelomeric probe, whereas the others (30/64) showed no hybridisation to the FISH probes. No telomeric repeat signals were detected associated to the subtelomeric signals in the bridges.

Thus, at least 53% of the observed chromosome fusions include a chromosome end. Interestingly, no telomeric repeats were detected associated to the subtelomeric signals. The FISH detection limits for this probe are estimated to be several hundred base pairs. We hypothesise from this observation that the absence of AtRad50 protein induces a rapid and drastic loss of telomeric repeats and that these chromosome ends are then recognised and repaired as double-strand breaks (DSBs).

To confirm the absence of telomeric repeat sequences in *atrad50* end-to-end chromosome fusions, we increased the resolution of the analysis by using FISH on extended DNA fibres (fibre-FISH). The exact lengths and positions of the subtelomeric BACs are known, as are the distances to the ends of their respective chromosomes. Figure 2 presents the results of hybridisation of extended DNA fibres from *atrad50* plants to a mix of all nine subtelomeric probes and the telomeric repeat probe as well as the positions, sizes and the distances to the beginning of the telomeric repeats of each of the nine subtelomeric BACs on the five *Arabidopsis* chromosomes. Our results show the expected degree of stretching of 2 kb/µm (Michalet *et al*, 1997). The lengths of

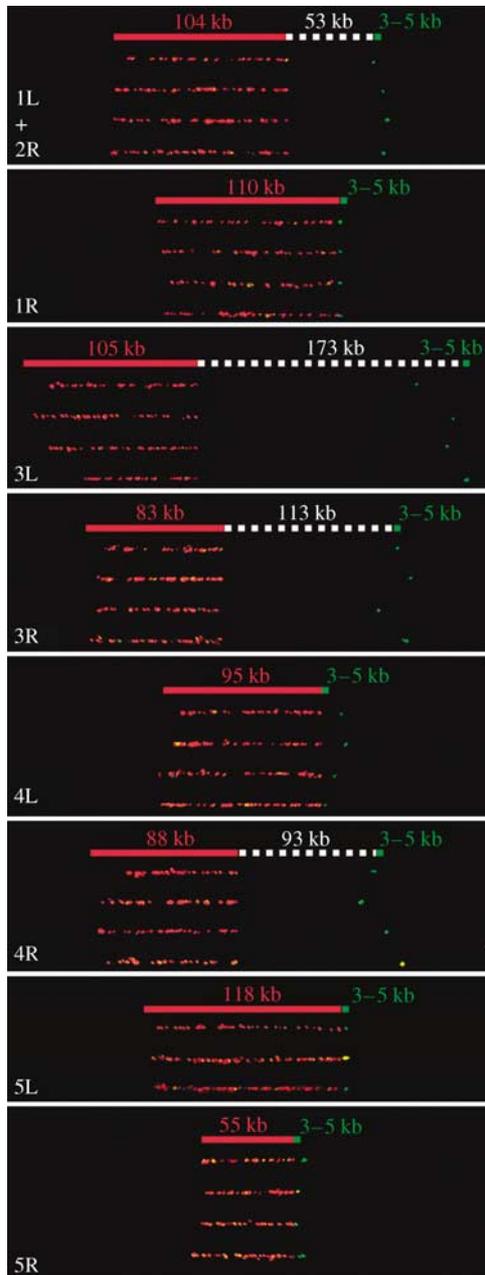


Figure 2 Validation of telomeric repeat (green) and the nine subtelomeric BAC (red) probes by fibre-FISH hybridisation of *atrads50* genomic DNA. Each panel shows a schematic with predicted lengths above the fibre-FISH images for a given chromosome end (indicated at the bottom left of each panel). Correspondence between predicted sizes from the *Arabidopsis* genome sequence and the fibre-FISH measurements confirms the specificity and the validity of FISH probes.

the different subtelomeric signals and the distances to the telomeric repeats permit individual identification of seven of the nine probed chromosome ends, with chromosome 1 left end being indistinguishable from that of the right end of chromosome 2. The fibre-FISH measurements are given in Table II, although probes for ends 1R and 5L are similar in length and position relative to the telomeric sequences, the mean lengths differ significantly from each other (Student's *t*-test: $t = 4.69$; $P = 0.18$). Chromosome 2L was not analysed as it consists of an rDNA repeat array.

Table II Means and standard deviations (in parentheses) of measured lengths in kb of chromosome ends from fibre-FISH analyses (see Figure 2)

End	SubTel	Gap	Tel	N
1L and 2R	107.6 (3.8)	63.5 (7.4)	3.1 (1.0)	11
1R	108.8 (2.8)	—	2.9 (1.4)	4
3L	89.1 (12.5)	155.6 (12.7)	2.9 (0.6)	4
3R	75.4 (2.9)	109.0 (8.4)	2.9 (1.4)	5
4L	94.2 (4.0)	—	2.6 (0.7)	5
4R	86.3 (7.6)	89.7 (10.8)	3.2 (1.1)	4
5L	115.4 (0.2)	—	3.2 (0.7)	3
5R	55.7 (4.2)	—	3.3 (1.1)	4

Except for chromosome ends 1L and 2R, all ends are individually identifiable from the subtelomeric BAC probe hybridisation (SubTel) and the distance (Gap) of this to the telomeric repeat sequence (Tel) at the end of the chromosome. Chromosome 2L was not analysed as it consists of an rDNA repeat array. The number of fibres analysed in each case is given (N).



Figure 3 Absence of telomeric repeats in *atrads50* end-to-end chromosomal fusions. Fibre-FISH of genomic DNA from *atrads50* (A) and *tert* (B) plants, hybridised with telomeric repeat (green) and the nine subtelomeric BAC (red) probes. Chromosomal fusions are characterised by the alignment of two subtelomeric signals on single fibre and any telomeric signals appear between the two subtelomeric signals. In contrast to the *tert* mutant (B), no telomeric repeat signals were observed in the *atrads50* chromosomal fusions (A).

Chromosome end-to-end fusions are identified as two subtelomeric signals juxtaposed in the same DNA fibre. Figure 3A shows several examples of these, none of which show detectable telomeric repeat signal between the two subtelomeric regions. In total, we identified eight end-to-end chromosome fusions from *atrads50* mutant plants and none presented any detectable telomeric repeat signal.

In the absence of telomerase, *Arabidopsis* plants show progressive loss of telomeric repeats finally giving rise to the production of anaphase bridges from generation 6 (Riha *et al*, 2001). Using a polymerase chain reaction (PCR) approach, Heacock *et al* (2004) found end-to-end fusions both with and without telomeric repeats in *tert* mutant plants. We have carried out similar PCR analyses, confirming these results on *tert* mutant plants (data not shown). Parallel experiments failed to amplify chromosome-end fusion junctions from the *atrads50* mutant plants, in agreement with our data showing more important losses of telomeric and subtelomeric DNA at fusion junctions in these plants (data not shown).

In order to confirm these data and to be able to compare it directly with the *atrads50* data (above), we carried out fibre-FISH on DNA fibres from nuclei of *Arabidopsis* generation 6 *tert* mutant plants. Figure 3B shows that chromosome fusions

both with and without detectable telomeric repeats were observed in the *tert* mutants (10 fusions analysed). These results contrast clearly with the absence of detectable telomeric repeats in chromosome end fusions of the *atrad50* mutant plants. We thus conclude that the majority of chromosome ends participating in chromosome fusions in the *atrad50* mutant plants have thus been subjected to variable and extensive terminal deletions. Unlike the progressive and relatively uniform loss of telomeric repeats that occurs in *tert* mutants, some chromosomes abruptly lose their telomeres in a single generation *atrad50* mutants, resulting in significant genomic instability.

AtRad50 protects shortened telomeres in the absence of telomerase

AtRad50 protein is thus essential for the protection of telomeres in *Arabidopsis* and the absence of this protein leads to significant terminal degradation of chromosomes and frequent chromosome fusions. The resulting dicentric chromosomes and bridge-breakage-fusion cycles give rise to significant genomic instability. Given the known roles of the Rad50 protein in DNA DSBR and in telomere maintenance, we posed the question of whether the severe chromosome degradation/fusion phenotype of the *atrad50* mutant is solely due to the role of AtRad50 in maintaining the telomeric cap structure, or whether this protein (and presumably the MRN complex?) plays other roles in chromosome-end protection?

In order to answer this question, we analysed the potential role of AtRad50 function on short telomeres generated in the telomerase mutant. Successive generations of telomerase mutant plants show progressively shorter telomeres and fourth or fifth telomerase mutant generation plants start to show anaphase bridging. We constructed a telomerase mutant *tert-atrad50* heterozygote line and analysed the frequency of mitotic anaphase bridges in *tert-ATRAD50+* and *tert-atrad50-* sister plants in successive generations. This approach thus permitted the study of the effect of the removal of the AtRad50 protein in plants with successively shorter telomeres.

Figure 4 presents the results of this analysis for third, fourth and fifth telomerase mutant generation plants. Mitotic figures from pistil cells were analysed for consecutive generations of the *atrad50/tert* double-mutant plants and *atrad50* and *tert* single-mutant plants. For each generation and mutant, 200–300 anaphases were examined from pistils isolated from 5–6 individual plants. 7.5–9.7% of anaphases from *atrad50* mutant plants show bridged chromosomes independent, as expected, of the generation analysed. In telomerase mutant generation 1, similar levels of chromosome bridges were observed in *atrad50* single-mutant and *atrad50/tert* double-mutant plants. However, in telomerase mutant generation 3, *atrad50/tert* plants presented 16.7% of anaphases with bridges, whereas the single *tert* mutant plants show 1.7% and *atrad50*, 7.4%. Thus, *atrad50/tert* double-mutant plants presented twice as many chromosome bridges than that expected from simple addition of the individual effects of each single mutation. A similar synergistic effect was observed in telomerase mutant generation 4, with 21.6% of fusions in *atrad50/tert* double-mutant plants compared to 8.7% for *atrad50* and 1.6% in *tert* single mutants. These results thus clearly show a synergistic effect of the

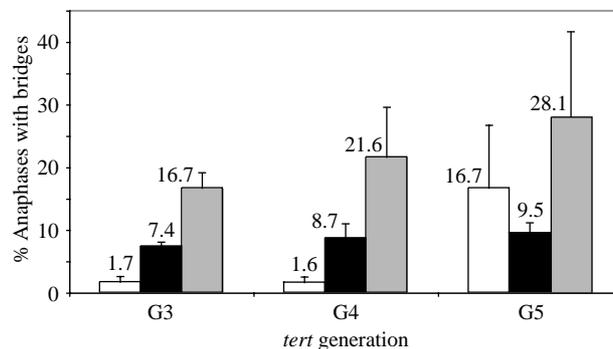


Figure 4 Synergistic effect of *atrad50* and *tert* mutations on the frequency of mitotic anaphases presenting at least one chromosome bridge. Data for *tert* (unfilled), *atrad50* (black) and double *tert/atrad50* (grey) mutants are shown. For each generation and mutant, approximately 250 anaphases were examined from 5 to 6 experiments of mitotic cells from flower pistils.

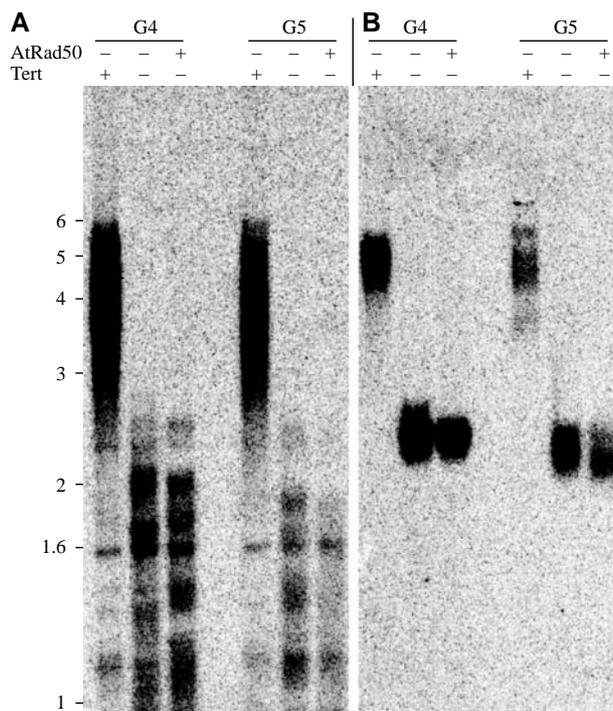


Figure 5 TRF analysis of bulk telomere lengths in DNA from flower buds from *atrad50*, *tert* and *atrad50/tert* double mutants of *tert* mutant generations 4 and 5. Southern analysis of MboI-digested total DNA using the telomeric repeat probe (A) and by the chromosome II-subtelomeric-specific probe (B). Positions of DNA size markers (kb) are shown to the left of the panels.

two mutations, with absence of AtRad50 protein exacerbating the effects of the telomere shortening produced by the absence of telomerase. The observed synergism of the two mutants supports a dual protective role for AtRad50 on normal and on shortened telomeres.

Two hypotheses can be proposed to explain these observations: either the higher levels of fusions seen in the double mutant result from an increased rate of telomeric repeat loss in the absence of AtRad50, or that the shortened telomeres in the telomerase mutant are ‘protected’ from the action of recombination by AtRad50 protein. In order to distinguish between these two hypotheses, we carried out TRF analysis of

the telomerase mutant generation 4 and 5 plants, in the presence or absence of the AtRad50 protein (Figure 5). No acceleration of telomere repeat loss is observed in double *tert/atrad50* mutant plants with respect to single *tert* mutants. Thus in cells with shortened telomeres, the lack of the AtRad50 protein provokes telomere dysfunction without accelerated loss of telomeric repeats. This result argues in favour of an active role for AtRad50 on shortened telomeres in ‘protecting’ them from recombination.

To better understand the role of AtRad50 in the protection of shortened telomeres, we analysed the structure of the chromosome fusions from *atrad50/tert* and *tert* plants by FISH. Figure 6 shows FISH analysis of mitoses from generation 5 *tert* mutant plants and double-mutant *tert/atrad50* sister plants. 38.1% of mitotic anaphases from the telomerase mutant generation 5 plants show detectable telomeric repeat DNA sequence in the bridge. Surprisingly, the double-mutant sister plants showed an even higher level, with 48.2% of

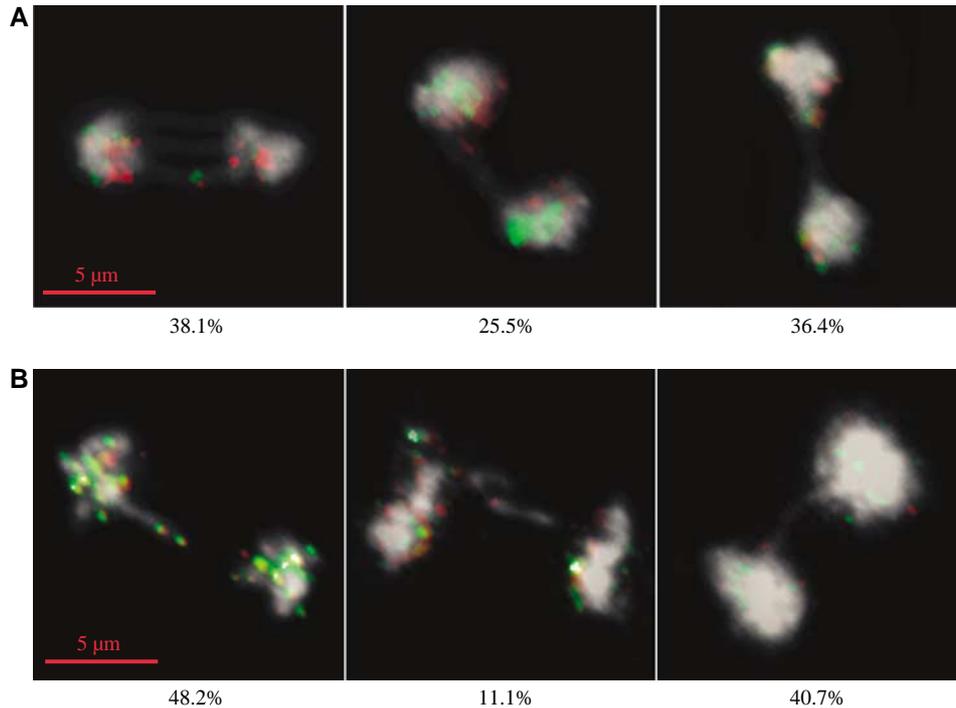


Figure 6 DAPI-stained mitotic nuclei from fifth *tert* generation: *tert* (A) and *tert/atrad50* (B) mutants analysed by FISH with telomeric repeat (green) and the nine subteleromic BAC (red) fluorescent probes. (A) In the *tert* mutant, 38.1% (21/55) chromosome bridges showed subteleromic and telomeric signals, 25.5% (14/55) only subteleromic signal and 36.4% (20/55) neither telomeric nor subteleromic signals. (B) In the double *tert/atrad50* mutant, 48.2% (13/27) chromosome bridges showed subteleromic and telomeric signals, 11.1% (3/27) only subteleromic signal and 40.7% (11/27) neither telomeric nor subteleromic signals.

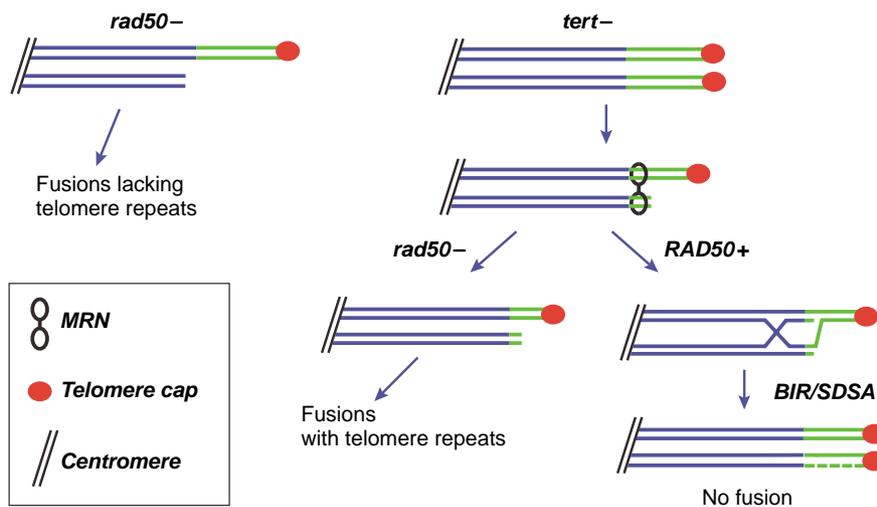


Figure 7 A model to explain the two roles of Rad50 in telomere maintenance. In the absence of Rad50, breakage or incomplete replication of some chromosome ends result in fused chromosomes lacking telomeric repeat DNA. Telomere erosion in the *tert* mutant results in uncapping of some telomeres, which are then recognised as DSBs by the cellular recombination machinery. MRN constrains this recombination to the sister chromatid via BIR or SDSA and thus favours repair of the telomere. In the absence of Rad50, this preference for the sister chromatid is lost and more chromosome fusions are found in the double *tert/atrad50* mutant. Each line represents a DNA strand and each group of four lines represents a pair of chromatids. Telomere repeat sequence is green.

bridge-containing anaphases showing telomeric repeat DNA in the bridge. This result was confirmed in the generation 4 *tert/atrad50* mutant plants (50.7%). Thus, absence of AtRad50 protein accelerates the appearance of chromosome fusions in the *tert* mutant plants, but these fusions include telomere repeat DNA characteristic of the *tert* mutants, rather than the absence of telomere repeat DNA characteristic of *atrad50* mutants. Absence of the AtRad50 protein thus increases the probability of fusion of shortened telomeres (due to absence of telomerase).

Discussion

Through analysis of *Arabidopsis atrad50* mutants, both alone and in conjunction with the telomerase mutant, we describe two roles for the Rad50 protein in telomere maintenance. Absence of AtRad50 protein leads to rapid (within a single generation) shortening of a subpopulation of chromosome ends and subsequently chromosome-end fusions lacking telomeric repeats. In addition to this effect, in the telomerase mutant, absence of AtRad50 'deprotects' partially eroded chromosome ends, greatly stimulating the probability of their participation in chromosome fusions. This synergy in the double *tert/atrad50* mutant thus results in a mixed population of 'rad50-minus' and 'tert-minus' chromosome-end fusions, lacking or including telomeric repeats at the fusion points, respectively. Given that we do not observe any effect of the *atrad50* mutant on telomeric DNA erosion in TRF analysis of the *tert* and *tert/atrad50* mutants, the 'deprotection' of the shortened telomeres does not result in increased general exonucleolytic degradation, but seems to act specifically in facilitating the access of recombination to these shortened, but still functional telomeres.

Arabidopsis atrad50 plants show high levels of chromosome fusions lacking telomere repeat DNA sequences at the fusion points. Such rapid chromosomal instability appearing in first generation has also been observed in *Arabidopsis atm atr* double-mutant plants (Vespa *et al*, 2005). Based on specific PCR amplification to detect chromosomal end-fusions, these authors suggested that telomeres are rapidly degraded in these mutants before fusion. Null mutations in either *MRE11* or *RAD50* in mice are early-embryonic lethal, preventing cytological analysis of chromosomes. However, mice homozygous for the hypomorphic mutation *rad50s* show low levels (0.1–0.2 per metaphase) of end-to-end fusions presenting telomeric repeats (Bender *et al*, 2002). A role for Rad50 in telomere protection has also been reported in yeast and *Drosophila* (Mieczkowski *et al*, 2003; Bi *et al*, 2004; Ciapponi *et al*, 2004), indicating that this essential role of the Rad50 protein in telomere maintenance is conserved in most eukaryotic cells.

The rapid loss of telomere repeats of only a subpopulation of chromosomes in *Arabidopsis atrad50* plants is reminiscent of the telomeric rapid deletion (TRD) observed in yeast and mammals (Lustig, 2003). TRD results from the telomeric t-loop structure being resolved by homologous recombination (HR) to yield a shortened telomere in one step (Li and Lustig, 1996; Bucholc *et al*, 2001; Wang *et al*, 2004). Arguing against this interpretation, however, is the dependence of TRF2 Δ B-induced t-loop HR on Nbs1 in mammals (Wang *et al*, 2004) and the fact that TRD in yeast is abrogated in the absence of

Rad50 or Mre11 (Bucholc *et al*, 2001). Thus, HR-dependent rapid loss of telomeres in yeast and mammals is dependent on MRX (or MRN) complex function. Our preliminary studies have failed to detect the appearance of telomeric repeat circles in *atrad50* mutant plants (data not shown) and we are currently crossing *atrad50*, with mutants defective in components of HR pathways to clarify whether the loss of repeats in *atrad50* plants is HR dependent.

An alternative mechanism has been proposed to explain the telomere shortening in human cells deficient for the helicase WRN (Bai and Murnane, 2003; Bailey and Murnane, 2006). This invokes breakage owing to DNA replication fork collapse in a subpopulation of telomeres to explain the stochastic loss of telomeric sequences at some telomeres, followed by chromosome fusions involving these damaged chromosome ends. This argument should also be applicable to the MRN complex and explain the *rad50* results reported here. Mre11 localises with chromatin in S-phase and this is enhanced by replication fork stalling in mammalian cells (Maser *et al*, 2001; Mirzoeva and Petrini, 2003) and Rad50 has been shown to localise to stalled replication forks in human cells (Robison *et al*, 2004). Mre11-dependent replication fork restart has been shown to act to avoid the accumulation of DSBs in replicating *Xenopus* oocyte extracts (Costanzo *et al*, 2001; Trenz *et al*, 2006). Furthermore, WRN protein localisation to gamma-H2AX at DNA DSBs is dependent upon MRN complex (Cheng *et al*, 2005).

Thus, absence of Rad50 protein can be expected to result in increased levels of chromosome and chromatid breaks, which would agree with the 49% of the anaphase chromosome bridges observed in *atrad50* plants with no detectable subtelomeric sequence hybridisation, even greater than the 36% seen in *tert* mutant plants. Additionally, a proportion could be explained by the fusion junction being hidden in the mass of the other chromosomes (i.e. not in the 'middle' of the bridge). Multiple rounds of breakage and fusion, following the initial event (in bridge-breakage-fusion cycles), would also result in such structures. The fibre-FISH analyses are based on the juxtaposition of two subtelomeric signals on one fibre and so are of no help here and further data are needed to distinguish between these arguments concerning the initiating events for the fusions. Notwithstanding, these propositions both provide potential mechanisms to explain the absence of telomeric repeat DNA in chromosome fusions seen in the *atrad50* mutant and the fact that the mutant plants show no concurrent generalised shortening of telomeric repeat DNA.

How is the AtRad50-dependent protection of telomeres mediated? In contrast to the telomere repeat DNA addition by telomerase in *Arabidopsis* and many other species, *Drosophila* telomeres are maintained by transposition of specialised

transposons (het-A and TART) (Mason and Biessmann, 1995; Pardue and DeBaryshe, 1999). Null mutations in the *Drosophila rad50* and *mre11* genes cause telomeric fusion without total loss of Het-A sequences (Bi *et al*, 2004; Ciapponi *et al*, 2004). In *Drosophila*, both *rad50* and *mre11* mutants present reduced levels of two telomere-associated proteins HOAP and HP1, both known to act in preventing telomere fusions (Bi *et al*, 2004; Ciapponi *et al*, 2004). The earlier telomere fusions we observe in *atrad50/tert* mutant plants, as compared with the *tert* mutant, could be due to a reduction of

TRF1 and/or TRF2 proteins in the absence of Rad50. A similar role in the protection of short telomeres has been described for the ATM protein in both plants and mammals (Chan and Blackburn, 2003; Qi *et al*, 2003; Vespa *et al*, 2005), where it has been proposed that loss of ATM drives short telomeres to be prematurely dysfunctional without any loss of telomeric repeats. One possible explanation for the similar phenotypes of *atm* and *rad50* mutants comes from the observation that ATM association to telomeres is dependent upon, or at least facilitated by, presence of the Rad50 protein (Takata *et al*, 2005). This hypothesis is further supported by the absence of an additive effect in telomere protection in double *atm/mre11* mutants in both *Drosophila* and yeast (Ritchie and Petes, 2000; Bi *et al*, 2004; Ciapponi *et al*, 2004).

Rad50 has been implicated in constraining recombination to sister-chromatids in *Schizosaccharomyces pombe* (Hartsuiker *et al*, 2001) and possibly in yeast and *Arabidopsis* (Malone *et al*, 1990; Moore and Haber, 1996; Bressan *et al*, 1999; Gherbi *et al*, 2001). Given this and structural and functional studies showing its role in tethering DNA molecules (Anderson *et al*, 2001; de Jager *et al*, 2001; Hopfner *et al*, 2001; Hopfner *et al*, 2002; Wiltzius *et al*, 2005), we speculate that the protective 'anti-fusion' role described in this work may indicate that, when a telomere shortens (in the *tert* mutant) to an extent to become a substrate for the recombination machinery of the cell, Rad50 acts to constrain this interaction to invasion of the sister chromatid. Extension of the invading end using the sister as template would re-establish the required telomere repeat length and thus 'heal' the shortened telomere (Figure 7). Such a mechanism could well be a 'safety-net' in normal cells. This use of the sister chromatid as a template to restore a shortened telomere is essentially the same mechanism as that proposed for the recombination-mediated (ALT) lengthening of telomeres in the absence of telomerase in animals (Bryan *et al*, 1995, 1997; Bailey *et al*, 2004; Londono-Vallejo *et al*, 2004) (review by Muntoni and Reddel, 2005) and similar to that of Rad50-dependent type II survivors in yeast (Teng and Zakian, 1999; Lundblad and Blackburn, 1993; Teng *et al*, 2000). Furthermore, the role of Rad50 in promoting this via constraint of recombination to sister chromatids is consistent with the mitotic hyperrecombination phenotype of *rad50* mutants in yeasts and also *Arabidopsis* (Malone *et al*, 1990; Moore and Haber, 1996; Bressan *et al*, 1999; Gherbi *et al*, 2001). Absence of Rad50 would thus increase the likelihood of the shortened chromosome end recombining in an end-to-end manner with another chromatid (of the same or another chromosome), yielding more frequent fusions and the resulting anaphase bridges.

In the light of the *Arabidopsis* data presented here, the Rad50 protein apparently plays a universal role in preventing telomere fusion, independently of their structure and the implication of telomerase. Absence of AtRad50 protein leads both to rapid shortening of a subpopulation of chromosome ends and also 'deprotects' partially eroded chromosome ends, greatly stimulating the probability of their participation in chromosome fusions. The synergy in the double *tert/atrad50* mutant thus results in a mixed population of chromosome-end fusions, lacking or including telomeric repeats at the fusion points. This 'deprotection' of shortened telomeres does not result in increased exonucleolytic degradation, but acts specifically in facilitating the access of recombination.

Materials and methods

Arabidopsis mutants and TRF analysis

Arabidopsis thaliana plants were grown in soil in the greenhouse under standard conditions. The *tert* (Fitzgerald *et al*, 1999) and *atrad50* (Gallego *et al*, 2001) *Arabidopsis* mutants have been described previously. The double *atrad50/tert* mutants were produced by crossing *atrad50* heterozygote with a *tert* homozygote (third mutant generation) using standard techniques. The *tert* mutant generations used in this work thus begin with the first *tert* mutant generation in the F2 plants from this cross. PCR genotyping was carried out as described for *tert* (Fitzgerald *et al*, 1999) and *atrad50* (Gallego *et al*, 2001). TRF analysis of telomere length in MboI-digested genomic DNA was as previously described (Gallego and White, 2001).

DAPI staining of mitoses

As described (Caryl *et al*, 2000), whole inflorescences were collected, fixed and mitotic chromosomes of fixed flower pistils were squashed on a slide. Slides were mounted using Vectashield (Vector Laboratories) mounting medium with 1.5 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) and observed by fluorescence microscopy, using a Zeiss AxioPlan2 microscope. Images were further processed and enhanced using Adobe Photoshop software.

Fluorescence in situ hybridisation

Arabidopsis BACs F6F3, F23A5, F17A22, F4P13, T20010, F6N15, T19P19, F7J8 and K9I9 were labelled with biotin-16-dUTP using the BioPrime DNA labelling system (Invitrogen) and telomeric probe was labelled with digoxigenin-11-dUTP (Roche) by PCR using specific telomere primers 5'(TTTAGGG)₆3'. FISH experiments were performed with slides prepared as described above for DAPI staining according to Schubert *et al* (2001). For the detection of biotin-labelled probe, avidin conjugated with Texas Red (1:500, Vector Laboratories) followed by goat anti-avidin conjugated with biotin (1:100, Vector Laboratories) and avidin-Texas Red (1:500) were used. For the detection of digoxigenin-labelled probe, mouse anti-digoxigenin (1:125, Roche) followed by rabbit anti-mouse fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:500, Sigma) and goat anti-rabbit conjugated with Alexa 488 (1:100, Molecular Probes) were used.

Isolation of nuclei and fibre-FISH

Isolation of plant nuclei was performed according to Zhong *et al* (1996) with minor modifications (Fransz P and Mathieu O, unpublished). Flower buds were frozen and ground to a fine powder in liquid nitrogen. The powder was transferred to a 50-ml centrifuge tube with 20 ml chilled nuclei isolation buffer (NIB: 10 mM Tris-HCl pH 9.5, 10 mM ethylene diaminetetra acetic acid, 100 mM KCl, 0.5 M sucrose, 4 mM spermidine, 1 mM spermine and 0.1% β-mercaptoethanol) and mixed gently on ice for 5 min. The mixture was filtered sequentially through 80 and 40 µm nylon filters and 1 ml of ice-cold NIB containing 10% Triton X-100 was added to the filtrate and gently mixed. The mixture was centrifuged at 2000g for 10 min at 4°C. The supernatant was decanted and the pellet was resuspended in NIB at 5 × 10⁵ nuclei/150 µl, to which an equal volume of 1% (w/v) low-melting-point agarose (42°C) was added. Molecular combing and FISH were carried out as described by Michalek *et al* (1997). Images were acquired on a Zeiss epifluorescence microscope using Axiovision software. Measurements were performed using the same software and images were enhanced using Adobe Photoshop software.

Acknowledgements

We thank the members of the BIOMOVE group for their help and discussions and Aaron Bensimon and Chiara Conti for teaching us the fibre-FISH technique. David Leach and Jim Haber are thanked for their insightful comments and discussion. This work was partly financed by an European Union research grant (QLG2-CT-2001-01397), the Commissariat d'Énergie Atomique (LRC-19V), the Centre National de la Recherche Scientifique and the Université Blaise Pascal. JBV is supported by a MENRT doctoral fellowship.

References

- Anderson DE, Trujillo KM, Sung P, Erickson HP (2001) Structure of the Rad50 × Mre11 DNA repair complex from *Saccharomyces cerevisiae* by electron microscopy. *J Biol Chem* **276**: 37027–37033
- Bai Y, Murnane JP (2003) Telomere instability in a human tumor cell line expressing a dominant-negative WRN protein. *Hum Genet* **113**: 337–347
- Bailey SM, Murnane JP (2006) Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucleic Acids Res* **34**: 2408–2417
- Bailey SM, Brennehan MA, Goodwin EH (2004) Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase-negative cells. *Nucleic Acids Res* **32**: 3743–3751
- Bender CF, Sikes ML, Sullivan R, Huye LE, Le Beau MM, Roth DB, Mirzoeva OK, Oltz EM, Petrini JH (2002) Cancer predisposition and hematopoietic failure in Rad50(S/S) mice. *Genes Dev* **16**: 2237–2251
- Bi X, Wei SC, Rong YS (2004) Telomere protection without a telomerase; the role of ATM and Mre11 in *Drosophila* telomere maintenance. *Curr Biol* **14**: 1348–1353
- Bleuyard JY, Gallego ME, White CI (2004) Meiotic defects in the *Arabidopsis* rad50 mutant point to conservation of the MRX complex function in early stages of meiotic recombination. *Chromosoma* **113**: 197–203
- Bressan DA, Baxter BK, Petrini JH (1999) The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 7681–7687
- Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR (1997) Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* **3**: 1271–1274
- Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR (1995) Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* **14**: 4240–4248
- Bucholc M, Park Y, Lustig AJ (2001) Intrachromatid excision of telomeric DNA as a mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**: 6559–6573
- Caryl AP, Armstrong SJ, Jones GH, Franklin FC (2000) A homologue of the yeast HOP1 gene is inactivated in the *Arabidopsis* meiotic mutant asy1. *Chromosoma* **109**: 62–71
- Cech TR (2004) Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell* **116**: 273–279
- Chan SW, Blackburn EH (2003) Telomerase and ATM/Tel1p protect telomeres from nonhomologous end joining. *Mol Cell* **11**: 1379–1387
- Cheng WH, Sakamoto S, Fox JT, Komatsu K, Carney J, Bohr VA (2005) Werner syndrome protein associates with gamma H2AX in a manner that depends upon Nbs1. *FEBS Lett* **579**: 1350–1356
- Ciapponi L, Cenci G, Ducau J, Flores C, Johnson-Schlitz D, Gorski MM, Engels WR, Gatti M (2004) The *Drosophila* Mre11/Rad50 complex is required to prevent both telomeric fusion and chromosome breakage. *Curr Biol* **14**: 1360–1366
- Connelly JC, Leach DR (2002) Tethering on the brink: the evolutionarily conserved Mre11–Rad50 complex. *Trends Biochem Sci* **27**: 410–418
- Costanzo V, Robertson K, Bibikova M, Kim E, Grieco D, Gottesman M, Carroll D, Gautier J (2001) Mre11 protein complex prevents double-strand break accumulation during chromosomal DNA replication. *Mol Cell* **8**: 137–147
- D'Adda di Fagagna F, Teo SH, Jackson SP (2004) Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev* **18**: 1781–1799
- D'Amours D, Jackson SP (2002) The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 317–327
- de Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C (2001) Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell* **8**: 1129–1135
- Fajkus J, Sykorova E, Leitch AR (2005) Telomeres in evolution and evolution in telomeres. *Chromosome Res* **13**: 469–479
- Fitzgerald MS, Riha K, Gao F, Ren S, McKnight TD, Shippen DE (1999) Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from *Arabidopsis* inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 14813–14818
- Gallego ME, White CI (2001) RAD50 function is essential for telomere maintenance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 1711–1716
- Gallego ME, White CI (2005) DNA repair and recombination functions in *Arabidopsis* telomere maintenance. *Chromosome Res* **13**: 481–491
- Gallego ME, Jeanneau M, Granier F, Bouchez D, Bechtold N, White CI (2001) Disruption of the *Arabidopsis* RAD50 gene leads to plant sterility and MMS sensitivity. *Plant J* **25**: 31–41
- Gherbi H, Gallego ME, Jalut N, Lucht JM, Hohn B, White CI (2001) Homologous recombination in plants is stimulated in the absence of Rad50. *EMBO Rep* **2**: 287–291
- Hartsuiker E, Vaessen E, Carr AM, Kohli J (2001) Fission yeast Rad50 stimulates sister chromatid recombination and links cohesion with repair. *EMBO J* **20**: 6660–6671
- Heacock M, Spangler E, Riha K, Puizina J, Shippen DE (2004) Molecular analysis of telomere fusions in *Arabidopsis*: multiple pathways for chromosome end-joining. *EMBO J* **23**: 2304–2313
- Hopfner KP, Craig L, Moncalian G, Zinkel RA, Usui T, Owen BA, Karcher A, Henderson B, Bodmer JL, McMurray CT, Carney JP, Petrini JH, Tainer JA (2002) The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* **418**: 562–566
- Hopfner KP, Karcher A, Craig L, Woo TT, Carney JP, Tainer JA (2001) Structural biochemistry and interaction architecture of the DNA double-strand break repair Mre11 nuclease and Rad50-ATPase. *Cell* **105**: 473–485
- Li B, Lustig AJ (1996) A novel mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**: 1310–1326
- Lisby M, Rothstein R (2004) DNA repair: keeping it together. *Curr Biol* **14**: R994–R996
- Londono-Vallejo JA, Der-Sarkissian H, Cazes L, Bacchetti S, Reddel RR (2004) Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange. *Cancer Res* **64**: 2324–2327
- Lundblad V, Blackburn EH (1993) An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* **73**: 347–360
- Lustig AJ (2003) Clues to catastrophic telomere loss in mammals from yeast telomere rapid deletion. *Nat Rev Genet* **4**: 916–923
- Malone RE, Ward T, Lin S, Waring J (1990) The RAD50 gene, a member of the double strand break repair epistasis group, is not required for spontaneous mitotic recombination in yeast. *Curr Genet* **18**: 111–116
- Maser RS, Mirzoeva OK, Wells J, Olivares H, Williams BR, Zinkel RA, Farnham PJ, Petrini JH (2001) Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis. *Mol Cell Biol* **21**: 6006–6016
- Mason JM, Biessmann H (1995) The unusual telomeres of *Drosophila*. *Trends Genet* **11**: 58–62
- Michael X, Ekong R, Fougereuse F, Rousseaux S, Schurra C, Hornigold N, van Slegtenhorst M, Wolfe J, Povey S, Beckmann JS, Bensimon A (1997) Dynamic molecular combing: stretching the whole human genome for high-resolution studies. *Science* **277**: 1518–1523
- Mieczkowski PA, Mieczkowska JO, Dominska M, Petes TD (2003) Genetic regulation of telomere-telomere fusions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 10854–10859
- Mirzoeva OK, Petrini JH (2003) DNA replication-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol Cancer Res* **1**: 207–218
- Moore JK, Haber JE (1996) Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**: 2164–2173
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR (1988) A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 6622–6626
- Muntoni A, Reddel RR (2005) The first molecular details of ALT in human tumor cells. *Hum Mol Genet* **14** (Spec No. 2): R191–R196
- Nugent CI, Bosco G, Ross LO, Evans SK, Salinger AP, Moore JK, Haber JE, Lundblad V (1998) Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr Biol* **8**: 657–660

- Pardue ML, DeBaryshe PG (1999) *Drosophila* telomeres: two transposable elements with important roles in chromosomes. *Genetica* **107**: 189–196
- Puizina J, Siroky J, Mokros P, Schweizer D, Riha K (2004) Mre11 deficiency in *Arabidopsis* is associated with chromosomal instability in somatic cells and Spo11-dependent genome fragmentation during meiosis. *Plant Cell* **16**: 1968–1978
- Qi L, Strong MA, Karim BO, Armanios M, Huso DL, Greider CW (2003) Short telomeres and ataxia-telangiectasia mutated deficiency cooperatively increase telomere dysfunction and suppress tumorigenesis. *Cancer Res* **63**: 8188–8196
- Richards EJ, Ausubel FM (1988) Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **53**: 127–136
- Riha K, McKnight TD, Griffing LR, Shippen DE (2001) Living with genome instability: plant responses to telomere dysfunction. *Science* **291**: 1797–1800
- Ritchie KB, Petes TD (2000) The Mre11p/Rad50p/Xrs2p complex and the Tel1p function in a single pathway for telomere maintenance in yeast. *Genetics* **155**: 475–479
- Robison JG, Elliott J, Dixon K, Oakley GG (2004) Replication protein A and the Mre11.Rad50.Nbs1 complex co-localize and interact at sites of stalled replication forks. *J Biol Chem* **279**: 34802–34810
- Schubert I, Fransz PF, Fuchs J, de Jong JH (2001) Chromosome painting in plants. *Methods Cell Sci* **23**: 57–69
- Slijepcevic P, Al-Wahiby S (2005) Telomere biology: integrating chromosomal end protection with DNA damage response. *Chromosoma* **114**: 275–285
- Stracker TH, Theunissen JW, Morales M, Petrini JH (2004) The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. *DNA Repair (Amsterdam)* **3**: 845–854
- Takata H, Tanaka Y, Matsuura A (2005) Late S phase-specific recruitment of Mre11 complex triggers hierarchical assembly of telomere replication proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **17**: 573–583
- Teng SC, Zakian VA (1999) Telomere–telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 8083–8093
- Teng SC, Chang J, McCowan B, Zakian VA (2000) Telomerase-independent lengthening of yeast telomeres occurs by an abrupt Rad50p-dependent, Rif-inhibited recombinational process. *Mol Cell* **6**: 947–952
- Tomaska L, McEachern MJ, Nosek J (2004) Alternatives to telomerase: keeping linear chromosomes via telomeric circles. *FEBS Lett* **567**: 142–146
- Trenz K, Smith E, Smith S, Costanzo V (2006) ATM and ATR promote Mre11 dependent restart of collapsed replication forks and prevent accumulation of DNA breaks. *EMBO J* **25**: 1764–1774
- Vespa L, Couvillion M, Spangler E, Shippen DE (2005) ATM and ATR make distinct contributions to chromosome end protection and the maintenance of telomeric DNA in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **19**: 2111–2115
- Wang RC, Smogorzewska A, de Lange T (2004) Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* **119**: 355–368
- Wiltzius JJ, Hohl M, Fleming JC, Petrini JH (2005) The Rad50 hook domain is a critical determinant of Mre11 complex functions. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 403–407
- Zhang Y, Zhou J, Lim CU (2006) The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control. *Cell Res* **16**: 45–54
- Zhong XB, Hans de Jong J, Zabel P (1996) Preparation of tomato meiotic pachytene and mitotic metaphase chromosomes suitable for fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Chromosome Res* **4**: 24–28
- Zhu XD, Kuster B, Mann M, Petrini JH, de Lange T (2000) Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* **25**: 347–352

Résultats complémentaires

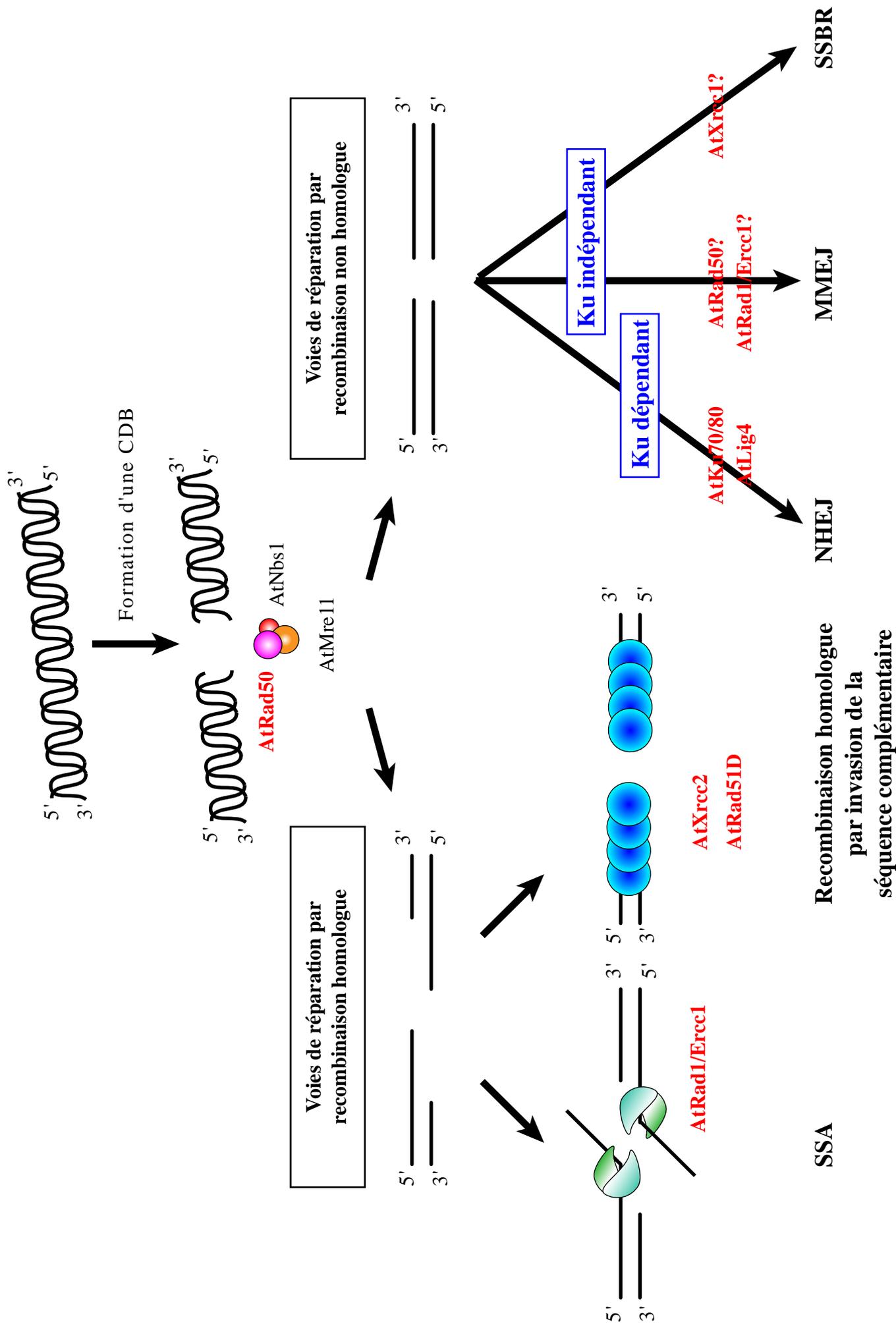


Figure 27 : Protéines impliquées dans les différentes voies de réparation des cassures de l'ADN

Dans cet article, nous avons montré que la protéine AtRad50 est très importante pour la protection des télomères. En effet la perte de cette protéine génère un phénotype au niveau du développement de l'appareil végétatif des plantes, associé à des fusions chromosomiques dont la moitié contiennent les extrémités des chromosomes avec perte des répétitions télomériques. La nature de l'autre moitié des fusions n'a pas pu être déterminée mais celles-ci ne se font pas par les extrémités. Nous nous sommes donc demandés quel pouvait être le mécanisme responsable de l'ensemble de ces fusions chromosomiques. Aucune étude n'avait été réalisée jusqu'à maintenant concernant ces fusions générées chez les mutants *atrad50*. Les seules études génétiques qui avaient été menées concernaient l'analyse de la voie permettant les fusions chez les mutants télomérase.

Chez les mammifères, la voie NHEJ semblait être impliquée dans ces fusions (Espejel *et al*, 2002a) mais récemment Maser *et al*, (2007) a contredit ces résultats (Maser *et al*, 2007). Chez *S. pombe* et *A. thaliana*, l'analyse de double mutants pour les gènes codant la sous unité catalytique de la télomérase et les protéines du NHEJ (hétérodimère Ku et la Lig4) n'ont pas permis d'inhiber ces fusions chromosomiques (Baumann & Cech, 2000; Riha & Shippen, 2003a). Les résultats que nous avons obtenus concernant la ou les voies générant ces chromosomes fusionnés chez les mutants pour la télomérase sont présentés dans l'Article 2.

Les différences majeures entre les fusions générées par la perte d'AtRad50 et celle de la télomérase concernent le nombre de générations nécessaires avant d'observer des fusions chromosomiques. En effet, dès la première génération des plantes mutantes *atrad50*, il est possible d'observer environ 10% d'anaphases présentant au moins un pont alors qu'il est nécessaire d'obtenir des plantes mutantes pour la télomérase de génération 6, pour observer le même pourcentage (Riha *et al*, 2001).

A

Génotypes	Nombre d'anaphases comptées	Pourcentage d'anaphases avec au moins un pont
<i>ATRAD50/ATKU80</i>	900	0
<i>atrad50</i>	747	13 ($\pm 2,5$)
<i>atku80</i>	900	0
<i>atrad50/ku80</i>	1191	7 (± 3)

**

B

Génotypes	Nombre d'anaphases comptées	Pourcentage d'anaphases avec au moins un pont
<i>ATRAD50/ATLIG4</i>	1055	0
<i>atrad50</i>	920	14,5 (± 4)
<i>atlig4</i>	893	0
<i>atrad50/lig4</i>	1200	5,5 ($\pm 1,5$)

**

Tableau 6 : Implication de la voie NHEJ dans les fusions chromosomiques des mutants *atrad50*

Le pourcentage d'anaphases présentant au moins une fusion chromosomique a été calculé par l'observation cytologique, de cellules en division (dans des tissus de pistils), d'environ 250 anaphases pour trois à quatre plantes différentes, par génotype. (**): différence significative à 97,5% (test de Student)

De plus, la nature de ces fusions est différente. Dans des cellules mitotiques d'*A. thaliana* mutantes pour la télomérase, des expériences de FISH, avec dix sondes subtélomériques spécifiques de chaque extrémité chromosomique ont permis de mettre en évidence que 89% de ces extrémités sont impliquées dans les fusions (Mokros *et al*, 2006). Ces résultats sont cohérents avec ceux que nous avons obtenus indiquant que 64% des fusions se font par les extrémités (en utilisant 9 extrémités sur 10 ; Vannier *et al*, 2006). La sonde manquante étant impliquée dans 18% des fusions (Mokros *et al*, 2006). Chez les plantes mutantes pour la télomérase, la majorité (80-90%) des fusions chromosomiques se font par les extrémités. Or chez les plantes mutantes pour *ATRAD50* seule la moitié les implique.

Ces résultats concernant la nature et la fréquence des fusions chromosomiques chez les plantes mutantes pour *ATRAD50* suggèrent que le ou les mécanismes pourraient être différents de ceux pour les mutants télomérase. Il a été suggéré que la voie NHEJ ne serait pas impliquée dans les fusions générées par l'absence d'AtMre11 puisque les double mutants *atmre11/ku70* ne présentent pas de diminution du nombre de fusions par rapport au simple mutant *atmre11* (respectivement 16 et 18% ; Puizina *et al*, 2004).

Nous avons voulu tester de nouveau l'implication de la voie NHEJ (Figure 27) dans les fusions générées par la perte d'AtRad50. Les double mutants entre *ATRAD50* et *ATKU80* ainsi qu'entre *ATRAD50* et la *ATLIG4* ont été obtenus. Nous avons effectué des analyses cytologiques sur environ 250 anaphases pour trois à quatre plantes différentes, par génotype.

Les plantes sauvages et mutantes pour *ATKU80* et *ATLIG4* ne présentent aucune fusion chromosomique (Tableau 6AB). Les mutants *atrad50* présentent une moyenne de 13% ($\pm 2,5\%$) et 14,5% ($\pm 1,5\%$) d'anaphases ayant des fusions chromosomiques alors que les doubles mutants *atrad50/ku80* et *atrad50/lig4* ont une moyenne de 7% ($\pm 2\%$) et 5,5% ($\pm 1,5\%$) d'anaphases ayant des fusions chromosomiques (Tableau 6AB).

A	Génotypes	Nombre d'anaphases comptées	Pourcentage d'anaphases avec au moins un pont
	<i>ATRAD50/ATRAD1</i>	800	0
	<i>atrad50</i>	1200	11 (± 1)
	<i>atrad1</i>	500	0
	<i>atrad50/rad1</i>	1085	11 (± 1)

B	Génotypes	Nombre d'anaphases comptées	Pourcentage d'anaphases avec au moins un pont
	<i>ATRAD50/ATERCC1</i>	600	0
	<i>atrad50</i>	600	10 (± 1)
	<i>atercc1</i>	600	0
	<i>atrad50/ercc1</i>	850	8,5 (± 1)

C	Génotypes	Nombre d'anaphases comptées	Pourcentage d'anaphases avec au moins un pont
	<i>ATRAD50/ATXRCC1</i>	300	0
	<i>atrad50</i>	350	10 (± 2)
	<i>atxrcc1</i>	967	0
	<i>atrad50/xrcc1</i>	949	5 (± 1)



Tableau 7 : Implication des voies MMEJ (et/ou SSA) et SSBR dans les fusions chromosomiques des mutants *atrad50*

Le pourcentage d'anaphases présentant au moins une fusion chromosomique a été calculé par l'observation cytologique, de cellules en division (dans des tissus de pistils), d'environ 250 anaphases pour trois à quatre plantes différentes, par génotype. (**): différence significative à 97,5% (test de Student)

La voie de réparation par recombinaison non homologue NHEJ semble être impliquée dans la formation de la moitié des fusions chromosomiques générées par l'absence d'AtRad50 mais ce n'est pas la seule. En effet, les doubles mutants *atrad50/ku80* et *atrad50/lig4* présentent encore sur la moitié des anaphases des fusions chromosomiques, indépendantes de la voie NHEJ et d'une voie comprenant AtRad50 (Figure 27).

Chez les mutants pour la télomérase, la voie de réparation par recombinaison non homologue MMEJ (Figure 27) a été suggérée pour être responsable d'une partie des fusions chromosomiques. En effet, les points de jonctions des fusions présentent des microhomologies chez les double mutants *attert/ku70*, dépendantes d'AtMre11 et d'AtLig4 (Heacock *et al*, 2004; Heacock *et al*, 2007). Cependant, le nombre de fusions n'est pas altéré dans les triple mutants *attert/ku70/mre11* et *attert/ku70/lig4*. Ces résultats suggèrent la présence d'une ou plusieurs autres voies permettant ces fusions. Les auteurs émettent l'hypothèse que la voie de réparation SSBR (Figure 27) faisant intervenir les protéines PARP-1, PARP-2 et XRCC1 pourrait intervenir dans le mécanisme de formation de ces fusions. De plus, ces trois protéines sont physiquement présentes au niveau des télomères en cellules humaines et interagissent avec TRF2 (Dantzer *et al*, 2004; Gomez *et al*, 2006).

Afin de déterminer la ou les voies responsables des fusions chromosomiques qui persistent dans les deux double mutants *atrad50/ku80* et *atrad50/lig4*, nous avons réalisé des double mutants entre *ATRAD50* et les gènes codant pour AtXrcc1 (voie SSBR) ainsi que pour AtRad1 et AtErcc1, protéines identifiées dans la voie de réparation par homologie de séquence (MMEJ et SSA ; Figure 27) chez *S. cerevisiae* (Adair *et al*, 2000; Fishman-Lobell & Haber, 1992; Ma *et al*, 2003).

Les plantes sauvages et mutantes pour *ATRAD1*, *ATERCC1* et *ATXRCC1* ne présentent aucune fusion chromosomique (Tableau 7ABC). Les mutants *atrad50* présentent

A	Génotypes	Nombre d'anaphases comptées	Pourcentage d'anaphases avec au moins un pont
	<i>atlig4</i>	200	0
	<i>atlig4/ercc1</i>	540	0
	<i>atrad50/lig4</i>	1066	6 ($\pm 1,5$)
	<i>atrad50/lig4/ercc1</i>	1104	6 ($\pm 1,5$)

B	Génotypes	Nombre d'anaphases comptées	Pourcentage d'anaphases avec au moins un pont
	<i>atku80</i>	300	0
	<i>atku80/xrcc1</i>	265	0
	<i>atrad50/ku80</i>	500	5,5 ($\pm 0,5$)
	<i>atrad50/ku80/xrcc1</i>	357	15 (± 4)

C	Génotypes	Nombre d'anaphases comptées	Pourcentage d'anaphases avec au moins un pont
	<i>atlig4</i>	300	0
	<i>atlig4/xrcc1</i>	500	0
	<i>atrad50/lig4</i>	536	5 (± 1)
	<i>atrad50/lig4/xrcc1</i>	830	9,5 ($\pm 1,5$)

Tableau 8 : Implication des voies NHEJ/MMEJ et NHEJ/SSBR dans les fusions chromosomiques des mutants *atrad50*

Le pourcentage d'anaphases présentant au moins une fusion chromosomique a été calculé par l'observation cytologique, de cellules en division (dans des tissus de pistils), d'environ 250 anaphases pour trois à quatre plantes différentes, par génotype. (**): différence significative à 97,5% (test de Student)

une moyenne de 11% ($\pm 1\%$), 10% ($\pm 1\%$) et 10% ($\pm 2\%$) d'anaphases ayant des fusions chromosomiques, équivalente aux doubles mutants *atrad50/rad1* et *atrad50/ercc1* qui ont une moyenne de 11% ($\pm 1\%$) et 8,5% ($\pm 1\%$) d'anaphases ayant des fusions chromosomiques (Tableau 7AB). Par contre, les double mutants *atrad50/xrcc1* ne présentent plus qu'environ 5% ($\pm 1\%$) d'anaphases ayant des fusions chromosomiques (Tableau 7C).

Ces résultats suggèrent que la voie de réparation par homologie de séquence (MMEJ et SSA ; Rad1/Rad10 dépendante ; Figure 27) ne semble pas avoir d'incidence significative sur le mécanisme de fusions chromosomiques générées par la perte d'AtRad50, contrairement à la voie SSBR (Xrcc1 dépendante ; Figure 27). Ces résultats sont concordants avec le fait que chez la levure, les protéines Rad50, Rad1 et Rad10 sont épistatiques (Ma *et al*, 2003). Ce résultat a été confirmé par un triple mutant *atrad50/lig4/ercc1* ayant une moyenne de 6% ($\pm 1,5\%$) d'anaphases ayant des fusions chromosomiques (Tableau 8A), ce qui suggère que les fusions restantes chez le double mutant *atrad50/lig4* (6% $\pm 1,5\%$; Tableau 8A) ne sont pas dépendantes de la voie de réparation par homologie de séquence (MMEJ et SSA ; Figure 27).

Il semblerait donc que les voies de réparation par recombinaison non homologue NHEJ et SSBR soient toutes les deux impliquées dans les fusions chromosomiques générées par la perte de AtRad50 (Figure 27). Afin de tester si ces deux voies sont épistatiques, nous avons réalisé des triple mutants entre les gènes *ATRAD50*, *ATKU80* et *ATXRCC1* ainsi qu'entre *ATRAD50*, *ATLIG4* et *ATXRCC1*. Ces deux triple mutants présentent respectivement 15% ($\pm 4\%$) et 9,5% ($\pm 1,5\%$) de fusions chromosomiques par anaphase (Tableau 8BC) Ce résultat, très voisin de celui obtenu chez des plantes simples mutantes *atrad50* (environ 10%), est très surprenant puisqu'il était attendu que l'inhibition de ces deux voies (NHEJ et SSBR) abolissent les fusions chromosomiques générées par le perte d'AtRad50 ou restent à un niveau équivalent aux double mutants (5,5% $\pm 0,5\%$ et 5% $\pm 1\%$; Tableau 8BC).

A

Génotypes	Nombre d'anaphases comptées	Pourcentage d'anaphases avec au moins un pont
<i>ATRAD50/ATXRCC2</i>	600	0
<i>atrad50</i>	600	9 ($\pm 1,5$)
<i>atxrcc2</i>	600	0 **
<i>atrad50/xrcc2</i>	1200	5,5 (± 1)

B

Génotypes	Nombre d'anaphases comptées	Pourcentage d'anaphases avec au moins un pont
<i>ATRAD50/ATRAD51D</i>	600	0
<i>atrad50</i>	600	9,5 (± 1)
<i>atrad51D</i>	600	0 **
<i>atrad50/rad51D</i>	519	5,5 ($\pm 0,5$)

C

Génotypes	Nombre d'anaphases comptées	Pourcentage d'anaphases avec au moins un pont
<i>atrad50/xrcc1</i>	342	5 (± 1) **
<i>atrad50/xrcc1/xrcc2</i>	1403	3 (± 1) **
<i>atrad50/xrcc1/xrcc2/ku80</i>	1091	10,5 (± 2)

Tableau 9 : Implication des voies HR et NHEJ/SSBR/HR dans les fusions chromosomiques des mutants *atrad50*

Le pourcentage d'anaphases présentant au moins une fusion chromosomique a été calculé par l'observation cytologique, de cellules en division (dans des tissus de pistils), d'environ 250 anaphases pour trois à quatre plantes différentes, par génotype. (**): différence significative à 97,5% (test de Student)

L'identification des voies permettant la reconnaissance des télomères non fonctionnels suite à la perte d'AtRad50, nous a amené à réaliser des double mutants entre *ATRAD50* et les gènes codant pour certaines protéines de la recombinaison homologue telles que les protéines paralogue de Rad51 : AtXrcc2 et AtRad51D (Figure 27). Les double mutants *atrads50/xrcc2* et *atrads50/rad51D* ont permis l'analyse cytologique de nombreuses anaphases qui a révélé que 5,5% ($\pm 1\%$) et 5,5% ($\pm 0,5\%$) des noyaux anaphasiques présentaient au moins une fusion chromosomique (Tableau 9AB).

Il semblerait donc que la voie de réparation par recombinaison homologue soit impliquée dans le mécanisme générant ces fusions. Suite à ces résultats nous avons décidé de tester l'implication des deux voies de recombinaison non homologue et homologue (Figure 27) dans ces fusions en réalisant un triple mutant *atrads50/xrcc1/xrcc2* ainsi qu'un quadruple mutant *atrads50/ku80/xrcc1/xrcc2*. Le triple mutant présente une moyenne de 3% ($\pm 1\%$) d'anaphases ayant des fusions chromosomiques alors que le quadruple mutant a une moyenne de 10,5% ($\pm 2\%$) d'anaphases ayant des fusions chromosomiques (Tableau 9C).

Les voies de réparation par recombinaison homologue et non homologue SSBR semblent donc être impliquées dans les fusions dues à la perte d'AtRad50. De manière très surprenante, la perte d'AtKu80 dans ce contexte entraîne la formation de nouvelles fusions.

L'ensemble de ces résultats impliquent donc la voie de réparation NHEJ (Figure 27) dans les fusions chromosomiques induites par la perte d'AtRad50 (diminution de 50% des fusions dans les double mutants *atrads50/ku80* et *atrads50/lig4*). Ce résultat est contradictoire avec l'analyse du mécanisme des fusions chromosomiques chez les plantes mutantes pour *ATMRE11* (environ 16% de fusions). En effet, les double mutants *atmre11/ku70* ne présentent pas de diminution de la fréquence de fusions (environ 18% ; Heacock *et al*, 2004). Cependant, il est difficile d'envisager que ces deux protéines possèdent le même rôle au niveau des

télomères puisque la perte d'AtMre11 entraîne une élongation des télomères alors que l'absence d'AtRad50 au niveau des télomères provoque une perte brutale des répétitions télomériques de certains chromosomes dans quelques cellules (Bundock *et al*, 2002; Gallego & White, 2001; Vannier *et al*, 2006). Il semblerait donc que la perte de l'une ou l'autre de ces protéines ne génèrent pas le même type de substrat de télomères non fonctionnels.

L'analyse du mécanisme permettant à l'autre moitié des fusions de persister, chez ces deux double mutants (*atrad50/ku80* et *atrad50/lig4*), suggère que la voie de réparation par homologie de séquence (MMEJ et/ou SSA) n'est pas nécessaire. Par contre, les voies SSBR et de réparation par recombinaison homologue semble l'être (Figure 27). Ces résultats suggèrent pour la première fois l'implication directe de ces deux voies de réparation dans la formation des fusions chromosomiques.

Certains résultats incohérents tels que ceux obtenus chez les mutants *atrad50/ku80/xrcc1*, *atrad50/lig4/xrcc1* et *atrad50/ku80/xrcc1/xrcc2* qui présentent une augmentation du nombre de fusions chromosomiques par anaphase, par rapport aux double mutants *atrad50/ku80*, *atrad50/lig4* et *atrad50/xrcc1*, nécessitent une analyse approfondie de la nature des substrats provoquant ces fusions en utilisant la technique de FISH.

Article 2

« ERCC1/XPF protects short telomeres from homologous recombination in *Arabidopsis thaliana* »

Jean-Baptiste Vannier, Annie Depeiges, Charles White et Maria Eugenia Gallego

Article accepté dans PloS Genetics

**ERCC1/XPF Protects Short Telomeres from Homologous Recombination in
Arabidopsis thaliana.**

Jean-Baptiste Vannier, Annie Depeiges, Charles White and Maria Eugenia Gallego*.

Génétique, Reproduction et Développement
UMR CNRS 6247 - Clermont Université - INSERM U931
24, avenue des Landais, 63177 Aubière cedex, France

*Corresponding author

megalleg@univ-bpclermont.fr

+33 473 407 978 (phone)

+33 473 407 777 (fax)

Suggested running title: Ercc1/Xpf telomere roles.

ABSTRACT

Notwithstanding the role of telomeres in "hiding" chromosome ends from DNA repair and recombination, many repair and recombination proteins play essential roles in telomere function and chromosome stability. Among these are Xpf and Ercc1, which form a structure-specific endonuclease known for its essential role in nucleotide excision repair and the subject of considerable interest in studies of recombination.

In contrast to observations in mammalian cells, we observe no enhancement of chromosomal instability in *Arabidopsis* plants mutated for either Xpf (*AtRad1*) or Ercc1 (*AtErcc1*) orthologs, which develop normally and show wild-type telomere length. However in the absence of telomerase, mutation of either of these two genes induces a significantly earlier onset of chromosomal instability. This early appearance of telomere instability is not due to a general acceleration of telomeric repeat loss, but is associated with the presence of dicentric chromosome bridges and cytologically visible extrachromosomal DNA fragments in mitotic anaphase. Such extrachromosomal fragments are not observed in single telomerase mutant plants presenting similar frequencies of anaphase bridges. Extensive FISH analyses show that these DNAs are broken chromosomes and correspond to two specific chromosome arms. Analysis of the *Arabidopsis* genome sequence identified two extensive blocks of degenerate telomeric repeats, which lie at the bases of these two arms. Our data thus indicate a protective role of RAD1/ERCC1 against 3' G-strand overhang invasion of interstitial telomeric repeats. The fact that the *atercc1* (and *atrad1*) mutants dramatically potentiate levels of chromosome instability in *attert* mutants, and the absence of such events in the presence of telomerase has important implications for models of the roles of recombination at telomeres and is a striking illustration of the impact of genome structure on the outcomes of equivalent recombination processes in different organisms.

AUTHOR SUMMARY

Telomeres are the specialised nucleoprotein structures evolved to avoid progressive replicative shortening and recombinational instability of the ends of linear chromosomes.

Notwithstanding this role of telomeres in "hiding" chromosome ends from DNA repair and recombination, many repair and recombination proteins play essential roles in telomere function and chromosome stability. Among these are Xpf and Ercc1, which form a structure-specific endonuclease known for its essential role in nucleotide excision repair and the subject of considerable interest in studies of recombination.

In this study we analyse the roles of the Xpf/Ercc1 telomere function and chromosome stability in the plant *Arabidopsis thaliana*, which with its remarkable tolerance to genomic instability and sequenced genome is an excellent higher eukaryotic model for these studies. Surprisingly and in striking contrast to observations in mammalian cells, we observe no enhancement of chromosomal instability in *Arabidopsis* plants lacking either of these two proteins, which develop normally and show wild-type telomere length. However *atercc1* (and *atrad1*) mutants profoundly affect the recombination of de-protected telomeres, dramatically potentiating chromosome instability. These results provide a striking illustration of the different outcomes and genomic impacts of the same recombination processes in different organisms.

INTRODUCTION

Telomeres are the specific chromatin structures present at the ends of linear chromosomes [1]. They are known to play two main roles in the preservation of chromosomal integrity: avoiding terminal DNA sequence loss after replication and assuring that the chromosome ends are not recognized by the cellular machinery as DNA double-strand breaks [2,3,4,5,6,7,8]. In general, eukaryotic telomeres are composed of tandem repeats of a short sequence rich in G/C that terminates in a single strand 3' overhang which can fold back and invade the duplex repeats to form the so called t-loop. A specific telomeric protein complex known as shelterin is implicated in the stabilization of the t-loop [9,10]. In mammalian cells this complex includes the specific telomeric-DNA-binding proteins TRF1 and TRF2, which interact directly with duplex telomeric DNA, and POT1 which associates with the 3' single stranded DNA. In most organisms telomeres are maintained by telomerase, a reverse transcriptase with a RNA subunit that serves as template for telomeric repeat synthesis. In the absence of telomerase, telomeres shorten with successive cell divisions, become non-functional and identified by the cell as damaged DNA, ultimately leading to genetic instability and cell death [11,12].

In recent years, many other proteins known for a more general role in cellular metabolism have been found to associate to telomeres, notably proteins involved in DNA repair and recombination. These include MRE11/RAD50/NBS1, KU70/KU80, DNAPKcs, BLM/WRN and ERCC1/XPF and have been found associated with telomeres and to play important roles in telomere protection and/or homeostasis (reviews [5,7,13,14]). In the work presented here our interest has focussed particularly on the Ercc1/Xpf heterodimer, which has been shown to associate to telomeres through interaction with TRF2 protein in mammalian cells [15]. Ercc1/Xpf is a structure-specific endonuclease, initially identified for its essential role in nucleotide excision repair (NER) in budding yeast [16]. Ercc1 and Xpf are highly conserved proteins and, in addition to yeast (Rad1/Rad10), orthologs have been identified in many organisms including Arabidopsis (AtErcc1/AtRad1) [17,18,19,20,21,22], *S.*

pombe (Rad16/Swi10) [23,24] and *Drosophila* (DmErcc1/MEI-9) [25,26]. The Ercc1/Xpf endonuclease activity specifically recognises double- to single-strand transitions in DNA, incising the 5'-3' single-strand just after the junction (reviews by [27,28,29,30]). This DNA structure is a common element of homologous recombination intermediates and the 3'-ended G-strand overhang at telomeres is also a DNA structure of this type, although it is protected by the T-loop structure. In agreement with this, it has been shown that TRF2 is essential for T-loop stabilization, and its absence results in Ercc1/Xpf -dependent, telomeric 3' overhang loss [15].

Telomeres in most plant species are constituted of the repeat sequence TTTAGGG, initially identified in *Arabidopsis thaliana* [31]. Described plant telomeres vary in length from 2-9 Kb in *Arabidopsis* to 150 Kb in tobacco. The presence of G-overhangs has been detected in *Arabidopsis* and *S. latifolia* [32] and t-loops have been observed at telomeres of the garden pea, *Pisum sativum* [33]. Thus end-capping mechanisms seem to be conserved between mammals and plants. However, relatively little is known about plant telomeric proteins and in particular, the constituents of the plant shelterin complex have not been functionally identified [34]. Notwithstanding, a number of factors known for their roles in DNA repair such as the Rad50/Mre11 complex and the Ku70/Ku80 heterodimer has been found to play essential roles in protection of *Arabidopsis* chromosome ends [13,14]. Given the conserved functional roles of the mammalian ERCC1/XPF proteins and the plant orthologs AtErcc1/AtRad1 in DNA repair and recombination, we present here an analysis of the roles of AtErcc1/AtRad1 in telomere homeostasis and chromosomal stability in *Arabidopsis* plants.

We demonstrate an essential role for the AtErcc1/AtRad1 nuclease in the protection of shortened telomeres in *attert* mutant plants. In striking contrast to XPF^{-/-} and ERCC1^{-/-} mammalian cells, *Arabidopsis* plants mutated for the *ATERCC1* or *ATRAD1* genes are viable and do not show any obvious defects in growth or development after more than 5 successive mutant generations. In the absence of telomerase, mutation of either *ATERCC1* or *ATRAD1* induces much earlier onset of developmental defects, correlated with increased genome instability. FISH analyses of mitotic anaphase figures shows that only 53% of the anaphase

bridges in double mutant plants result from end-to-end chromosome fusions, compared to 91% in later generation *tert* mutants with the same level of instability. Furthermore, 90% of the non end-to-end chromosome bridges are accompanied by large acentric DNA fragments in the double mutants. This simultaneous formation of a dicentric and an acentric chromosome is a consequence of recombination between telomeres and large interstitial blocks of degenerate telomeric sequences present on the right arms of chromosomes 1 and 4. We conclude that the endonuclease AtErcc1/AtRad1 protects short telomeres from "destructive" homologous recombination in Arabidopsis plants.

RESULTS

Absence of AtErcc1/AtRad1 accelerates genomic instability in telomerase-minus Arabidopsis plants.

Absence of TRF2 protein in mammalian cells leads to telomere uncapping and chromosome fusions. Such fusions require the presence of the ERCC1/XPF nuclease, which by eliminating the single-stranded 3' G-strand overhang, generates the non-homologous end-joining (NHEJ) substrate [15]. We decided to check whether the AtErcc1/AtRad1 proteins are required for chromosome end-to-end fusions detected in the absence of telomerase in Arabidopsis plants [35]. To answer this question we generated double mutant *atercc1/attert* and *atrada1/attert* Arabidopsis lines and compared their phenotypes with that of a single *atercc1*, *atrada1* and *attert* mutant lines in successive generations.

Homozygous *attert* mutant plants were crossed to homozygous *atercc1* and to *atrada1* plants, to produce the doubly heterozygous F1 lines: *attert/ATTERT atercc1/ATERCC1* and *attert/ATTERT atrada1/ATRADA1*. Wild type, homozygous single *attert*, *atercc1*, *atrada1* and double *attert/atercc1* and *attert/atrada1* F2 lines were selected and their growth and developmental phenotypes followed through successive generations of self-fertilisation. The original F2 lines are labelled Generation 1 (G1) for the *attert* mutant status, and successive generations labelled G2, G3, At any given generation plants were identified as belonging to one of three arbitrary phenotypic classes: wild-type (normal), semi-sterile (reduced fertility) or sterile (this class includes plants arrested in vegetative growth and those unable to produce viable seeds) (Supplemental Data, Fig.1). Single mutant *atercc1* and *atrada1* plants show wild type phenotype and this is maintained over successive generations. *attert* mutant plants show the expected progressive increase in both the proportion of plants presenting developmental defects and an increasing severity of these phenotypes over successive generations. The appearance and severity of these *tert* phenotypes were however considerably advanced in the double *atercc1/attert* and *atrada1/attert* mutants. The results

are presented in Figure 1A for the third, fourth and fifth (G3, G4, G5) telomerase mutant generation plants (see also Supplemental data, Table 1). G3 *aterrc1/attert* seeds show 80% germination efficiency, compared to 100% in G3 *attert* single mutant plants. More importantly, 17.9% of *atercc1/attert* plants were semi-sterile while no obvious defects were visible in the single *attert* mutant plants. By generation five (G5), no normal *atercc1/attert* plants were observed from a total of 135 plants, while 68% of the G5 *attert* mutant plants were phenotypically normal. Equivalent results were obtained for the *atrad1/attert* double mutant (Supplemental Data Table 1). Thus, absence of the nuclease AtErcc1/AtRad1 induces a substantial acceleration of the *attert*-associated developmental phenotype in Arabidopsis plants.

These observations raise the question of whether the accelerated developmental anomalies in *atercc1/attert* and *atrad1/attert* correlate with increased levels of cytogenetic damage in the double mutants. Successive generations of *attert* mutant plants show progressive shortening of telomeres that eventually become uncapped and as a result end-to-end chromosomal fusions are generated. These fused, dicentric chromosomes can be detected as chromosome bridges at mitotic anaphase. We thus analyzed the frequencies of mitotic anaphase bridges in successive generations of *the* double and single mutant plants. For each mutant and generation, 200-300 mitotic anaphases were examined from pistil cells isolated from 3 individual plants (Supplemental Data Table 2). As expected from their wild-type phenotype, no mitotic anaphases presenting bridges were detected in *aterrc1*, nor in *atrad1* single mutant plants. Figure 1B presents the results for generations two to five (G2..G5) of double *atercc1/attert* and single *attert* mutant plants. No anaphase bridges were observed in cells from the three first generations of single *attert* mutant plants. In contrast, *atercc1/attert* double mutant plants show 4-5% of anaphases with chromosome bridges in generation two and 15% in generation three. By generation four, 30% of the anaphases prepared from *atercc1/attert* plants show chromosome bridges, compared to only 2-5% in the single *attert* mutant third generation plants. Moreover, a higher proportion of anaphases presenting 2 or 3 bridges were observed in double mutant plants compared to the *attert*

single mutant plants. Equivalent results were obtained in anaphase preparations from pistil cells from *atrada1/attert* double mutant plants where chromosomes bridges appear 3 generations earlier as compared with the *attert* single mutant lines derived from the same cross (Supplemental Data Table 2). Thus the accelerated *attert* phenotype observed in *attert* plants lacking the AtErcc1/AtRad1 nuclease is directly correlated with an earlier onset of genomic instability in these plants. These results strongly suggest a protective role of AtErcc1/AtRad1 proteins at short telomeres generated in the absence of telomerase. This effect of the Ercc1/Rad1 proteins contrasts with that observed in mammalian cells with uncapped telomeres due to lack of TRF2, where the nuclease is essential for telomere fusion [15].

Loss of AtErcc1/AtRad1 proteins generates extrachromosomal DNA

The simplest hypothesis to explain the accelerated appearance of genome instability is an increased rate of telomere erosion in the *atercc1/attert* double mutant plants. To test this hypothesis we carried out TRF analysis on DNA prepared from generations 2 to 5 of wild-type, *atercc1*, *atrada1* and *attert* single mutants, and *atercc1/attert* and *atrada1/attert* double mutant plants (Fig.2). As expected from the absence of phenotype, telomeres of the *atercc1* and *atrada1* single mutant plants were maintained at the wild-type length through the four generations analyzed. A slight acceleration of telomere loss is observed in *atercc1/attert* and *atrada1/attert* double mutant plants, as compared to single *attert* mutant plants. However, this cannot explain the appearance of fusions two generations earlier in double mutant plants. As shown in Figure 2, telomeres are longer in G2 *atercc1/attert* plants than in G4 *attert* mutant plants, although the former have a greater proportion of mitoses with bridges (3.4%) than the latter (2.3%). Specific TRF analysis for the telomeres of the long arm of chromosome 2 and the short arm of chromosome 5, confirmed that telomeres in *atercc1/attert* G2 are longer than in G4 *attert* in contrast with the similar number of

anaphases with bridges detected in these plants (Fig. 2). Similar results were obtained in later generations and in *attert* plants lacking the AtRad1 protein (Fig. 2 and Supplemental data Table 2). Thus, increased telomere erosion in the absence of the Ercc1/Rad1 endonuclease Arabidopsis plants cannot explain the acceleration of telomere dysfunction in the *attert/atercc1* and *attert/atrad1* plants.

The alternative hypothesis is that the Ercc1/Rad1 proteins protect short telomeres against recombination. We thus carried out fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) analyses of chromosome fusions using telomeric-repeat and subtelomeric probes (a pool of BACs corresponding to the two ends of each of the five Arabidopsis chromosomes). The subtelomeric BAC FISH probes have been previously validated by Fibre-FISH [36]. Three categories of anaphase bridges could be detected in the FISH analyses, those corresponding to end-to-end chromosome fusions presenting subtelomeric signals with (class I) or without (class II) telomeric repeats, and bridges lacking both subtelomeric and telomeric signals (class III) (Fig 2A). The proportions of the three classes of anaphase bridges were determined in *attert* plants at G5 (10% of anaphases with bridges) and G7 (25% anaphases with bridges). As expected, in correlation with the increased loss of telomere repeats in G7 plants, the proportion of bridges lacking telomeric signals is increased with respect to G5 plants (25% versus 6,5%). This increase was accompanied by a corresponding reduction in the proportion of bridges with telomeric repeats (G5 84%, G7 66%). No changes were seen in the proportion of class III bridges lacking both subtelomeric and telomeric signals (G5 9,5%, G7 9%) (Fig.3B). In contrast a substantial increase in the proportions of class II and III bridges was observed in *atercc1/attert* mitoses. Thus, G3 *atercc1/attert* cells that present a similar proportion of anaphases with bridges to G5 *attert* cells (10-15%), show 49% of class II (versus 6,5% in *attert* cells) and 18% of class III (versus 9% in *attert* cells) (Fig.3B). Strikingly, the proportion of class III bridges increases up to 47% in *atercc1/attert* G5 cells, versus 9% in G7 *attert* cells which show the same proportion of anaphases with bridges (25%). Thus, by G5 almost half of the anaphase bridges in *atercc1/attert* cells do not result from chromosome end-to-end fusions. Similar results were obtained for *atrad1/attert* cells (data not shown).

These observations suggest strongly that Ercc1/Rad1 endonuclease protects short telomeres against other types of recombination than the fusion of uncapped chromosomes ends.

Careful observation of the FISH images of mitotic *atercc1/attert* cells revealed extrachromosomal DNA masses in 90% of the anaphases presenting class III bridges (Fig.4). In all cases this extrachromosomal DNA hybridized both with subtelomeric and telomeric repeat FISH probes. To better understand the nature of these extrachromosomal DNAs, we realized FISH analyses using a pool of 10 BAC probes situated in the middle of each arm of the five *Arabidopsis* chromosomes. All the analyzed anaphase figures containing extrachromosomal DNA produced a positive signal. Identical results were obtained with a mix of centromere-proximal BAC probes specific for each chromosome arm. Equivalent results were obtained for *atrad1/attert* double mutant plants (data not shown). Class III bridges in *atercc1/attert* and *atrad1/attert* are thus associated with the generation of acentric DNA corresponding to a chromosome arm in at least 90% of cases.

AtErcc1/AtRad1 proteins protect shortened telomeres from the action of recombination.

In order to explain these data, we considered the hypothesis that in the absence of AtErcc1/AtRad1, short telomeres unable to form a t-loop could invade internal telomere-related sequences, in a similar manner to the events proposed to generate telomeric double minute chromosomes in ERCC1-deficient mouse cells [15]. With only 5 chromosome pairs and a fully sequenced genome, *Arabidopsis* is a particularly good model for the dissection of such events. We thus used the sequence viewer of the *Arabidopsis* Information Resource (TAIR) (<http://www.arabidopsis.org/servlets/sv>) and the "fuzznuc" program of the EMBOSS suite [37] to map and characterise interstitial telomeric repeats in the *Arabidopsis* genome, presented in schematic form in Figure 5. The bioinformatics search of sequences revealed the presence of 4 contiguous perfect TTTAGGG repeats on chromosomes 1R and 2L and three repeats at two loci on chromosome 5R. Searching for the CCCTAAA sequence identified three

loci with 8, 30 and 5 contiguous perfect repeats on chromosome arms 1R, 3L and 4R respectively. Five loci of three contiguous repeats are found on chromosomes 1L, 3L, 3R and 4R. Of particular interest are two extensive regions of degenerate telomeric repeats identified on chromosome 1R (349 Kb) and 4R (67Kb). 5.9% of the chromosome 1R region DNA consists of perfect C-strand telomere repeats 5'-(CCCTAAA)_n-3', a figure which rises to 17.2% if repeats with 1 mismatch are included. G-strand repeats 5'-(TTTAGGG)_n-3' are considerably less represented in this block, with 0.05% and 1.3% respectively. Similarly the chromosome 4R region has 8.8% (perfect) and 25.18% (including 1 mismatch) C-strand repeats and 0 (perfect) and 0.8% (1 mismatch) G-strand repeats. The longest perfect tandem C-strand repeats in these regions are an 8-mer (8 tandem repeats) in the 1R region and a 5-mer in the 4R region. On the G-strand, the longest perfect tandem repeat in these regions is a 3-mer in the 1R region, with none in the 4R region.

Should a telomeric 3'-ended G-overhang recombine and crossover with interstitial telomeric repeat sequences, the consequences would depend upon the orientation of these sequences relative to the centromere(s) and whether they are on the same chromatid or chromosome arm. In all, there are eight possible invasion configurations (Fig.6A). Holliday junction resolution of only two of these would generate the observed a dicentric + acentric figure, as illustrated in Figure 6B and 6C. Figure 6B shows invasion by another chromosome (or chromatid) of 5'-(CCCTAAA)_n-3' sequences, such as those present in the extensive blocks on the right arms of chromosomes 1R and 4R. As the fusion junction of the resulting dicentric chromosome is close to the centromere, the subtelomeric and telomeric FISH signals will not be visible in the chromosome bridge, which will thus correspond to the observed class III dicentric chromosome. Figure 6C shows invasion by another chromosome (or chromatid) of the 5'-(TTTAGGG)_n-3' sequence, such as that present on the left arm of chromosome 2. In both cases resolution of the resulting Holliday junction can give rise to a dicentric and an acentric chromosome.

According to this model, the acentric DNA observed in *aterrc1/attert* Arabidopsis cells should correspond to chromosome arms 1R, 4R and possibly, 2L. To test this prediction, we

carried out FISH analyses using BAC probes corresponding to all 10 individual Arabidopsis chromosome arms. The results in Figure 7A show that only probes for the right arms of chromosomes 1 and 4 hybridized with the extrachromosomal DNA. We confirmed these results with FISH using only the probes to Chr. 1R (red) and Chr. 4R (green) – the extrachromosomal DNA in 35 out of the 36 anaphases examined hybridised to one of these two probes (Fig. 7B,C). The acentric fragments thus correspond to the chromosome arms distal to the two extensive blocks of interstitial telomeric DNA and these data thus strongly support the origin of the observed dicentric+acentric chromosomes in *atercc1/attert* plants through homologous recombination of telomeric and interstitial telomere-repeat DNA sequences.

DISCUSSION

We present here an analysis of the roles of the structure-specific Ercc1/Xpf (AtErcc1/AtRad1) endonuclease in telomere homeostasis in the plant *Arabidopsis thaliana*. Double *atercc1/attert* or *atrad1/attert* mutant *Arabidopsis* plants show considerably more severe growth and developmental phenotypes than single *attert* mutant plants. This aggravation of the telomerase mutant phenotype is directly correlated with an earlier onset of chromosome instability, as detected by the appearance of mitotic dicentric anaphase bridges. Analysis of the structure of these dicentric chromosomes shows that, in contrast to *attert* plants where 90% of dicentrics result from end-to-end fusion, 47% of dicentrics in *atercc1/attert* cells result from recombination of telomeres with two extensive regions of interstitial telomere-related DNA in the *Arabidopsis* genome.

In mammalian cells the ERCC1/XPF heterodimer is associated to telomeres through interaction with TRF2 [15]. The rapid ageing phenotype of ERCC1^{-/-} and XPF^{-/-} mice has been attributed to roles of these proteins in DNA repair mechanisms other than NER, such as the repair of DNA interstrand cross-links (44,45) and DSB (46,47). Cytogenetic analyses of ERCC1^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) show neither defects in telomeres nor in telomeric G-strand homeostasis and no end-to-end chromosomes fusions were detected in these cells. However, FISH analysis on metaphase spreads of ERCC1^{-/-} MEF cells showed greatly elevated numbers of telomere-containing double-minute chromosomes (TDMs), compared to wild-type and XPC^{-/-} controls [15]. This generation of double minute chromosomes presumably contributes to the severe postnatal growth defects and death at 3 weeks of mice mutated for either protein [38,39,40,41,42].

Although the roles of the ERCC1/XPF nuclease in NER and double strand break repair are conserved in *Arabidopsis* [17,18,21], *Arabidopsis atercc1* and *atrad1* mutants grow and develop normally and show no detectable chromosomal instability, with neither anaphase bridging nor alterations in bulk telomere length detected in these plants after more than five mutant generations (this work). The situation is however strikingly different in plants also

lacking telomerase, in which absence of either the *Atercc1* or *Atrad1* proteins dramatically advances the appearance of developmental defects and chromosomal instability.

As with many other organisms including mammals, absence of telomerase leads to progressive shortening of telomeric repeat arrays, destabilising the T-loop structure at telomeres and resulting in their recognition by the cellular recombination machinery. Recombination of these shortened, non-functional telomeres principally results in end-to-end chromosomal fusions and dicentric chromosomes (reviewed by [10]). However, overhanging G-strand telomeric DNA from non-functional telomeres could also invade and recombine with interstitial telomere-like sequences. Such recombination between telomeres and interstitial sequences would have differing consequences, depending on the location and orientation of these interstitial sequences with respect to the centromere. Studies in cultured human cells suggest that the ERCC1/XPF endonuclease would play two roles in the avoidance of such events: removal of G-strand overhangs at decapped telomeres would reduce the propensity of these to invade cognate interstitial sequences and should such invasion occur, ERCC1/XPF cleavage of the intermediate structure would pre-empt resolution by the recombination machinery [15].

In this work we report strong developmental phenotypes in *atercc1/attert* (and *attert/atrad1*) Arabidopsis plants, associated with the frequent occurrence of mitoses with dicentric and acentric chromosomes. Southern analysis shows little or no acceleration of bulk telomere shortening in the double *atercc1/attert* and *attert/atrad1* mutants, compared to single *attert* plants. Thus, although a minor contribution of the absence of AtErcc1/AtRad1 to telomere shortening in *attert* mutants cannot be ruled out, this cannot explain the dramatic acceleration of the developmental and chromosomal instability phenotypes observed in the double mutants. This conclusion is reinforced by the striking decrease in the relative proportion of end-to-end (Class I) chromosomal fusions in double *atercc1/attert* and *attert/atrad1* mutants compared to single *attert* mutants. This is more than compensated by relative increases in proportions of mitoses with dicentric bridges lacking telomeric (Class II) or both telomeric and sub-telomeric (Class III) DNA in double mutants. Furthermore,

acentric chromosome arms are observed in 90% of mitoses with Class III dicentric bridges in the double mutants. Absence of *AtErcc1/AtRad1* thus both strongly increases the numbers and nature of chromosomal fusions in *attert* mutants.

In order to determine whether these dicentric+acentric figures could result from recombination between telomeres and interstitial telomeric-sequences, we analysed the numbers and positions of internal telomere-related sequences in the fully sequenced Arabidopsis genome. This bioinformatics analysis shows the presence of 2 extensive blocks of degenerate telomere sequence on the right arms of Arabidopsis chromosomes 1 and 4. Invasion of these interstitial telomere-related sequences by the G-strand of a decapped telomere would create a recombination intermediate, processing of which by the homologous recombination machinery could generate the observed dicentric + acentric mitotic figures (Fig.8: b->e->g). Our analysis predicts that the acentric chromosomes should correspond to the right arms of either chromosome 1 or 4, a prediction confirmed in 35/36 of such acentrics examined.

The processes leading to the events which we describe in Arabidopsis plants (dicentric chromosome + acentric arm; Fig. 8g) thus appear equivalent to those resulting in the TDMs in human cells described by Zhu et al [15]. The striking difference between our data and that in animal cells is the normal growth and development and the absence of karyotypic abnormalities in (ATTERT+) *atercc1* or *atrad1* mutant plants. The karyotypic instability of *atrad1* and *atercc1* mutants thus depends upon the absence of telomerase. This implies that interstitial telomere invasions do not occur, or are very rare in wild-type plants, in contrast to the observations in cultured human cells, where such invasion events are presumably very frequent (TDMs observed in 44-86% of mitoses in different ERCC1-/- cell lines).

It is striking to note the different outcomes of equivalent recombination processes in the different organisms. Homologous recombination of telomeres with interstitial sequences in direct orientation on the same chromatid arm is proposed to generate massive chromosome breakage and circular acentrics (TDMs) in mouse cell culture, while recombination of telomeres with interstitial sequences in inverted orientation on another

chromatid arm leads to breakage and fusion of two specific chromosome arms in Arabidopsis. These differences thus appear to primarily depend upon the structure of the genome/karyotype and the locations of the interacting sequences. This striking illustration of the different outcomes and impacts of recombination processes in the different genomic contexts is underlined by recent data from the fission yeast, *S. pombe* [43].

Absence of telomerase (Trt1) in *S. pombe* leads to telomere shortening and cell death. However, rare "survivor" cells escape and grow normally due to circularisation of their chromosomes. A recent report shows that the absence of Rad16 has no effect on the rate of telomere shortening in *trt1* cells, but strongly reduced the occurrence of survivors (Rad16 is the *S. pombe* XPF ortholog). In a series of elegant experiments, these authors further show that the chromosome circularisation leading to survival of *trt1* cells occurs through Rad16-dependent, single-strand annealing (SSA) recombination between homology regions present as inverted repetitions between 7 and 13 Kb from the telomeres of chromosomes I and II [43]. As in Arabidopsis and animal cells, absence of *S. pombe* Rad16 protein thus profoundly affects the recombination of de-protected telomeres, at least in this selected subset of "survivor" events. In Arabidopsis *atercc1/attert* plants, end-to-end chromosome fusions represent 53% of (total) anaphase bridges, which can thus not have been generated through the ERCC1/XPF -dependent SSA recombination pathway. We are currently initiating work to elucidate the roles of the different homologous and non-homologous recombination pathways in the generation of these fusions.

Acknowledgements

We thank the members of the BIOMOVE group for their help and discussions and Ingo Schubert for his kind help with the choice of BAC clones.

Materials and Methods

Arabidopsis mutants and TRF analysis

Arabidopsis thaliana plants were grown in soil in the greenhouse under standard conditions. The *attert* [44], *atercc1* [18] and *atrad1* [45] *Arabidopsis* mutants have been described previously. The two double *atrad1/tert* and *atercc1/attert* mutants were produced by crossing *atrad1* and *atercc1* homozygotes with a *tert* homozygote (3rd mutant generation), using standard techniques. PCR genotyping was carried out as described for *attert* [44], *atrad1* [19] and *atercc1* [18]. TRF analysis of telomere length in Mbo1-digested genomic DNA was as previously described for the telomeric and subtelomeric chromosome 2 probes [46] and for subtelomeric 5 probe [47].

DAPI staining of mitoses

Whole flower buds were collected and fixed, pistils were digested and were squashed on a slides [48]. Slides were mounted using Vectashield (Vector Laboratories) mounting medium with 1.5 g/ml DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) and observed by fluorescence microscopy, using a Zeiss Imager.Z1 microscope. Images were further processed and enhanced using Adobe Photoshop software.

Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH)

BACs from subtelomeric regions of *Arabidopsis* chromosomes (F6F3, F23A5, F15B18, F17A22, F4P13, T20O10, F6N15, T19P19, F7J8, K9I9), the middle of chromosome arms (F12K11, F20D21, T8K22, F12C20, K1G2, F16L2, T5K18,T1A4, MIJC20) [49] and centromere-proximal regions (F12K21, F2J6, T25N22, T10F5, T4A2, T5C2, T32N4, T32A17, T8M17, F5H8) [49] were labelled with biotin-16-dUTP or digoxigenin-11-dUTP (Roche)

using the BioPrime DNA labelling system (Invitrogen) and telomeric probe was labelled by PCR [(95°C 1', 55°C 40", 72°C 2')x5 (94°C 1', 60°C 40", 72°C 2')x25] with digoxigenin-11-dUTP using specific telomere primers 5'(TTTAGGG)₆3'. FISH experiments were performed according to [50], as previously described [36]. For the detection of biotin-labelled probes, avidin:Texas Red (1:500, Vector Laboratories) followed by goat anti-avidin:biotin (1:100, Vector Laboratories) and avidin-Texas Red (1:500) were used. Mouse anti-digoxigenin (1:125, Roche) followed by rabbit anti-mouse:fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:500, Sigma) and goat anti-rabbit:Alexa 488 (1:100, Molecular Probes) were used for the detection of digoxigenin-labelled probe. For multiple hybridisations of the same slide, FISH was carried out according to Mokros *et al* [51], using BACs labelled either with Cy5-dUTP or Cy3-dUTP (Amersham) by standard nick translation reactions (Roche).

Figure Legends

Figure 1. Accelerated genomic instability of *attert/atercc1* double mutants.

A: Proportions of normal (black fill), semi-sterile (white fill) and sterile (grey fill) *attert* (left) and *attert/atercc1* (right) mutants of generations G3, G4 and G5. With successive generations, increasing proportions of *attert* mutant plants have reduced fertility or are sterile. This phenotype is considerably worsened in double *attert/atercc1* mutants. Single *atercc1* and *atrad1* mutants are fully fertile and develop normally (not shown). Percentage seed germination and numbers of plants counted in each class are given above the bars.

B: Percentage of mitotic anaphases with one (black fill), two (white) or more (grey) chromosome bridges in *attert* and *atercc1/attert* mutants, through *attert* mutant generations G2, G3, G4 and G5. For each mutant and generation, 200-300 mitotic anaphases were examined from pistil cells. Error bars are +/- one standard deviation, from three independent experiments.

Figure 2. Telomere length measurements in *attert*, *atercc1*, *atrad1* and double mutants.

TRF analysis of bulk telomere lengths in DNA from plants of *attert* mutant generations G2 to G5. Southern blots of Mbo1-digested total DNA from wild-type, *attert*, *atercc1*, and double *atercc1/attert* mutants (upper) and wild-type, *attert*, *atrad1*, and double *atrad1/attert* mutants (lower). Southern analysis using the telomeric repeat probe (left panels), and subtelomeric probes to chromosome 5 (middle panels) and chromosome 2 (right panels). An internal (non-telomeric) band at approximately 1.2Kb is seen in all samples with the chromosome 5 subtelomeric probe. Positions of DNA size markers are shown to the left. Wild-type controls are sister plants from the same original cross.

Figure 3. Fluorescence *in situ* hybridisation analysis (FISH) of the structure and origin of dicentric chromosome bridges.

A: Examples of FISH analysis of mitoses from flower pistils: from right to left, fluorescent probes to telomeric repeat DNA (green), pooled 10 subtelomeric BACs (red), DAPI-stained DNA (white) and merged image. From top to bottom: examples of anaphase bridges of class I (both subtelomeric and telomeric foci in bridge), class II (only subtelomeric foci present in the bridge) and class III (bridges with neither subtelomeric nor telomeric foci). The scale bar represents 5 μ m.

B: Distribution of the three classes of anaphase bridges in *attert* (generations G5, G7) and *atercc1/attert* (G3, G5) mutant plants. Relative percentages and numbers counted in each class, mutant and generation are indicated in the bars.

Figure 4. Identification of extrachromosomal DNA containing subtelomeric and telomeric signals.

90% of *attert/atercc1* class III mitotic figures (anaphase bridges with neither subtelomeric nor telomeric foci) present an acentric chromosome fragment (arrows) that

hybridises with both subtelomeric and telomeric probes. Rehybridisation of these slides with pools of 10 BAC probes located in the middle of each of the ten Arabidopsis chromosome arms (Middle) or near to the centromere (Centro). All extrachromosomal DNA fragments hybridized with both probe sets indicating that they consist of (at least the major part) whole chromosome arms. Two mitotic figures (upper, lower) with DAPI-stained DNA (white), subtelomeric (red), telomeric (green) and merged images are shown from left to right. Rightmost images show rehybridisation with centromere-proximal (upper) and middle-arm (lower) probe sets (red). The scale bar represents 5 μ m.

Figure 5. Interstitial telomeric repeat in Arabidopsis thaliana genome.

5'-(TTTAGGG)_n-3' (blue) and 5'-(CCCTAAA)_n-3' (red) interstitial telomeric repeat loci shown on the five Arabidopsis chromosomes. The number of perfect repeats (numbers or asterisk for triple-repeats) is given for each locus. Two extensive regions of degenerate 5'-(CCCTAAA)_n-3' repeats were identified on chromosome 1R (349 Kb) and 4R (67Kb). Centromere positions are indicated as bulges in the chromosomes. Details are given in the text.

Figure 6. Possible interstitial invasion configurations and outcomes.

Invasion of the same (left) or another (right) chromatid in direct (top) or inverted (bottom) orientations gives eight possible configurations of telomere invasion of interstitial telomeric-repeat DNA. (A) Resolution of only two of these eight configurations will result in the co-incident production of a dicentric and an acentric chromosome (B,C). Telomeric-repeat DNA (green), subtelomeric regions (red) and centromeres (balls) are indicated.

Figure 7. Acentric DNA fragments are the right arms of chromosomes 1 and 4.

(A) *attert/atercc1* mitotic figures with acentric DNA were hybridized with individual BAC probes specific to the right and left arms of each of the five chromosomes in

independent experiments. Only the probes to the right arms of chromosomes 1 and 4 hybridized to acentric fragments. Numbers of mitotic figures analysed are given to the right for each probe pair. (B) Repeating this analysis with only the probes for the right arms of chromosomes 1 and 4. Panel (C) shows an example of the FISH analysis with, from left to right: DAPI-stained DNA (white), BAC probes to the right arm of chromosome 4 (red) and 1 (green) and the merged image. Rehybridisation with the pooled subtelomeric BAC probe set is shown in the rightmost image (SubT). Acentric fragments are arrowed. The scale bar represents 5 μ m.

Figure 8. Model of the roles of AtErcc1/AtRad1 in different fates of uncapped telomeres in *attert* mutant Arabidopsis.

Erosion of telomeric repeat DNA in the *attert* mutant leads to progressively more frequent loss of T-loop structure and uncapping of telomeres (a->b). Uncapped telomeres may be further eroded by exonucleases (b->c) or AtErcc1/AtRad1 can cleave the G-strand overhang to leave a blunt end (b->d). Non-homologous, micro-homology mediated, or single-strand annealing recombination (NHEJ, MMJ, SSA) can fuse chromosomes of these structures (c->f and d->f). The G-strand overhang of structure (b) can also recombine with interstitial telomeric repeat sequences (e) and in certain invasion configurations (Chr 1R and 4R in Arabidopsis), resolution of this structure by Holliday-junction resolvase generates a dicentric plus an acentric chromosome (g). Cleavage of structure (e) by Rad1/Ercc1 prior to the action of resolvase will produce structure (d), although the existence of this Rad1/Ercc1-dependent process (e->d) cannot be verified in Arabidopsis, given that evidence for structure (e) is only found in the absence of Rad1/Ercc1.

Supplemental Data Figure 1. Phenotypes of *atercc1/attert* plants.

Photographs of normal, semi-sterile and sterile *atercc1/attert* mutants.

References

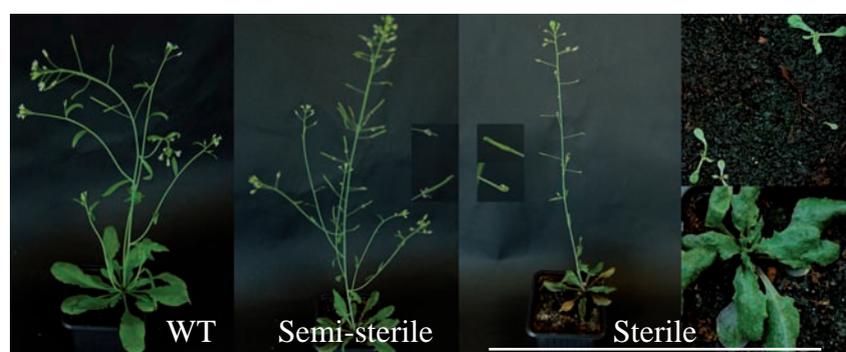
1. Blackburn EH (2000) Telomere states and cell fates. *Nature* 408: 53-56.
2. Blackburn EH (2005) Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett* 579: 859-862.
3. Blasco MA (2005) Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging. *Embo J* 24: 1095-1103.
4. Cech TR (2004) Beginning to understand the end of the chromosome. *Cell* 116: 273-279.
5. d'Adda di Fagagna F, Teo SH, Jackson SP (2004) Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev* 18: 1781-1799.
6. Ferreira MG, Miller KM, Cooper JP (2004) Indecent exposure: when telomeres become uncapped. *Mol Cell* 13: 7-18.
7. Harrington L (2004) Those dam-aged telomeres! *Curr Opin Genet Dev* 14: 22-28.
8. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, Greider CW, Harley CB (1992) Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 225: 951-960.
9. de Lange T (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19: 2100-2110.
10. Palm W, de Lange T (2008) How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. *Annu Rev Genet*.
11. Bianchi A, Shore D (2008) How telomerase reaches its end: mechanism of telomerase regulation by the telomeric complex. *Mol Cell* 31: 153-165.
12. Collins K (2006) The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 484-494.
13. Gallego ME, White CI (2005) DNA repair and recombination functions in Arabidopsis telomere maintenance. *Chromosome Res* 13: 481-491.
14. Riha K, Heacock ML, Shippen DE (2006) The role of the nonhomologous end-joining DNA double-strand break repair pathway in telomere biology. *Annu Rev Genet* 40: 237-277.
15. Zhu XD, Niedernhofer L, Kuster B, Mann M, Hoeijmakers JH, 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: 1489-1498.
16. Davies AA, Friedberg EC, Tomkinson AE, Wood RD, West SC (1995) Role of the Rad1 and Rad10 proteins in nucleotide excision repair and recombination. *Journal of Biological Chemistry* 270: 24638-24641.
17. Dubest S, Gallego ME, White CI (2002) Role of the AtRad1p endonuclease in homologous recombination in plants. *EMBO Rep* 3: 1049-1054.
18. Dubest S, Gallego ME, White CI (2004) Roles of the AtErcc1 protein in recombination. *Plant J* 39: 334-342.
19. Fidantsef AL, Mitchell DL, Britt AB (2000) The Arabidopsis UVH1 gene is a homolog of the yeast repair endonuclease RAD1. *Plant Physiol* 124: 579-586.
20. Gallego F, Fleck O, Li A, Wyrzykowska J, Tinland B (2000) AtRAD1, a plant homologue of human and yeast nucleotide excision repair endonucleases, is involved in dark repair of UV damages and recombination. *Plant J* 21: 507-518.
21. Hefner E, Preuss SB, Britt AB (2003) Arabidopsis mutants sensitive to gamma radiation include the homologue of the human repair gene ERCC1. *J Exp Bot* 54: 669-680.
22. Liu Z, Hall JD, Mount DW (2001) Arabidopsis UVH3 gene is a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD2 and human XPG DNA repair genes. *Plant J* 26: 329-338.
23. Carr AM, Schmidt H, Kirchhoff S, Muriel WJ, Sheldrick KS, et al. (1994) The rad16 gene of *Schizosaccharomyces pombe*: a homolog of the RAD1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14: 2029-2040.
24. Rodel C, Jupitz T, Schmidt H (1997) Complementation of the DNA repair-deficient swi10 mutant of fission yeast by the human ERCC1 gene. *Nucleic Acids Res* 25: 2823-2827.

25. Baker BS, Carpenter AT, Ripoll P (1978) The Utilization during Mitotic Cell Division of Loci Controlling Meiotic Recombination and Disjunction in *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* 90: 531-578.
26. Sekelsky JJ, McKim KS, Chin GM, Hawley RS (1995) The *Drosophila* meiotic recombination gene *mei-9* encodes a homologue of the yeast excision repair protein Rad1. *Genetics* 141: 619-627.
27. Bardwell AJ, Bardwell L, Tomkinson AE, Friedberg EC (1994) Specific cleavage of model recombination and repair intermediates by the yeast Rad1-Rad10 DNA endonuclease. *Science* 265: 2082-2085.
28. Ciccio A, McDonald N, West SC (2008) Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. *Annu Rev Biochem* 77: 259-287.
29. de Laat WL, Appeldoorn E, Jaspers NG, Hoeijmakers JH (1998) DNA structural elements required for ERCC1-XPF endonuclease activity. *J Biol Chem* 273: 7835-7842.
30. Tomkinson AE, Bardwell AJ, Bardwell L, Tappe NJ, Friedberg EC (1993) Yeast DNA repair and recombination proteins Rad1 and Rad10 constitute a single-stranded-DNA endonuclease. *Nature* 362: 860-862.
31. Richards EJ, Ausubel FM (1988) Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 53: 127-136.
32. Riha K, McKnight TD, Fajkus J, Vyskot B, Shippen DE (2000) Analysis of the G-overhang structures on plant telomeres: evidence for two distinct telomere architectures. *Plant J* 23: 633-641.
33. Cesare AJ, Quinney N, Willcox S, Subramanian D, Griffith JD (2003) Telomere looping in *P. sativum* (common garden pea). *Plant J* 36: 271-279.
34. Zellinger B, Riha K (2007) Composition of plant telomeres. *Biochim Biophys Acta* 1769: 399-409.
35. Riha K, McKnight TD, Griffing LR, Shippen DE (2001) Living with genome instability: plant responses to telomere dysfunction. *Science* 291: 1797-1800.
36. Vannier JB, Depeiges A, White C, Gallego ME (2006) Two roles for Rad50 in telomere maintenance. *Embo J* 25: 4577-4585.
37. Rice P, Longden I, Bleasby A (2000) EMBOS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet* 16: 276-277.
38. McWhir J, Selfridge J, Harrison DJ, Squires S, Melton DW (1993) Mice with DNA repair gene (ERCC-1) deficiency have elevated levels of p53, liver nuclear abnormalities and die before weaning. *Nat Genet* 5: 217-224.
39. Nakane H, Takeuchi S, Yuba S, Saijo M, Nakatsu Y, et al. (1995) High incidence of ultraviolet-B-or chemical-carcinogen-induced skin tumours in mice lacking the xeroderma pigmentosum group A gene. *Nature* 377: 165-168.
40. Selfridge J, Hsia KT, Redhead NJ, Melton DW (2001) Correction of liver dysfunction in DNA repair-deficient mice with an ERCC1 transgene. *Nucleic Acids Res* 29: 4541-4550.
41. Tian M, Shinkura R, Shinkura N, Alt FW (2004) Growth retardation, early death, and DNA repair defects in mice deficient for the nucleotide excision repair enzyme XPF. *Mol Cell Biol* 24: 1200-1205.
42. Weeda G, Donker I, de Wit J, Morreau H, Janssens R, et al. (1997) Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. *Curr Biol* 7: 427-439.
43. Wang X, Baumann P (2008) Chromosome fusions following telomere loss are mediated by single-strand annealing. *Mol Cell* 31: 463-473.
44. Fitzgerald MS, Riha K, Gao F, Ren S, McKnight TD, et al. (1999) Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from *Arabidopsis* inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14813-14818.
45. Harlow GR, Jenkins ME, Pittalwala TS, Mount DW (1994) Isolation of *Uvh1*, an *Arabidopsis* Mutant Hypersensitive to Ultraviolet Light and Ionizing Radiation. *Plant Cell* 6 (2) 227-235.
46. Gallego ME, White CI (2001) RAD50 function is essential for telomere maintenance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1711-1716.

47. Maillet G, White CI, Gallego ME (2006) Telomere-length regulation in inter-ecotype crosses of *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* 62: 859-866.
48. Caryl AP, Armstrong SJ, Jones GH, Franklin FC (2000) A homologue of the yeast HOP1 gene is inactivated in the *Arabidopsis* meiotic mutant *asy1*. *Chromosoma* 109: 62-71.
49. Pecinka A, Schubert V, Meister A, Kreth G, Klatte M, et al. (2004) Chromosome territory arrangement and homologous pairing in nuclei of *Arabidopsis thaliana* are predominantly random except for NOR-bearing chromosomes. *Chromosoma* 113: 258-269.
50. Schubert I, Fransz PF, Fuchs J, de Jong JH (2001) Chromosome painting in plants. *Methods Cell Sci* 23: 57-69.
51. Mokros P, Vrbsky J, Siroky J (2006) Identification of chromosomal fusion sites in *Arabidopsis* mutants using sequential bicolour BAC-FISH. *Genome* 49: 1036-1042.

Supplementary Data Table 1. Developmental defects in *attert* versus *attert/atrad1* and *attert/atercc1* mutants.

	Total seeds	Germinated (percentage)	Normal	Semi-steril	Steril
<i>attert/ATERCC1</i>					
G2	80	80 (100)	80	0	0
G3	80	76 (95)	66	9	4
G4	320	169 (53)	116	19	34
G5	320	205 (68)	99	25	81
<i>attert/atercc1</i>					
G2	320	257 (80)	211	46	0
G3	304	192 (63)	19	58	115
G4	320	135 (42)	0	16	119
G5	320	109 (35)	0	17	92
<i>attert/ATRAD1</i>					
G2	160	150 (94)	144	0	6
G3	160	134 (84)	115	10	9
G4	160	85 (54)	49	20	16
G5	320	223 (70)	93	44	86
<i>attert/atrad1</i>					
G2	320	281 (88)	272	6	1
G3	320	234 (73)	151	36	47
G4	320	121 (38)	10	48	63
G5	320	104 (32)	0	8	96



Supplementary Data Table 2. Quantification of mitosis with one or more anaphases bridges in *attert* versus *attert/atrada1* and *attert/atercc1* mutants

	Total anaphases scored of three plants	Bridges	Mean (standard deviation)
<i>attert-/ATERCC1+</i>	G2 600	1	0,17 (0)
	G3 600	1	0,17 (0)
	G4 600	16	2,33 (0)
	G5 600	53	8,83 (0)
<i>attert-/atercc1-</i>	G2 547	19	3,4 (0)
	G3 569	167	14,8 (3)
	G4 600	104	29,53 (8,5)
	G5 500	141	27 (5)
<i>attert-/ATRADA1+</i>	G2 600	0	0 (0)
	G3 600	0	0 (0)
	G4 600	14	2,33 (0)
	G5 864	72	7,86 (0)
<i>attert-/atrada1-</i>	G2 360	9	2,37 (0)
	G3 400	42	11,17 (0)
	G4 600	71	10,83 (1)
	G5 843	120	16,4 (2)

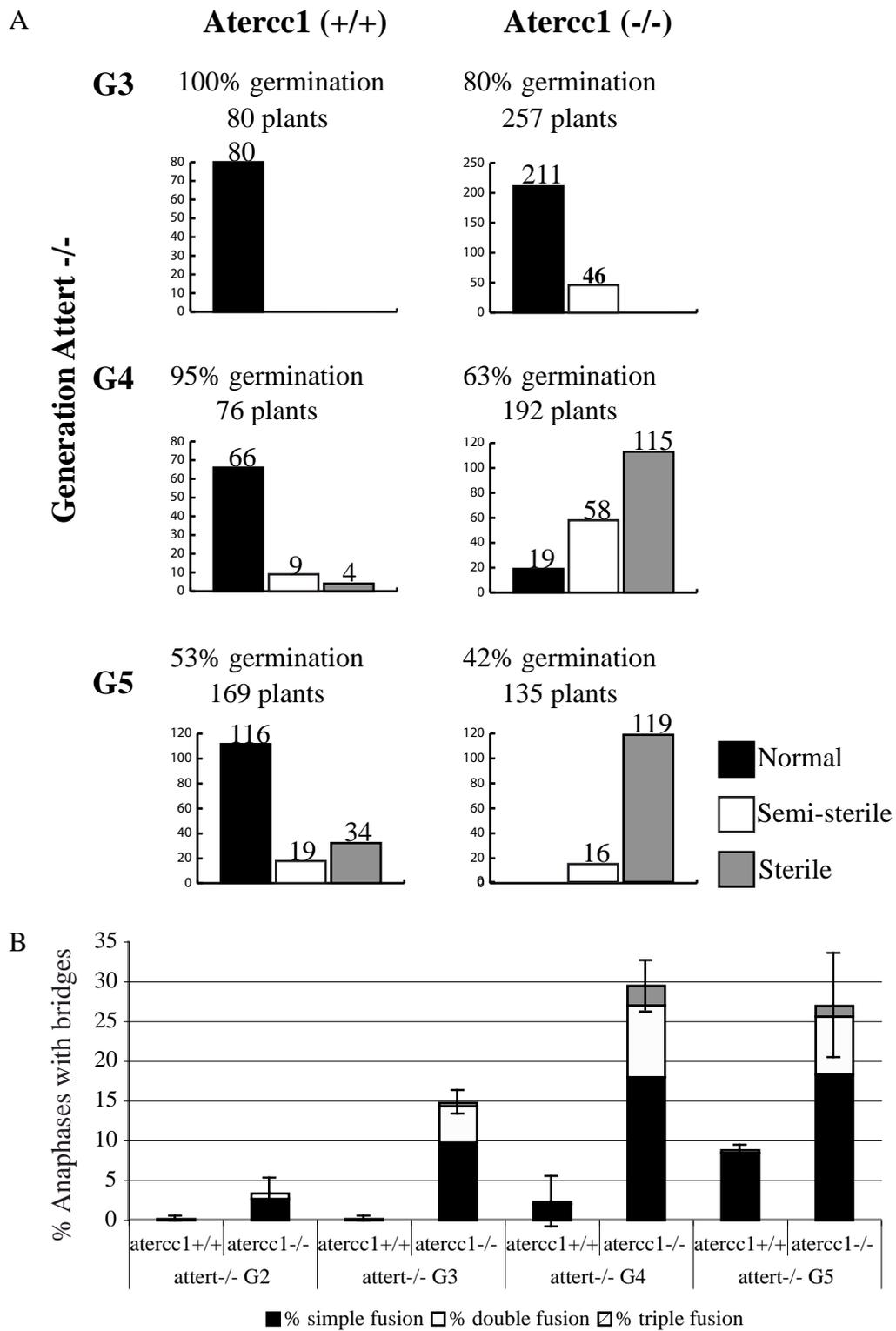


Figure 1

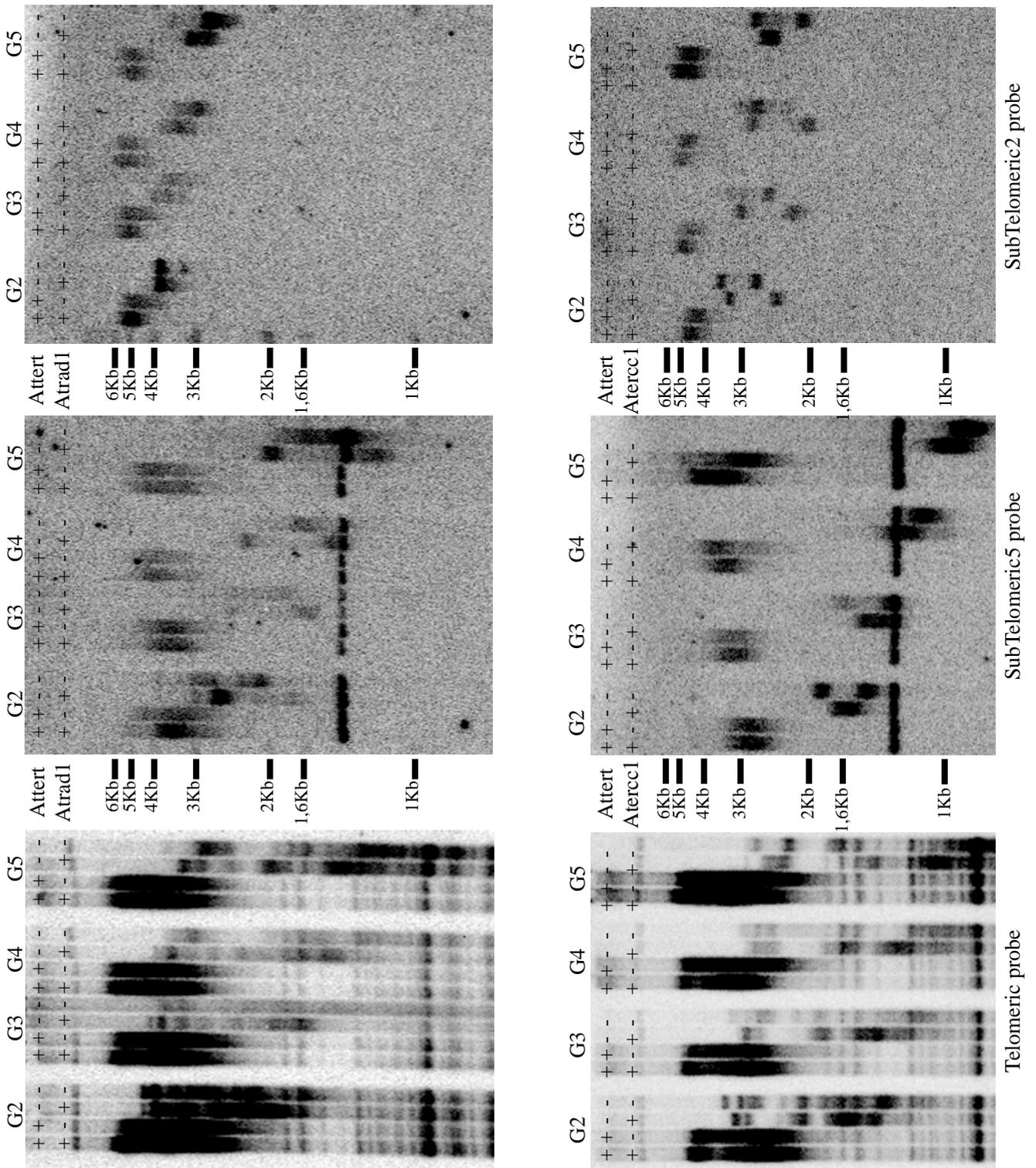


Figure 2

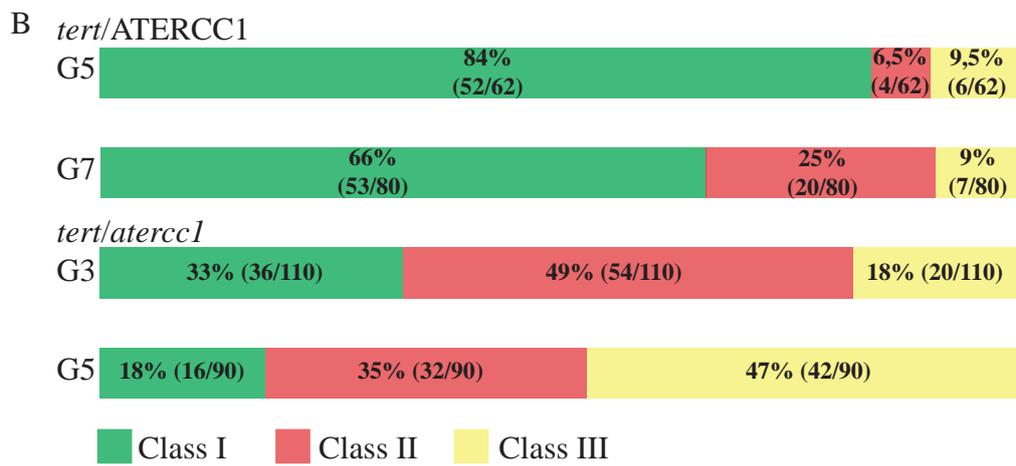
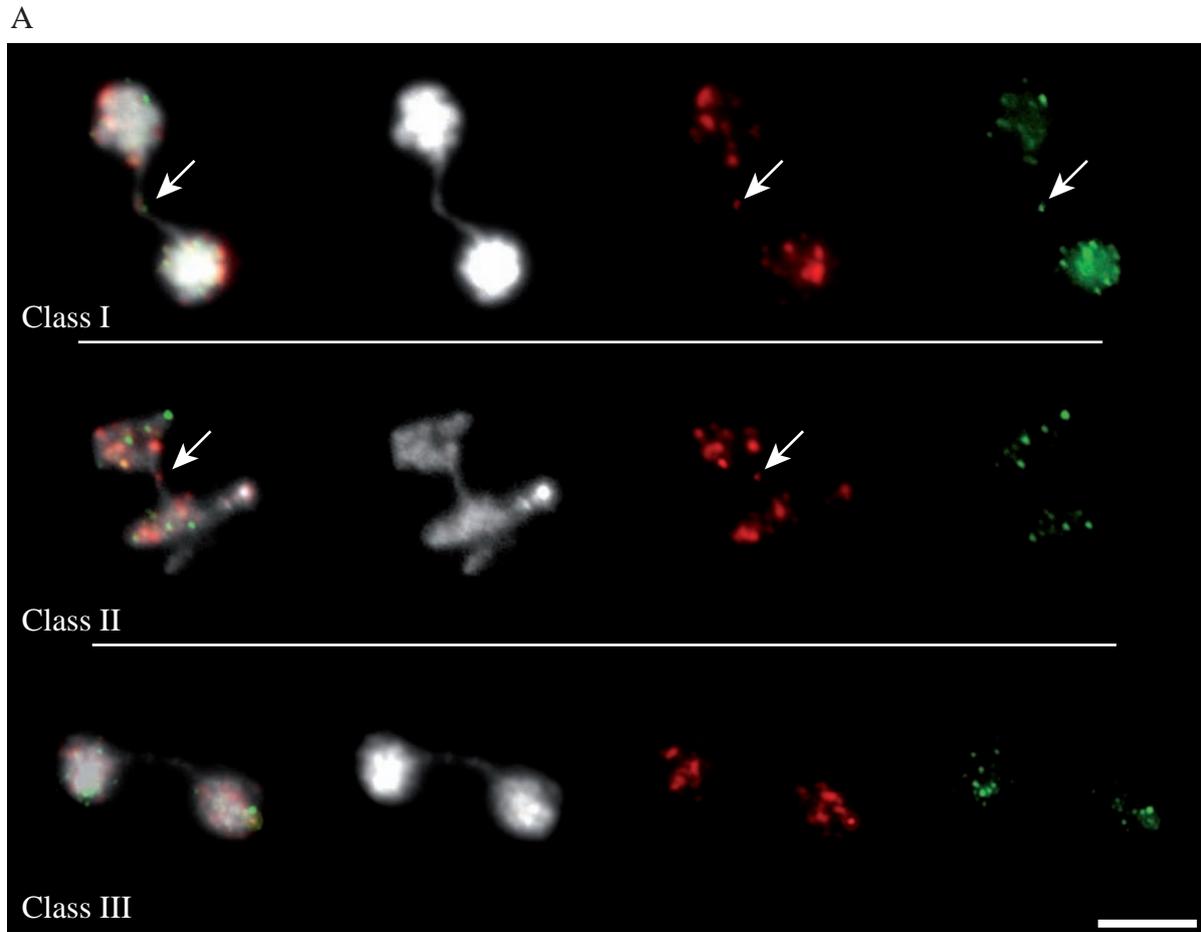


Figure 3

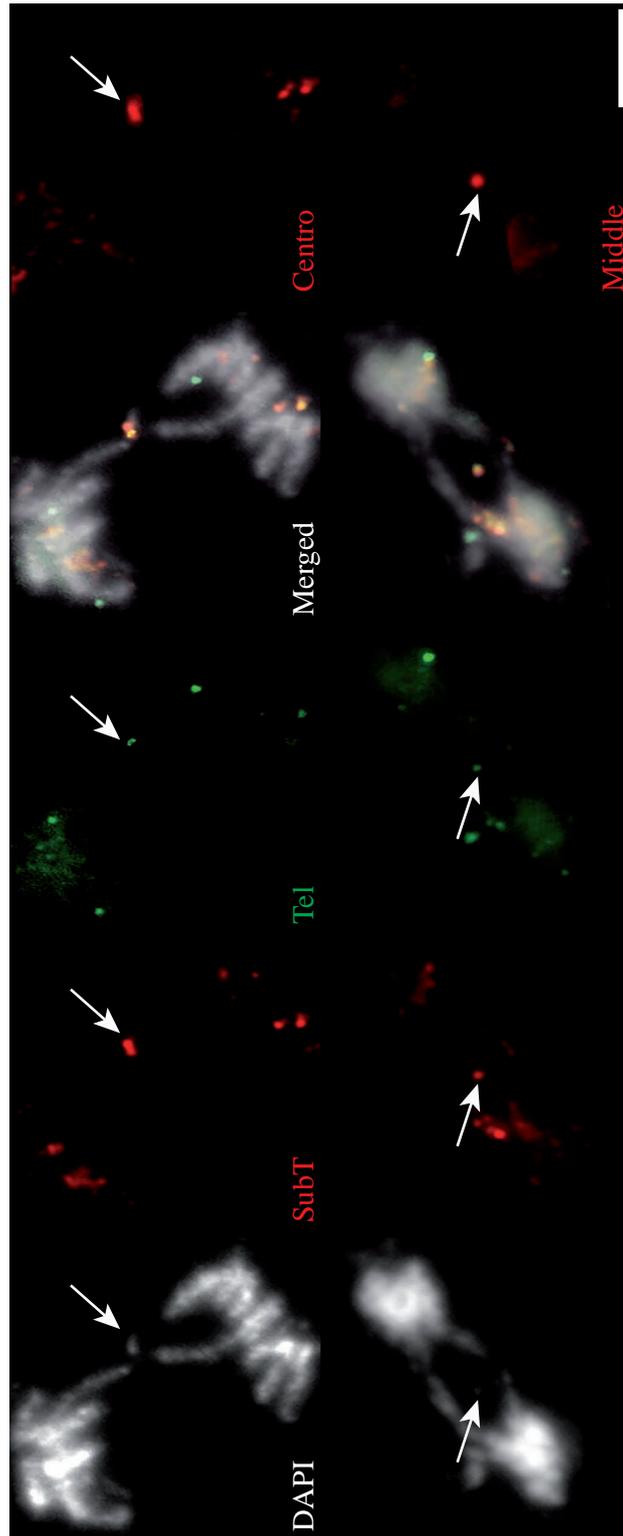


Figure 4

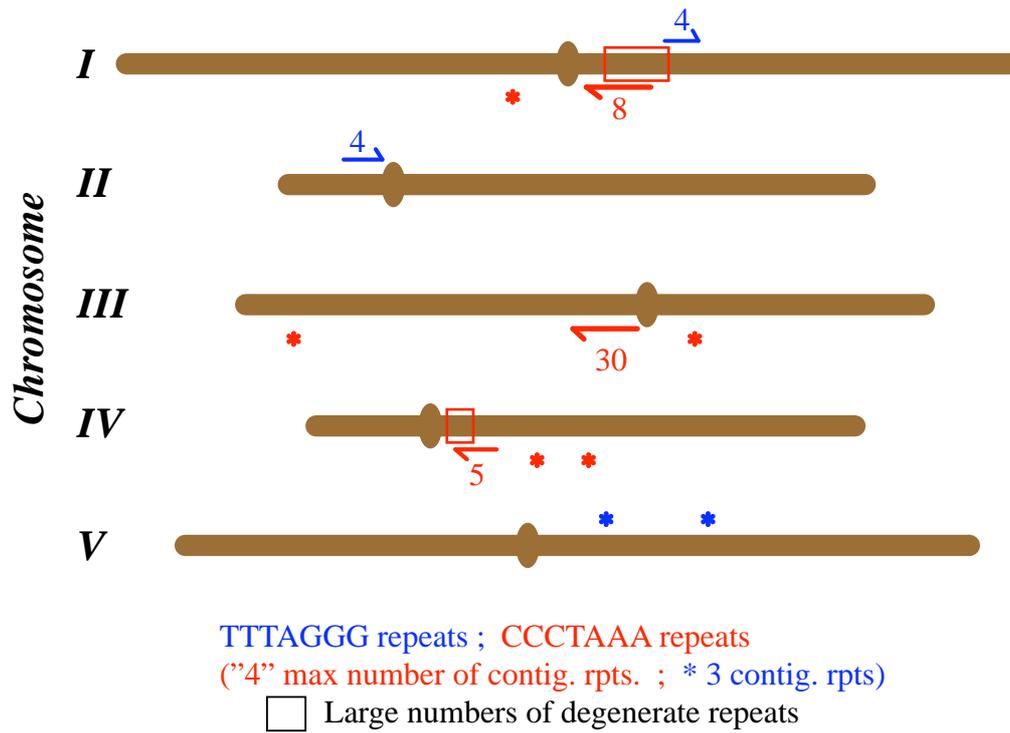


Figure 5

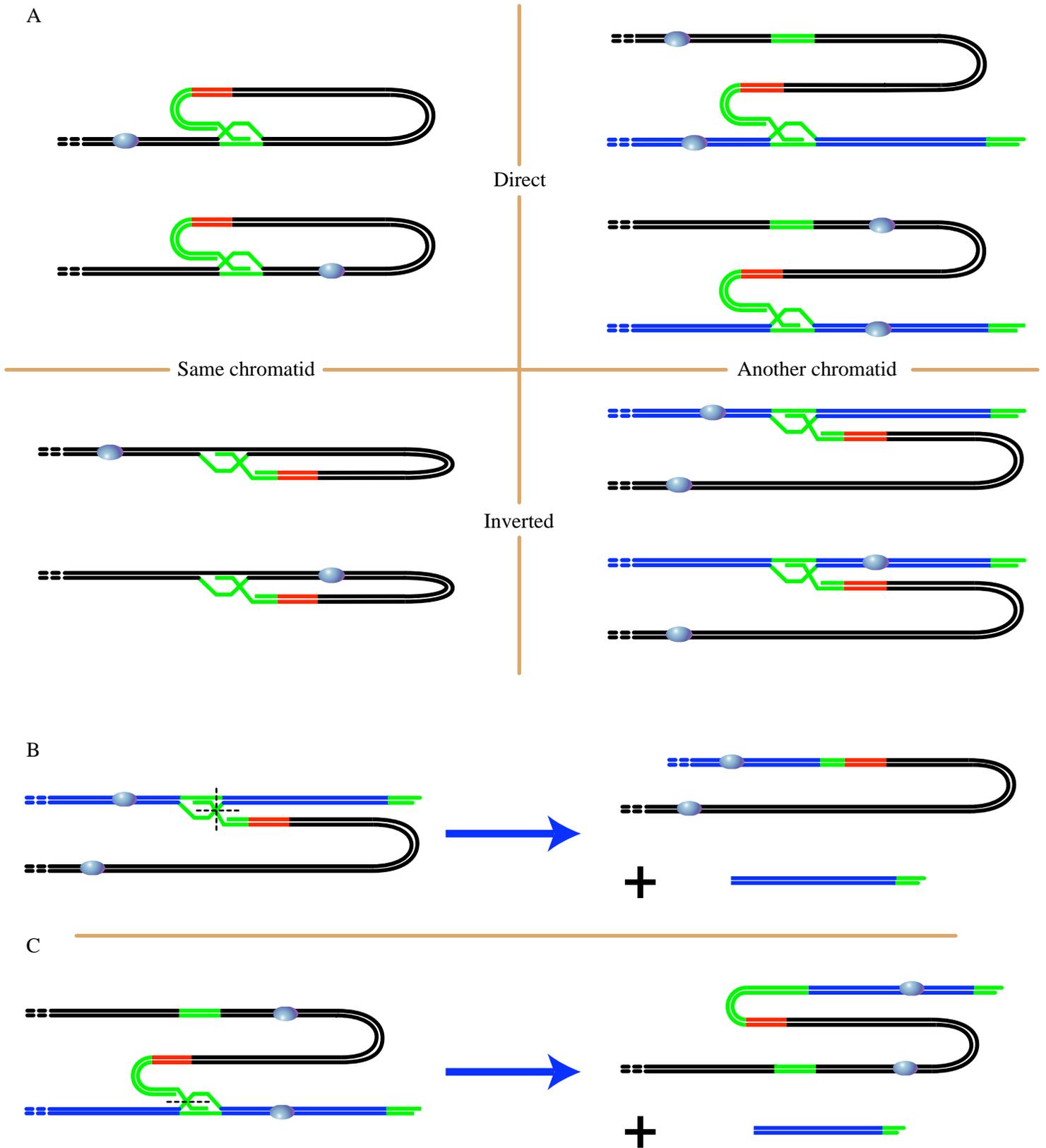


Figure 6

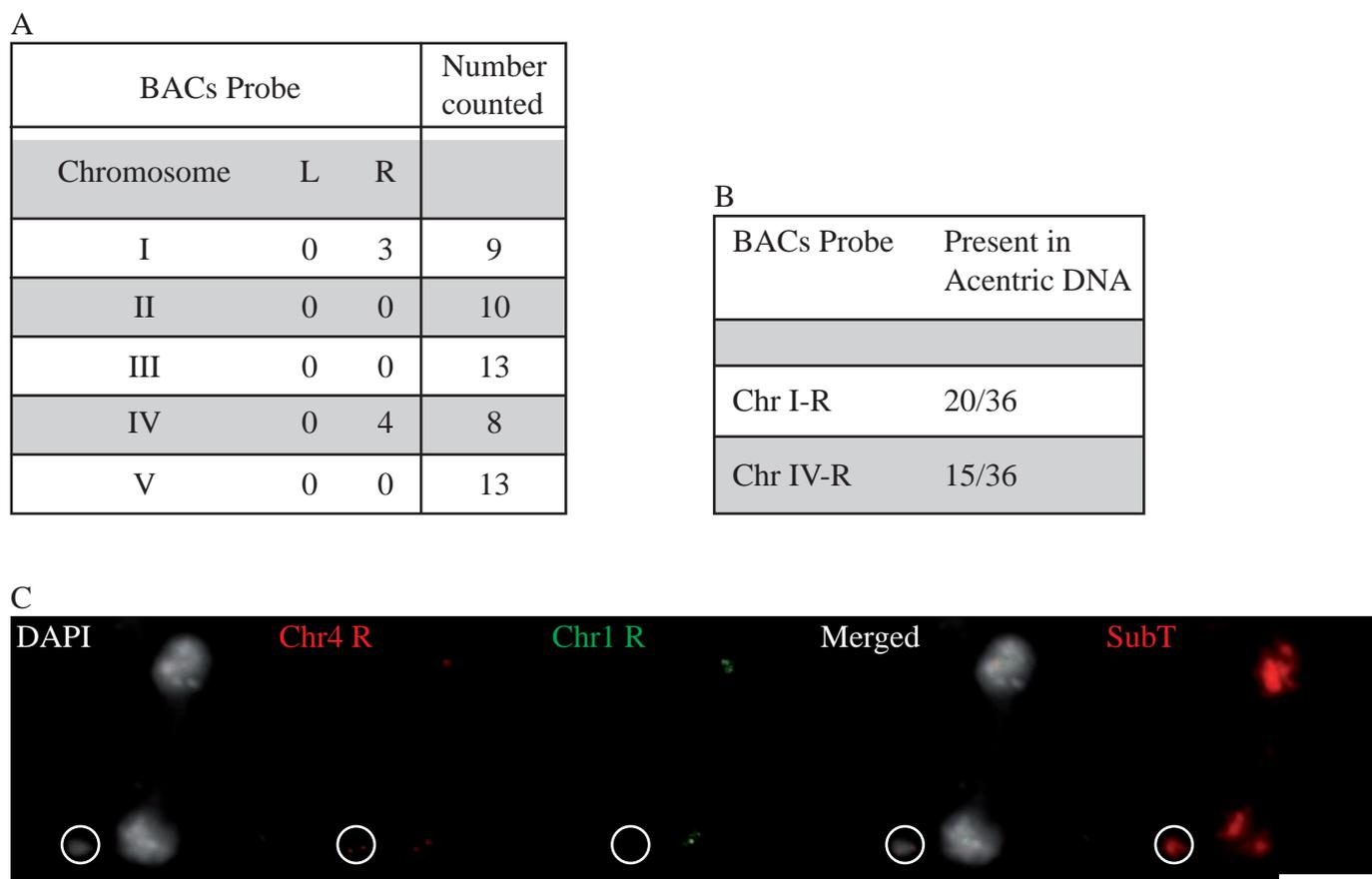


Figure 7

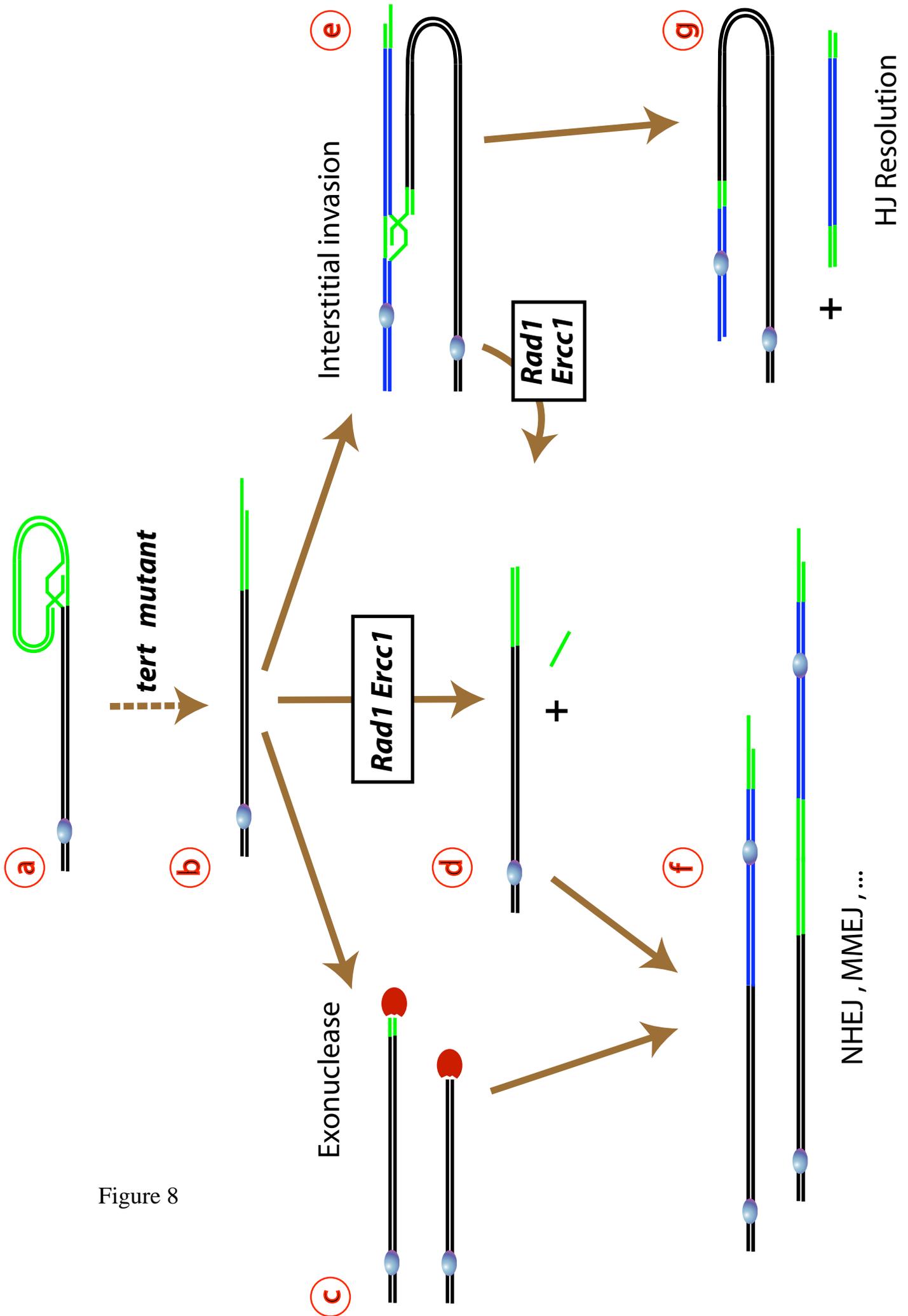


Figure 8

Discussion générale et perspectives

I. La protéine AtRad50 protège les télomères normaux et déprotégés par deux mécanismes différents

L'inactivation du gène *ATRAD50*, chez *A. thaliana*, s'accompagne de sévères défauts morphologiques ainsi que d'un raccourcissement de la longueur des télomères observé *in vitro* sur des cals dérivés de plantes mutantes *atrada50*, sans modification de l'activité de la télomérase. Les plantes mutantes pour *ATRAD50* ne présentent pas ce raccourcissement des télomères sur une seule génération (stérilité totale des mutants) suggérant que ces évènements doivent être minoritaires (Bundock *et al*, 2002; Gallego *et al*, 2001; Gallego & White, 2001; Vannier *et al*, 2006). Mes travaux de thèse ont débuté par l'identification de l'origine du phénotype des plantes mutantes *atrada50*. L'objectif de cette étude était de mettre en évidence le rôle de la protéine RAD50 dans l'homéostasie télomérique.

Les plantes déficientes pour *ATRAD50* présentent des phénotypes similaires aux plantes mutantes pour la sous-unité catalytique AtTert de la télomérase (de génération 6). Nous nous sommes demandés si ces phénotypes étaient associés à des fusions chromosomiques détectées par des ponts anaphasiques en cellules mitotiques, comme chez les plantes mutantes pour la télomérase (Riha *et al*, 2001). L'analyse cytologique des plantes mutantes *atrada50*, en première génération, nous a permis d'identifier qu'environ 13% ($\pm 3\%$) des anaphases présentent au moins un pont anaphasique (Article 1, Tableau 1). Ce résultat est en accord avec l'analyse des plantes mutantes *atmre11* présentant 16% de fusions chromosomiques, dont une certaine proportion (non quantifiée) a indiqué la présence d'extrémités de chromosomes (Puizina *et al*, 2004). Nous avons donc voulu déterminer si les évènements de fusions, chez les plantes mutantes *atrada50*, se réalisaient par les extrémités des chromosomes et à quelle fréquence.

La nature spécifique de la majorité des séquences subtélomériques chez *A. thaliana*, nous a permis d'identifier des sondes uniques pour neuf extrémités de chromosomes sur dix.

Ces sondes ainsi que la sonde des répétitions télomériques ont été vérifiées pour leur spécificité par peignage moléculaire (Article 1, Figure 2). Les analyses par FISH sur cellules mitotiques et par peignage moléculaire ont permis de montrer que la moitié des évènements de fusions dues à la perte d'AtRad50, se faisait par les extrémités des chromosomes avec perte des répétitions télomériques (Article 1, Figures 1, 2 et 3). Ces résultats sont cohérents avec l'absence d'amplification (par PCR) des points de jonction des fusions, chez les plantes mutantes *atrad50* (résultats non montrés). La perte d'AtRad50 entraîne donc un raccourcissement très rapide (en une génération) d'une certaine population des télomères, qui deviennent non fonctionnels et par conséquent sont reconnus comme des CDB.

Chez *S. cerevisiae* et *S. pombe*, les protéines du complexe MRX et la télomérase agissent dans la même voie (Boulton & Jackson, 1998; Nugent & Lundblad, 1998). Nous avons alors étudié le rôle de la protéine AtRad50 en contexte de télomères raccourcis et donc non fonctionnels. Pour cela, nous avons réalisé le croisement entre des plantes mutantes pour *ATRAD50* et *ATTERT*. L'analyse cytologique a permis de déterminer une augmentation du nombre de fusions chromosomiques entre le double mutant *atrad50/tert* et le simple mutant *attert* (Article 1, Figure 4). Cette augmentation se traduit par un décalage de deux générations dans l'apparition des anaphases présentant au moins un pont anaphasique. Ceci suggère que chez *A. thaliana*, les protéines AtRad50 et télomérase n'agissent pas dans la même voie et leur inhibition provoque une augmentation synergique de l'instabilité chromosomique. Par contre, l'analyse de la longueur des télomères par TRF n'a pas permis de déterminer une perte importante des répétitions télomériques entre le double mutant *atrad50/tert* et le simple mutant *attert* (Article 1, Figure 5). Atrad50 semble donc protéger les télomères courts contre une augmentation de leur reconnaissance par les mécanismes de réparation mais pas contre un mécanisme exonucléasique.

L'analyse par FISH sur des noyaux mitotiques de plantes double mutantes *atrad50/tert*, par rapport au simple mutant *atert*, a permis de montrer que l'absence d'AtRad50 entraîne une augmentation de la reconnaissance des télomères raccourcis (plus de fusions par les extrémités et avec des répétitions télomériques ; Article 1, Figure 6). Ces résultats suggèrent qu'AtRad50 aurait un rôle de protection des télomères raccourcis.

Nous avons émis l'hypothèse que ce rôle pourrait être lié au fait que RAD50 soit capable de lier deux molécules d'ADN et ainsi de contraindre la recombinaison entre chromatides soeurs (de Jager *et al*, 2001b; Hartsuiker *et al*, 2001; Hopfner *et al*, 2000). Dans ce cas les évènements de réparation par copie de la séquence homologue ne pourraient pas être détectés puisque que la réparation ne produirait pas de fusions entre les extrémités des chromosomes (Article 1, Figure 7).

Mon travail de thèse a donc permis de mieux comprendre l'origine du phénotype des plantes mutantes *atrad50* ainsi que d'identifier deux rôles pour la protéine RAD50 dans la protection des télomères. Cette protéine protège contre la perte rapide des répétitions télomériques au niveau des télomères normaux alors qu'elle induirait la recombinaison au niveau des télomères non fonctionnels.

Les résultats de cet article ainsi que le modèle suggéré, nous permettent d'envisager une étude sur la réplication des télomères chez *A. thaliana* afin de déterminer si des échanges ont lieu entre chromatides soeurs et si ce mécanisme est dépendant d'AtRad50. Pour cela, nous pourrions utiliser la technique de CO-FISH qui nécessite la synchronisation de cultures cellulaires d'*A. thaliana*, mise au point par Menges et Murray (2003). Ces auteurs ont obtenu des synchronisations de 80% des cellules en phase S ainsi que 92% des cellules en phase G2 (Menges *et al*, 2003). Par contre l'une des difficultés de ce projet est liée à la détection des signaux en métaphase, du fait de la taille très réduite des chromosomes d'*A. thaliana*. En

effet, dans les tissus à forte division cellulaire tels que les tissus méristématiques (racines, fleurs), les observations cytologiques révèlent très rarement de beaux étalements de métaphases avec les chromosomes séparés. Néanmoins, il est possible d'augmenter la proportion de cellules mitotiques par l'ajout, aux cultures cellulaires, de drogues agissant contre les microtubules telles que l'aphidicoline ou la propyzamide. Ces expériences ont été mises au point chez le tabac avec des enrichissements de cellules mitotiques de l'ordre de 70 à 90% (Kumagai-Sano *et al*, 2006) et seraient très intéressantes à mettre au point chez *A. thaliana*.

II. Le complexe AtRad1/Ercc1 est impliquée dans la protection des télomères courts

Depuis de nombreuses années, il est connu que les organismes déficients pour la télomérase présentent une instabilité génétique liée à des fusions chromosomiques. Néanmoins, la ou les voies reconnaissant les télomères déprotégés suite à leur raccourcissement n'ont été que très peu recherchées. Les rares études qui ont été effectuées portent uniquement sur l'implication de la voie de réparation par recombinaison non homologue, NHEJ, dans ces fusions. Que ce soit chez les mammifères, *S. pombe* et *A. thaliana*, cette voie ne semble pas être essentielle puisque les double mutants entre la télomérase et les gènes codant pour l'hétérodimère KU ou l'ADN Ligase IV présentent toujours des fusions chromosomiques (Baumann & Cech, 2000; Maser *et al*, 2007; Riha & Shippen, 2003a).

Dans le but d'approfondir nos connaissances sur la formation de ces fusions, nous avons essayé d'identifier la ou les voies de reconnaissance des télomères déprotégés en contexte de plantes mutantes pour la télomérase.

L'existence d'une voie de réparation par recombinaison basée sur l'utilisation d'homologies de séquence proches de la lésion a alors été suggérée. Cette voie serait dépendante du complexe Rad1/Rad10 comme chez la levure. Actuellement, ce complexe Rad1/Rad10 intervient dans deux types de réparation selon la longueur des homologies utilisées et la nature des protéines qui y interviennent. En effet, la recombinaison non homologue MMEJ faisant intervenir le complexe Rad1/Rad10 et éventuellement le complexe MRX et la ligase 4 a été identifiée par la présence, comme son nom l'indique, de microhomologies de séquences, entre 1 et 10 nucléotides au point de jonctions des cassures (Ma *et al*, 2003).

La recombinaison homologue SSA, faisant intervenir le complexe Rad1/Rad10 ainsi que les protéines Rad52, Srs2 et Rpa, est très efficace lorsque les homologies de séquences excèdent 200 nucléotides (Fishman-Lobell & Haber, 1992; Paques & Haber, 1999; Sugawara *et al*, 2000; Umezu *et al*, 1998). Nous nous sommes donc intéressés au rôle éventuel de cette voie dans la formation des fusions chromosomiques dépendantes de l'absence de la télomérase.

Nous avons réalisé des croisements entre des plantes mutantes pour *ATTERT* et des plantes mutantes pour *ATRADI* ou *ATERCCI*. Nous avons donc obtenu des plantes doublement hétérozygotes permettant la sélection et l'analyse des double mutants par rapport à tous les témoins issus du même croisement. L'analyse phénotypique de ces double mutants *attert/rad1* et *attert/ercc1* a montré une augmentation de l'aggravation du phénotype télomérase (Riha *et al*, 2001) de deux générations par rapport au simple mutant *attert* (Article

2, Figure 1A). Cette accélération de la visualisation des anomalies morphologiques est corrélée avec une augmentation de l'instabilité chromosomique observée en cytologie par des ponts anaphasiques (Article 2, Figure 1B). En revanche, aucune accélération de la dégradation de la longueur des télomères n'a été observée (Article 2, Figure 2). L'analyse par FISH sur cellules mitotiques en utilisant des sondes spécifiques des dix extrémités de chromosomes d'*A. thaliana* a permis de mettre en évidence que chez les double mutants, les fusions se font plus fréquemment sans répétitions télomériques et également sans impliquer les extrémités des chromosomes (Article 2, Figure 3).

Ces résultats suggèrent donc pour le complexe AtRad1/Ercc1 un rôle de protection contre les mécanismes de recombinaison au niveau des télomères non fonctionnels. De plus, une analyse cytologique approfondie des fusions chromosomiques nous a permis d'identifier des structures d'ADN acentriques proches des fusions chromosomiques (Article 2, Figure 4). Ces structures ont été identifiées par FISH comme des bras entiers des chromosomes 1 droit et 4 droit (Article 2, Figure 4). Ces chromosomes acentriques semblent être le résultat de l'invasion de l'extrémité des télomères dans des régions interstitielles de répétitions télomériques dégénérées (de plusieurs centaines de kb), localisées à proximité des centromères des bras droits des chromosomes 1 et 4 (Article 2, Figure 5, 6 et 7). La résolution de ces structures génèrerait un chromosome dicentrique et libérerait un bras entier de chromosome sans centromère (acentrique).

Ces résultats sont en accord avec les observations de Zhu *et al.* (2003), où les auteurs ont identifié, dans des MEF dérivées de souris mutantes *ercc1*, des cercles extrachromosomiques contenant des répétitions télomériques. Or, contrairement à nos résultats, ces observations ne sont pas associées à des fusions chromosomiques. Ceci peut être expliqué par l'orientation et la position des séquences télomériques interstitielles. En effet, les

auteurs suggèrent que les extrémités des télomères seraient capables d'envahir des séquences télomériques interstitielles en orientation directe sur la même chromatide (Zhu *et al*, 2003).

Par contre nos résultats impliquent des séquences interstitielles en orientation inverse sur une autre chromatide générant un chromosome dicentrique et un fragment linéaire acentrique (Article 2, Figure 6). D'autre part, les résultats en cellules de mammifères ont été obtenus à partir de souris uniquement déficientes pour *ERCC1*. Or chez *A. thaliana*, les plantes mutantes pour *ATRAD1* et *ATERCC1* ne présentent pas de phénotype particulier, ni de fusions chromosomiques ni de raccourcissement des télomères et ceci même après cinq générations. Il semblerait donc que chez *A. thaliana* le rôle de ce complexe soit centré autour de la protection des télomères raccourcis.

Nous n'avons pas réussi à identifier un réel rôle de la voie de réparation par homologie de séquence, dépendante de *AtRad1/Ercc1*, dans la formation des fusions chromosomiques dues au raccourcissement des télomères. Nous avons observé une augmentation du nombre de fusions dans les double mutants *attert/rad1* et *attert/ercc1* par rapport au simple mutant *attert*. Ces fusions sont associées à un changement complet de leur nature. En effet, dans les double mutants (par rapport au simple mutant), il a été observé une diminution du nombre d'évènements impliquant des répétitions télomériques (de 84% à 33%) et au contraire une augmentation du nombre de fusions par les extrémités sans répétitions (de 6,5% à 49% ; Article 2, Figure 3).

Ces résultats indiquent une perte rapide des répétitions télomériques qui n'est pas confirmée par l'analyse de la longueur des télomères en « Southern blot ». Nous avons alors émis l'hypothèse que cette perte rapide pourrait être liée à la formation de cercles télomériques ou à l'action d'une exonucléase. Des premières expériences d'amplification des cercles télomériques (Zellinger *et al*, 2007) en collaboration avec l'équipe de K. Riha ne nous a pas permis de les identifier. Ces résultats suggèrent qu'une exonucléase (à déterminer ;

Exo1 ?) pourrait être à l'origine de la perte des répétitions télomériques avant les mécanismes de fusions par les extrémités.

Il semblerait donc que le complexe AtRad1/Ercc1 ne soit pas impliqué dans le ou les mécanismes permettant les fusions chromosomiques puisque le nombre général de fusions a augmenté dans les double mutants. Ces résultats sont différents de ceux obtenus chez *S. pombe* où la grande majorité des levures déficientes pour *TRT1* (gène codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase) meurent mais une minorité survit par circularisation de ses chromosomes, indépendamment des protéines Ku70 et Lig4 (Baumann & Cech, 2000). Wang *et al.* (2008) ont testé le rôle éventuel de la voie SSA dans cette circularisation en produisant des double mutants *trt1/rad16* (*RAD1*). Ces derniers présentent une accélération de l'apparition des défauts de croissance par rapport au simple mutant *trt1* et ceci de manière indépendante du raccourcissement des télomères, tout comme chez *A. thaliana*. De plus, les double mutants ne parviennent pas à survivre au delà de quelques divisions. Il semblerait donc que la voie de réparation par SSA soit nécessaire pour la circularisation des chromosomes chez *S. pombe*, en absence de la télomérase (Wang & Baumann, 2008).

Ces études chez *S. pombe* ont permis d'identifier les protéines impliquées dans un mécanisme de survie (circularisation des chromosomes) des levures double mutantes *trt1/rad16*. Par contre, l'analyse du mécanisme responsable de l'accélération des défauts de croissance n'a pas pu être réalisée du fait de la létalité rapide de ces levures. Or notre étude contribue à identifier l'origine de cette accélération, par l'implication du complexe AtRad1/Ercc1 dans la protection des télomères non fonctionnels. Nous sommes actuellement à la recherche des voies responsables des fusions chromosomiques par les extrémités chez les double mutants *attert/rad1* et *attert/ercc1*. Pour cela, nous allons inhiber la voie de réparation par recombinaison non homologue NHEJ en produisant des triple mutants *attert/rad1/ku80* et *attert/ercc1/lig4*.

Nous construisons actuellement une protéine AtRad1 avec le domaine nucléase inactif (par mutagenèse dirigée) afin d'étudier le rôle de l'activité endonucléasique dans les anomalies morphologiques et cytologiques des double mutants. Aucun lien n'a pu être clairement établi entre l'activité catalytique de ce complexe et son rôle au niveau des télomères, puisqu'en cellules de mammifères, le raccourcissement des télomères du à la surexpression de TRF2 ou de XPF sont indépendants du domaine nucléase (Wu *et al*, 2007b; 2008).

L'observation de chromosomes dicentriques et de fragments acentriques laissent supposer un mécanisme permettant la résolution de la structure d'invasion de l'extrémités des télomères dans les séquences interstitielles. Cette structure doit être reconnue et coupée par une nucléase de type résolvasse. Afin de l'identifier, nous allons produire des triple mutants avec des résolvasse telles que XRCC3 (Liu *et al*, 2007) et l'endonucléase MUS81. Cette dernière étant impliquée dans la résolution de jonctions de Holliday chez l'Homme (Ciccia *et al*, 2003). Nous envisageons également de travailler avec la résolvasse GEN1 très récemment découverte chez l'Homme et la levure (Yen1) par le groupe de S. West, et qui serait la véritable résolvasse des jonctions de Holliday (Ip *et al*, 2008).

III. Les protéines et les complexes protéiques de la recombinaison au niveau des télomères

Les protéines et les complexes protéiques de la reconnaissance des lésions de l'ADN sont très conservés entre les espèces et leur rôle dans la signalisation et la réparation des cassures a été bien démontré. Les télomères, localisés au niveau des extrémités des chromosomes ("cassures") ne doivent pas être reconnus par ces machineries cellulaires et présentent donc une organisation protéique et structurale très complexe. De manière très

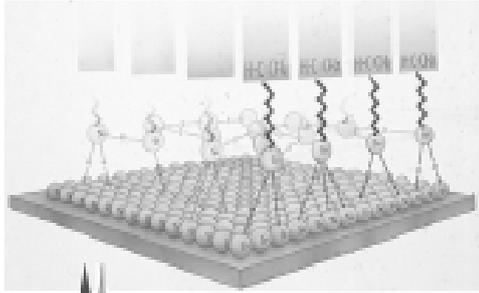
surprenante, de nombreuses protéines de la réparation sont physiquement associées aux télomères. Néanmoins, le rôle de ces protéines ainsi que le ou les mécanismes dans lesquels elles interviendraient restent à déterminer.

Chez *A. thaliana*, mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence le rôle de la protéine AtRad50 et du complexe AtRad1/Ercc1 de la recombinaison homologue et/ou non homologue dans l'homéostasie télomérique, ainsi que de suggérer des mécanismes de leur action au niveau des télomères. AtRad50 est impliquée dans la protection des télomères normaux et avec AtRad1/Ercc1, ils agissent contre la nature recombinante des télomères courts. Cette plante modèle représente un excellent outil pour étudier l'implication de toutes les protéines de la recombinaison dans l'homéostasie télomérique. En effet, *A. thaliana* est capable de résister à l'absence de nombreuses protéines impliquées dans la recombinaison qui entraînent la létalité chez des organismes tels que la levure et les mammifères. De plus, cette plante permet par des croisements multiples d'obtenir des double, triple et quadruple mutants qui sont des outils génétiques performants pour l'analyse des voies de réparation des lésions de l'ADN et qui permettront peut-être de découvrir la hiérarchisation de ces différentes voies.

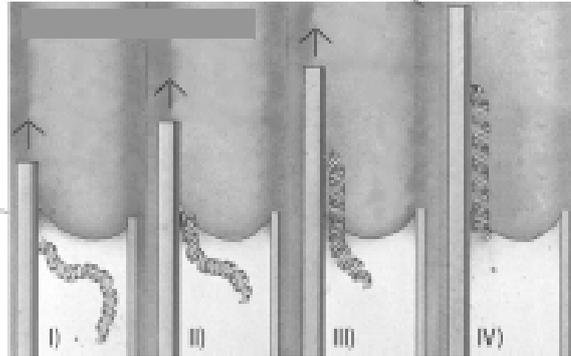
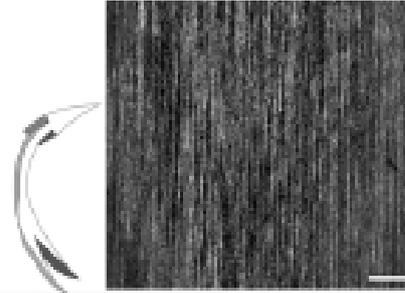
Annexe

Description du peignage moléculaire

(A) La surface de la lamelle est silanisée dans le préparateur de lames



(C) Le résultat final est une surface recouverte de molécules linéaires d'ADN



(B) L'ADN est étiré par peignage moléculaire

Figure 28 : Principe du peignage moléculaire

(A) : Une monocouche de silane est fixée de manière covalente à une lamelle par des groupes Si. La combinaison entre les liaisons hydrophobiques / électrostatiques des extrémités de l'ADN et les terminaisons vinyls du silane permet l'ancrage de l'ADN à la surface de la lamelle.

(B) : L'ADN se lie à la surface par ses extrémités libres. Lorsque la lamelle remonte du réservoir, contenant l'ADN en solution, un ménisque se forme entre l'air et le liquide. Ce ménisque exerce une force constante le long de la molécule d'ADN et permet de les étirer sur plusieurs centaines de Kb.

(C) : Lorsque l'ADN est complètement remonté du réservoir, il est immobilisé sous une forme étirée. L'utilisation d'un agent intercalant de l'ADN tel que le YOYO-1, va permettre de visualiser les fibres au microscope. (d'après Lebofsky *et al*, 2000)

Préparation des noyaux d'Arabidopsis

Des bourgeons floraux sont broyés dans l'azote liquide et la poudre résultante est stockée dans des tubes à vis à -80°C . Un tube contenant 1,5 mL de poudre est dissous dans 40mL de NIB (Tris 10mM pH9,5; EDTA 10mM; KCl 100mM; Sucrose 500mM; Spermidine 4mM; Spermine 1mM) contenant 0,1% de β Mercaptoethanol. Le mélange est doucement agité pendant 5min dans la glace puis successivement filtré à travers des filtres de 80 et 40 μm . 2 mL de NIB contenant 0,1% de β Mercaptoethanol et 10% de triton X-100 sont ajoutés au filtrat avant la centrifugation à 2000g pendant 10 min à 4°C . Le culot de noyaux est repris dans un mélange NIB contenant 0,1% de β Mercaptoethanol et low melting agarose à 1% pour obtenir un plug d'agarose à 0,5% de 3.105 noyaux. Le plug est démoulé puis incubé dans du tampon de digestion à 50°C . Le tampon est changé deux fois avant l'incubation pour toute la nuit. Les plugs sont ensuite conservés à 4°C dans de l'EDTA 50mM pH8.

Préparation des blocs d'ADN pour le peignage

Un plug est lavé dans du TE, 30min sur un rotateur à disque. Il est ensuite placé dans un tube eppendorf (2ml) et recouvert de MES pH 6.5, 100mM, (1,5ml). Le tube est mis au bain-marie à 70°C pendant 20min, puis 5min à 42°C et enfin 2 μl de β -agarase (BioLabs 1000U/ml) sont ajoutés sans pipeter puis digestion toute la nuit à 42°C .

Peignage moléculaire

Le principe du peignage moléculaire est décrit dans la figure 28. L'ADN est placé dans un réservoir et une lamelle silanisée est insérée sur le support de la machine qui plonge la lamelle dans le réservoir pendant 5min pour ancrer l'ADN à sa surface. Pendant la remontée de la lamelle, il se crée un ménisque entre l'air et la solution d'ADN qui permet de linéariser plusieurs centaines de kilobases d'ADN. La lamelle est incubée dans une solution de YOYO-

1 (1µl/1,3ml MES), un agent intercalant de l'ADN fluorescent dans le vert, pour vérifier le peignage. L'observation est faite au microscope avec le filtre FITC. L'ADN peigné est fixé en plaçant la lame à 65°C pendant minimum 1heure 30min et les lames sont conservées à -20°C.

Hybridation in-situ des sondes sur l'ADN peigné

Les surfaces peignées sont remises à température ambiante et l'ADN de ces surfaces est dénaturé au NaOH 0,5M pendant 20min avec faible agitation puis lavées avec du PBS. 200ng de chaque sonde marquée à la biotine et à la digoxigénine est repris dans du tampon d'hybridation (50% Formamide; 2X SSC; 0,5% SDS; 0,5% Sarcosyl; 0,35% Boehringer blocking reagent; NaCl 10mM) puis dénaturé dans l'eau bouillante pendant 5min puis choc thermique dans de l'eau glacée. Le mélange de sondes est ajouté aux surfaces, que l'on recouvre avec une lamelle. L'hybridation est effectuée sur toute la nuit à 37°C, en chambre humide. La lamelle est enlevée en trempant la lame dans du SSC 2X puis les surfaces sont lavées dans du formamide50%/SSC 2X, 3 fois 5min à température ambiante avec agitation, puis dans du SSC 2X, 3 fois 5min avec agitation. Les anticorps sont dilués dans une solution d'agent bloquant à 1% (poudre Boehringer solubilisée dans SSC 2X/Tween20) et ajoutés dans cet ordre précis sur la lame :

- L'anticorps anti-digoxigénine de mouton couplés au FITC (1/50) et la streptavidine couplée au fluorochrome 594 (1/50) sont incubés pendant 20 min à 37°C en chambre humide.
- Puis l'anticorps anti-IgG de mouton préparés chez l'âne couplés au fluorochrome 488 (1/50) et l'anticorps anti-streptavidine de lapin couplés à la biotine (1/50) sont incubés pendant 20 min à 37°C en chambre humide.
- Enfin l'anticorps anti-IgG d'âne préparés chez le lapin couplés au FITC (1/50) et la streptavidine couplée au fluorochrome 594 (1/50) sont incubés pendant 20min à 37°C en chambre humide.

Entre chaque étape, 3 lavages avec agitation de 3min à température ambiante avec SSC 2X/Tween20 sont réalisés. Enfin un dernier rinçage en PBS est effectué avant le montage en Vectashield contenant du DAPI (2µg/mL Vector Laboratories).

Acquisition et analyse des signaux de FISH

Pour l'analyse microscopique, un microscope à épifluorescence a été utilisé. Le laboratoire utilise un microscope à épifluorescence Zeiss Axiophot 2 équipé d'une caméra (Photometrics) et d'une lampe à UV, afin d'exciter les fluorochromes couplés aux anticorps, ainsi que les filtres FITC, Texas Red et DAPI. Le microscope est géré par le logiciel Axiovision permettant de capturer les images et de mesurer les signaux. Ce logiciel permet de convertir les pixels en microns, en fonction de l'objectif utilisé, puis de déterminer la taille en kilobase par la relation 1micron = 2kb.

Références bibliographiques

- Adair GM, Rolig RL, Moore-Faver D, Zabelshansky M, Wilson JH, Nairn RS (2000) Role of ERCC1 in removal of long non-homologous tails during targeted homologous recombination. *EMBO J* **19**(20): 5552-5561
- Adams SP, Leitch IJ, Bennett MD, Leitch AR (2000) Aloe L--a second plant family without (TTTAGGG)_n telomeres. *Chromosoma* **109**(3): 201-205
- Ahnesorg P, Smith P, Jackson SP (2006) XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell* **124**(2): 301-313
- Al-Wahiby S, Slijepcevic P (2005) Chromosomal aberrations involving telomeres in BRCA1 deficient human and mouse cell lines. *Cytogenet Genome Res* **109**(4): 491-496
- Alani E, Padmore R, Kleckner N (1990) Analysis of wild-type and rad50 mutants of yeast suggests an intimate relationship between meiotic chromosome synapsis and recombination. *Cell* **61**(3): 419-436
- Ambrus A, Chen D, Dai J, Bialis T, Jones RA, Yang D (2006) Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res* **34**(9): 2723-2735
- Amiard S, Doudeau M, Pinte S, Poulet A, Lenain C, Faivre-Moskalenko C, Angelov D, Hug N, Vindigni A, Bouvet P, Paoletti J, Gilson E, Giraud-Panis MJ (2007) A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion. *Nat Struct Mol Biol* **14**(2): 147-154
- Ancelin K, Brunori M, Bauwens S, Koering CE, Brun C, Ricoul M, Pommier JP, Sabatier L, Gilson E (2002) Targeting assay to study the cis functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2. *Mol Cell Biol* **22**(10): 3474-3487
- Artandi SE (2006) Telomeres, telomerase, and human disease. *N Engl J Med* **355**(12): 1195-1197
- Assenmacher N, Hopfner KP (2004) MRE11/RAD50/NBS1: complex activities. *Chromosoma* **113**(4): 157-166
- Audebert M, Salles B, Calsou P (2004) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem* **279**(53): 55117-55126
- Autexier C, Pruzan R, Funk WD, Greider CW (1996) Reconstitution of human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA. *EMBO J* **15**(21): 5928-5935
- Bai Y, Murnane JP (2003) Telomere instability in a human tumor cell line expressing NBS1 with mutations at sites phosphorylated by ATM. *Mol Cancer Res* **1**(14): 1058-1069
- Bailly V, Sommers CH, Sung P, Prakash L, Prakash S (1992) Specific complex formation between proteins encoded by the yeast DNA repair and recombination genes RAD1 and RAD10. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(17): 8273-8277
- Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**(6922): 499-506
- Ball SE, Gibson FM, Rizzo S, Tooze JA, Marsh JC, Gordon-Smith EC (1998) Progressive telomere shortening in aplastic anemia. *Blood* **91**(10): 3582-3592

- Banik SS, Counter CM (2004) Characterization of interactions between PinX1 and human telomerase subunits hTERT and hTR. *J Biol Chem* **279**(50): 51745-51748
- Barbour L, Xiao W (2003) Regulation of alternative replication bypass pathways at stalled replication forks and its effects on genome stability: a yeast model. *Mutat Res* **532**(1-2): 137-155
- Bardwell AJ, Bardwell L, Johnson DK, Friedberg EC (1993) Yeast DNA recombination and repair proteins Rad1 and Rad10 constitute a complex in vivo mediated by localized hydrophobic domains. *Mol Microbiol* **8**(6): 1177-1188
- Bardwell AJ, Bardwell L, Tomkinson AE, Friedberg EC (1994) Specific cleavage of model recombination and repair intermediates by the yeast Rad1-Rad10 DNA endonuclease. *Science* **265**(5181): 2082-2085
- Bardwell L, Cooper AJ, Friedberg EC (1992) Stable and specific association between the yeast recombination and DNA repair proteins RAD1 and RAD10 in vitro. *Mol Cell Biol* **12**(7): 3041-3049
- Baumann P, Cech TR (2000) Protection of telomeres by the Ku protein in fission yeast. *Mol Biol Cell* **11**(10): 3265-3275
- Baumann P, Cech TR (2001) Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans. *Science* **292**(5519): 1171-1175
- Baur JA, Zou Y, Shay JW, Wright WE (2001) Telomere position effect in human cells. *Science* **292**(5524): 2075-2077
- Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L (1998) Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol* **8**(3): 177-180
- Bechter OE, Shay JW, Wright WE (2004) The frequency of homologous recombination in human ALT cells. *Cell Cycle* **3**(5): 547-549
- Bender CF, Sikes ML, Sullivan R, Huye LE, Le Beau MM, Roth DB, Mirzoeva OK, Oltz EM, Petrini JH (2002) Cancer predisposition and hematopoietic failure in Rad50(S/S) mice. *Genes Dev* **16**(17): 2237-2251
- Berthiau AS, Yankulov K, Bah A, Revardel E, Luciano P, Wellinger RJ, Geli V, Gilson E (2006) Subtelomeric proteins negatively regulate telomere elongation in budding yeast. *EMBO J* **25**(4): 846-856
- Bertuch AA, Lundblad V (2004) EXO1 contributes to telomere maintenance in both telomerase-proficient and telomerase-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **166**(4): 1651-1659
- Bilaud T, Brun C, Ancelin K, Koering CE, Laroche T, Gilson E (1997) Telomeric localization of TRF2, a novel human telobox protein. *Nat Genet* **17**(2): 236-239
- Bilaud T, Koering CE, Binet-Brasselet E, Ancelin K, Pollice A, Gasser SM, Gilson E (1996) The telobox, a Myb-related telomeric DNA binding motif found in proteins from yeast, plants and human. *Nucleic Acids Res* **24**(7): 1294-1303
- Blackburn EH, Gall JG (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* **120**(1): 33-53
- Blasco MA (2005) Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging. *EMBO J* **24**(6): 1095-1103

- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW (1997) Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* **91**(1): 25-34
- Bleuyard JY, Gallego ME, Savigny F, White CI (2005) Differing requirements for the Arabidopsis Rad51 paralogs in meiosis and DNA repair. *Plant J* **41**(4): 533-545
- Bleuyard JY, White CI (2004) The Arabidopsis homologue of Xrcc3 plays an essential role in meiosis. *EMBO J* **23**(2): 439-449
- Blier PR, Griffith AJ, Craft J, Hardin JA (1993) Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks. *J Biol Chem* **268**(10): 7594-7601
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* **279**(5349): 349-352
- Bonato D, Revers LF, Brendel M, Henriques JA (2005) The eukaryotic Pso2/Snm1/Artemis proteins and their function as genomic and cellular caretakers. *Braz J Med Biol Res* **38**(3): 321-334
- Borde V (2007) The multiple roles of the Mre11 complex for meiotic recombination. *Chromosome Res* **15**(5): 551-563
- Boulton SJ, Jackson SP (1998) Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J* **17**(6): 1819-1828
- Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T (1997) Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet* **17**(2): 231-235
- Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR (1997) Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* **3**(11): 1271-1274
- Bucholc M, Park Y, Lustig AJ (2001) Intrachromatid excision of telomeric DNA as a mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**(19): 6559-6573
- Buck D, Malivert L, de Chasseval R, Barraud A, Fondaneche MC, Sanal O, Plebani A, Stephan JL, Hufnagel M, le Deist F, Fischer A, Durandy A, de Villartay JP, Revy P (2006) Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly. *Cell* **124**(2): 287-299
- Buis J, Wu Y, Deng Y, Leddon J, Westfield G, Eckersdorff M, Sekiguchi JM, Chang S, Ferguson DO (2008) Mre11 nuclease activity has essential roles in DNA repair and genomic stability distinct from ATM activation. *Cell* **135**(1): 85-96
- Bunch JT, Bae NS, Leonardi J, Baumann P (2005) Distinct requirements for Pot1 in limiting telomere length and maintaining chromosome stability. *Mol Cell Biol* **25**(13): 5567-5578
- Bundock P, van Attikum H, Hooykaas P (2002) Increased telomere length and hypersensitivity to DNA damaging agents in an Arabidopsis KU70 mutant. *Nucleic Acids Res* **30**(15): 3395-3400
- Byun MY, Hong JP, Kim WT (2008) Identification and characterization of three telomere repeat-binding factors in rice. *Biochem Biophys Res Commun* **372**(1): 85-90

- Caldecott KW (2003) XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)* **2**(9): 955-969
- Caldecott KW (2008) DNA damage responses and neurological disease. Preface. *DNA Repair (Amst)* **7**(7): 1009
- Caldecott KW, Aoufouchi S, Johnson P, Shall S (1996) XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res* **24**(22): 4387-4394
- Callen E, Samper E, Ramirez MJ, Creus A, Marcos R, Ortega JJ, Olive T, Badell I, Blasco MA, Surrallés J (2002) Breaks at telomeres and TRF2-independent end fusions in Fanconi anemia. *Hum Mol Genet* **11**(4): 439-444
- Cantoni O, Murray D, Meyn RE (1987) Induction and repair of DNA single-strand breaks in EM9 mutant CHO cells treated with hydrogen peroxide. *Chem Biol Interact* **63**(1): 29-38
- Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR, 3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH (1998) The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* **93**(3): 477-486
- Carr AM, Schmidt H, Kirchhoff S, Muriel WJ, Sheldrick KS, Griffiths DJ, Basmacioglu CN, Subramani S, Clegg M, Nasim A, *et al.* (1994) The rad16 gene of *Schizosaccharomyces pombe*: a homolog of the RAD1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **14**(3): 2029-2040
- Celli GB, de Lange T (2005) DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat Cell Biol* **7**(7): 712-718
- Celli GB, Denchi EL, de Lange T (2006) Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination. *Nat Cell Biol* **8**(8): 885-890
- Cerosaletti K, Concannon P (2004) Independent roles for nibrin and Mre11-Rad50 in the activation and function of Atm. *J Biol Chem* **279**(37): 38813-38819
- Cerosaletti K, Wright J, Concannon P (2006) Active role for nibrin in the kinetics of atm activation. *Mol Cell Biol* **26**(5): 1691-1699
- Cesare AJ, Griffith JD (2004) Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Mol Cell Biol* **24**(22): 9948-9957
- Cesare AJ, Quinney N, Willcox S, Subramanian D, Griffith JD (2003) Telomere looping in *P. sativum* (common garden pea). *Plant J* **36**(2): 271-279
- Chahwan C, Nakamura TM, Sivakumar S, Russell P, Rhind N (2003) The fission yeast Rad32 (Mre11)-Rad50-Nbs1 complex is required for the S-phase DNA damage checkpoint. *Mol Cell Biol* **23**(18): 6564-6573
- Chai W, Ford LP, Lenertz L, Wright WE, Shay JW (2002) Human Ku70/80 associates physically with telomerase through interaction with hTERT. *J Biol Chem* **277**(49): 47242-47247
- Chai W, Sfeir AJ, Hoshiyama H, Shay JW, Wright WE (2006) The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres. *EMBO Rep* **7**(2): 225-230
- Chen CM, Wang CT, Ho CH (2001a) A plant gene encoding a Myb-like protein that binds telomeric GGTTAG repeats in vitro. *J Biol Chem* **276**(19): 16511-16519

- Chen JL, Blasco MA, Greider CW (2000) Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. *Cell* **100**(5): 503-514
- Chen L, Trujillo K, Ramos W, Sung P, Tomkinson AE (2001b) Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol Cell* **8**(5): 1105-1115
- Chen MJ, Lin YT, Lieberman HB, Chen G, Lee EY (2001c) ATM-dependent phosphorylation of human Rad9 is required for ionizing radiation-induced checkpoint activation. *J Biol Chem* **276**(19): 16580-16586
- Cheung I, Schertzer M, Rose A, Lansdorp PM (2006) High incidence of rapid telomere loss in telomerase-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Nucleic Acids Res* **34**(1): 96-103
- Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P, de Lange T (1995) A human telomeric protein. *Science* **270**(5242): 1663-1667
- Churikov D, Wei C, Price CM (2006) Vertebrate POT1 restricts G-overhang length and prevents activation of a telomeric DNA damage checkpoint but is dispensable for overhang protection. *Mol Cell Biol* **26**(18): 6971-6982
- Ciapponi L, Cenci G, Gatti M (2006) The *Drosophila* Nbs protein functions in multiple pathways for the maintenance of genome stability. *Genetics* **173**(3): 1447-1454
- Ciccia A, Constantinou A, West SC (2003) Identification and characterization of the human mus81-eme1 endonuclease. *J Biol Chem* **278**(27): 25172-25178
- Ciccia A, McDonald N, West SC (2008) Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins. *Annu Rev Biochem* **77**: 259-287
- Cleaver JE (2005) Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer* **5**(7): 564-573
- Cohn M, Blackburn EH (1995) Telomerase in yeast. *Science* **269**(5222): 396-400
- Collins K (2006) The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(7): 484-494
- Compton SA, Choi JH, Cesare AJ, Ozgur S, Griffith JD (2007) Xrcc3 and Nbs1 are required for the production of extrachromosomal telomeric circles in human alternative lengthening of telomere cells. *Cancer Res* **67**(4): 1513-1519
- Cooke HJ, Smith BA (1986) Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 213-219
- Copenhaver GP, Pikaard CS (1996) RFLP and physical mapping with an rDNA-specific endonuclease reveals that nucleolus organizer regions of *Arabidopsis thaliana* adjoin the telomeres on chromosomes 2 and 4. *Plant J* **9**(2): 259-272
- Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S (1992) Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* **11**(5): 1921-1929
- Crabbe L, Verdun RE, Haggblom CI, Karlseder J (2004) Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science* **306**(5703): 1951-1953

- d'Adda di Fagagna F, Hande MP, Tong WM, Roth D, Lansdorp PM, Wang ZQ, Jackson SP (2001) Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Curr Biol* **11**(15): 1192-1196
- d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP (2003) A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**(6963): 194-198
- D'Amours D, Jackson SP (2001) The yeast Xrs2 complex functions in S phase checkpoint regulation. *Genes Dev* **15**(17): 2238-2249
- D'Amours D, Jackson SP (2002) The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(5): 317-327
- Dantzer F, Giraud-Panis MJ, Jaco I, Ame JC, Schultz I, Blasco M, Koering CE, Gilson E, Menissier-de Murcia J, de Murcia G, Schreiber V (2004) Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2. *Mol Cell Biol* **24**(4): 1595-1607
- Davies AA, Friedberg EC, Tomkinson AE, Wood RD, West SC (1995) Role of the Rad1 and Rad10 proteins in nucleotide excision repair and recombination. *J Biol Chem* **270**(42): 24638-24641
- de Jager M, Dronkert ML, Modesti M, Beerens CE, Kanaar R, van Gent DC (2001a) DNA-binding and strand-annealing activities of human Mre11: implications for its roles in DNA double-strand break repair pathways. *Nucleic Acids Res* **29**(6): 1317-1325
- de Jager M, van Noort J, van Gent DC, Dekker C, Kanaar R, Wyman C (2001b) Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol Cell* **8**(5): 1129-1135
- de Jager M, Wyman C, van Gent DC, Kanaar R (2002) DNA end-binding specificity of human Rad50/Mre11 is influenced by ATP. *Nucleic Acids Res* **30**(20): 4425-4431
- de Laat WL, Appeldoorn E, Jaspers NG, Hoeijmakers JH (1998) DNA structural elements required for ERCC1-XPF endonuclease activity. *J Biol Chem* **273**(14): 7835-7842
- de Lange T (2005) Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* **19**(18): 2100-2110
- DeFazio LG, Stansel RM, Griffith JD, Chu G (2002) Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *Embo J* **21**(12): 3192-3200
- Denchi EL, de Lange T (2007) Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* **448**(7157): 1068-1071
- Diede SJ, Gottschling DE (2001) Exonuclease activity is required for sequence addition and Cdc13p loading at a de novo telomere. *Curr Biol* **11**(17): 1336-1340
- Difilippantonio S, Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Reina San Martin B, Van Laethem F, Yang YP, Petukhova GV, Eckhaus M, Feigenbaum L, Manova K, Kruhlak M, Camerini-Otero RD, Sharan S, Nussenzweig M, Nussenzweig A (2005) Role of Nbs1 in the activation of the Atm kinase revealed in humanized mouse models. *Nat Cell Biol* **7**(7): 675-685

- Difilippantonio S, Celeste A, Kruhlak MJ, Lee Y, Difilippantonio MJ, Feigenbaum L, Jackson SP, McKinnon PJ, Nussenzweig A (2007) Distinct domains in Nbs1 regulate irradiation-induced checkpoints and apoptosis. *J Exp Med* **204**(5): 1003-1011
- Dimitrova N, Chen YC, Spector DL, de Lange T (2008) 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* **456**(7221): 524-528
- Ding H, Schertzer M, Wu X, Gertsenstein M, Selig S, Kammori M, Pourvali R, Poon S, Vulto I, Chavez E, Tam PP, Nagy A, Lansdorp PM (2004) Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein. *Cell* **117**(7): 873-886
- Dokal I (2000) Dyskeratosis congenita in all its forms. *Br J Haematol* **110**(4): 768-779
- Doucet-Chabeaud G, Godon C, Brutesco C, de Murcia G, Kazmaier M (2001) Ionising radiation induces the expression of PARP-1 and PARP-2 genes in Arabidopsis. *Mol Genet Genomics* **265**(6): 954-963
- Dubest S, Gallego ME, White CI (2004) Roles of the AtErcc1 protein in recombination. *Plant J* **39**(3): 334-342
- Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR (2000) Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* **26**(4): 447-450
- Duquette ML, Handa P, Vincent JA, Taylor AF, Maizels N (2004) Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. *Genes Dev* **18**(13): 1618-1629
- Dvir A, Peterson SR, Knuth MW, Lu H, Dynan WS (1992) Ku autoantigen is the regulatory component of a template-associated protein kinase that phosphorylates RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(24): 11920-11924
- Dyneke JN, Smith S (2004) Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis. *Science* **304**(5667): 97-100
- Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocci S, Proytcheva M, German J (1995) The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* **83**(4): 655-666
- Espejel S, Franco S, Rodriguez-Perales S, Bouffler SD, Cigudosa JC, Blasco MA (2002a) Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *EMBO J* **21**(9): 2207-2219
- Espejel S, Franco S, Sgura A, Gae D, Bailey SM, Taccioli GE, Blasco MA (2002b) Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance. *EMBO J* **21**(22): 6275-6287
- Espejel S, Martin M, Klatt P, Martin-Caballero J, Flores JM, Blasco MA (2004) Shorter telomeres, accelerated ageing and increased lymphoma in DNA-PKcs-deficient mice. *EMBO Rep* **5**(5): 503-509
- Evans SK, Lundblad V (1999) Est1 and Cdc13 as comediators of telomerase access. *Science* **286**(5437): 117-120
- Evans SK, Lundblad V (2002) The Est1 subunit of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase makes multiple contributions to telomere length maintenance. *Genetics* **162**(3): 1101-1115

- Fajkus J, Kralovics R, Kovarik A, Fajkusova L (1995) The telomeric sequence is directly attached to the HRS60 subtelomeric tandem repeat in tobacco chromosomes. *FEBS Lett* **364**(1): 33-35
- Falzon M, Fewell JW, Kuff EL (1993) EBP-80, a transcription factor closely resembling the human autoantigen Ku, recognizes single- to double-strand transitions in DNA. *J Biol Chem* **268**(14): 10546-10552
- Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, *et al.* (1995) The RNA component of human telomerase. *Science* **269**(5228): 1236-1241
- Ferreira MG, Cooper JP (2001) The fission yeast Taz1 protein protects chromosomes from Ku-dependent end-to-end fusions. *Mol Cell* **7**(1): 55-63
- Fidantsef AL, Mitchell DL, Britt AB (2000) The Arabidopsis UVH1 gene is a homolog of the yeast repair endonuclease RAD1. *Plant Physiol* **124**(2): 579-586
- Fishman-Lobell J, Haber JE (1992) Removal of nonhomologous DNA ends in double-strand break recombination: the role of the yeast ultraviolet repair gene RAD1. *Science* **258**(5081): 480-484
- Fitzgerald MS, Riha K, Gao F, Ren S, McKnight TD, Shippen DE (1999) Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from Arabidopsis inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 14813-14818
- Forsythe HL, Jarvis JL, Turner JW, Elmore LW, Holt SE (2001) Stable association of hsp90 and p23, but Not hsp70, with active human telomerase. *J Biol Chem* **276**(19): 15571-15574
- Francoeur AM, Peebles CL, Gompper PT, Tan EM (1986) Identification of Ki (Ku, p70/p80) autoantigens and analysis of anti-Ki autoantibody reactivity. *J Immunol* **136**(5): 1648-1653
- French JD, Dunn J, Smart CE, Manning N, Brown MA (2006) Disruption of BRCA1 function results in telomere lengthening and increased anaphase bridge formation in immortalized cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* **45**(3): 277-289
- Fujisawa M, Tanaka H, Tatsumi N, Okada H, Arakawa S, Kamidono S (1998) Telomerase activity in the testis of infertile patients with selected causes. *Hum Reprod* **13**(6): 1476-1479
- Furuse M, Nagase Y, Tsubouchi H, Murakami-Murofushi K, Shibata T, Ohta K (1998) Distinct roles of two separable in vitro activities of yeast Mre11 in mitotic and meiotic recombination. *EMBO J* **17**(21): 6412-6425
- Gallego ME, Bleuyard JY, Daoudal-Cotterell S, Jallut N, White CI (2003a) Ku80 plays a role in non-homologous recombination but is not required for T-DNA integration in Arabidopsis. *Plant J* **35**(5): 557-565
- Gallego ME, Jallut N, White CI (2003b) Telomerase dependence of telomere lengthening in Ku80 mutant Arabidopsis. *Plant Cell* **15**(3): 782-789
- Gallego ME, Jeanneau M, Granier F, Bouchez D, Bechtold N, White CI (2001) Disruption of the Arabidopsis RAD50 gene leads to plant sterility and MMS sensitivity. *Plant J* **25**(1): 31-41
- Gallego ME, White CI (2001) RAD50 function is essential for telomere maintenance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1711-1716

- Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, Meyn MS, Timmers C, Hejna J, Grompe M, D'Andrea AD (2001) Interaction of the Fanconi anemia proteins and BRCA1 in a common pathway. *Mol Cell* **7**(2): 249-262
- Garvik B, Carson M, Hartwell L (1995) Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Mol Cell Biol* **15**(11): 6128-6138
- Gherbi H, Gallego ME, Jalut N, Lucht JM, Hohn B, White CI (2001) Homologous recombination in *planta* is stimulated in the absence of Rad50. *EMBO Rep* **2**(4): 287-291
- Ghosal G, Muniyappa K (2005) *Saccharomyces cerevisiae* Mre11 is a high-affinity G4 DNA-binding protein and a G-rich DNA-specific endonuclease: implications for replication of telomeric DNA. *Nucleic Acids Res* **33**(15): 4692-4703
- Gilley D, Tanaka H, Hande MP, Kurimasa A, Li GC, Oshimura M, Chen DJ (2001) DNA-PKcs is critical for telomere capping. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 15084-15088
- Gomez M, Wu J, Schreiber V, Dunlap J, Dantzer F, Wang Y, Liu Y (2006) PARP1 is a TRF2-associated poly(ADP-ribose)polymerase and protects eroded telomeres. *Mol Biol Cell* **17**(4): 1686-1696
- Gorski MM, Romeijn RJ, Eeken JC, de Jong AW, van Veen BL, Szuhai K, Mullenders LH, Ferro W, Pastink A (2004) Disruption of *Drosophila* Rad50 causes pupal lethality, the accumulation of DNA double-strand breaks and the induction of apoptosis in third instar larvae. *DNA Repair (Amst)* **3**(6): 603-615
- Gottlieb TM, Jackson SP (1993) The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**(1): 131-142
- Gottschling DE, Aparicio OM, Billington BL, Zakian VA (1990) Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell* **63**(4): 751-762
- Gowan SM, Heald R, Stevens MF, Kelland LR (2001) Potent inhibition of telomerase by small-molecule pentacyclic acridines capable of interacting with G-quadruplexes. *Mol Pharmacol* **60**(5): 981-988
- Granotier C, Pennarun G, Riou L, Hoffschir F, Gauthier LR, De Cian A, Gomez D, Mandine E, Riou JF, Mergny JL, Mailliet P, Dutrillaux B, Boussin FD (2005) Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends. *Nucleic Acids Res* **33**(13): 4182-4190
- Greenwell PW, Kronmal SL, Porter SE, Gassenhuber J, Obermaier B, Petes TD (1995) TEL1, a gene involved in controlling telomere length in *S. cerevisiae*, is homologous to the human ataxia telangiectasia gene. *Cell* **82**(5): 823-829
- Greider CW, Blackburn EH (1985) Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* **43**(2 Pt 1): 405-413
- Greider CW, Blackburn EH (1987) The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**(6): 887-898
- Greider CW, Blackburn EH (1989) A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* **337**(6205): 331-337
- Greider CW, Blackburn EH (1996) Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am* **274**(2): 92-97

- Grenon M, Gilbert C, Lowndes NF (2001) Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. *Nat Cell Biol* **3**(9): 844-847
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T (1999) Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* **97**(4): 503-514
- Gu Y, Jin S, Gao Y, Weaver DT, Alt FW (1997) Ku70-deficient embryonic stem cells have increased ionizing radiosensitivity, defective DNA end-binding activity, and inability to support V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(15): 8076-8081
- Guillet M, Boiteux S (2002) Endogenous DNA abasic sites cause cell death in the absence of Apn1, Apn2 and Rad1/Rad10 in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **21**(11): 2833-2841
- Guirouilh-Barbat J, Huck S, Bertrand P, Pirzio L, Desmaze C, Sabatier L, Lopez BS (2004) Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol Cell* **14**(5): 611-623
- Guo X, Deng Y, Lin Y, Cosme-Blanco W, Chan S, He H, Yuan G, Brown EJ, Chang S (2007) Dysfunctional telomeres activate an ATM-ATR-dependent DNA damage response to suppress tumorigenesis. *EMBO J* **26**(22): 4709-4719
- Guzder SN, Torres-Ramos C, Johnson RE, Haracska L, Prakash L, Prakash S (2004) Requirement of yeast Rad1-Rad10 nuclease for the removal of 3'-blocked termini from DNA strand breaks induced by reactive oxygen species. *Genes Dev* **18**(18): 2283-2291
- Hackett JA, Feldser DM, Greider CW (2001) Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell* **106**(3): 275-286
- Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M, Weinberg RA (1999) Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* **5**(10): 1164-1170
- Hammarsten O, Chu G (1998) DNA-dependent protein kinase: DNA binding and activation in the absence of Ku. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(2): 525-530
- Hanakahi LA, Sun H, Maizels N (1999) High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA. *J Biol Chem* **274**(22): 15908-15912
- Hanaoka S, Nagadoi A, Yoshimura S, Aimoto S, Li B, de Lange T, Nishimura Y (2001) NMR structure of the hRap1 Myb motif reveals a canonical three-helix bundle lacking the positive surface charge typical of Myb DNA-binding domains. *J Mol Biol* **312**(1): 167-175
- Hande P, Slijepcevic P, Silver A, Bouffler S, van Buul P, Bryant P, Lansdorp P (1999) Elongated telomeres in scid mice. *Genomics* **56**(2): 221-223
- Hanson H, Mathew CG, Docherty Z, Mackie Ogilvie C (2001) Telomere shortening in Fanconi anaemia demonstrated by a direct FISH approach. *Cytogenet Cell Genet* **93**(3-4): 203-206
- Harle-Bachor C, Boukamp P (1996) Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6476-6481
- Harley CB (2002) Telomerase is not an oncogene. *Oncogene* **21**(4): 494-502

- Harley CB, Futcher AB, Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**(6274): 458-460
- Hartsuiker E, Vaessen E, Carr AM, Kohli J (2001) Fission yeast Rad50 stimulates sister chromatid recombination and links cohesion with repair. *EMBO J* **20**(23): 6660-6671
- Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC (1990) Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* **346**(6287): 866-868
- Hausmann MF, Winkler DW, O'Reilly KM, Huntington CE, Nisbet IC, Vleck CM (2003) Telomeres shorten more slowly in long-lived birds and mammals than in short-lived ones. *Proc Biol Sci* **270**(1522): 1387-1392
- Hayflick L (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**: 614-636
- Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**: 585-621
- He H, Multani AS, Cosme-Blanco W, Tahara H, Ma J, Pathak S, Deng Y, Chang S (2006) POT1b protects telomeres from end-to-end chromosomal fusions and aberrant homologous recombination. *EMBO J* **25**(21): 5180-5190
- Heacock M, Spangler E, Riha K, Puizina J, Shippen DE (2004) Molecular analysis of telomere fusions in Arabidopsis: multiple pathways for chromosome end-joining. *Embo J* **23**(11): 2304-2313
- Heacock ML, Idol RA, Friesner JD, Britt AB, Shippen DE (2007) Telomere dynamics and fusion of critically shortened telomeres in plants lacking DNA ligase IV. *Nucleic Acids Res* **35**(19): 6490-6500
- Heller-Uszynska K, Schnippenkoetter W, Kilian A (2002) Cloning and characterization of rice (*Oryza sativa* L) telomerase reverse transcriptase, which reveals complex splicing patterns. *Plant J* **31**(1): 75-86
- Hemann MT, Greider CW (1999) G-strand overhangs on telomeres in telomerase-deficient mouse cells. *Nucleic Acids Res* **27**(20): 3964-3969
- Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR (2002) Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* **21**(4): 598-610
- Hentges P, Ahnesorg P, Pitcher RS, Bruce CK, Kysela B, Green AJ, Bianchi J, Wilson TE, Jackson SP, Doherty AJ (2006) Evolutionary and functional conservation of the DNA non-homologous end-joining protein, XLF/Cernunnos. *J Biol Chem* **281**(49): 37517-37526
- Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM (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): 501-513
- Hirano T (2002) The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev* **16**(4): 399-414
- Hockemeyer D, Daniels JP, Takai H, de Lange T (2006) Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell* **126**(1): 63-77

- Hockemeyer D, Sfeir AJ, Shay JW, Wright WE, de Lange T (2005) POT1 protects telomeres from a transient DNA damage response and determines how human chromosomes end. *EMBO J* **24**(14): 2667-2678
- Hoeijmakers JH (2001) DNA repair mechanisms. *Maturitas* **38**(1): 17-22; discussion 22-13
- Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, Trager JB, Morin GB, Toft DO, Shay JW, Wright WE, White MA (1999) Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev* **13**(7): 817-826
- Hong JP, Byun MY, Koo DH, An K, Bang JW, Chung IK, An G, Kim WT (2007) Suppression of RICE TELOMERE BINDING PROTEIN 1 results in severe and gradual developmental defects accompanied by genome instability in rice. *Plant Cell* **19**(6): 1770-1781
- Hooykaas PJ, Schilperoort RA (1992) Agrobacterium and plant genetic engineering. *Plant Mol Biol* **19**(1): 15-38
- Hopfner KP, Karcher A, Shin DS, Craig L, Arthur LM, Carney JP, Tainer JA (2000) Structural biology of Rad50 ATPase: ATP-driven conformational control in DNA double-strand break repair and the ABC-ATPase superfamily. *Cell* **101**(7): 789-800
- Hornsby PJ (2006) Short telomeres: cause or consequence of aging? *Aging Cell* **5**(6): 577-578
- Hsia KT, Millar MR, King S, Selfridge J, Redhead NJ, Melton DW, Saunders PT (2003) DNA repair gene Ercc1 is essential for normal spermatogenesis and oogenesis and for functional integrity of germ cell DNA in the mouse. *Development* **130**(2): 369-378
- Hsu HL, Gilley D, Blackburn EH, Chen DJ (1999) Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(22): 12454-12458
- Hsu HL, Gilley D, Galande SA, Hande MP, Allen B, Kim SH, Li GC, Campisi J, Kohwi-Shigematsu T, Chen DJ (2000) Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev* **14**(22): 2807-2812
- Huang J, Dynan WS (2002) Reconstitution of the mammalian DNA double-strand break end-joining reaction reveals a requirement for an Mre11/Rad50/NBS1-containing fraction. *Nucleic Acids Res* **30**(3): 667-674
- Hwang MG, Cho MH (2007) Arabidopsis thaliana telomeric DNA-binding protein 1 is required for telomere length homeostasis and its Myb-extension domain stabilizes plant telomeric DNA binding. *Nucleic Acids Res* **35**(4): 1333-1342
- Ip SC, Rass U, Blanco MG, Flynn HR, Skehel JM, West SC (2008) Identification of Holliday junction resolvases from humans and yeast. *Nature* **456**(7220): 357-361
- Ivanov EL, Haber JE (1995) RAD1 and RAD10, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **15**(4): 2245-2251
- Ivanov EL, Sugawara N, White CI, Fabre F, Haber JE (1994) Mutations in XRS2 and RAD50 delay but do not prevent mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **14**(5): 3414-3425
- Iwano T, Tachibana M, Reth M, Shinkai Y (2004) Importance of TRF1 for functional telomere structure. *J Biol Chem* **279**(2): 1442-1448

- Jaco I, Munoz P, Blasco MA (2004) Role of human Ku86 in telomere length maintenance and telomere capping. *Cancer Res* **64**(20): 7271-7278
- Jaco I, Munoz P, Goytisolo F, Wesoly J, Bailey S, Taccioli G, Blasco MA (2003) Role of mammalian Rad54 in telomere length maintenance. *Mol Cell Biol* **23**(16): 5572-5580
- Jacob NK, Skopp R, Price CM (2001) G-overhang dynamics at Tetrahymena telomeres. *EMBO J* **20**(15): 4299-4308
- Jaspers NG, Raams A, Silengo MC, Wijgers N, Niedernhofer LJ, Robinson AR, Giglia-Mari G, Hoogstraten D, Kleijer WJ, Hoeijmakers JH, Vermeulen W (2007) First reported patient with human ERCC1 deficiency has cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome with a mild defect in nucleotide excision repair and severe developmental failure. *Am J Hum Genet* **80**(3): 457-466
- Jones JM, Gellert M, Yang W (2001) A Ku bridge over broken DNA. *Structure (Camb)* **9**(10): 881-884
- Kabotyanski EB, Gomelsky L, Han JO, Stamato TD, Roth DB (1998) Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic Acids Res* **26**(23): 5333-5342
- Kakuo S, Asaoka K, Ide T (1999) Human is a unique species among primates in terms of telomere length. *Biochem Biophys Res Commun* **263**(2): 308-314
- Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC (1998) Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol* **8**(12): 483-489
- Kanaar R, Wyman C (2008) DNA repair by the MRN complex: break it to make it. *Cell* **135**(1): 14-16
- Kannan K, Nelson AD, Shippen DE (2008) Dyskerin is a component of the Arabidopsis telomerase RNP required for telomere maintenance. *Mol Cell Biol* **28**(7): 2332-2341
- Karamysheva ZN, Surovtseva YV, Vespa L, Shakirov EV, Shippen DE (2004) A C-terminal Myb extension domain defines a novel family of double-strand telomeric DNA-binding proteins in Arabidopsis. *J Biol Chem* **279**(46): 47799-47807
- Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T (1999) p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* **283**(5406): 1321-1325
- Kelleher C, Kurth I, Lingner J (2005) Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro. *Mol Cell Biol* **25**(2): 808-818
- Kim H, You S, Farris J, Kong BW, Christman SA, Foster LK, Foster DN (2002) Expression profiles of p53-, p16(INK4a)-, and telomere-regulating genes in replicative senescent primary human, mouse, and chicken fibroblast cells. *Exp Cell Res* **272**(2): 199-208
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **266**(5193): 2011-2015
- Kim SH, Beausejour C, Davalos AR, Kaminker P, Heo SJ, Campisi J (2004) TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *J Biol Chem* **279**(42): 43799-43804
- Kim SH, Kaminker P, Campisi J (1999) TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* **23**(4): 405-412

- Koering CE, Pollice A, Zibella MP, Bauwens S, Puisieux A, Brunori M, Brun C, Martins L, Sabatier L, Pulitzer JF, Gilson E (2002) Human telomeric position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity. *EMBO Rep* **3**(11): 1055-1061
- Kondo S, Satoh Y, Kuroki T (1989) Reduced levels of UV-induced unscheduled DNA synthesis in epidermal keratinocytes of patients with xeroderma pigmentosum and correlation with development of skin neoplasms. *Cancer Res* **49**(8): 1927-1930
- Kozlov S, Gueven N, Keating K, Ramsay J, Lavin MF (2003) ATP activates ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in vitro. Importance of autophosphorylation. *J Biol Chem* **278**(11): 9309-9317
- Krogh BO, Symington LS (2004) Recombination proteins in yeast. *Annu Rev Genet* **38**: 233-271
- Kuchar M, Fajkus J (2004) Interactions of putative telomere-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*: identification of functional TRF2 homolog in plants. *FEBS Lett* **578**(3): 311-315
- Kumagai-Sano F, Hayashi T, Sano T, Hasezawa S (2006) Cell cycle synchronization of tobacco BY-2 cells. *Nat Protoc* **1**(6): 2621-7
- Larrivee M, LeBel C, Wellinger RJ (2004) The generation of proper constitutive G-tails on yeast telomeres is dependent on the MRX complex. *Genes Dev* **18**(12): 1391-1396
- Le S, Moore JK, Haber JE, Greider CW (1999) RAD50 and RAD51 define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* **152**(1): 143-152
- Lebofsky R, Bensimon A (2003) Single DNA molecule analysis: applications of molecular combing. *Brief Funct Genomic Proteomic* **1**: 385-96.
- Lee GE, Yu EY, Cho CH, Lee J, Muller MT, Chung IK (2004) DNA-protein kinase catalytic subunit-interacting protein KIP binds telomerase by interacting with human telomerase reverse transcriptase. *J Biol Chem* **279**(33): 34750-34755
- Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW, 2nd, Greider CW, DePinho RA (1998) Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* **392**(6676): 569-574
- Lee JH, Paull TT (2004) Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* **304**(5667): 93-96
- Lees-Miller SP, Meek K (2003) Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie* **85**(11): 1161-1173
- Lei M, Podell ER, Cech TR (2004) Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nat Struct Mol Biol* **11**(12): 1223-1229
- Lei M, Zaug AJ, Podell ER, Cech TR (2005) Switching human telomerase on and off with hPOT1 protein in vitro. *J Biol Chem* **280**(21): 20449-20456
- Lenain C, Bauwens S, Amiard S, Brunori M, Giraud-Panis MJ, Gilson E (2006) The Apollo 5' exonuclease functions together with TRF2 to protect telomeres from DNA repair. *Curr Biol* **16**(13): 1303-1310
- Lendvay TS, Morris DK, Sah J, Balasubramanian B, Lundblad V (1996) Senescence mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a defect in telomere replication identify three additional EST genes. *Genetics* **144**(4): 1399-1412

- Leonardi J, Box JA, Bunch JT, Baumann P (2008) TER1, the RNA subunit of fission yeast telomerase. *Nat Struct Mol Biol* **15**(1): 26-33
- Lermontova I, Schubert V, Bornke F, Macas J, Schubert I (2007) Arabidopsis CBF5 interacts with the H/ACA snoRNP assembly factor NAF1. *Plant Mol Biol* **65**(5): 615-626
- Lewis LK, Karthikeyan G, Westmoreland JW, Resnick MA (2002) Differential suppression of DNA repair deficiencies of Yeast rad50, mre11 and xrs2 mutants by EXO1 and TLC1 (the RNA component of telomerase). *Genetics* **160**(1): 49-62
- Li B, de Lange T (2003) Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. *Mol Biol Cell* **14**(12): 5060-5068
- Li B, Lustig AJ (1996) A novel mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**(11): 1310-1326
- Li B, Oestreich S, de Lange T (2000) Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* **101**(5): 471-483
- Liang F, Jasin M (1996) Ku80-deficient cells exhibit excess degradation of extrachromosomal DNA. *J Biol Chem* **271**(24): 14405-14411
- Lingner J, Cooper JP, Cech TR (1995) Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? *Science* **269**(5230): 1533-1534
- Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR (1997) Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* **276**(5312): 561-567
- Liu D, O'Connor MS, Qin J, Songyang Z (2004) Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J Biol Chem* **279**(49): 51338-51342
- Liu Y, Tarsounas M, O'Regan P, West SC (2007) Role of RAD51C and XRCC3 in genetic recombination and DNA repair. *J Biol Chem* **282**(3): 1973-1979
- Loayza D, De Lange T (2003) POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* **423**(6943): 1013-1018
- Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW (2005) DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* **120**(4): 497-512
- Londono-Vallejo JA, Der-Sarkissian H, Cazes L, Bacchetti S, Reddel RR (2004) Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange. *Cancer Res* **64**(7): 2324-2327
- Longhese MP, Paciotti V, Neecke H, Lucchini G (2000) Checkpoint proteins influence telomeric silencing and length maintenance in budding yeast. *Genetics* **155**(4): 1577-1591
- Lu H, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (2007) Length-dependent binding of human XLF to DNA and stimulation of XRCC4.DNA ligase IV activity. *J Biol Chem* **282**(15): 11155-11162
- Lundblad V, Blackburn EH (1990) RNA-dependent polymerase motifs in EST1: tentative identification of a protein component of an essential yeast telomerase. *Cell* **60**(4): 529-530

- Lundblad V, Blackburn EH (1993) An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* **73**(2): 347-360
- Lundblad V, Szostak JW (1989) A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* **57**(4): 633-643
- Luo G, Yao MS, Bender CF, Mills M, Bladl AR, Bradley A, Petrini JH (1999) Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(13): 7376-7381
- Lustig AJ (2001) Cdc13 subcomplexes regulate multiple telomere functions. *Nat Struct Biol* **8**(4): 297-299
- Lustig AJ (2003) Clues to catastrophic telomere loss in mammals from yeast telomere rapid deletion. *Nat Rev Genet* **4**(11): 916-923
- Lustig AJ, Petes TD (1986) Identification of yeast mutants with altered telomere structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(5): 1398-1402
- Luzzatto L, Karadimitris A (1998) Dyskeratosis and ribosomal rebellion. *Nat Genet* **19**(1): 6-7
- Lydeard JR, Jain S, Yamaguchi M, Haber JE (2007) Break-induced replication and telomerase-independent telomere maintenance require Pol32. *Nature* **448**(7155): 820-823
- Ma JL, Kim EM, Haber JE, Lee SE (2003) Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences. *Mol Cell Biol* **23**(23): 8820-8828
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR (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): 781-794
- Maceluch J, Kmiecik M, Szweykowska-Kulinska Z, Jarmolowski A (2001) Cloning and characterization of Arabidopsis thaliana AtNAP57--a homologue of yeast pseudouridine synthase Cbf5p. *Acta Biochim Pol* **48**(3): 699-709
- Maillet G, White CI, Gallego ME (2006) Telomere-length regulation in inter-ecotype crosses of Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **62**(6): 859-866
- Makarov VL, Hirose Y, Langmore JP (1997) Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* **88**(5): 657-666
- Marcand S, Gilson E, Shore D (1997) A protein-counting mechanism for telomere length regulation in yeast. *Science* **275**(5302): 986-990
- Marian CO, Bordoli SJ, Goltz M, Santarella RA, Jackson LP, Danilevskaya O, Beckstette M, Meeley R, Bass HW (2003) The maize Single myb histone 1 gene, Smh1, belongs to a novel gene family and encodes a protein that binds telomere DNA repeats in vitro. *Plant Physiol* **133**(3): 1336-1350
- Maringele L, Lydall D (2002) EXO1-dependent single-stranded DNA at telomeres activates subsets of DNA damage and spindle checkpoint pathways in budding yeast yku70Delta mutants. *Genes Dev* **16**(15): 1919-1933
- Martin SG, Laroche T, Suka N, Grunstein M, Gasser SM (1999) Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell* **97**(5): 621-633

- Maser RS, Wong KK, Sahin E, Xia H, Naylor M, Hedberg HM, Artandi SE, DePinho RA (2007) DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is not required for dysfunctional telomere fusion and checkpoint response in the telomerase-deficient mouse. *Mol Cell Biol* **27**(6): 2253-2265
- Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* **18**(6): 3563-3571
- 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
- McClintock B (1941) The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics* **26**(2): 234-282
- McEachern MJ, Haber JE (2006) Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annu Rev Biochem* **75**: 111-135
- McElligott R, Wellinger RJ (1997) The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J* **16**(12): 3705-3714
- McPherson JP, Hande MP, Poonepalli A, Lemmers B, Zablocki E, Migon E, Shehabeldin A, Porras A, Karaskova J, Vukovic B, Squire J, Hakem R (2006) A role for Brca1 in chromosome end maintenance. *Hum Mol Genet* **15**(6): 831-838
- Meek K, Gupta S, Ramsden DA, Lees-Miller SP (2004) The DNA-dependent protein kinase: the director at the end. *Immunol Rev* **200**: 132-141
- Melnikova L, Biessmann H, Georgiev P (2005) The Ku protein complex is involved in length regulation of Drosophila telomeres. *Genetics* **170**(1): 221-235
- Menges M, Hennig L, Gruissem W, Murray JA (2003) Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension. *Plant Mol Biol* **53**(4): 423-442
- Meyne J, Moyzis RK (1994) In situ hybridization using synthetic oligomers as probes for centromere and telomere repeats. *Methods Mol Biol* **33**: 63-74
- Miller KM, Ferreira MG, Cooper JP (2005) Taz1, Rap1 and Rif1 act both interdependently and independently to maintain telomeres. *EMBO J* **24**(17): 3128-3135
- Milne GT, Jin S, Shannon KB, Weaver DT (1996) Mutations in two Ku homologs define a DNA end-joining repair pathway in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol* **16**(8): 4189-4198
- Mimori T, Hardin JA (1986) Mechanism of interaction between Ku protein and DNA. *J Biol Chem* **261**(22): 10375-10379
- Mimori T, Hardin JA, Steitz JA (1986) Characterization of the DNA-binding protein antigen Ku recognized by autoantibodies from patients with rheumatic disorders. *J Biol Chem* **261**(5): 2274-2278
- Mitchell JR, Collins K (2000) Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell* **6**(2): 361-371
- Mitchell JR, Wood E, Collins K (1999) A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* **402**(6761): 551-555

- Mitton-Fry RM, Anderson EM, Hughes TR, Lundblad V, Wuttke DS (2002) Conserved structure for single-stranded telomeric DNA recognition. *Science* **296**(5565): 145-147
- Miyoshi T, Kanoh J, Saito M, Ishikawa F (2008) Fission yeast Pot1-Tpp1 protects telomeres and regulates telomere length. *Science* **320**(5881): 1341-1344
- Mokros P, Vrbsky J, Siroky J (2006) Identification of chromosomal fusion sites in Arabidopsis mutants using sequential bicolour BAC-FISH. *Genome* **49**(8): 1036-1042
- Moore JK, Haber JE (1996) Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**(5): 2164-2173
- Moreau S, Morgan EA, Symington LS (2001) Overlapping functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Mre11, Exo1 and Rad27 nucleases in DNA metabolism. *Genetics* **159**(4): 1423-1433
- Morin GB (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* **59**(3): 521-529
- Muftuoglu M, Wong HK, Imam SZ, Wilson DM, 3rd, Bohr VA, Opresko PL (2006) Telomere repeat binding factor 2 interacts with base excision repair proteins and stimulates DNA synthesis by DNA polymerase beta. *Cancer Res* **66**(1): 113-124
- Munoz P, Blanco R, Flores JM, Blasco MA (2005) XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer. *Nat Genet* **37**(10): 1063-1071
- Munoz-Jordan JL, Cross GA, de Lange T, Griffith JD (2001) t-loops at trypanosome telomeres. *EMBO J* **20**(3): 579-588
- Murti KG, Prescott DM (1999) Telomeres of polytene chromosomes in a ciliated protozoan terminate in duplex DNA loops. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25): 14436-14439
- Myung K, Ghosh G, Fattah FJ, Li G, Kim H, Dutia A, Pak E, Smith S, Hendrickson EA (2004) Regulation of telomere length and suppression of genomic instability in human somatic cells by Ku86. *Mol Cell Biol* **24**(11): 5050-5059
- Nairz K, Klein F (1997) mre11S--a yeast mutation that blocks double-strand-break processing and permits nonhomologous synapsis in meiosis. *Genes Dev* **11**(17): 2272-2290
- Nakada D, Matsumoto K, Sugimoto K (2003) ATM-related Tel1 associates with double-strand breaks through an Xrs2-dependent mechanism. *Genes Dev* **17**(16): 1957-1962
- Nakamura TM, Cooper JP, Cech TR (1998) Two modes of survival of fission yeast without telomerase. *Science* **282**(5388): 493-496
- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR (1997) Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* **277**(5328): 955-959
- Nakamura TM, Moser BA, Russell P (2002) Telomere binding of checkpoint sensor and DNA repair proteins contributes to maintenance of functional fission yeast telomeres. *Genetics* **161**(4): 1437-1452
- Nassif N, Penney J, Pal S, Engels WR, Gloor GB (1994) Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair. *Mol Cell Biol* **14**(3): 1613-1625

- Natarajan S, Groff-Vindman C, McEachern MJ (2003) Factors influencing the recombinational expansion and spread of telomeric tandem arrays in *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot Cell* **2**(5): 1115-1127
- Natarajan S, McEachern MJ (2002) Recombinational telomere elongation promoted by DNA circles. *Mol Cell Biol* **22**(13): 4512-4521
- Neidle S, Parkinson GN (2003) The structure of telomeric DNA. *Curr Opin Struct Biol* **13**(3): 275-283
- Niedernhofer LJ, Garinis GA, Raams A, Lalai AS, Robinson AR, Appeldoorn E, Odijk H, Oostendorp R, Ahmad A, van Leeuwen W, Theil AF, Vermeulen W, van der Horst GT, Meinecke P, Kleijer WJ, Vijg J, Jaspers NG, Hoeijmakers JH (2006) A new progeroid syndrome reveals that genotoxic stress suppresses the somatotroph axis. *Nature* **444**(7122): 1038-1043
- Niida H, Matsumoto T, Satoh H, Shiwa M, Tokutake Y, Furuichi Y, Shinkai Y (1998) Severe growth defect in mouse cells lacking the telomerase RNA component. *Nat Genet* **19**(2): 203-206
- Nishino T, Komori K, Ishino Y, Morikawa K (2003) X-ray and biochemical anatomy of an archaeal XPF/Rad1/Mus81 family nuclease: similarity between its endonuclease domain and restriction enzymes. *Structure* **11**(4): 445-457
- Nugent CI, Bosco G, Ross LO, Evans SK, Salinger AP, Moore JK, Haber JE, Lundblad V (1998) Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr Biol* **8**(11): 657-660
- Nugent CI, Hughes TR, Lue NF, Lundblad V (1996) Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* **274**(5285): 249-252
- Nugent CI, Lundblad V (1998) The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev* **12**(8): 1073-1085
- Nunez F, Chipchase MD, Clarke AR, Melton DW (2000) Nucleotide excision repair gene (ERCC1) deficiency causes G(2) arrest in hepatocytes and a reduction in liver binucleation: the role of p53 and p21. *FASEB J* **14**(9): 1073-1082
- O'Connor MS, Safari A, Liu D, Qin J, Songyang Z (2004) The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. *J Biol Chem* **279**(27): 28585-28591
- O'Connor MS, Safari A, Xin H, Liu D, Songyang Z (2006) A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(32): 11874-11879
- Oguchi K, Liu H, Tamura K, Takahashi H (1999) Molecular cloning and characterization of AtTERT, a telomerase reverse transcriptase homolog in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **457**(3): 465-469
- Oikawa S, Tada-Oikawa S, Kawanishi S (2001) Site-specific DNA damage at the GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening. *Biochemistry* **40**(15): 4763-4768
- Okabe J, Eguchi A, Masago A, Hayakawa T, Nakanishi M (2000) TRF1 is a critical trans-acting factor required for de novo telomere formation in human cells. *Hum Mol Genet* **9**(18): 2639-2650
- Okamoto K, Iwano T, Tachibana M, Shinkai Y (2008) Distinct roles of TRF1 in the regulation of telomere structure and lengthening. *J Biol Chem* **283**(35): 23981-23988

- Olovnikov AM (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): 181-190
- Opresko PL, Mason PA, Podell ER, Lei M, Hickson ID, Cech TR, Bohr VA (2005) POT1 stimulates RecQ helicases WRN and BLM to unwind telomeric DNA substrates. *J Biol Chem* **280**(37): 32069-32080
- Opresko PL, von Kobbe C, Laine JP, Harrigan J, Hickson ID, Bohr VA (2002) Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *J Biol Chem* **277**(43): 41110-41119
- Paillard S, Strauss F (1991) Analysis of the mechanism of interaction of simian Ku protein with DNA. *Nucleic Acids Res* **19**(20): 5619-5624
- Palm W, de Lange T (2008) How shelterin protects Mammalian telomeres. *Annu Rev Genet* **42**: 301-334
- Pandita RK, Sharma GG, Laszlo A, Hopkins KM, Davey S, Chakhparonian M, Gupta A, Wellinger RJ, Zhang J, Powell SN, Roti Roti JL, Lieberman HB, Pandita TK (2006) Mammalian Rad9 plays a role in telomere stability, S- and G2-phase-specific cell survival, and homologous recombinational repair. *Mol Cell Biol* **26**(5): 1850-1864
- Paques F, Haber JE (1997) Two pathways for removal of nonhomologous DNA ends during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**(11): 6765-6771
- Paques F, Haber JE (1999) Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(2): 349-404
- Pardo B, Marcand S (2005) Rap1 prevents telomere fusions by nonhomologous end joining. *EMBO J* **24**(17): 3117-3127
- Park CH, Bessho T, Matsunaga T, Sancar A (1995) Purification and characterization of the XPF-ERCC1 complex of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem* **270**(39): 22657-22660
- Parkinson GN, Lee MP, Neidle S (2002) Crystal structure of parallel quadruplexes from human telomeric DNA. *Nature* **417**(6891): 876-880
- Paull TT, Gellert M (1998) The 3' to 5' exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol Cell* **1**(7): 969-979
- Paull TT, Gellert M (1999) Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex. *Genes Dev* **13**(10): 1276-1288
- Pennock E, Buckley K, Lundblad V (2001) Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell* **104**(3): 387-396
- Pich U, Fuchs J, Schubert I (1996) How do Alliaceae stabilize their chromosome ends in the absence of TTTAGGG sequences? *Chromosome Res* **4**(3): 207-213
- Pich U, Schubert I (1998) Terminal heterochromatin and alternative telomeric sequences in *Allium cepa*. *Chromosome Res* **6**(4): 315-321

- Pingoud A, Fuxreiter M, Pingoud V, Wende W (2005) Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell Mol Life Sci* **62**(6): 685-707
- Porter SE, Greenwell PW, Ritchie KB, Petes TD (1996) The DNA-binding protein Hdf1p (a putative Ku homologue) is required for maintaining normal telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **24**(4): 582-585
- Prasher JM, Lalai AS, Heijmans-Antonissen C, Ploemacher RE, Hoeijmakers JH, Touw IP, Niedernhofer LJ (2005) Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient *Ercc1*^{-/-} mice. *EMBO J* **24**(4): 861-871
- Puizina J, Siroky J, Mokros P, Schweizer D, Riha K (2004) Mre11 deficiency in *Arabidopsis* is associated with chromosomal instability in somatic cells and Spo11-dependent genome fragmentation during meiosis. *Plant Cell* **16**(8): 1968-1978
- Puizina J, Weiss-Schneeweiss H, Pedrosa-Harand A, Kamenjarin J, Trinajstić I, Riha K, Schweizer D (2003) Karyotype analysis in *Hyacinthella dalmatica* (Hyacinthaceae) reveals vertebrate-type telomere repeats at the chromosome ends. *Genome* **46**(6): 1070-1076
- Purdy A, Su TT (2004) Telomeres: not all breaks are equal. *Curr Biol* **14**(15): R613-614
- Qi L, Strong MA, Karim BO, Armanios M, Huso DL, Greider CW (2003) Short telomeres and ataxia-telangiectasia mutated deficiency cooperatively increase telomere dysfunction and suppress tumorigenesis. *Cancer Res* **63**(23): 8188-8196
- Raices M, Verdun RE, Compton SA, Haggblom CI, Griffith JD, Dillin A, Karlseder J (2008) *C. elegans* telomeres contain G-strand and C-strand overhangs that are bound by distinct proteins. *Cell* **132**(5): 745-757
- Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, Rohde JM, Passons C, Shay JW, Wright WE (2001) Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes Dev* **15**(4): 398-403
- Ranganathan V, Heine WF, Ciccone DN, Rudolph KL, Wu X, Chang S, Hai H, Ahearn IM, Livingston DM, Resnick I, Rosen F, Seemanova E, Jarolim P, DePinho RA, Weaver DT (2001) Rescue of a telomere length defect of Nijmegen breakage syndrome cells requires NBS and telomerase catalytic subunit. *Curr Biol* **11**(12): 962-966
- Raymond WE, Kleckner N (1993) RAD50 protein of *S.cerevisiae* exhibits ATP-dependent DNA binding. *Nucleic Acids Res* **21**(16): 3851-3856
- Reeves WH (1985) Use of monoclonal antibodies for the characterization of novel DNA-binding proteins recognized by human autoimmune sera. *J Exp Med* **161**(1): 18-39
- Reichenbach P, Hoss M, Azzalin CM, Nabholz M, Bucher P, Lingner J (2003) A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed. *Curr Biol* **13**(7): 568-574
- Reynolds RJ, Friedberg EC (1981) Molecular mechanisms of pyrimidine dimer excision in *Saccharomyces cerevisiae*: incision of ultraviolet-irradiated deoxyribonucleic acid in vivo. *J Bacteriol* **146**(2): 692-704
- Richards EJ, Ausubel FM (1988) Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **53**(1): 127-136

- Riha K, McKnight TD, Fajkus J, Vyskot B, Shippen DE (2000) Analysis of the G-overhang structures on plant telomeres: evidence for two distinct telomere architectures. *Plant J* **23**(5): 633-641
- Riha K, McKnight TD, Griffing LR, Shippen DE (2001) Living with genome instability: plant responses to telomere dysfunction. *Science* **291**(5509): 1797-1800
- Riha K, Shippen DE (2003a) Ku is required for telomeric C-rich strand maintenance but not for end-to-end chromosome fusions in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2): 611-615
- Riha K, Shippen DE (2003b) Telomere structure, function and maintenance in Arabidopsis. *Chromosome Res* **11**(3): 263-275
- Riha K, Watson JM, Parkey J, Shippen DE (2002) Telomere length deregulation and enhanced sensitivity to genotoxic stress in Arabidopsis mutants deficient in Ku70. *EMBO J* **21**(11): 2819-2826
- Riou JF, Gomez D, Lemarteleur T, Trentesaux C (2003) [G-quadruplex DNA: myth or reality?]. *Bull Cancer* **90**(4): 305-313
- Rodriguez K, Wang Z, Friedberg EC, Tomkinson AE (1996) Identification of functional domains within the RAD1.RAD10 repair and recombination endonuclease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**(34): 20551-20558
- Ruckova E, Friml J, Prochazkova Schruppfova P, Fajkus J (2008) Role of alternative telomere lengthening unmasked in telomerase knock-out mutant plants. *Plant Mol Biol* **66**(6): 637-646
- Samper E, Goytisolo FA, Slijepcevic P, van Buul PP, Blasco MA (2000) Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Rep* **1**(3): 244-252
- San Filippo J, Sung P, Klein H (2008) Mechanism of eukaryotic homologous recombination. *Annu Rev Biochem* **77**: 229-257
- Sargent RG, Rolig RL, Kilburn AE, Adair GM, Wilson JH, Nairn RS (1997) Recombination-dependent deletion formation in mammalian cells deficient in the nucleotide excision repair gene ERCC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(24): 13122-13127
- Schaetzlein S, Kodandamireddy NR, Ju Z, Lechel A, Stepczynska A, Lilli DR, Clark AB, Rudolph C, Kuhnel F, Wei K, Schlegelberger B, Schirmacher P, Kunkel TA, Greenberg RA, Edelmann W, Rudolph KL (2007) Exonuclease-1 deletion impairs DNA damage signaling and prolongs lifespan of telomere-dysfunctional mice. *Cell* **130**(5): 863-877
- Schiestl RH, Prakash S (1988) RAD1, an excision repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is also involved in recombination. *Mol Cell Biol* **8**(9): 3619-3626
- Schiestl RH, Zhu J, Petes TD (1994) Effect of mutations in genes affecting homologous recombination on restriction enzyme-mediated and illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **14**(7): 4493-4500
- Schreiber V, Ame JC, Dolle P, Schultz I, Rinaldi B, Fraulob V, Menissier-de Murcia J, de Murcia G (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* **277**(25): 23028-23036
- Schrumpfova P, Kuchar M, Mikova G, Skrisovska L, Kubicarova T, Fajkus J (2004) Characterization of two Arabidopsis thaliana myb-like proteins showing affinity to telomeric DNA sequence. *Genome* **47**(2): 316-324

- Schulz VP, Zakian VA, Ogburn CE, McKay J, Jarzebowicz AA, Edland SD, Martin GM (1996) Accelerated loss of telomeric repeats may not explain accelerated replicative decline of Werner syndrome cells. *Hum Genet* **97**(6): 750-754
- Seidel JJ, Anderson CM, Blackburn EH (2008) A novel Tel1/ATM N-terminal motif, TAN, is essential for telomere length maintenance and a DNA damage response. *Mol Cell Biol* **28**(18): 5736-5746
- Seto AG, Livengood AJ, Tzfati Y, Blackburn EH, Cech TR (2002) A bulged stem tethers Est1p to telomerase RNA in budding yeast. *Genes Dev* **16**(21): 2800-2812
- Sfeir AJ, Shay JW, Wright WE (2005) Fine-tuning the chromosome ends: the last base of human telomeres. *Cell Cycle* **4**(11): 1467-1470
- Shakirov EV, Shippen DE (2004) Length regulation and dynamics of individual telomere tracts in wild-type Arabidopsis. *Plant Cell* **16**(8): 1959-1967
- Shakirov EV, Surovtseva YV, Osburn N, Shippen DE (2005) The Arabidopsis Pot1 and Pot2 proteins function in telomere length homeostasis and chromosome end protection. *Mol Cell Biol* **25**(17): 7725-7733
- Shampay J, Szostak JW, Blackburn EH (1984) DNA sequences of telomeres maintained in yeast. *Nature* **310**(5973): 154-157
- Shannon M, Lamerdin JE, Richardson L, McCutchen-Maloney SL, Hwang MH, Handel MA, Stubbs L, Thelen MP (1999) Characterization of the mouse Xpf DNA repair gene and differential expression during spermatogenesis. *Genomics* **62**(3): 427-435
- Shao X, Grishin NV (2000) Common fold in helix-hairpin-helix proteins. *Nucleic Acids Res* **28**(14): 2643-2650
- Shay JW (2005) Meeting report: the role of telomeres and telomerase in cancer. *Cancer Res* **65**(9): 3513-3517
- Shay JW, Wright WE (2004) Telomeres are double-strand DNA breaks hidden from DNA damage responses. *Mol Cell* **14**(4): 420-421
- Shippen-Lentz D, Blackburn EH (1990) Functional evidence for an RNA template in telomerase. *Science* **247**(4942): 546-552
- Siegal G, Turchi JJ, Myers TW, Bambara RA (1992) A 5' to 3' exonuclease functionally interacts with calf DNA polymerase epsilon. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(20): 9377-9381
- Sijbers AM, de Laat WL, Ariza RR, Biggerstaff M, Wei YF, Moggs JG, Carter KC, Shell BK, Evans E, de Jong MC, Rademakers S, de Rooij J, Jaspers NG, Hoeijmakers JH, Wood RD (1996) Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell* **86**(5): 811-822
- Singer MS, Gottschling DE (1994) TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science* **266**(5184): 404-409
- Siroky J, Zluvova J, Riha K, Shippen DE, Vyskot B (2003) Rearrangements of ribosomal DNA clusters in late generation telomerase-deficient Arabidopsis. *Chromosoma* **112**(3): 116-123

- Smogorzewska A, Karlseder J, Holtgreve-Grez H, Jauch A, de Lange T (2002) DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Curr Biol* **12**(19): 1635-1644
- Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T (2000) Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* **20**(5): 1659-1668
- Snow BE, Erdmann N, Cruickshank J, Goldman H, Gill RM, Robinson MO, Harrington L (2003) Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. *Curr Biol* **13**(8): 698-704
- Song K, Jung D, Jung Y, Lee SG, Lee I (2000) Interaction of human Ku70 with TRF2. *FEBS Lett* **481**(1): 81-85
- St Onge RP, Udell CM, Casselman R, Davey S (1999) The human G2 checkpoint control protein hRAD9 is a nuclear phosphoprotein that forms complexes with hRAD1 and hHUS1. *Mol Biol Cell* **10**(6): 1985-1995
- Starita LM, Parvin JD (2003) The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr Opin Cell Biol* **15**(3): 345-350
- Steinert S, White DM, Zou Y, Shay JW, Wright WE (2002) Telomere biology and cellular aging in nonhuman primate cells. *Exp Cell Res* **272**(2): 146-152
- Stellwagen AE, Haimberger ZW, Veatch JR, Gottschling DE (2003) Ku interacts with telomerase RNA to promote telomere addition at native and broken chromosome ends. *Genes Dev* **17**(19): 2384-2395
- Stracker TH, Morales M, Couto SS, Hussein H, Petrini JH (2007) The carboxy terminus of NBS1 is required for induction of apoptosis by the MRE11 complex. *Nature* **447**(7141): 218-221
- Strunnikov AV, Jessberger R (1999) Structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins: conserved molecular properties for multiple biological functions. *Eur J Biochem* **263**(1): 6-13
- Sugawara N, Haber JE (1992) Characterization of double-strand break-induced recombination: homology requirements and single-stranded DNA formation. *Mol Cell Biol* **12**(2): 563-575
- Sugawara N, Ira G, Haber JE (2000) DNA length dependence of the single-strand annealing pathway and the role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **20**(14): 5300-5309
- Sugiyama T, New JH, Kowalczykowski SC (1998) DNA annealing by RAD52 protein is stimulated by specific interaction with the complex of replication protein A and single-stranded DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11): 6049-6054
- Sun H, Yabuki A, Maizels N (2001) A human nuclease specific for G4 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(22): 12444-12449
- Sundquist WI, Klug A (1989) Telomeric DNA dimerizes by formation of guanine tetrads between hairpin loops. *Nature* **342**(6251): 825-829
- Sung P, Reynolds P, Prakash L, Prakash S (1993) Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD1/RAD10 endonuclease. *J Biol Chem* **268**(35): 26391-26399
- Surovtseva YV, Shakirov EV, Vespa L, Osbun N, Song X, Shippen DE (2007) Arabidopsis POT1 associates with the telomerase RNP and is required for telomere maintenance. *EMBO J* **26**(15): 3653-3661

- Sykorova E, Lim KY, Chase MW, Knapp S, Leitch IJ, Leitch AR, Fajkus J (2003) The absence of Arabidopsis-type telomeres in *Cestrum* and closely related genera *Vestia* and *Sessea* (Solanaceae): first evidence from eudicots. *Plant J* **34**(3): 283-291
- Symington LS (2002) Role of RAD52 epistasis group genes in homologous recombination and double-strand break repair. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(4): 630-670, table of contents
- Szostak JW, Blackburn EH (1982) Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* **29**(1): 245-255
- Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ, Stahl FW (1983) The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**(1): 25-35
- Taggart AK, Teng SC, Zakian VA (2002) Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science* **297**(5583): 1023-1026
- Tahara H, Kuniyasu H, Yokozaki H, Yasui W, Shay JW, Ide T, Tahara E (1995) Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions. *Clin Cancer Res* **1**(11): 1245-1251
- Takai H, Smogorzewska A, de Lange T (2003) DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* **13**(17): 1549-1556
- Takata H, Tanaka Y, Matsuura A (2005) Late S phase-specific recruitment of Mre11 complex triggers hierarchical assembly of telomere replication proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **17**(4): 573-583
- Tamura K, Adachi Y, Chiba K, Oguchi K, Takahashi H (2002) Identification of Ku70 and Ku80 homologues in *Arabidopsis thaliana*: evidence for a role in the repair of DNA double-strand breaks. *Plant J* **29**(6): 771-781
- Tarsounas M, Munoz P, Claas A, Smiraldi PG, Pittman DL, Blasco MA, West SC (2004) Telomere maintenance requires the RAD51D recombination/repair protein. *Cell* **117**(3): 337-347
- Tauchi H, Kobayashi J, Morishima K, Matsuura S, Nakamura A, Shiraishi T, Ito E, Masnada D, Delia D, Komatsu K (2001) The forkhead-associated domain of NBS1 is essential for nuclear foci formation after irradiation but not essential for hRAD50[middle dot]hMRE11[middle dot]NBS1 complex DNA repair activity. *J Biol Chem* **276**(1): 12-15
- Teng SC, Chang J, McCowan B, Zakian VA (2000) Telomerase-independent lengthening of yeast telomeres occurs by an abrupt Rad50p-dependent, Rif-inhibited recombinational process. *Mol Cell* **6**(4): 947-952
- Teng SC, Zakian VA (1999) Telomere-telomere recombination is an efficient bypass pathway for telomere maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**(12): 8083-8093
- Tesmer VM, Ford LP, Holt SE, Frank BC, Yi X, Aisner DL, Ouellette M, Shay JW, Wright WE (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): 6207-6216
- Thacker J (2005) The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett* **219**(2): 125-135
- Thompson LH, Schild D (2002) Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* **509**(1-2): 49-78

- Ting NS, Yu Y, Pohorelic B, Lees-Miller SP, Beattie TL (2005) Human Ku70/80 interacts directly with hTR, the RNA component of human telomerase. *Nucleic Acids Res* **33**(7): 2090-2098
- Tomita K, Matsuura A, Caspari T, Carr AM, Akamatsu Y, Iwasaki H, Mizuno K, Ohta K, Uritani M, Ushimaru T, Yoshinaga K, Ueno M (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): 5186-5197
- Tomkinson AE, Bardwell AJ, Bardwell L, Tappe NJ, Friedberg EC (1993) Yeast DNA repair and recombination proteins Rad1 and Rad10 constitute a single-stranded-DNA endonuclease. *Nature* **362**(6423): 860-862
- Trujillo KM, Roh DH, Chen L, Van Komen S, Tomkinson A, Sung P (2003) Yeast xrs2 binds DNA and helps target rad50 and mre11 to DNA ends. *J Biol Chem* **278**(49): 48957-48964
- Trujillo KM, Yuan SS, Lee EY, Sung P (1998) Nuclease activities in a complex of human recombination and DNA repair factors Rad50, Mre11, and p95. *J Biol Chem* **273**(34): 21447-21450
- Tsai CJ, Kim SA, Chu G (2007) Cernunnos/XLF promotes the ligation of mismatched and noncohesive DNA ends. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(19): 7851-7856
- Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, Rosenblatt RL, Shay JW, Garcia CK (2007) Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(18): 7552-7557
- Tsodikov OV, Enzlin JH, Schärer OD, Ellenberger T (2005) Crystal structure and DNA binding functions of ERCC1, a subunit of the DNA structure-specific endonuclease XPF-ERCC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(32): 11236-11241
- Tsubouchi H, Ogawa H (1998) A novel mre11 mutation impairs processing of double-strand breaks of DNA during both mitosis and meiosis. *Mol Cell Biol* **18**(1): 260-268
- Tsubouchi H, Ogawa H (2000) Exo1 roles for repair of DNA double-strand breaks and meiotic crossing over in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **11**(7): 2221-2233
- Tsukamoto Y, Kato J, Ikeda H (1996) Effects of mutations of RAD50, RAD51, RAD52, and related genes on illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **142**(2): 383-391
- Udayakumar D, Bladen CL, Hudson FZ, Dynan WS (2003) Distinct pathways of nonhomologous end joining that are differentially regulated by DNA-dependent protein kinase-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* **278**(43): 41631-41635
- Uegaki K, Adachi N, So S, Iizumi S, Koyama H (2006) Heterozygous inactivation of human Ku70/Ku86 heterodimer does not affect cell growth, double-strand break repair, or genome integrity. *DNA Repair (Amst)* **5**(3): 303-311
- Umezaki K, Sugawara N, Chen C, Haber JE, Kolodner RD (1998) Genetic analysis of yeast RPA1 reveals its multiple functions in DNA metabolism. *Genetics* **148**(3): 989-1005
- Usui T, Ogawa T, Ogawa H (2001) [Functional regulation of the Mre11/Rad50/Xrs2 complex in the processes of recombination and DSB repair]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **46**(8 Suppl): 1030-1037
- Usui T, Ohta T, Oshiumi H, Tomizawa J, Ogawa H, Ogawa T (1998) Complex formation and functional versatility of Mre11 of budding yeast in recombination. *Cell* **95**(5): 705-716

- Uziel T, Lerenthal Y, Moyal L, Andegeko Y, Mittelman L, Shiloh Y (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J* **22**(20): 5612-5621
- van Attikum H, Bundock P, Overmeer RM, Lee LY, Gelvin SB, Hooykaas PJ (2003) The Arabidopsis AtLIG4 gene is required for the repair of DNA damage, but not for the integration of Agrobacterium T-DNA. *Nucleic Acids Res* **31**(14): 4247-4255
- Van Dyck E, Stasiak AZ, Stasiak A, West SC (1999) Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. *Nature* **401**(6751): 403
- van Overbeek M, de Lange T (2006) Apollo, an Artemis-related nuclease, interacts with TRF2 and protects human telomeres in S phase. *Curr Biol* **16**(13): 1295-1302
- van Steensel B, de Lange T (1997) Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* **385**(6618): 740-743
- van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T (1998) TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* **92**(3): 401-413
- vanAnkeren SC, Murray D, Meyn RE (1988) Induction and rejoining of gamma-ray-induced DNA single- and double-strand breaks in Chinese hamster AA8 cells and in two radiosensitive clones. *Radiat Res* **116**(3): 511-525
- Vannier JB, Depeiges A, White C, Gallego ME (2006) Two roles for Rad50 in telomere maintenance. *EMBO J* **25**(19): 4577-4585
- Vaziri H, Benchimol S (1998) Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* **8**(5): 279-282
- Veldman T, Etheridge KT, Counter CM (2004) Loss of hPot1 function leads to telomere instability and a cut-like phenotype. *Curr Biol* **14**(24): 2264-2270
- Venkatesan RN, Price C (1998) Telomerase expression in chickens: constitutive activity in somatic tissues and down-regulation in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14763-14768
- Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T (2007) Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* **445**(7128): 661-665
- Vergunst AC, Jansen LE, Fransz PF, de Jong JH, Hooykaas PJ (2000) Cre/lox-mediated recombination in Arabidopsis: evidence for transmission of a translocation and a deletion event. *Chromosoma* **109**(4): 287-297
- Vespa L, Couvillion M, Spangler E, Shippen DE (2005) ATM and ATR make distinct contributions to chromosome end protection and the maintenance of telomeric DNA in Arabidopsis. *Genes Dev* **19**(18): 2111-2115
- Vespa L, Warrington RT, Mokros P, Siroky J, Shippen DE (2007) ATM regulates the length of individual telomere tracts in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(46): 18145-18150
- Vleck CM, Haussmann MF, Vleck D (2003) The natural history of telomeres: tools for aging animals and exploring the aging process. *Exp Gerontol* **38**(7): 791-795

- Vulliamy TJ, Marrone A, Knight SW, Walne A, Mason PJ, Dokal I (2006) Mutations in dyskeratosis congenita: their impact on telomere length and the diversity of clinical presentation. *Blood* **107**(7): 2680-2685
- Walker JR, Corpina RA, Goldberg J (2001) Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* **412**(6847): 607-614
- Wang F, Podell ER, Zaug AJ, Yang Y, Baciu P, Cech TR, Lei M (2007) The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* **445**(7127): 506-510
- Wang RC, Smogorzewska A, de Lange T (2004) Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* **119**(3): 355-368
- Wang X, Baumann P (2008) Chromosome fusions following telomere loss are mediated by single-strand annealing. *Mol Cell* **31**(4): 463-473
- Wang Y, Patel DJ (1993) Solution structure of the human telomeric repeat d[AG3(T2AG3)3] G-tetraplex. *Structure* **1**(4): 263-282
- Waterworth WM, Altun C, Armstrong SJ, Roberts N, Dean PJ, Young K, Weil CF, Bray CM, West CE (2007) NBS1 is involved in DNA repair and plays a synergistic role with ATM in mediating meiotic homologous recombination in plants. *Plant J* **52**(1): 41-52
- Webb CJ, Zakian VA (2008) Identification and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* TER1 telomerase RNA. *Nat Struct Mol Biol* **15**(1): 34-42
- Weeda G, Donker I, de Wit J, Morreau H, Janssens R, Vissers CJ, Nigg A, van Steeg H, Bootsma D, Hoeijmakers JH (1997) Disruption of mouse ERCC1 results in a novel repair syndrome with growth failure, nuclear abnormalities and senescence. *Curr Biol* **7**(6): 427-439
- Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Taylor RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW, Harley CB, Morin GB (1997) Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet* **17**(4): 498-502
- Weiss H, Scherthan H (2002) Aloe spp.--plants with vertebrate-like telomeric sequences. *Chromosome Res* **10**(2): 155-164
- Weiss-Schneeweiss H, Riha K, Jang CG, Puizina J, Scherthan H, Schweizer D (2004) Chromosome termini of the monocot plant *Othocallis siberica* are maintained by telomerase, which specifically synthesises vertebrate-type telomere sequences. *Plant J* **37**(4): 484-493
- Welsh PL, Owens KN, King MC (2000) Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet* **16**(2): 69-74
- Wellinger RJ, Ethier K, Labrecque P, Zakian VA (1996) Evidence for a new step in telomere maintenance. *Cell* **85**(3): 423-433
- Weng NP, Granger L, Hodes RJ (1997) Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20): 10827-10832
- West CE, Waterworth WM, Jiang Q, Bray CM (2000) Arabidopsis DNA ligase IV is induced by gamma-irradiation and interacts with an Arabidopsis homologue of the double strand break repair protein XRCC4. *Plant J* **24**(1): 67-78

- West CE, Waterworth WM, Story GW, Sunderland PA, Jiang Q, Bray CM (2002) Disruption of the Arabidopsis AtKu80 gene demonstrates an essential role for AtKu80 protein in efficient repair of DNA double-strand breaks in vivo. *Plant J* **31**(4): 517-528
- Weterings E, Verkaik NS, Bruggenwirth HT, Hoeijmakers JH, van Gent DC (2003) The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic Acids Res* **31**(24): 7238-7246
- White MF (2003) Archaeal DNA repair: paradigms and puzzles. *Biochem Soc Trans* **31**(Pt 3): 690-693
- Williams RS, Moncalian G, Williams JS, Yamada Y, Limbo O, Shin DS, Grocock LM, Cahill D, Hitomi C, Guenther G, Moiani D, Carney JP, Russell P, Tainer JA (2008) Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair. *Cell* **135**(1): 97-109
- Williamson JR, Raghuraman MK, Cech TR (1989) Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: the G-quartet model. *Cell* **59**(5): 871-880
- Wong KK, Maser RS, Bachoo RM, Menon J, Carrasco DR, Gu Y, Alt FW, DePinho RA (2003) Telomere dysfunction and Atm deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. *Nature* **421**(6923): 643-648
- Wright WE, Shay JW (1992) Telomere positional effects and the regulation of cellular senescence. *Trends Genet* **8**(6): 193-197
- Wright WE, Shay JW (2001) Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev* **11**(1): 98-103
- Wright WE, Tesmer VM, Huffman KE, Levene SD, Shay JW (1997) Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. *Genes Dev* **11**(21): 2801-2809
- Wu L, Multani AS, He H, Cosme-Blanco W, Deng Y, Deng JM, Bachilo O, Pathak S, Tahara H, Bailey SM, Behringer RR, Chang S (2006) Pot1 deficiency initiates DNA damage checkpoint activation and aberrant homologous recombination at telomeres. *Cell* **126**(1): 49-62
- Wu Y, Mitchell TR, Zhu XD (2008) Human XPF controls TRF2 and telomere length maintenance through distinctive mechanisms. *Mech Ageing Dev* **129**(10): 602-610
- Wu Y, Xiao S, Zhu XD (2007a) MRE11-RAD50-NBS1 and ATM function as co-mediators of TRF1 in telomere length control. *Nat Struct Mol Biol* **14**(9): 832-840
- Wu Y, Zagal NJ, Rainbow AJ, Zhu XD (2007b) 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): 157-166
- Xin H, Liu D, Wan M, Safari A, Kim H, Sun W, O'Connor MS, Songyang Z (2007) TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature* **445**(7127): 559-562
- Yang Q, Zheng YL, Harris CC (2005) POT1 and TRF2 cooperate to maintain telomeric integrity. *Mol Cell Biol* **25**(3): 1070-1080
- Yang SW, Kim SK, Kim WT (2004) Perturbation of NgTRF1 expression induces apoptosis-like cell death in tobacco BY-2 cells and implicates NgTRF1 in the control of telomere length and stability. *Plant Cell* **16**(12): 3370-3385

- Yano K, Chen DJ (2008) Live cell imaging of XLF and XRCC4 reveals a novel view of protein assembly in the non-homologous end-joining pathway. *Cell Cycle* **7**(10): 1321-1325
- Yasumoto S, Kunimura C, Kikuchi K, Tahara H, Ohji H, Yamamoto H, Ide T, Utakoji T (1996) Telomerase activity in normal human epithelial cells. *Oncogene* **13**(2): 433-439
- Ye JZ, Donigian JR, van Overbeek M, Loayza D, Luo Y, Krutchinsky AN, Chait BT, de Lange T (2004a) TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *J Biol Chem* **279**(45): 47264-47271
- Ye JZ, Hockemeyer D, Krutchinsky AN, Loayza D, Hooper SM, Chait BT, de Lange T (2004b) POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes Dev* **18**(14): 1649-1654
- Yildiz O, Kearney H, Kramer BC, Sekelsky JJ (2004) Mutational analysis of the Drosophila DNA repair and recombination gene mei-9. *Genetics* **167**(1): 263-273
- Yoo S, Dynan WS (1999) Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. *Nucleic Acids Res* **27**(24): 4679-4686
- Yoshimura SH, Maruyama H, Ishikawa F, Ohki R, Takeyasu K (2004) Molecular mechanisms of DNA end-loop formation by TRF2. *Genes Cells* **9**(3): 205-218
- Young JA, Schreckhise RW, Steiner WW, Smith GR (2002) Meiotic recombination remote from prominent DNA break sites in *S. pombe*. *Mol Cell* **9**(2): 253-263
- Yu EY, Kim SE, Kim JH, Ko JH, Cho MH, Chung IK (2000) Sequence-specific DNA recognition by the Myb-like domain of plant telomeric protein RTBP1. *J Biol Chem* **275**(31): 24208-24214
- Yu X, Gabriel A (2003) Ku-dependent and Ku-independent end-joining pathways lead to chromosomal rearrangements during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **163**(3): 843-856
- Zappulla DC, Cech TR (2004) Yeast telomerase RNA: a flexible scaffold for protein subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 10024-10029
- Zaug AJ, Podell ER, Cech TR (2005) Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(31): 10864-10869
- Zellinger B, Akimcheva S, Puizina J, Schirato M, Riha K (2007) Ku suppresses formation of telomeric circles and alternative telomere lengthening in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **27**(1): 163-169
- Zhang Q, Williams ES, Askin KF, Peng Y, Bedford JS, Liber HL, Bailey SM (2005) Suppression of DNA-PK by RNAi has different quantitative effects on telomere dysfunction and mutagenesis in human lymphoblasts treated with gamma rays or HZE particles. *Radiat Res* **164**(4 Pt 2): 497-504
- Zhong Q, Chen CF, Chen PL, Lee WH (2002) BRCA1 facilitates microhomology-mediated end joining of DNA double strand breaks. *J Biol Chem* **277**(32): 28641-28647
- Zhong ZH, Jiang WQ, Cesare AJ, Neumann AA, Wadhwa R, Reddel RR (2007) Disruption of telomere maintenance by depletion of the MRE11/RAD50/NBS1 complex in cells that use alternative lengthening of telomeres. *J Biol Chem* **282**(40): 29314-29322

Zhu QH, Ramm K, Shivakkumar R, Dennis ES, Upadhyaya NM (2004) The ANOTHER INDEHISCENCE1 gene encoding a single MYB domain protein is involved in anther development in rice. *Plant Physiol* **135**(3): 1514-1525

Zhu XD, Kuster B, Mann M, Petrini JH, de Lange T (2000) Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nat Genet* **25**(3): 347-352

Zhu XD, Niedernhofer L, Kuster B, Mann M, Hoeijmakers JH, 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**(6): 1489-1498

Zubko MK, Guillard S, Lydall D (2004) Exo1 and Rad24 differentially regulate generation of ssDNA at telomeres of *Saccharomyces cerevisiae* cdc13-1 mutants. *Genetics* **168**(1): 103-115

Résumé

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques spécialisées dont l'un des rôles est d'empêcher le raccourcissement progressif de l'extrémité des chromosomes suite à la réplication et l'instabilité génomique due à la recombinaison de l'extrémité de chromosomes. Malgré, le rôle des télomères dans la protection de l'extrémité des chromosomes contre les mécanismes de réparation de l'ADN et de recombinaison, de nombreuses protéines de ces voies jouent des rôles essentiels dans l'homéostasie des télomères et la stabilité des chromosomes. Parmi-elles, la protéine RAD50 appartenant au complexe MRE11/RAD50/XRS2(NBS1) et l'endonucléase structure spécifique XPF/ERCC1 sont localisées aux télomères; ces deux complexes connus pour leur rôle dans les voies de réparation de l'ADN ainsi que dans les études sur la recombinaison.

Nous avons identifié deux rôles différents pour la protéine RAD50 dans la maintenance télomérique et dans la protection des extrémités des chromosomes, en contexte de présence et absence de la télomérase. L'absence d'AtRAD50 augmente significativement le nombre de fusions chromosomiques impliquant des télomères raccourcis. Nous proposons que ce rôle protecteur des télomères raccourcis de RAD50 est le résultat de sa fonction de contraindre la recombinaison entre chromatides soeurs et ainsi d'éviter les événements de fusions par les extrémités. Nous avons recherché le ou les mécanismes impliqué(s) dans ces événements de fusions chromosomiques chez les mutants *atrada50* en réalisant des croisements entre des plantes déficientes pour *ATRADA50* et des plantes déficientes pour des gènes codant des protéines des voies de réparation par recombinaison non-homologue et homologue.

Au contraire de la situation en cellules de mammifères, nous n'avons pas observé d'instabilité chromosomique chez les plantes mutantes correspondantes pour *XPF (AtRAD1)* or *ERCC1 (AtERCC1)*. Cependant, en absence de la télomérase, la mutation de l'un de ces deux gènes entraîne une augmentation précoce et significative de l'instabilité chromosomique sans accélération générale de la perte des répétitions télomériques, mais associée à la présence de fragments ADN extrachromosomiques visibles en cytologie. Une analyse intensive par FISH a permis d'identifier ces ADN comme des bras entiers spécifiques de deux chromosomes. Nos données indiquent un rôle protecteur de RAD1/ERCC1 contre l'invasion de l'ADN simple brin télomérique dans des séquences télomériques interstitielles. Le fait que les mutations de *rad1* (ou *ercc1*) augmentent dramatiquement l'instabilité chromosomique des mutants télomérase a des implications très importantes pour les modèles des rôles de la recombinaison aux télomères.

Abstract

Telomeres are the specialised nucleoprotein structures evolved to avoid progressive replicative shortening and recombinational instability of the ends of linear chromosomes. Notwithstanding this role of telomeres in "hiding" chromosome ends from DNA repair and recombination, many repair and recombination proteins play essential roles in telomere function and chromosome stability. Among these are RAD50 from MRE11/RAD50/XRS2(NBS1) complex and XPF/ERCC1 structure-specific endonuclease; both known for their essential role in DNA repair pathways and the subject of considerable interest in studies of recombination.

We identified two roles for the RAD50 protein in telomere maintenance and the protection of chromosome ends both in the presence and absence of telomerase. Absence of AtRAD50 significantly increases chromosomal fusions involving shortened telomeres. We proposed that this protective role of RAD50 protein on shortened telomeres results from its action in constraining recombination to sister chromatids and thus avoiding end-to-end interactions. We have researched the mechanisms involved in chromosomal fusions in *atrada50* mutants by crosses between *ATRADA50* and different NHEJ or HR DNA repair mutants.

In contrast to the situation in mammalian cells, we observe no chromosomal instability in the corresponding plants mutated for either *XPF (AtRAD1)* or *ERCC1 (AtERCC1)* orthologs. However in the absence of telomerase, mutation of either of these two genes induces a significantly earlier onset of chromosomal instability without general acceleration of telomeric repeat loss, but associated with the presence of cytologically visible extrachromosomal DNA fragments. Extensive FISH analyses show that these DNAs are broken chromosomes from two specific chromosome arms. Our data thus indicate a protective role of RAD1/ERCC1 against 3' G-strand overhang invasion of interstitial telomeric repeats. The fact that the *rad1* (or *ercc1*) mutants dramatically potentiate levels of chromosome instability in telomerase mutants has important implications for models of the roles of recombination at telomeres.

Mots-clés:

Télomères, Réparation de l'ADN, Stabilité des génomes, XPF/ERCC1, MRE11/RAD50/XRS2(NBS1), *Arabidopsis thaliana*