



HAL
open science

La télomérase : fonctions biologiques et ciblage thérapeutique

Pauline Billard

► **To cite this version:**

Pauline Billard. La télomérase : fonctions biologiques et ciblage thérapeutique. Sciences pharmaceutiques. 2017. hal-01932302

HAL Id: hal-01932302

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01932302v1>

Submitted on 23 Nov 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE
2017

FACULTE DE PHARMACIE

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement

Le 11 Septembre 2017, sur un sujet dédié à :

**La télomérase : fonctions biologiques et ciblage
thérapeutique**

Pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par Pauline BILLARD

Née le 15/11/1992 à Villers-Semeuse (08)

Membres du Jury

Président et Co-Directeur :	Jean – Louis MERLIN	Docteur en Pharmacie PU-PH en biologie cellulaire – Université de Lorraine
Directeur:	Delphine PONCET	Docteur en Pharmacie MCU-PH en biochimie – Université Lyon 1
Juges :	Alexandre HARLE	Docteur en Pharmacie MCU-PH en biologie cellulaire oncologique - Université de Lorraine
	Emmanuel RANFAING	Docteur en Pharmacie Pharmacien Responsable de l'ALTIR

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2016-2017

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Béatrice FAIVRE

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine

Responsables de la filière Industrie

Responsable de la filière Hôpital

Responsable Pharma Plus ENSIC

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Responsable Pharma Plus ENSGSI

Responsable de la Communication

**Responsable de la Cellule de Formation Continue
et individuelle**

**Responsable de la Commission d'agrément
des maîtres de stage**

Responsable ERASMUS

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Igor CLAROT

Marie-Paule SAUDER

Béatrice FAIVRE

Béatrice FAIVRE

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Jean-Claude BLOCK

Max HENRY

Alain MARSURA

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

Dominique NOTTER
Christine PERDIAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Gabriel TROCKLE
Maria WELLMAN-ROUSSEAU
Colette ZINUTTI

ENSEIGNANTS

Section CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Epidémiologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Biologie cellulaire, Hématologie
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Alexandre HARLE	82	Biologie cellulaire oncologique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique

Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Florence DUMARCAY	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Anthony GANDIN	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Caroline GAUCHER	86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie, Sécurité sanitaire</i>

ENSEIGNANTS (suite)

Section CNU*

Discipline d'enseignement

Alexandrine LAMBERT	85	<i>Informatique, Biostatistiques</i>
Julie LEONHARD	86/01	<i>Droit en Santé</i>
Christophe MERLIN	87	<i>Microbiologie environnementale</i>
Maxime MOURER	86	<i>Chimie organique</i>
Coumba NDIAYE	86	<i>Epidémiologie et Santé publique</i>
Marianne PARENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Francine PAULUS	85	<i>Informatique</i>
Caroline PERRIN-SARRADO	86	<i>Pharmacologie</i>
Virginie PICHON	85	<i>Biophysique</i>
Sophie PINEL	85	<i>Informatique en Santé (e-santé)</i>
Anne SAPIN-MINET	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Marie-Paule SAUDER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Guillaume SAUTREY	85	<i>Chimie analytique</i>
Rosella SPINA	86	<i>Pharmacognosie</i>
Sabrina TOUCHET	86	<i>Pharmacochimie</i>
Mihayl VARBANOV	87	<i>Immuno-Virologie</i>
Marie-Noëlle VAULTIER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Emilie VELOT	86	<i>Physiologie-Physiopathologie humaines</i>
Mohamed ZAIYOU	87	<i>Biochimie et Biologie moléculaire</i>

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	<i>Sémiologie</i>
--------------------	----	-------------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	11	<i>Anglais</i>
--------------------	----	----------------

☒ *En attente de nomination*

***Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier chaque **membre de mon jury** :

Madame Delphine Poncet, enfin Delphine... je te remercie d'avoir en plus d'encadrer mon stage de Master 2, accepté d'être ma directrice de Thèse. Tu m'as transmis beaucoup en ces quelques mois, tant sur le plan scientifique que personnel. Tu m'as confortée dans la vision que j'avais de la recherche et ainsi confirmé mon envie de continuer dans cette voie. Je te remercie quoiqu'il arrive pour le temps que tu m'as accordé, tes conseils et ta disponibilité en espérant que ça ne soit que le début !!!!

Monsieur le Professeur Jean Louis Merlin, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'être mon Président du jury ainsi que mon Co-directeur. Sachez que lors de mon SIR dans votre unité, vous avez conforté mes envies de poursuivre dans la recherche en Cancérologie. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude.

Monsieur Alexandre Harlé, je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail. Merci de votre gentillesse et de vos précieux conseils. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Monsieur Ranfaing, je vous remercie d'avoir bien voulu faire partie de mon jury, en plus de m'avoir fait confiance lors de mon passage dans la pharmacie de l'ALTIR, vous m'avez fait découvrir une autre vision de la profession et transmis de nouvelles connaissances. J'en profite pour remercier aussi tout le reste de l'équipe pour ces supers moments passés à l'ALTIR à vos côtés.

A mes parents, merci de votre soutien inconditionnel et ce malgré la distance qui nous sépare. Je n'y serai jamais arrivée sans votre aide. Je vous aime.

A mon frère et ma sœur : mini Billard et mon petit Dobby... merci d'avoir été à mes côtés, je vous aime même si on sait tous que le premier c'est le meilleur !!!

A ma Mamoune, merci à toi aussi d'avoir toujours été présente. (Ne me souffle pas trop les réponses aux questions pendant ma soutenance...on va se faire démasquer sinon)

A mes amis : Tout d'abord merci à tous d'avoir été là dans les bons et les mauvais moments mais plus particulièrement :

A la bande des coincoins :

Yoyo, ma copine de l'Ain ! Merci pour tout ces souvenirs durant ce cursus.

Elo, malgré la distance nous n'avons jamais été aussi proche... j'en suis ravie! Je te remercie pour ton soutien et pour l'aides que tu m'as donné pour l'organisation de cette soutenance.

Claire, homme de ma vie ! Encore merci pour ses soirées bouffe, jeux...! Presque colloc' nous avons été mdr !

Julie, la maman de mon neveu...je suis heureuse de t'avoir rencontré « Une amie est comme un trèfle à quatre feuilles : difficile à obtenir mais un plaisir à garder »

Loulou, tu as toujours été près de moi dès cette rentrée en P2 et je t'en remercie ! Tu es pleine de franchise et de gentillesse, j'ai beaucoup trop de souvenirs avec toi (ou pas) et je compte bien en avoir encore des tas d'autres ! Petite pensée à cette danse du brocoli sur ton lit !!!!

A Cyrielle / binôme / marraine...merci de m'avoir fait glisser du côté obscur pendant ce cursus ! Merci pour tous ses bons moments. Tu comptes énormément pour moi et je ne vais pas te lâcher de sitôt ! Je te aime !

A Djésia, ma camarade d'emmerdes ! On les aura toutes collectionnées je pense mais je sais maintenant que si il me faut une scie sauteuse pour un problème de machine à laver un dimanche je peux t'appeler ! J'en profite pour encore de féliciter pour tout ce que tu as accompli cette année.

A Nina, malgré la grande distance qu'il y a eu entre nous tu as toujours été présente pour moi et je t'en remercie encore et encore.

A Camille, ma camarade pharma de Master ! Heureusement que tu étais là ! Cet heureux hasard de tomber sur toi le jour de la rentrée. On va y arriver !!!!!

A PXI, on aura dégusté passer ce « super » concours tout les deux mais ça nous aura permis de mieux nous connaître et je peux te remercier de tout ton soutien.

A, Sergio, Audrey, Justine et tout les autres, merci d'avoir fait de moi la fille que je suis maintenant. Vous êtes tous des amis en or.

A Valentin, merci de m'avoir encouragée et soutenue durant toute cette année, pour tous ses bons moments passés ensemble et ceux à venir. Merci pour tout ce que tu m'apportes au quotidien.

Table des Matières

Table des Matières	1
Tables des Figures.....	3
Tables des Tableaux.....	4
Table des abréviations et acronymes.....	5
I. Introduction	8
II. Les télomères.....	8
1. ADN télomériques.....	8
2. Complexe Shelterin	12
a. Protection des télomères.....	13
b. Réplication des télomères.....	16
III. La télomérase.....	18
1. La sous unité catalytique.....	18
2. La sous unité ribonucléique TERC et ses co-facteurs.....	20
3. Les protéines associées à la télomérase	24
a. Hsp90 et p23.....	24
b. Hsp90 et Akt	24
c. TEP1.....	25
4. Assemblage de la télomérase	25
IV. La signalisation et régulation de la télomérase	27
1. Modifications épigénétiques.....	28
a. Méthylation du promoteur hTERT	28
b. Modification des histones	28
2. Régulation transcriptionnelle du gène	29
a. Activateurs.....	30
b. Inhibiteurs	31
c. Activateurs et inhibiteurs	32
3. Régulation post transcriptionnelle	32
4. Régulation post traductionnelle.....	34
a. Phosphorylation.....	34
b. Translocation	34
V. Rôles Biologiques de la télomérase	35
1. Régulation de la taille des télomères.....	35
2. Régulation du stress oxydant	36
3. Protection de l'ADN mitochondrial	37
4. Régulation de la voie Wnt-β caténine.....	38
5. Régulation de la voie NF-κB	39
6. Rôle dans le phénomène d'ARN interférence	40
VI. Télomères, télomérase et pathologies	41
1. Vieillesse cellulaire.....	41
a. Raccourcissement télomérique et vieillissement.....	41
b. Rôle du stress oxydatif	42
c. ERO et raccourcissement télomérique.....	42
2. Cancer	42
a. Rôles canoniques des télomères et de la télomérase dans le cancer	43
b. Rôles non-canoniques de la télomérase dans le cancer	45

c. La télomérase : un biomarqueur et une cible pour la thérapie anti-cancéreuse	46
VII. Ciblage thérapeutiques	47
1. Dérivés naturels	47
a. Le thé vert	47
b. Le curcuma	48
2. Inhibiteurs pharmacologiques de télomérase : Oligonucléotides antisens	49
3. Ciblage du G-Quadruplexe	51
a. BRACO-19.....	53
b. Télomestatine.....	54
c. Quarfloxine	55
4. Immunothérapie	57
a. GV1001.....	57
b. GNRVAC1.....	57
5. Thérapie anti-vieillessement	58
VIII. Conclusion et perspectives.....	60
Bibliographie	61

Tables des Figures

Figure 1: Mise en évidence des télomères sur les chromosomes	8
Figure 2: ADN télomérique.....	9
Figure 3: G quadruplexe.....	10
Figure 4: Représentation de l'extrémité télomérique stabilisée par les G-quadruplexe	10
Figure 5: Observation des G-quadruplexe dans la cellule.....	11
Figure 6: Boucle télomérique (T-loop)	11
Figure 7: Conformation télomérique en boucles	12
Figure 8: Stabilisation de la D-loop par la formation de G quadruplexe	12
Figure 9: Complexe protéique Shelterin	13
Figure 10: Conformation télomérique stabilisée par le complexe Sheltrins	13
Figure 11: Mécanismes de réparation des cassures doubles brin d'ADN	14
Figure 12: Activation des voie de l'ATR kinase et de l'ATM kinase.....	15
Figure 13: Schéma de la protéine TERT	19
Figure 14: Localisation des différents signaux d'adressage de TERT	20
Figure 15: Structure de la sous unité ribonucléique de la télomérase.....	21
Figure 16: Mise en évidence des régions conservées de la structure secondaire de TERC.....	22
Figure 17: Le complexe télomérase	23
Figure 18: Pseudouridination des ribosomes	24
Figure 19: Assemblage de la télomérase dans les corps de Cajal	26
Figure 20: Etapes de la synthèse protéique	27
Figure 21: L'activité transcriptionnelle est régulée par la conformation des histones.....	29
Figure 22: Régulation Transcriptionnelle de hTERT.....	30
Figure 23: Stimulation de la transcription de TERT par la voie de JAK/STAT	31
Figure 24: Variants d'épissage de TERT.....	33
Figure 25: Epissage alternatif de TERT sous le contrôle du block 6 de préARNm	34
Figure 26: Phénomène de raccourcissement des télomères	35
Figure 27 : Activité transcriptase inverse aux télomères de la télomérase	36
Figure 28: Production mitochondriale de ERO.....	37
Figure 29: Fonctions extra-télomériques de TERT	39
Figure 30: Les 6 caractéristiques du cancer	43
Figure 31: Action d'ATRX/DAXX aux télomères.....	45
Figure 32: L'épigallocatechine-3-gallate présent dans le thé vert	47
Figure 33: Curcumine isolée du rhizome du Curcuma	48
Figure 34: Mécanisme d'action des oligonucléotides antisens.....	49
Figure 35: Imetelstat : inhibiteur de télomérase.....	50
Figure 36: Mode d'action de l'Imetelstat	50
Figure 37: le G-quadruplexe cible pour l'inhibition de la télomérase	52
Figure 38: différentes localisations des ligands de G-quadruplexe.....	53
Figure 39: Structure de la molécule du BRACO-19	53
Figure 40: Structure de la Télomestatine	54
Figure 41: Processus de développement de la Quarfloxine	56
Figure 42: Structure du cycloastragénol ou TA-65.....	59

Tables des Tableaux

Tableau I: Récapitulatif des rôles télomériques des protéines Sheltrins	17
---	----

Table des abréviations et acronymes

53BP1: p53-binding protein 1
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
ADNmt : ADN mitochondrial
Akt: Protéine Kinase B ou Akt1
ALT: Alternative Lengthening of Telomeres
AP-2: Adipocyte Protein 2
APB: ALT PML associated Body
ARN: Acide RiboNucléique
ARNm: Acide RiboNucléique messenger
ATM: Ataxia- Telangiectasia Mutated
ATR: Ataxia- Telangiectasia mutated (ATM) and RAD3-related
ATRIP: ATR-Interacting Protein
ATRX: ATP-dependent helicase ATRX, X-linked helicase II
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large
BHE: Barrière Hémato-Encéphalique
BRCA1: Breast Cancer 1
BRG1: Brahma-related gene 1
C-myc : Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
CDB: Cassure Double Brin
CHK1: Checkpoint kinase 1
COX1/2: cyclo-oxygénase 1/2
CR: Région Conservée
CTE: C-Terminal Extension
DAXX: Death domain-associated protein 6
DDR: DNA Damage Response
DKC1: Dyskeratosis Congenita 1
E2: Oestradiol
EGCG: EpiGalloCatéchine Gallate
EGF: Epidermal Growth Factor
ERE: Element de Reponse au Estrogènes
ERO: Espèces réactives oxygénés
ER α : Recepteur aux Estrogènes α
ETS1: ETS Proto-Oncogene 1
FISH: Hybridation In Situ en Fluorescence
GABP: GA-binding protein
HAT: histone acétylase
HDAC: histone déacétylase
HER-2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HIF-1 α/β : Hypoxia Inducible Factors 1 α/β
HLA: Human Leukocyte Antigen

HR: Homologous Recombination
Hsp90: 90KDa Shock Protein
IC: inhibitory concentration
IL-2: Interleukine-2
JAK: Janus Kinase
KDa: Kilo Dalton
Kpb: Kilo paire de bases
LEF: lymphoid enhancer-binding factor
LINE-1: Long interspersed nuclear elements-1
MEN1: Menin gene
miRNA: micro RNA
MLS: Mitochondrial Localization Signal
MnSOD: Manganese- Dependent Superoxide Dismutase
MRN: Meiotic recombination protein-11 (MRE11) – RAD50–Nijmegen breakage syndrome protein-1 (NBS1) complex
NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide
NES: Nuclear Export Signal
NHEJ: Non-Homologous End Joining
NLS: Nuclear Localization Signal
NMD : Non sens Mediated-Decay
NoLD : Nucleolar Localization Signal
OB: oligonucleotide/oligosaccharide-binding
OGG1: 8-Oxoguanine glycosylase
Pb: Paire de bases
PDL1: Programmed death-ligand 1
PGC1 α/β : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α/β
PI3K: Phosphoinositide 3-kinase
PML: Promyelocytic Leukemia
POT1: Protection of Telomeres Protein 1
PP2A: Protéin Phosphatase 2
pRb: retinoblastoma protein
RAN: RAs-related Nuclear protein
RAP1: Ras - related Protein 1
RdRP: RNA-dependent RNA polymerase
RISC: RNA-induced silencing complex
RMN: Résonance Magnétique Nucléaire
RMRP: RNA Component Of Mitochondrial RNA Processing Endoribonuclease

RPA: Replication protein A
RT: Reverse transcriptase
scaRNA: Small Cajal body-specific RNA
SiRNA: Small interfering RNA
SMYD3: SET And MYND Domain Containing 3
SnoARN: Small nucleolar ARN

SOD: Superoxyde Dismutase
Sp1: Stimulating protein 1
SSB: Single Strand Break
STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription
TA: Telomerase Activation
TBE: Template Boudary Element
TCF: Transcriptional Factor
TEN: TERT N-terminal
TEP1: Telomerase-associated Protein 1
TERC: Telomerase RNA component
TERT: Telomerase reverse transcriptase
TGF- β : Transforming growth factor β
TIN2: TRF1-Interacting Nuclear factor 2
TLP1: telomerase protein component 1 gene
TOBP1: Topoisomerase (DNA) II Binding Protein 1
TPP1: TINT1-PIP1-Ptop
TR: Reverse Transcriptase
TRBD: TERT-specific high-affinity RNA-binding domain
TRF1: Telomeric Repeat Factor 1
TRF2: Telomeric Repeat Factor 2
USF1/2: Upstream stimulatory factor 1/2

I. Introduction

L'intérêt de la télomérase en recherche n'a jamais été aussi important que depuis la démonstration de son rôle dans le processus de vieillissement et de cancérogenèse. En 2009, trois scientifiques (Elizabeth Blackburn, Carol Greider et Jack Szostak) ont d'ailleurs reçu le prix Nobel de médecine pour leurs travaux sur cette enzyme. Dans le cadre de cette thèse d'exercice, nous allons nous focaliser sur les effets biologiques connus de cette enzyme et sur les différentes opportunités thérapeutiques que celle-ci peut fournir pour des pathologies comme le cancer.

II. Les télomères

Les noyaux cellulaires renferment les chromosomes, supports du patrimoine génétique de chaque être vivant, dont les télomères constituent les extrémités. (Figure 1). Ces télomères sont sujets à des marques épigénétiques répressives et sont de nature hétérochromatinienne.

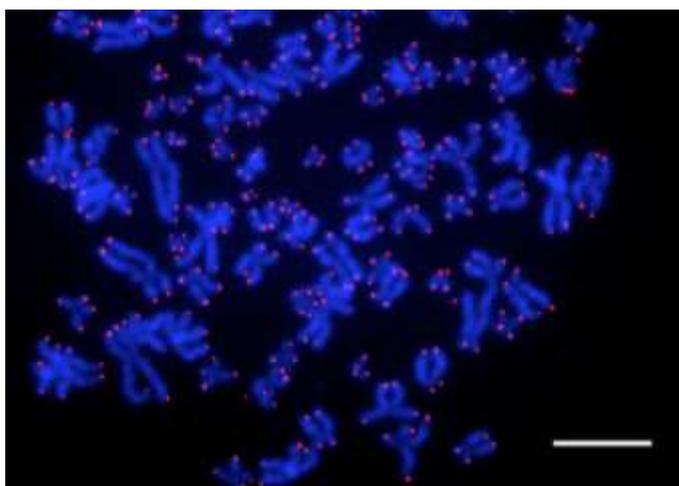


Figure 1: Mise en évidence des télomères sur les chromosomes

Mise en évidence des télomères par une technique de fluorescence in situ (FISH) à l'aide d'une sonde télomérique. Les chromosomes apparaissent en bleu et les télomères en rouge.

Lors de chaque division cellulaire, les chromosomes sont raccourcis d'environ 50 à 200 paires de bases (pb) (Pestana et al., 2017). Lorsqu'ils atteignent une taille limite, la cellule arrête définitivement de proliférer. Les télomères sont ainsi considérés comme les « horloges biologiques » de nos cellules.

1. ADN télomériques

Dans les cellules humaines, les télomères sont constitués de séquences d'ADN répétées hexamériques 5'-TTAGGG-3' et ont une taille moyenne de 9-15 kpb. Ils se terminent par une extrémité cohésive d'ADN libre. La partie simple brin de cette extrémité est appelée la partie 3'G-overhang et a une taille de l'ordre de 50 à 500 nucléotides (Hwang et al., 2014) (Figure 2).

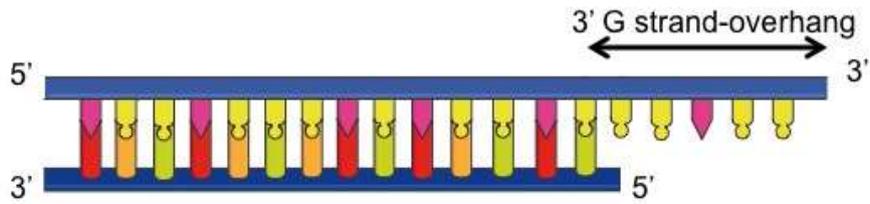


Figure 2: ADN télomérique

Les télomères sont constitués d'une partie double brin de plusieurs kilobases et se terminent par une partie simple brin appelé 3'G-overhang.

Afin d'éviter que cette extrémité soit reconnue comme une cassure double-brin, les télomères adoptent une conformation spécifique permettant de cacher l'extrémité libre 3' simple brin. Il existe deux conformations décrites : le G-quadruplexe et la T-loop.

Du fait de sa haute concentration en guanine, l'ADN télomérique peut former des complexes intra ou intermoléculaires que l'on appelle G-quadruplexe ou G4. Ces tétrades sont stabilisées par des liaisons hydrogènes entre les quatre guanines au sein d'une structure planaire (Figure 3a). L'empilage de plusieurs de ces structures entraîne la formation des G4 qui sont stabilisés par des cations monovalents comme K^+ ou Na^+ .

La structure unimoléculaire avec la formation d'un G4 avec un seul brin d'ADN est possible mais il a aussi été observé *in vitro* des structures composées de plusieurs brins d'ADN. Dans le G4, l'orientation du ou des brins peut varier donnant alors des structures parallèles ou antiparallèles (Figure 3b-e) (Hänsel-Hertsch et al., 2017). En fonction de l'orientation de ces brins, les séquences nucléotidiques qui relient les guanines peuvent alors être latérales, diagonales ou inversées.

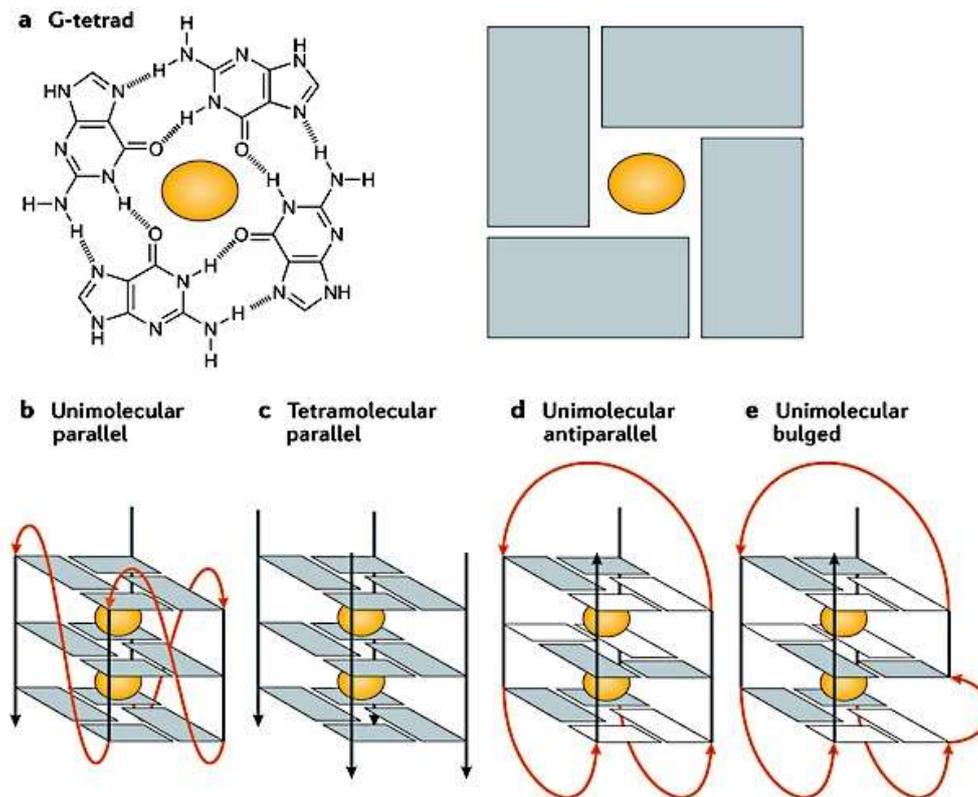


Figure 3: G quadruplexe

A : Schématisation d'un complexe G4 avec l'association des 4 guanines dans un même plan via des liaisons hydrogènes. **B-C-D-E** : représentation des diverses orientations du ou des brins d'ADN contenus dans le G-quadruplexe (Hänsel-Hertsch et al., 2017).

Ces structures de G-quadruplexe ne sont pas spécifiques des télomères mais il a été démontré qu'une conformation intramoléculaire monomérique permettait la stabilisation de l'extrémité simple brin (Oganesian and Karlseder, 2009) (Figure 4).

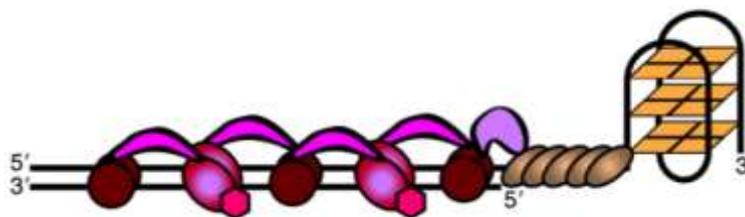


Figure 4: Représentation de l'extrémité télomérique stabilisée par les G-quadruplexe

Par la formation de G-quadruplexe, les extrémités télomériques sont stabilisées (Oganesian and Karlseder, 2009)

Au niveau de la cellule, les G-quadruplexe peuvent être observés lors de différents phénomènes autres que la stabilisation des télomères, dans lesquels une partie de l'ADN est transitoirement sous forme simple brin. C'est le cas des mécanismes comme la transcription, la réplication ou la traduction de l'ARNm. (Figure 5) (Rhodes and Lipps, 2015).

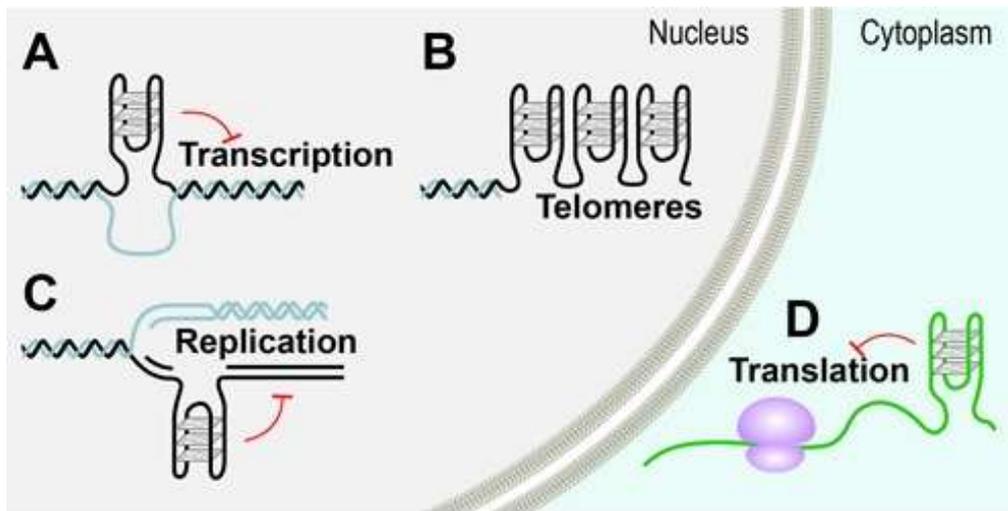


Figure 5: Observation des G-quadruplexe dans la cellule

Les G quadruplexe peuvent être observés lors de différents phénomènes au sein de la cellule :

A : la transcription, **B** : la stabilisation des télomères, **C** : la réplication et **D** : la traduction (Rhodes and Lipps, 2015).

Concernant l'hypothèse de la T-loop, Griffith et son équipe sont les premiers en 1999 à la visualiser grâce à la microscopie électronique (Figure 6).

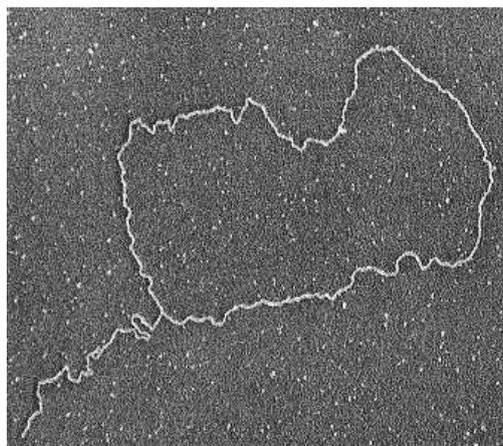


Figure 6: Boucle télomérique (T-loop)

Visualisation par microscopie électronique (Griffith et al., 1999)

Cette boucle télomérique est en fait constituée de deux boucles T et D (T-loop et D-loop). La boucle T correspond au repliement de la partie double brin des télomères et la boucle D est formée par l'hybridation de la partie 3' simple brin au sein de la boucle T, déplaçant le brin 5'-3' amont (Figure 7).

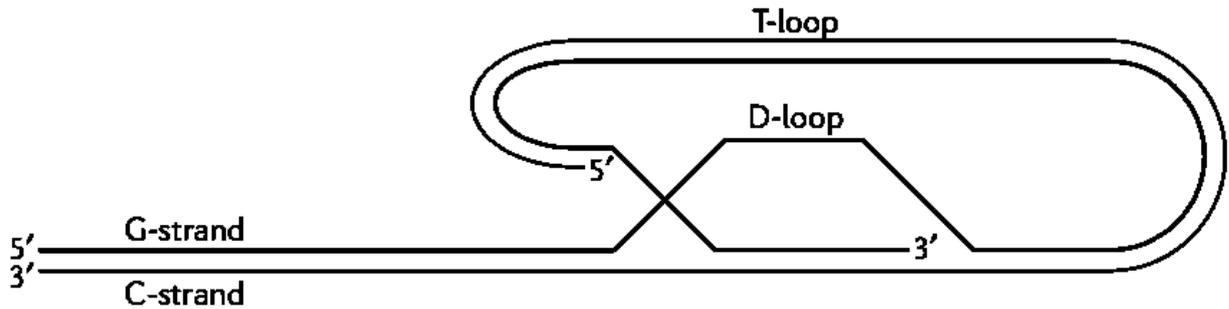


Figure 7: Conformation télomérique en boucles

Représentation schématique de la T-loop permettant le repli de la séquence d'ADN double brin et de la D-loop hybridant la partie 3'G-overhang (Nandakumar and Cech, 2013).

Cette structure pourrait par ailleurs être stabilisée, par la formation de G-quadruplexe en conformation intramoléculaire monomérique, comme démontré *in vitro*, dans un milieu riche en potassium (Xu et al., 2007) (Figure 8). Cependant sa mise en place et son maintien sont contrôlés par un ensemble de protéines formant le complexe Shelterin.

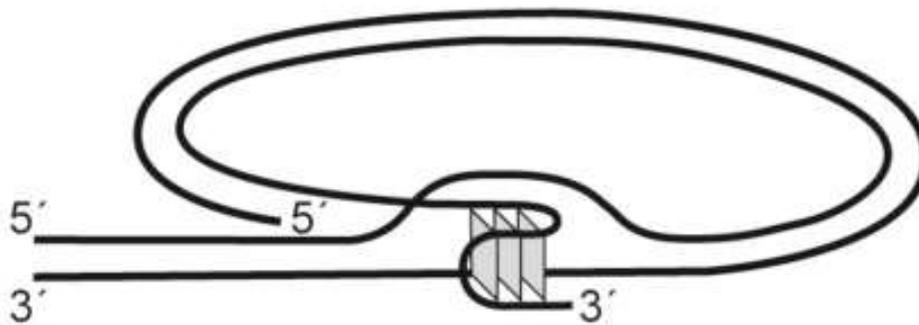


Figure 8: Stabilisation de la D-loop par la formation de G quadruplexe

Cette conformation de G quadruplexe permet la stabilisation de la D-loop et ainsi le bon repliement des extrémités télomérique (Garavís et al., 2013).

2. Complexe Shelterin

Le complexe Shelterin, (de shelter, signifiant « abris » en anglais), assure donc la stabilité de cette boucle et protège ainsi les extrémités télomériques (Figures 9 et 10).

Ce complexe est composé de 6 protéines dans les cellules humaines :

- TRF1 et TRF2 liées à la partie double brin
- POT1 fixée à la partie simple brin
- TIN2 faisant le lien entre TRF1 et TRF2 d'une part et TPP1 d'autre part
- TPP1 faisant le lien entre TIN2 et POT1
- RAP1 fixée à TRF2

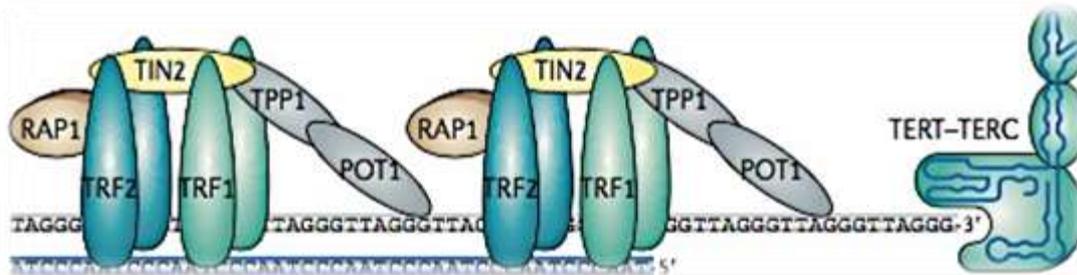


Figure 9: Complexe protéique Shelterin

Répartition des 6 protéines du complexe sur l'ADN télomérique. La télomérase est représentée avec ses deux sous unités TERT et TERC (Martínez and Blasco, 2011).

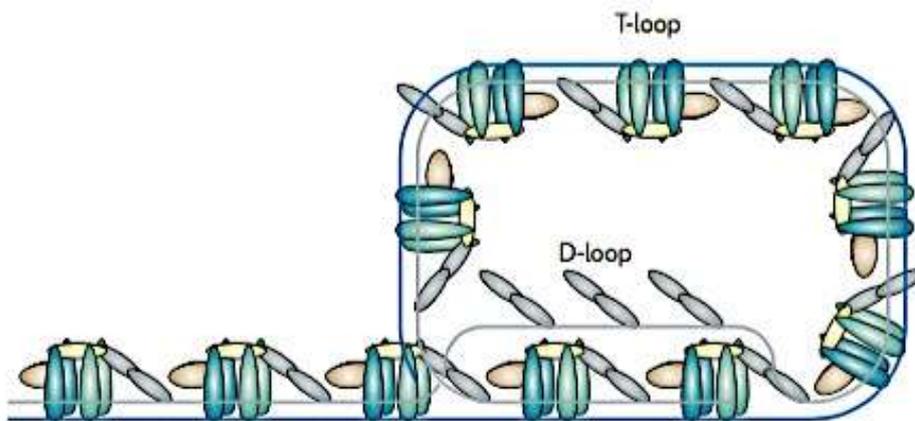


Figure 10: Conformation télomérique stabilisée par le complexe Shelterins

Par l'intermédiaire des interactions protéiques entre les composants du Shelterin, les deux boucles télomériques sont stabilisées, assurant la protection des télomères (Martínez and Blasco, 2011)

Il est à noter que les protéines TRF1 et TRF2 sont présentes tout au long des télomères mais sans le reste du complexe Shelterin, au contraire des autres protéines comme TPP1 ou POT1 (Takai et al., 2010).

Du fait de leur localisation ces 6 protéines ont des rôles télomériques mais il a été aussi démontré que certaines d'entre elles possèdent aussi des rôles extra-télomériques.

a. Protection des télomères

De façon physiologique, suite à un dommage de l'ADN causant une cassure double-brin (DSB : double strand break) ou simple brin (SSB : single strand break) des mécanismes de réponses aux dommages à l'ADN (DNA damage Response ou DDR) se mettent en place afin de permettre leur réparation et par suite de sauvegarder l'intégrité génétique.

Il existe deux mécanismes de réparations des DSB, l'un conserve l'information génétique intacte par un mécanisme de recombinaison homologue (Homologous Recombination ou HR), l'autre va induire une perte d'information par la « suture » de deux extrémités double brins entre elles (Non-Homologous End Joining ou NHEJ) (Figure 11).

Dans la voie NHEJ, l'intervenant protéique pour la reconnaissance de la cassure double brins est la DNA-PK (DNA dependant kinase) constituée de Ku70/Ku80 et de sa sous unité catalytique DNA-PKcs. La jonction des deux brins d'ADN se réalise par l'intermédiaire du

complexe Xrcc4/Ligase IV. Pour la recombinaison homologue, la reconnaissance de la cassure double brin se fait par le complexe MRN (Mre11/Rad50/Nbs1) qui va induire un remodelage de la chromatine. Le complexe RPA (Replication Protein A) se fixe alors sur l'ADN entraînant la formation de simples brins. La recombinaison peut alors être réalisée via la fixation de RAD51 sur ces extrémités simple brin et la synthèse de d'ADN complémentaire (Figure 11).

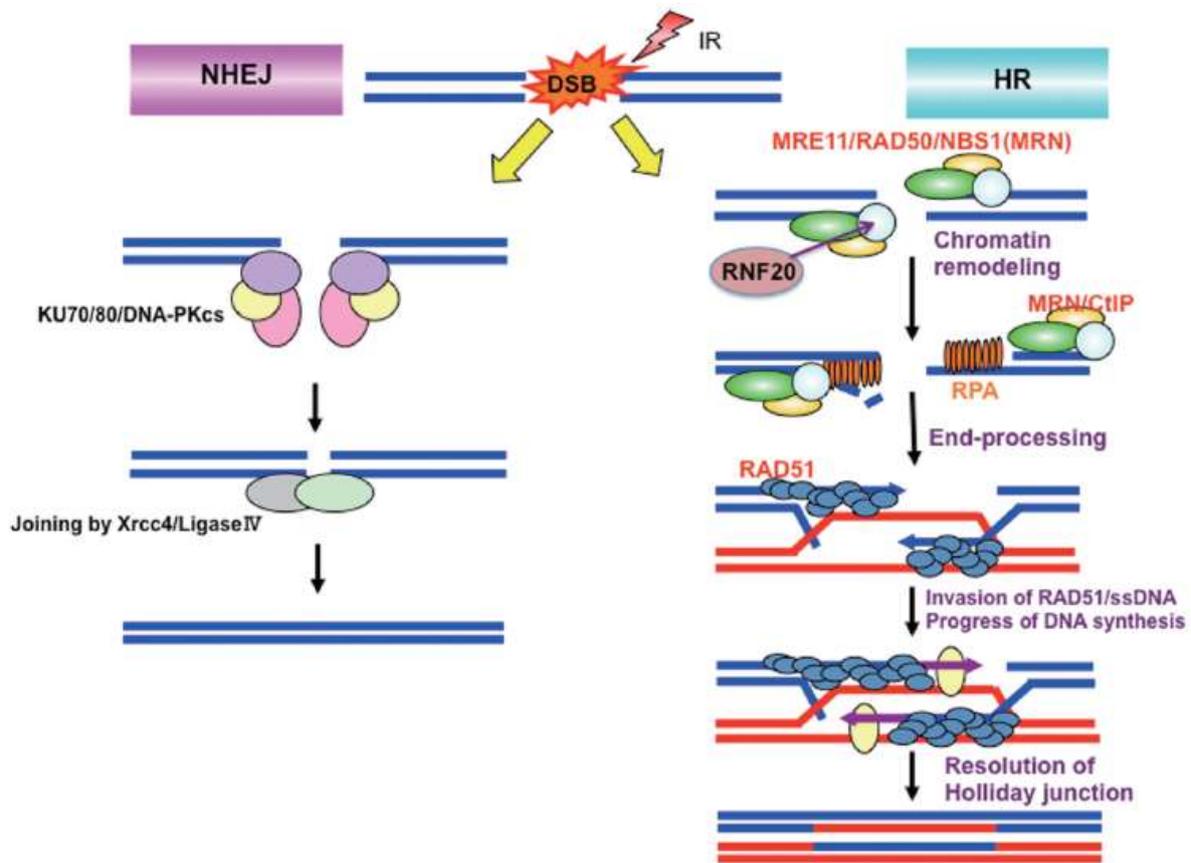


Figure 11: Mécanismes de réparation des cassures doubles brin d'ADN

Suite à une cassure double brin, l'ADN peut être réparé de deux façon différentes : avec le système de recombinaison homologue (HR) ou de rejoignement des extrémité par recombinaison non homologue (NHEJ) (Saito et al., 2013).

Les signalisations induisant la réparation de l'ADN suite à des cassures doubles brins sont médiées par l'intermédiaire de kinases (figure 12) :

Tout d'abord, suite à des cassures double brin de l'ADN, le complexe MRN peut être recruté. Ce complexe va alors recruter lui-même la protéine kinase ATM. Cette protéine, inactive sous forme dimérisée s'autophosphoryle, ce qui dissocie le dimère et rend alors la kinase active. La kinase ATM phosphoryle alors le variant d'histone H2AX (γ H2AX) qui recrute différents partenaires comme 53BP1 ou BRCA1 qui seront aussi phosphorylés par la kinase ATM. L'ensemble de ces protéines phosphorylées va alors initier des signaux d'arrêt du cycle cellulaire (via CHK2) et permettre la mise en place des processus de réparation de l'ADN.

Suite à une cassure simple brin, une autre voie de signalisation est activée : il s'agit de la voie ATR (ATM kinase reliée à la RAD3 kinase). Cette voie est activée par la liaison du complexe RPA sur l'ADN simple brin exposé. Le complexe Rad1-Rad9-Hus1 (complexe 9.1.1) et

ATRIP se fixe alors sur le complexe RPA. ATR liée à ATRIP recrute alors TOPBP1, cette liaison entraîne alors la phosphorylation de la kinase CHK1 par ATR qui permet l'activation de diverses voies comme l'arrêt du cycle cellulaire (Cimprich and Cortez, 2008).

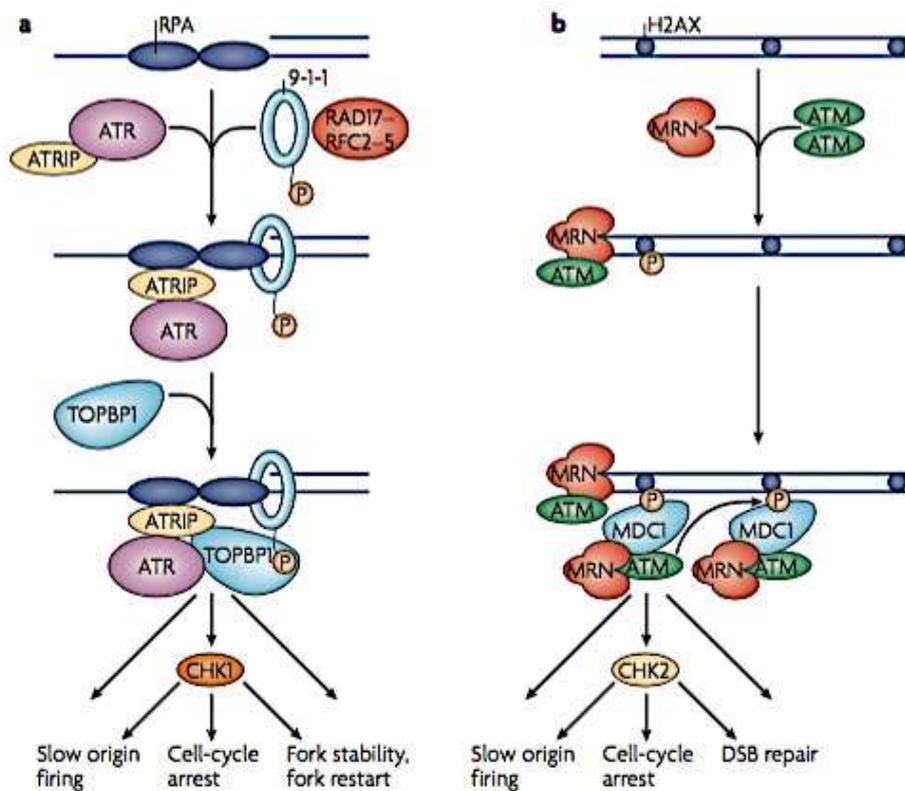


Figure 12: Activation des voies de l'ATR kinase et de l'ATM kinase

A : la voie de l'ATR et **B** de l'ATM kinase qui permettent l'arrêt du cycle cellulaire et la mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN. (Cimprich and Cortez, 2008).

Après arrêt du cycle et initiation de la réparation, ces kinases peuvent envoyer de nouveaux signaux. En effet, si cette réparation est mauvaise ou impossible, elles induiront un signal de mort cellulaire par apoptose ou de sénescence répliative.

La voie de la kinase ATM reposant sur la fixation du complexe MRN à l'ADN double brin libre, la formation de la boucle T télomérique inhibe donc cette voie.

En effet, il a été observé qu'au niveau des télomères, il suffisait d'une seule séquence 5'-TTAGGG-3' proche du duplex télomérique pour la formation efficace de la boucle T. Cette efficacité est levée en cas de déficience en TRF2 (Stansel et al., 2001). Il a donc été démontré que la protéine TRF2 jouait un rôle important dans le maintien de la boucle T (De Lange, 2004) et donc dans l'inhibition de la voie de l'ATM kinase prévenant ainsi les mécanismes de réparation de l'ADN qui seraient inappropriés.

D'un autre côté, la voie de l'ATR kinase est initiée par la liaison du complexe RPA sur l'ADN monocaténaire. Dans ce cadre, POT1, par sa fixation au niveau de la boucle T sur la partie monocaténaire de l'ADN télomérique empêche la fixation de ce complexe et entraîne alors l'inhibition de la voie de l'ATR kinase (De Lange, 2009).

En s'intéressant aux autres protéines du complexe Shelterin, Sfeir et ses collègues ont pu observé l'apparition de dommages à l'ADN lors d'une délétion de la protéines TRF1. Cela correspond à un trouble des mécanismes de réparation de l'ADN au niveau des télomères. Ces dommages étant non visibles lors de l'inhibition la kinase ATR, ils ont pu conclure que TRF1 permettait elle aussi de protéger les extrémités télomériques des mécanismes de réparation inappropriés induit par la voie de ATR (Sfeir et al., 2009).

C'est donc en inhibant l'accès aux séquences télomériques des protéines du DDR, que les protéines du Shelterin permettent la sauvegarde des télomères contre les différents mécanismes de réponses aux dommages à l'ADN.

En parallèle de ce rôle « conformationnel », des interactions directes entre différents membres du Shelterin et des composants du DDR (comme Ku70, Ku80 pour TRF2) ont été rapportées et participeraient également du contrôle contre l'activation inappropriée d'un DDR.

Nous avons vu que la protéine POT1 se fixe sur la partie simple brin de l'ADN télomérique c'est à dire sur la séquence 3'-G overhang.

Ainsi cette partie est protégée des mécanismes de recombinaison homologue et non homologue dont elle pourrait être sujette mais aussi des réponses entraînant la mort cellulaire comme celle médiée par la kinase ATR vu précédemment. Concernant son rôle sur la voie de l'ATR kinase, il a été montré chez la souris que la délétion des deux isoformes murines de POT1 : POT1b et POT1a entraînait l'activation de la voie de l'ATR kinase (He et al., 2006; Kibe et al., 2010) en permettant la fixation du complexe RPA sur l'ADN. Ainsi il a été confirmé que POT1 protège les extrémités télomérique de la voie de l'ATR kinase.

b. Réplication des télomères

En conditions physiologiques, lors de la phase de réplication de l'ADN, la télomérase (dont nous détaillerons le mode d'action plus loin) permet l'allongement des télomères. Les protéines télomériques sont essentielles pour ce processus.

Par exemple, en cas de délétion de TRF1, la réplication des télomères n'est pas correcte et entraîne alors une mort cellulaire rapide (Sfeir et al., 2009).

Pour expliquer cet effet, il existe différentes explications : premièrement, en cas de délétion de TRF1, les télomères vont activer la voie de l'ATR kinase en phase S du cycle cellulaire. Cela entraîne alors la formation de télomères avec des structures aberrantes en métaphase (lié à des troubles de la condensation des télomères ou des cassures de l'ADN) qui entraîneront la mort cellulaire. L'autre explication est liée à l'action de TRF1 sur la réplication de l'ADN télomérique. En effet, TRF1 permet le recrutement d'hélicase comme BLM RecQ qui supprime la formation des G-quadruplexe qui entravent la fourche de réplication télomérique (Sfeir et al., 2009).

De la même façon, afin que l'élongation des télomères puisse avoir lieu, il est nécessaire que la télomérase soit recrutée au niveau des télomères. Pour cela, TPP1 possède un rôle central et crucial. Tejera et al. ont montré en 2010 que TPP1 permettait le recrutement de la télomérase et interagissait avec sa sous unité catalytique TERT *in vivo*. (Tejera et al., 2010). Cette action est indépendante de la présence de la protéine POT1. Par la suite il a tout de même été démontré que POT1 possédait un rôle dans le contrôle de la processivité de l'enzyme en se liant à TPP1 (Wang et al., 2007a).

Concernant le lien entre TPP1 et TERT, il a été démontré que parmi les 8 sites théoriques de phosphorylation de TPP1, la phosphorylation de la serine S111 en fin de phase G2/M du cycle cellulaire permettait l'augmentation de l'interaction de TPP1 avec TERT (Zhang et al., 2013).

Ainsi, nous pouvons donc conclure que le complexe Shelterin possède différentes actions au niveau des télomères qui permettent leur stabilité, leur protection mais aussi leur réplication (Tableau I).

Tableau I: Récapitulatif des rôles télomériques des protéines Sheltrins

	TRF1	TRF2	POT1	TIN2	RAP1	TPP1
Protection télomères	X	X		X	X	X
Protection G'overhang			X			
Recrutement télomérase						X
Réplication télomères	X					X

III. La télomérase

La télomérase est une ribonucléoprotéine exerçant une activité de transcriptase inverse nécessaire à l'allongement des télomères. Elle a été identifiée et décrite la première fois en 1985 par Elizabeth H. Blackburn dans des extraits cellulaires de *Tetrahymena thermophila*, un protozoaire cilié (Greider and Blackburn, 1985). Ceci lui vaudra de recevoir le Prix Nobel de médecine en 2009. Quelques d'années plus tard, la télomérase sera observée sur des cellules humaines immortalisées (HeLa) (Morin, 1989).

Dans l'organisme humain, la télomérase est exprimée dans les cellules germinales, dans les cellules souches et progénitrices et dans des tissus à taux de prolifération élevés (tels que des lymphocytes activés) et son activité est absente dans les cellules somatiques normales.

Cette enzyme est composée d'une sous unité catalytique (TERT), d'un ARN matrice (TERC ou TR) ainsi que des sous unités protéiques associées (comme la Dyskérine).

1. La sous unité catalytique

Le gène *TERT* codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase est situé sur la partie distale du chromosome 5 (5p15.33) et est composé de 16 exons et de 15 introns. La protéine est constituée de 1132 acides aminés (127kDA) et sa séquence est très similaire d'une espèce à l'autre.

La protéine TERT est constituée du domaine N-terminal (TEN) relié via un domaine linker à l'anneau TERT, lui-même constitué des domaines TRBD (domaine de liaison à haute affinité à l'ARN), RT (reverse transcriptase) et CTE (C-terminal extension). Les interactions intramoléculaires entre TRBD et CTE sont à l'origine de la conformation en anneau et forme en leur centre le site actif de l'enzyme qui contient le duplex ARN matrice – ADN télomérique.

Par ailleurs, les motifs T, 1, 2, 3, A, IFD, B, C, D et E, composant le site actif de l'enzyme sont très conservés au cours de l'évolution (Figure 13), les autres domaines plus divergents autorisent des interactions et des régulations spécifiques d'espèces.

En observant que certaines espèces ne possédaient pas de domaine TEN, l'équipe de Robart AR. a cherché à savoir si le domaine TEN était indispensable pour la bonne activité de TERT chez l'homme. Ils ont ainsi démontré que TERT possédait la capacité de catalyser la synthèse des répétitions télomériques sans l'aide de TEN *in vitro* (Robart and Collins, 2011). Cependant la processivité de l'enzyme est directement dépendante de son interaction via le domaine TEN avec le complexe POT1-TPP1. (Zaug et al., 2010). En effet, il est a noté que le domaine TEN et en particulier la glycine 100 interagit avec le domaine OB (oligonucleotide/oligosaccharide-binding) de TPP1 *in vitro* mais aussi *in vivo*.

Cette interaction module également le recrutement de TERT aux télomères. En effet, des mutations dans le domaine TEN perturbant l'interaction TERT-TPP1 causent des troubles dans le recrutement de la télomérase (Schmidt et al.).

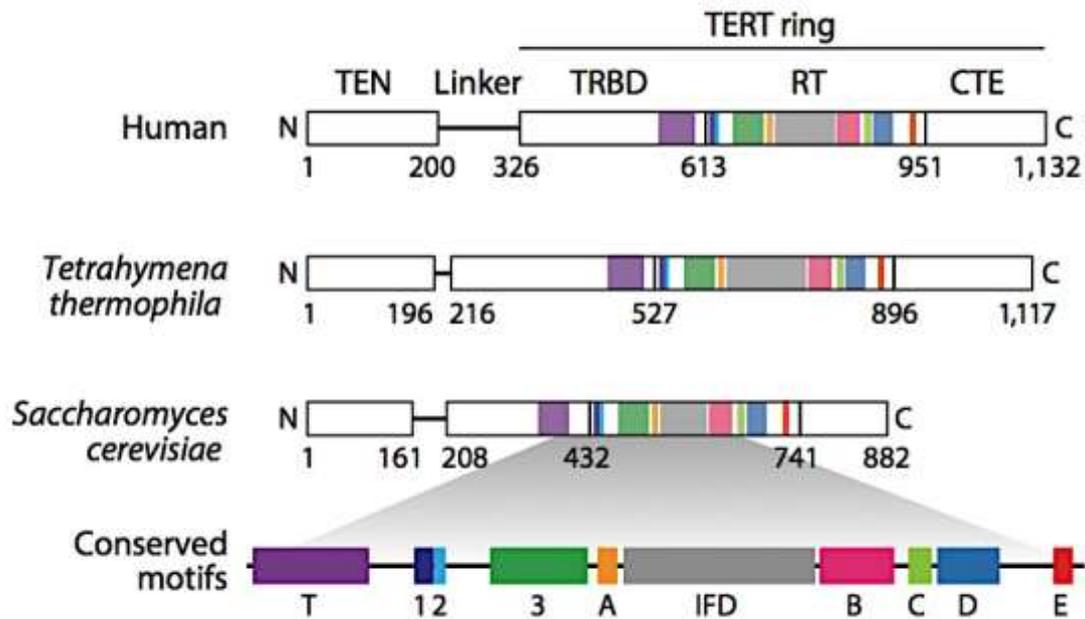


Figure 13: Schéma de la protéine TERT

Dans cette représentation de la protéine TERT, il est observable que les domaines T, 1, 2, 3, A, IFD, B, C, D et E sont conservés au travers de diverses espèces telles que l'Homme, *tetrahymena thermophila* (protozoaire) ou de *Saccharomyces cerevisiae* (levure) (Wu et al., 2017).

Il est à noter que TERT possède différentes localisations cellulaires, en effet, TERT a été observée dans le noyau, la mitochondrie ou encore dans le cytoplasme. Pour permettre ces différentes localisations, TERT possède des signaux d'adressage. À l'intérieur du noyau, TERT transite également par différents compartiments pour permettre sa maturation (voir plus loin).

Elle possède ainsi un domaine de localisation nucléolaire (NoLD) (Etheridge et al., 2002) situé entre les acides aminés 326 et 620 (Figure 14). Une mutation dans ce domaine empêche l'association de TERT et de TERC. De plus des mutations des domaines II ou du motif T entraînent une impossibilité de localisation nucléolaire alors que des mutations du domaine III ne perturbent pas la translocation. Il est aussi à noter que TERT s'accumule dans les nucléoles des cellules n'exprimant pas TERC.

TERT est une protéine de grande taille, dont l'export nucléaire via les pores nucléaires demande une machinerie spécifique. (Seimiya et al., 2000). En démontrant que la liaison de la protéine 14.3.3 avec TERT à son extrémité C-terminale permettait l'export de TERT du noyau, il a été possible d'identifier la séquence correspondante de TERT conditionnant la translocation cytosolique de TERT. Il s'agit de la séquence NES (signal d'export nucléaire) en position 970-981 de TERT. Cette séquence est riche en Leucine et hydrophobe (conditions de l'export nucléaire) et se lie aux résidus 1030-1047 de la protéine 14.3.3.

Pour son import nucléaire, le signal de localisation nucléaire (NLS) a été identifié comme étant la séquence d'acides aminés 222-240 (Chung et al., 2012). De plus, il est à noter que la

phosphorylation de la serine 227 par Akt est nécessaire pour l'import complet et correct de TERT dans le noyau. La translocation de TERT depuis le noyau peut ainsi être induite sous conditions de stress oxydatif qui entraînerait la phosphorylation de la tyrosine 707 par la protéine Src (Haendeler et al., 2003a).

Plus récemment, un signal de localisation mitochondrial (MLS) a aussi été décrit suite à l'observation de TERT dans les mitochondries (Santos et al., 2004), cette séquence est constituée des 20 premiers acides aminés N-terminaux de TERT. Il est à noter que ce changement de localisation de TERT n'est rendu possible qu'après une phosphorylation de la tyrosine 707 de TERT par une kinase de la famille des Src kinase. Ainsi la forme phosphorylée de TERT est présente dans la mitochondrie. Cette relocalisation est inhibée par PP1 : l'inhibiteur naturel de la famille des Src Kinase (Haendeler et al., 2003a).

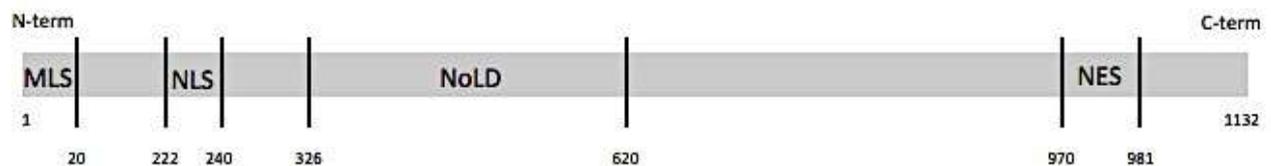


Figure 14: Localisation des différents signaux d'adressage de TERT

Avec la présence d'un MLS et d'un NLS pour l'import mitochondrial et nucléaire, un NoLD pour la localisation nucléolaire ainsi qu'un NES pour l'export nucléaire, TERT peut donc avoir différentes localisations subcellulaires.

Dans les formes autres que nucléaires, TERT serait présente de façon indépendante de TERC, et sa présence serait ainsi indépendante de son action de transcriptase inverse (Maida et al., 2009; Park et al., 2009; Sharma et al., 2012).

Ainsi TERT semble avoir des rôles extra-téломériques que nous détaillerons un peu plus loin.

2. La sous unité ribonucléique TERC et ses co-facteurs

Le gène codant pour TERC se situe sur le chromosome 3 (3q26.2). Au contraire de la sous-unité TERT qui montre une grande homologie à travers les espèces, la sous-unité ribonucléique possède elle une grande variabilité de séquence et de structure secondaire avec tout de même certains domaines structuraux très conservés.

En effet, les domaines pseudknot (liant TERT), ARN matrice, les éléments liés à la matrice ou TBE (Template Boundary Element) et les zones de fixation à TERT sont toujours présents et un dernier domaine permet la liaison de divers partenaires protéiques que nous détaillerons par la suite (Figure 15).

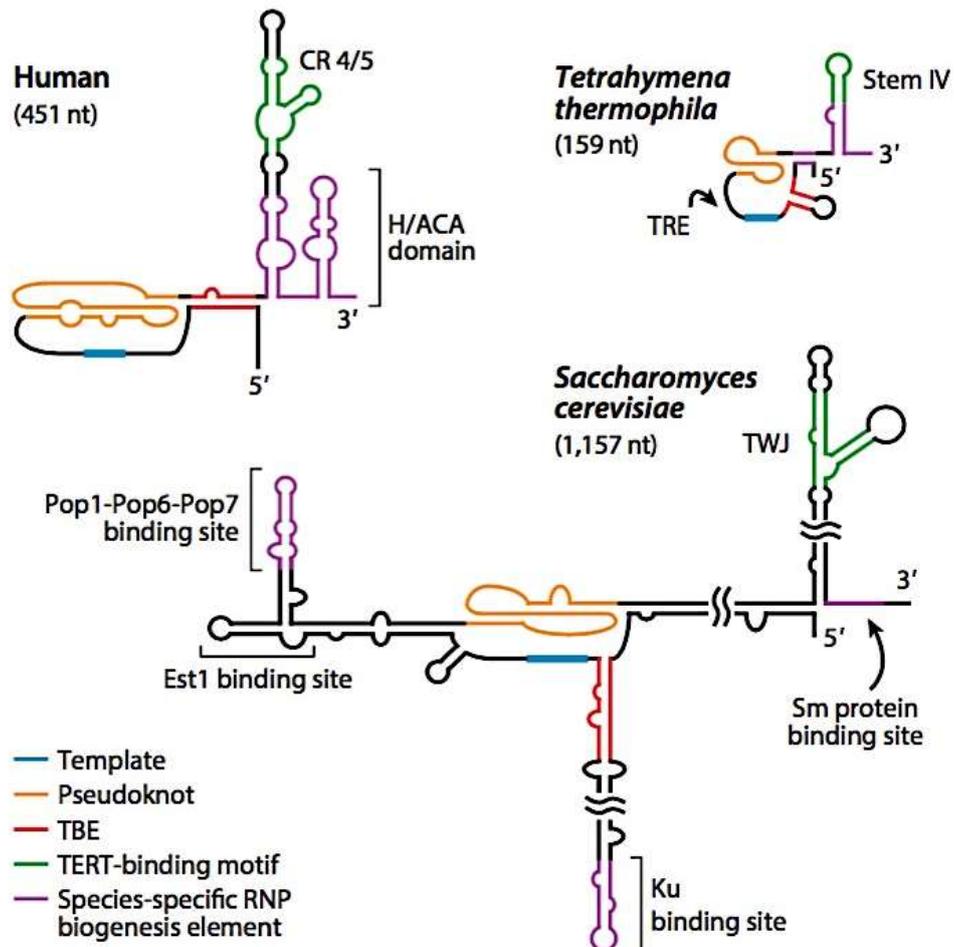


Figure 15: Structure de la sous unité ribonucléique de la télomérase

Représentation de la sous unité TERC avec les différents domaines communs entre les espèces. TERT se liant à la partie contenant pseudoknot-TBE-template ainsi qu'au domaine contenant le motif de liaison à TERT (Wu et al., 2017).

Chez l'homme, TERC comporte 445 nucléotides composant les 7 régions conservées (CR) (Figure 16). CR1 contenant le brin matriciel d'ARN, CR2 et CR3 composent le pseudoknot, CR4 et CR5 permettent la fixation de TERT. CR6 et CR7 ont un rôle dans la stabilité de TERC (Legassie and Jarstfer, 2006). TERT se fixe donc via les domaines CR2/CR3 et CR4/CR5.

L'ARN matrice de la télomérase possède par ailleurs plusieurs partenaires protéiques (Figure 17).

Le principal partenaire est la Dyskérine. Cette protéine est codée par le gène DKC1 sur le chromosome X (Xq28), il code pour 514 acides aminés composant la protéine (57KDa).

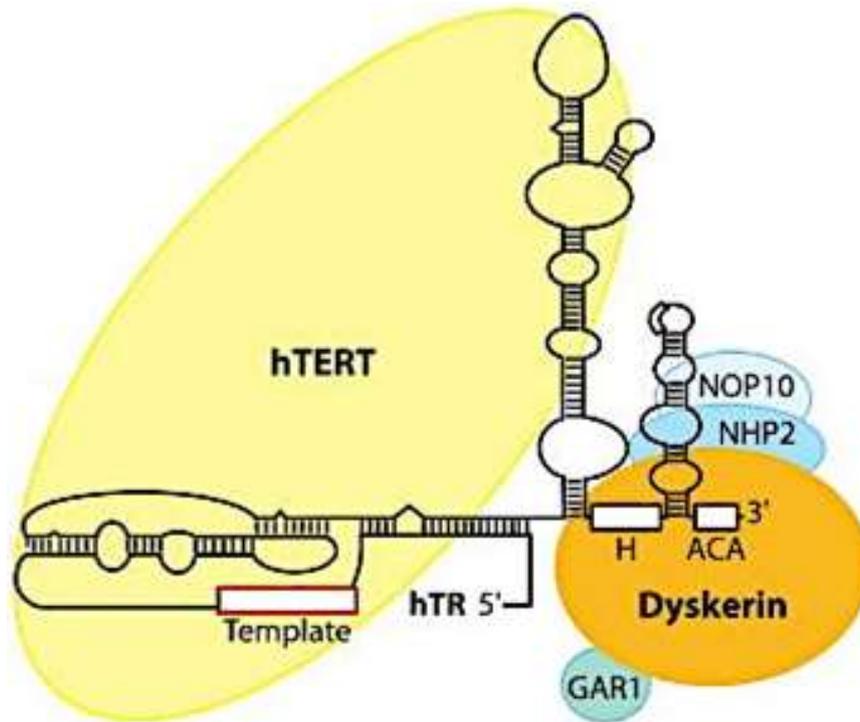


Figure 17: Le complexe télomérase

La forme active de la télomérase est composée de hTERT stabilisée sous forme de complexe ribonucléique avec l'ARN TERC et ses partenaires protéiques : la Dyskérine, NOP10 NHP2 et GAR1 (Armanios, 2009).

La Dyskérine est associée aux longs ARN non codants comportant une boîtes H/ACA, comme TERC. Selon la nature de l'ARN elle possède un rôle différent, dans les cas des SnoARN elle est impliquée dans la biogénèse des ribosomes avec la conversion des résidus uridine des ARN ribosomiques en pseudouridine, qui confère alors aux ribosomes leur activité (Figure 18).

Au niveau des télomères, elle stabilise le complexe TERT-TERC en se liant spécifiquement sur TERC via son motif H/ACA (Mitchell et al., 1999) (Figure 17).

Quelles que soient ses fonctions, la Dyskérine agit sous forme de complexe avec trois autres protéines : NOP10, GAR1 et NHP2. Ces protéines sont elles aussi liées à l'ARN TERC.

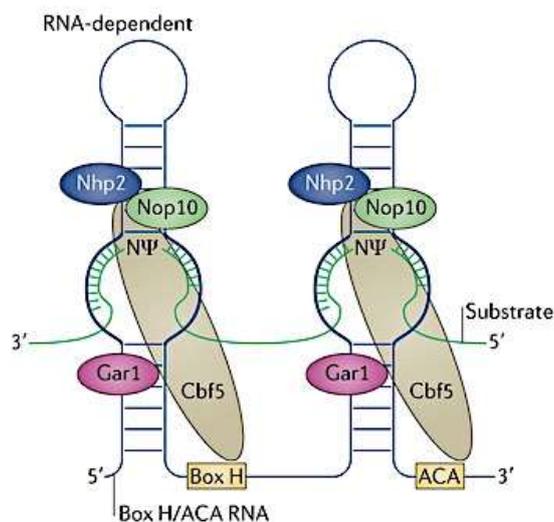


Figure 18: Pseudouridination des ribosomes

Localisation de l'ensemble des protéines de la boîte H/ACA au niveau des ARN ribosomiques permettant la formation de pseudouridine (Ψ) (Karijolich et al., 2015).

3. Les protéines associées à la télomérase

La télomérase est un composant important pour la survie cellulaire, remplissant diverses fonctions. Pour ce faire, elle est liée avec différents partenaires protéiques permettant la mise en place de diverses voies de signalisation mais aussi participant à la maturation de l'enzyme et donc à son activité. Ainsi les partenaires de la télomérase seront différents selon le rôle, la localisation ou le stade de maturation de TERT.

a. Hsp90 et p23

En 1999, S.E. Holt et al ont montré l'importance de la liaison entre la sous-unité TERT et les protéines p23 et Hsp90. En effet, ces protéines permettent le bon assemblage de la télomérase et donc son activité transcriptase inverse (Holt et al., 1999).

Hsp90 est une protéine permettant un bon repliement tridimensionnel des protéines mais elle possède aussi un rôle pour les protéines dépliées, les protégeant afin qu'elles ne s'agrègent pas entre elles.

Cette interaction protéique avec Hsp90 et p20 favoriserait donc la maturation et la protection de TERT.

b. Hsp90 et Akt

Dans ce contexte, en 2003, Haendeler et ses collègues ont montré que la liaison des protéines Hsp90 et Akt à TERT stimule la fonction anti-apoptotique de la télomérase (Haendeler et al., 2003b).

En effet, la PI3 kinase phosphoryle Akt qui phosphoryle à son tour TERT et forme alors un complexe trimérique avec Hsp90. Hsp90 étant nécessaire à la protection contre la

déphosphorylation d'Akt par PP2A, la liaison entre ces trois composés régule alors positivement la fonction anti-apoptotique de TERT

c. **TEP1**

La protéine p80 a été identifiée pour la première fois en 1995, comme un partenaire de TERC chez *Tetrahymena thermophila*, (Collins et al., 1995; Harrington et al., 1995). Son homologue humain a été identifié en 1997, il s'agit de TEP1 codée par le gène TLP1 (Nakayama et al., 1997). Cette protéine est essentielle pour l'activité de la télomérase mais ne permet pas à elle seule activer l'enzyme (Harrington et al., 1997). TEP1 lie à la fois TERC et TERT afin de jouer son rôle de régulateur.

En dehors de ces partenaires directs, d'autres protéines liées à la télomérase sont connues, même si pour certaines leur rôle n'a pas encore été établi précisément.

4. **Assemblage de la télomérase**

Afin d'être fonctionnelle, les différentes sous-unités de la télomérase doivent s'assembler selon différentes étapes (Zhong et al., 2012).

Tout d'abord, TERC est fixé et stabilisé par les protéines NOP10, NHP2 et la Dyskérine dans les nucléoles puis est associé dans les corps de Cajal à TERT. Il est à noter que TERT est aussi localisé dans les nucléoles (grâce à son signal NoLD), ou elle est stockée avant son assemblage avec TERC.

Au niveau des corps de Cajal, une sous unité d'holoenzyme : TCAB1 (telomerase Cajal body protein1) est présente en forte quantité. TCAB1 doit être repliée par un système de chaperonne CCT/TRIC (Freund et al., 2014). Une fois sous forme active, la protéine TCAB1 possède plusieurs rôles : premièrement, la présence de TCAB1 dans les corps de Cajal est nécessaire pour la localisation de TERC dans ces corps de Cajal. Dans un second temps, il a été montré que TCAB1 s'associait spécifiquement avec des petits ARN spécifiques des corps de Cajal (scaRNAs) impliqués dans les modifications d'épissage d'ARN. Ce complexe TCAB1-scaRNA fixe alors un complexe actif TERC-TERT-protéines associées et cette liaison permet l'association télomérase-téломères et donc l'allongement des télomères (Venteicher et al., 2009) (Figure 19).

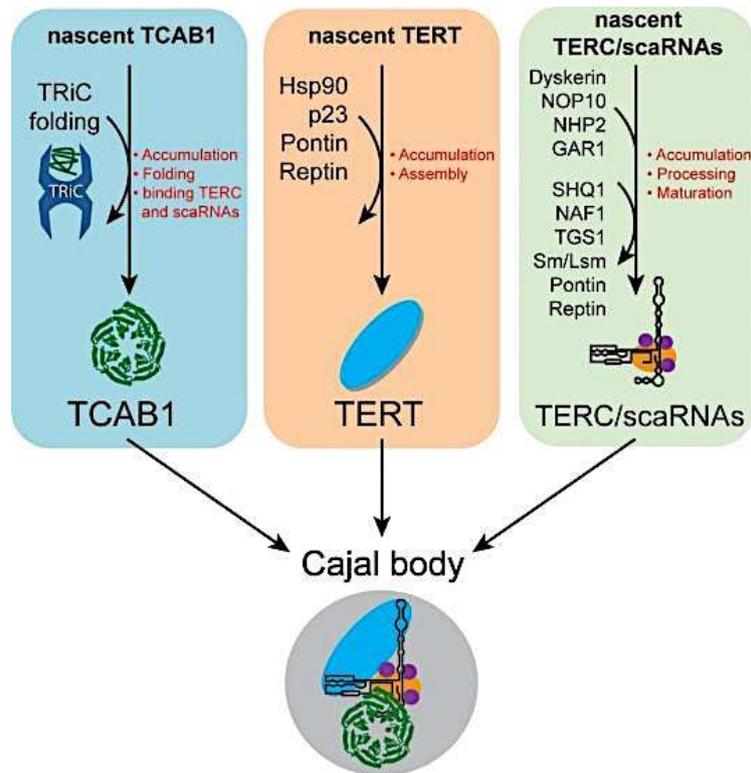


Figure 19: Assemblage de la télomérase dans les corps de Cajal

Après la maturation des différents acteurs que sont TCAB1, TERT et TERC, la formation du complexe final se réalise dans les corps de Cajal sous la dépendance de TCAB1 qui est spécifiquement lié à des petit ARN modulant l'épissage d'ARN (scaRNA) (Freund et al., 2014).

Lors de la phase S, les corps de Cajal s'associent aux télomères, étape qui permet l'activité de la télomérase. Le recrutement de TERT aux télomères se fait par l'action de TPP1. En effet, le recrutement se réalise via le domaine OB de TPP1, et sous la dépendance de TIN2 qui recrute elle-même TPP1 au télomère (Abreu et al., 2010). Une fois l'extension du télomère commencée, l'interaction POT1-TPP1 augmente son efficacité en réduisant la vitesse de dissociation de TERC et promeut ainsi la translocation de la télomérase en aval et l'ajout de nouvelles répétitions télomérique (Wang et al., 2007b).

IV. La signalisation et régulation de la télomérase

Il est connu que le facteur limitant de l'activité de la télomérase est le niveau d'expression de TERT. La quantité de TERC est quant à elle en large excès et ne conditionne pas l'activité enzymatique (Yi et al., 2001). Ainsi, une étude a montré que le niveau d'expression de TERT est fortement corrélé avec l'activité de la télomérase (Kilian et al., 1997). La régulation de l'expression de TERT se fait à différents niveaux. Elle peut survenir suite à des modifications épigénétiques, ces modifications ont lieu avant la transcription de l'ADN et n'entraînent pas de changements au niveau de la séquence nucléique du gène. Des modifications transcriptionnelles en trans faisant intervenir des facteurs activateurs ou inhibiteurs de transcription peuvent aussi avoir lieu, ainsi que des régulations en cis via des mutations des séquences promotrices de TERT. Des modifications post-transcriptionnelles jouant sur l'épissage des pré-ARNm existent également. Enfin, des remaniements peuvent survenir au moment de la traduction de l'ARNm en protéine (Figure 20).

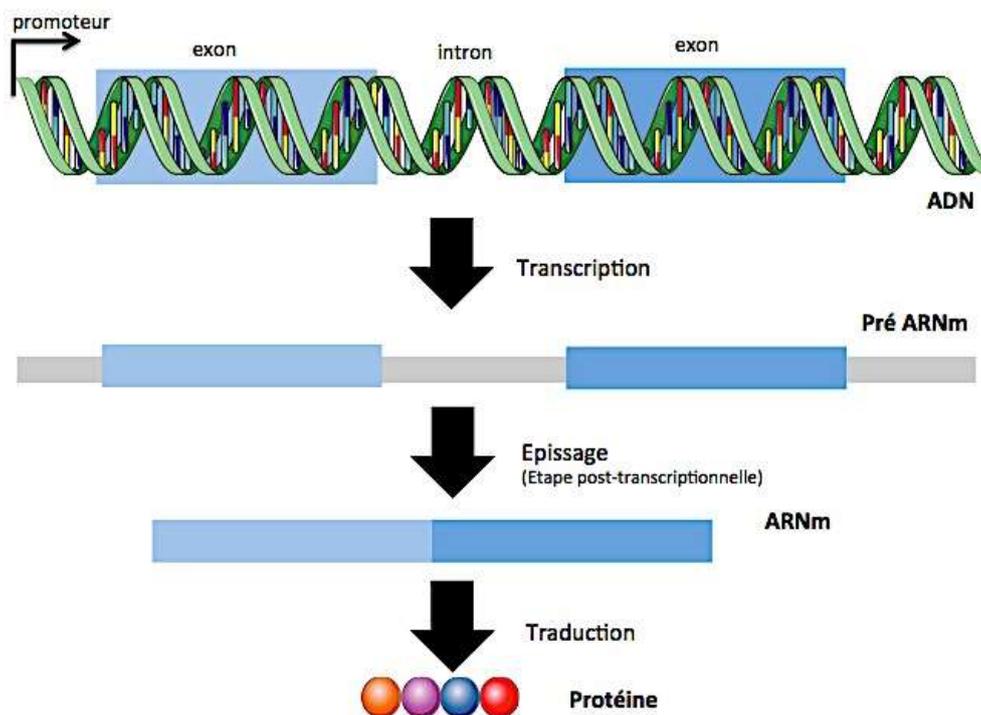


Figure 20: Etapes de la synthèse protéique

Avec les différentes étapes de la synthèse protéique, nous pouvons observer les différents niveaux de régulation de la télomérase.

1. Modifications épigénétiques

Dans le noyau, notre ADN est enroulé autour d'octamères d'histones, formant ainsi des nucléosomes. L'organisation spatiale de ces nucléosomes permet de compacter l'ADN et d'organiser des territoires chromatinien et chromosomique. La dynamique ou le remodelage de la chromatine est contrôlée par des modifications covalentes des histones et de l'ADN, nommée « marques épigénétiques ». Ce remodelage des nucléosomes régule entre autres la balance entre la régulation positive et la régulation négative de la transcription. Nous nous intéresserons successivement aux modifications de l'ADN puis des histones.

a. Méthylation du promoteur hTERT

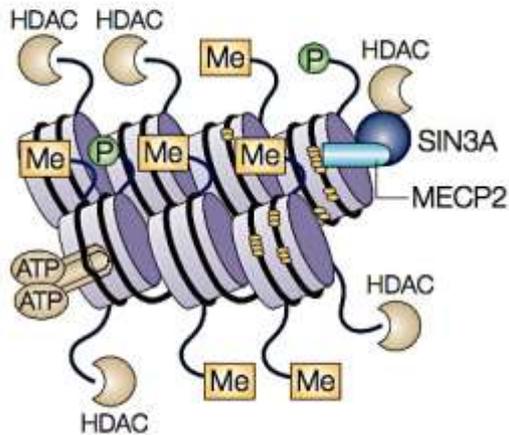
La méthylation ou déméthylation de l'ADN et plus précisément des séquences régulatrices telles que les promoteurs jouent un rôle important dans la régulation de l'expression génique. En effet, au niveau des régions 5' des gènes qui comportent les promoteurs, une forte concentration de dinucléotides Cytosine - Guanine est observée, c'est ce que l'on appelle les îlots CpG. Ces îlots sont classiquement déméthylés pour activer la transcription des gènes (Jones, 2012). Cependant, lors de la tumorigenèse, une hyperméthylation de promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur se met en place et empêche ainsi leur transcription. Ceci est un exemple du rôle majeur de ces modifications épigénétiques dans le développement du cancer et font des acteurs de l'épigénétique des cibles du traitement du cancer.

Le promoteur d'hTERT est une séquence d'environ 1100 paires de bases (Wick et al., 1999), qui comporte des îlots CpG. La méthylation de certains dinucléotides CpG joue un rôle important dans la régulation d'expression de TERT (Devereux et al., 1999). Ainsi, il a été démontré, que l'hyperméthylation du promoteur d'hTERT était associée à l'inhibition de l'activité de la télomérase dans des lignées de fibroblastes et de kératinocytes (Shin et al., 2003). La même équipe a observé qu'en exposant ces cellules, à la 5-azacytadine, un inhibiteur de la méthylation, il était possible de ré-exprimer TERT, ce qui confirme le rôle de la méthylation du promoteur hTERT dans la régulation de l'activité de la télomérase.

b. Modification des histones

L'acétylation ou la méthylation/déméthylation des histones sont des mécanismes qui contrôlent la décondensation locale de la chromatine, facilitant ainsi l'accès à la machinerie transcriptionnelle. Ainsi une acétylation des histones au niveau des résidus lysines par l'intermédiaire des histones acétyltransférases (HAT) entraîne une régulation positive de la transcription de TERT et au contraire, une désacétylation via les histones déacétylases (HDAC) entraîne une répression de la transcription (Figure 21). Il est ainsi démontré que les inhibiteurs d'HDAC comme la tricostatine A activent la transcription de la télomérase et donc son activité enzymatique (Takakura et al., 2001).

a Closed chromatin: transcriptional repression



b Open chromatin: transcriptional activation

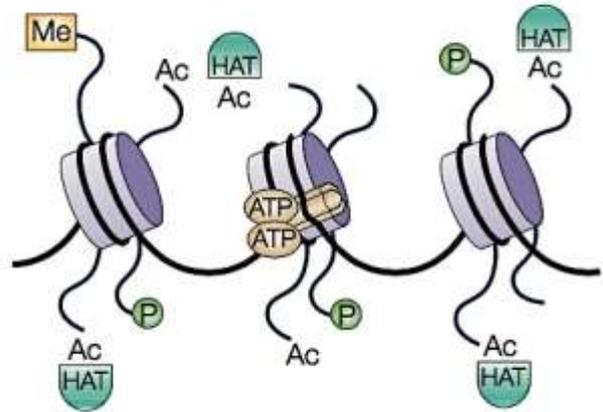


Figure 21: L'activité transcriptionnelle est régulée par la conformation des histones

- a** : une chromatine condensée par une déacétylation entraîne une inhibition de la transcription
- b** : la transcription est stimulée par une acétylation des chromatines (Johnstone, 2002).

Dans le cas des méthylation, plus stables que les acétylation, une hyperméthylation par les histones méthyltransférases entraîne une régulation positive ou négative selon les résidus méthylés et le type de méthylation (mono, di ou tri-méthylation).

Concernant la méthylation du promoteur d'hTERT, une triméthylation H3K4 a lieu par l'intermédiaire de la méthyltransférase SMYD3 entraîne une activation de la transcription de TERT (Liu et al., 2007). Dans la même publication, les auteurs expliquent ce lien en démontrant que cette triméthylation permet le maintien de l'acétylation des histones et donc de la forme décondensée de la chromatine. En utilisant un siRNA contre SMYD3, les histones sont moins acétylées et les facteurs de transcription tels que c-myc ou Sp1 possédant leur site de fixation dans le promoteur de TERT ne peuvent plus se fixer pour activer la transcription du gène.

Ainsi, les marques épigénétiques classiques régulent l'expression de TERT et peuvent donc être ciblées par les thérapies épigénétiques.

2. Régulation transcriptionnelle du gène

Un autre aspect de la régulation de l'expression de TERT est la régulation transcriptionnelle du gène par le biais de facteurs activateurs, inhibiteurs ou de facteurs ayant les deux capacités selon les cas (Figure 22).

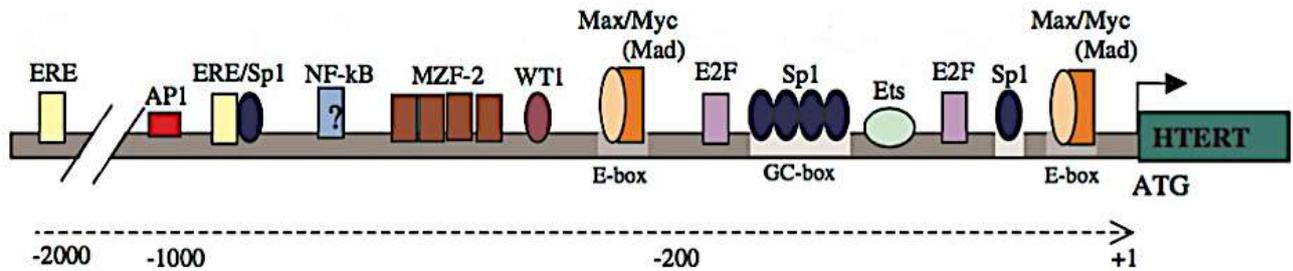


Figure 22: Régulation Transcriptionnelle de hTERT

Cette représentation du promoteur hTERT montre les différents facteurs de transcription qu'ils soient activateurs ou inhibiteurs.

a. Activateurs

Différents facteurs de transcriptions activateurs sont aujourd'hui connus, tels que, c-myc, NF-κB, STAT, Ets ou les récepteurs ERα.

Myc a été le premier facteur activateur de la transcription décrit pour TERT dans des fibroblastes primaires mais aussi dans des cellules épithéliales (Wu et al., 1999). Son action est décrite comme immédiate sur la transcription est non dépendante de la prolifération cellulaire. Le système de régulation par Myc est complexe mais il a été démontré l'importance des deux boîtes-E se trouvant sur le promoteur hTERT (Figure 22). La fixation se réalise par la création d'un complexe Myc/Max qui se fixe à la boîte E. Ce lien entraîne alors le recrutement de facteurs stimulants (USF1/2) la transcription de TERT.

Nous savons que la transcription de c-myc peut être indirectement stimulée par les estrogènes qui part leur liaison à leur récepteur (ER) entraîne une activation de la voie PI3 Kinase / Akt et par suite une augmentation de l'expression de c-myc (Butt et al., 2005; Caldon et al., 2009). Ainsi les estrogènes sont des activateurs indirects de la transcription de TERT par l'intermédiaire de c-myc. Parmi les estrogènes, l'œstradiol (E2) se lie au récepteur ERα et le complexe E2/ ERα se liant aux séquences ERE (Estrogen Response Element) du promoteur de TERT active directement sa transcription entraînant alors une augmentation de l'activité de la télomérase (Haneline, 2009).

Le rôle activateur de NF-κB a quant à lui été démontré sur des cellules murines (Yin et al., 2000). Son mécanisme d'action, n'a pas encore été parfaitement établi même si le rôle activateur de NF-κB sur l'expression de Myc peut expliquer son impact sur la transcription de TERT. Il est tout de même à noter que NF-κB possède aussi son propre site de fixation sur le promoteur hTERT.

STAT5 est aussi un facteur activateur de la transcription de TERT, cependant pour se lier au promoteur, STAT5 doit être activé par phosphorylation de sa tyrosine, cela est rendu possible via une stimulation de l'interleukine 2 (IL-2) qui se fixe à son récepteur et entraîne alors une cascade de phosphorylation de la voie JAK/STAT (Yamada et al., 2012). Ainsi via la voie de JAK/STAT, l'IL-2 permet la stimulation de la transcription de TERT (Figure 23).

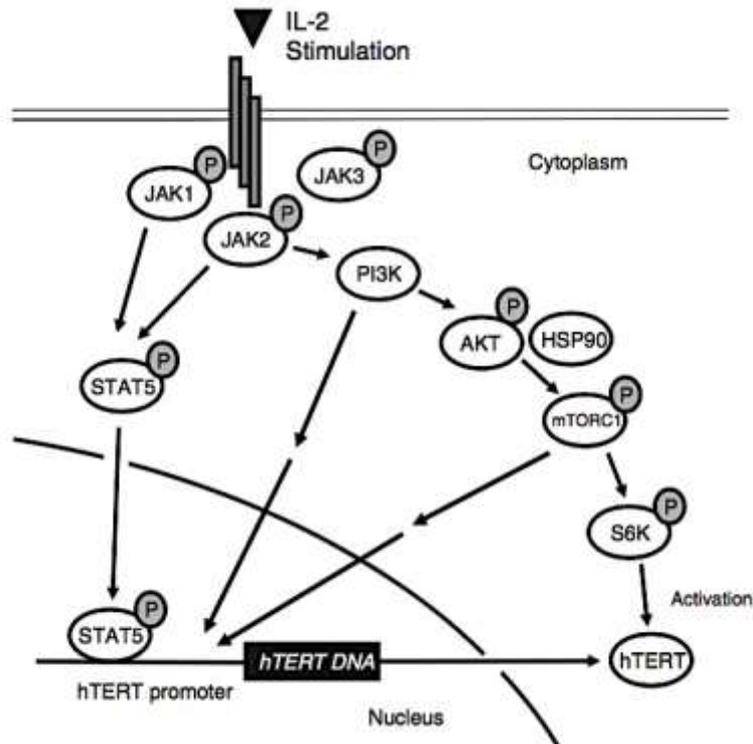


Figure 23: Stimulation de la transcription de TERT par la voie de JAK/STAT

Une stimulation résultante de la fixation de l'IL-2 à son récepteur va entraîner la cascade de phosphorylation de JAK1 et JAK2 ainsi que de STAT5 qui pourra alors se fixer au promoteur de TERT et activer la transcription de TERT (Yamada et al., 2012).

De nombreux autres facteurs activateurs de la transcription de TERT sont connus comme les cytokines EGF et TGF β (Maida et al., 2002; Yang et al., 2001), ou la protéine AP-2 (Deng et al., 2007).

b. Inhibiteurs

Différents inhibiteurs de la transcription sont aussi connus à ce jour tels que p53, Mad1 ou les cyclines D et E.

Mad1 a été le premier facteur de transcription découvert comme réprimant la transcription de TERT (Günes et al., 2000). Cette répression se fait alors de façon indépendante de c-myc mais nécessite les boîtes E du promoteur hTERT. En effet, de la même façon que myc, Mad1 forme un complexe avec la protéine Max qui peut alors se fixer sur les boîtes E du promoteur. Ainsi Myc et Mad1 exercent une action différente sur le promoteur de TERT grâce au même site de fixation.

p53 et les protéines de la même famille comme p63 et p73 ont aussi montré leur rôle dans la répression de la transcription de TERT (Yao et al., 2012). Leur action se fait de façon indépendante les uns des autres. Il a été démontré que p63 avait besoin de la protéine Sp1 pour inhiber la transcription de TERT. L'effet de p53 est quant à lui dépendant des boîtes-E et des sites E2F. En effet, p53 ne peut réprimer la transcription que lorsque l'expression de c-

myc est elle-même faible. Dans le cas d'une surexpression de myc ou d'une mutation des sites E2F, p53 perd sa capacité d'inhibiteur de la transcription de TERT.

De la même façon, MEN1 réprime la transcription des gènes possédant des sites de liaison à AP1 (Agarwal et al., 1999) ou à NK- κ B (Heppner et al., 2001) dans leur promoteur, comme c'est le cas dans le promoteur de TERT. Il a ainsi été établi que MEN1 était un répresseur de la transcription de TERT (Lin and Elledge, 2003).

c. Activateurs et inhibiteurs

D'autres facteurs de transcription modulant l'expression de TERT sont connus mais leur impact sur cette transcription est sujet à controverse. En effet, pour les protéine HIF-1 α et HIF-1 β la répression de TERT dans les cellules cancéreuses a été démontré par une équipe (Yatabe et al., 2004) mais l'effet inverse a aussi été observé par une autre équipe (Koshiji et al., 2004).

La protéine Sp1 possède elle aussi la capacité d'activer la transcription de TERT en se liant sur cinq zones riches en Guanine et Cytosine (boîtes GC) (Kyo et al., 2000) mais il a été montré qu'elle peut tout aussi bien réprimer la transcription de TERT (Won et al., 2002). Cette capacité de moduler de façon positive ou négative la transcription a aussi été mise en évidence pour une protéine de la même famille : Sp3 qui se lie aux mêmes séquences que Sp1 sur le promoteur.

Ainsi la régulation de l'activité télomérase est possible par le biais de nombreux facteurs de transcription, dont l'expression est par ailleurs fréquemment dérégulée au cours du processus tumoral (mutation/ perte de p53, surexpression de c-myc...etc)

3. Régulation post transcriptionnelle

L'épissage alternatif est le mécanisme post transcriptionnel qui permet la formation de différents ARNm à partir d'une même séquence d'ARN pré-messager.

Pour TERT, seul l'ARNm « full length » ayant subi un épissage normal, conservant les 16 exons permet la formation de l'enzyme fonctionnelle (Sæbøe-Larssen et al., 2006).

Il a été identifié au moins 22 variants d'épissage (Hrdlicková et al., 2012) classés en 3 catégories, parmi lesquels figurent : le variant sauvage ou « full length », les variants formés par une délétion dans un ou plusieurs exons et les variants formés avec une insertion d'un exon supplémentaire (Figure 24).

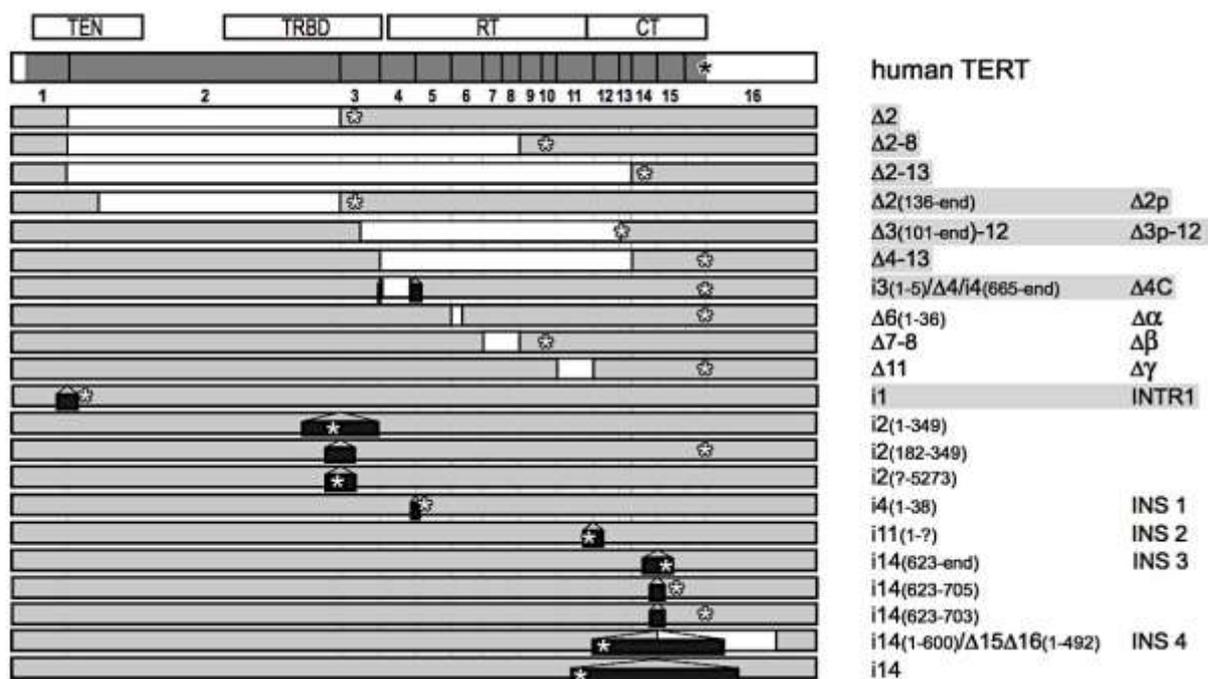


Figure 24: Variants d'épissage de TERT

Selon les délétions (rectangle blanc) ou les insertions (rectangles noir) se réalisant au sein d'un ou de plusieurs exons, plusieurs variants d'épissage sont formés et peuvent alors entraîner la formation de codon STOP (marqué par une astérisque) plus précoce que dans la forme sauvage (en gris foncé) (Hrdlicková et al., 2012).

Les insertions ou les délétions survenant dans les exons de TERT entraînent un décalage dans le cadre de lecture de la séquence et peuvent entraîner la formation d'un codon STOP prématuré. Ces ARN dits « non-sens » sont alors pris en charge et dégradé par le système NMD (non sense-mediated-decay) (Wong et al., 2014a).

Parmi ces variants, seules les isoformes alpha et bêta ont été caractérisées *in vitro*. Colgin et ses collaborateurs ont ainsi montré que le variant α inhibait l'activité de la télomérase endogène entraînant alors un raccourcissement des télomères (Colgin et al., 2000). Concernant la forme β , il a été démontré qu'elle ne permettait pas l'action de reverse transcriptase mais qu'elle protégeait la cellule de la voie de l'apoptose médiée par p53 en l'inhibant (Listerman et al., 2013).

Par ailleurs, une séquence présente dans l'ARN pré-messager permettrait l'épissage alternatif de l'isoforme β (Figure 25). En effet, sans cette séquence de 38 paires de bases, l'épissage alternatif des exons 7 et 8 est impossible. Cette séquence se situe entre les exons 6 et 7 et est présente chez les anciens primates comme le gorille, le babouin ou l'homme mais est absente chez les mammifères comme la souris ou le chien (Wong et al., 2014b).

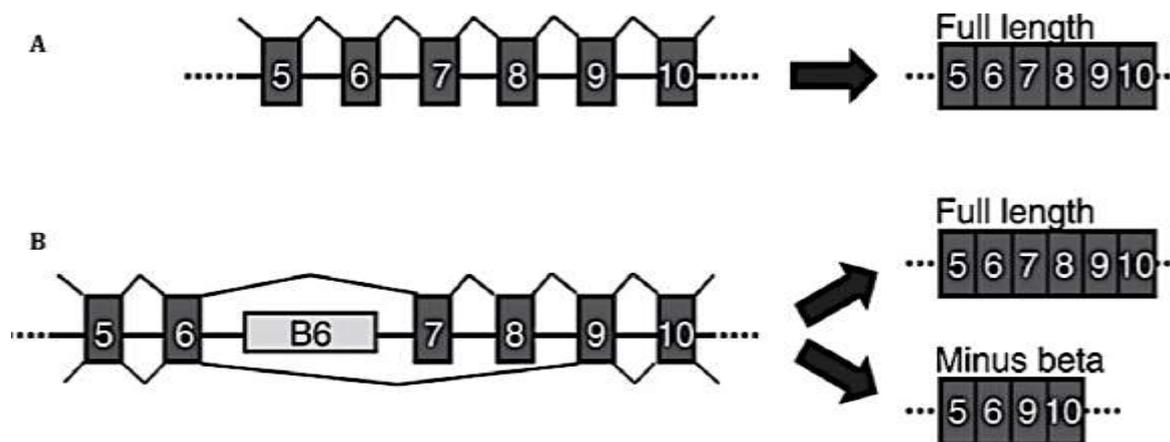


Figure 25: Epissage alternatif de TERT sous le contrôle du block 6 de préARNm

A : Formation classique de la forme sauvage de TERT sans le block 6

B : Le Block 6 (B6) est cependant obligatoire pour la formation de l'isoforme β de TERT sans les exons 7 et 8 via l'épissage alternatif (Wong et al., 2014b).

4. Régulation post traductionnelle

a. Phosphorylation

Nous avons vu auparavant que l'association des protéines Hsp90 et Akt à TERT permettait la phosphorylation d'Akt et le maintien de son activité. Il est à noter que cette phosphorylation est réalisée en parallèle de la phosphorylation de la Serine 227 de la sous unité TERT par Akt (Haendeler et al., 2003b). En effet TERT est un substrat d'Akt qui grâce à une phosphorylation permet l'activation de la fonction enzymatique de la télomérase (Kang et al., 1999).

De façon inverse, la phosphatase A2 (PPA2) induit une déphosphorylation de TERT et alors une inactivation de l'enzyme.

Ce système de phosphorylation /déphosphorylation de TERT est donc un acteur majeur de la régulation post traductionnelle de la télomérase en contrôlant son état d'activation.

b. Translocation

Un autre moyen de régulation post-traductionnelle de la télomérase réside dans la possibilité de modifier sa localisation avec ses différents signaux d'adressage vu précédemment (NES, NLS, NoLD ou encore MLS).

V. Rôles Biologiques de la télomérase

1. Régulation de la taille des télomères

Le rôle principal de la télomérase est d'allonger les télomères via son activité de transcriptase inverse au niveau des extrémités télomériques.

Au cours de la division cellulaire, on observe une diminution de la taille des télomères d'environ 50 à 200 paires de bases (pb) due : à l'impossibilité de répliquer en totalité les extrémités 5' (the « end replication problem ») et à la maturation par excision 5'-3' des extrémités télomériques (Figure 26). Cette érosion télomérique fait des télomères de réelles « horloges biologiques » décomptant la durée de vie de chaque cellule. Ainsi une cellule peut tout au plus se diviser une centaine de fois avant d'atteindre la limite d'Hayflick et alors entrer en sénescence répllicative (arrêt définitif de prolifération) (Hayflick, 1965). Dans les cellules germinales responsables de la formation des gamètes et donc ayant une durée de vie illimitée théoriquement mais aussi dans les cellules progénitrices ou les lymphocytes, la télomérase est présente de façon constitutive (Martínez and Blasco, 2011; O'Sullivan and Karlseder, 2010).

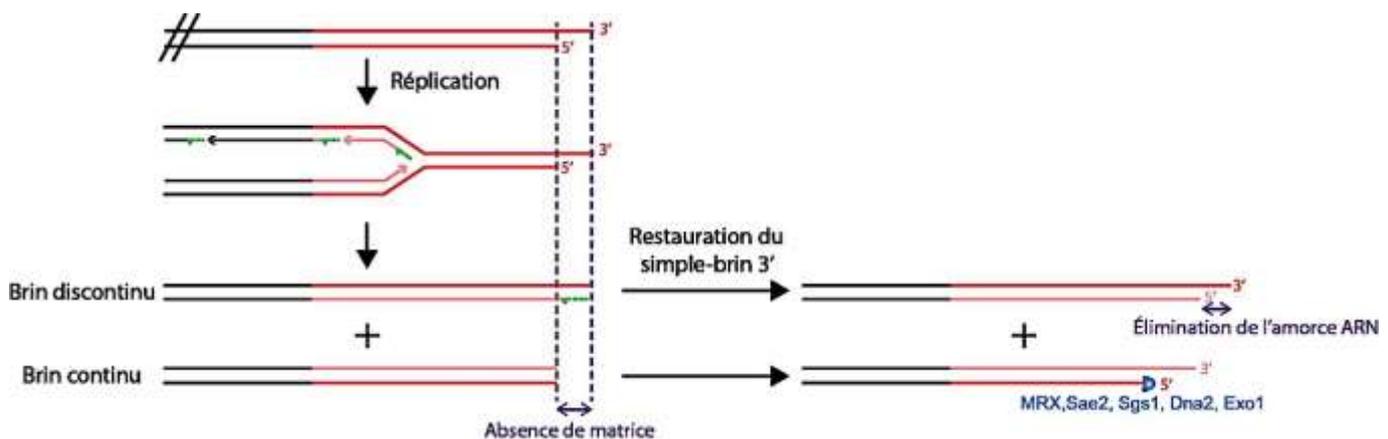


Figure 26: Phénomène de raccourcissement des télomères

Lors de la réplication, l'absence de matrice pour l'extrémité 3' simple brin entraîne sa perte lors de la réplication du brin continu. Le brin continu est quant à lui maturé par excision 5'-3' afin de reconstituer l'extrémité 3' simple brin.

Pour ce phénomène d'élongation des télomères, à la fin de la phase S, la télomérase reconnaît par le biais de TERC, une séquence complémentaire au niveau de la partie 3' simple brin des extrémités télomériques et vient s'y associer (hybridation complémentaire via TERC). La sous-unité catalytique TERT synthétise alors l'ADN complémentaire à sa séquence d'ARN matrice puis transloque en direction 3', s'hybride à nouveau et ajoute ainsi successivement plusieurs répétitions télomérique. (Figure 27).

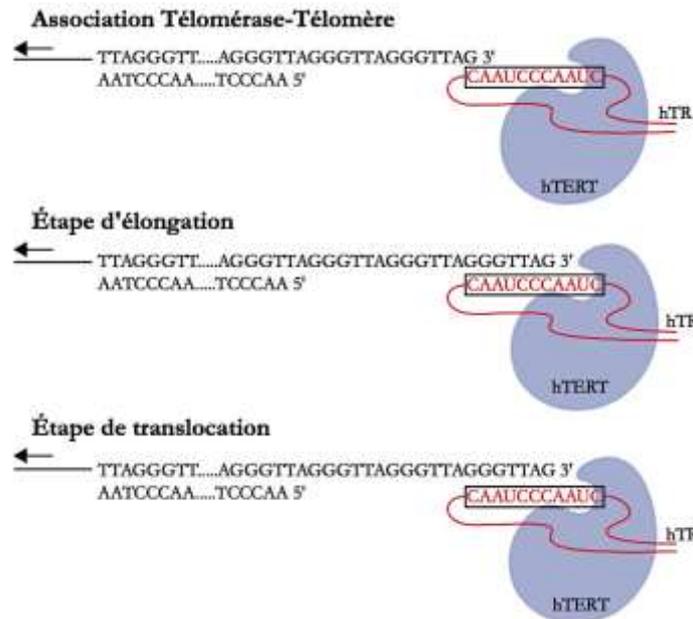


Figure 27 : Activité transcriptase inverse aux télomères de la télomérase

Les 3 étapes de l'élongation des télomères au moyen de la télomérase : association avec l'ADN télomérique, synthèse d'ADN et translocation de la télomérase pour recommencer un cycle d'élongation (Souiden et al., 2010)

Le recrutement de la télomérase sur un télomère donné est contrôlé par des protéines télomériques. Ces protéines contrôlent entre autres son adressage aux télomères à partir des corps de Cajal, son lieu de stockage dans les cellules (Cf partie III.4).

2. Régulation du stress oxydant

De façon physiologique, le stress oxydant est causé par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Parmi les ERO, nous pouvons citer l'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. La production majoritaire de cet anion a lieu au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Cet anion est alors pris en charge par des superoxydes dismutases (SOD) dans la matrice mitochondriale (SOD2) ou dans l'espace inter membranaire (SOD1) (Figure 28) afin de former du peroxyde d'hydrogène lui-même pris en charge par une catalase le détoxifiant en eau. Une concentration trop élevée d'ERO peut être signe de dysfonctionnement mitochondrial et peut conduire à l'apoptose ou à l'autophagie de la cellule.

Par le biais de modèle murins, un rôle sur le stress oxydant de la télomérase a pu être démontré. En effet, en réalisant des souris TERT ou TERC Knock Out, Sahin et ses collaborateurs ont montré que l'érosion des télomères entraîne une stabilisation de p53 qui réprime alors la transcription des gènes PGC1 α et PGC1 β . Ces gènes sont des régulateurs de la masse et de la fonction mitochondriale. Un dérèglement du métabolisme mitochondrial comme par exemple de la chaîne respiratoire est alors visible avec une augmentation de la production d'ERO (Sahin et al., 2011). Cependant, avant l'observation de l'érosion télomérique, des signes de dysfonctionnement mitochondriaux sont observables, ce qui

suggère un rôle de la télomérase sur le métabolisme mitochondrial de façon indépendante de p53.

De plus la translocation de TERT au niveau de la mitochondrie par l'intermédiaire des ERO (Haendeler et al., 2009) a été démontré et selon les équipes de recherche, une influence positive ou négative sur la production de ERO est observée même si les publications récentes tendent plus vers le fait que TERT au sein de la mitochondrie entraîne une meilleure respiration mitochondriale et donc une diminution de la production d'ERO. Les mécanismes sous-jacents de cette régulation de la production d'ERO restent cependant non identifiés.

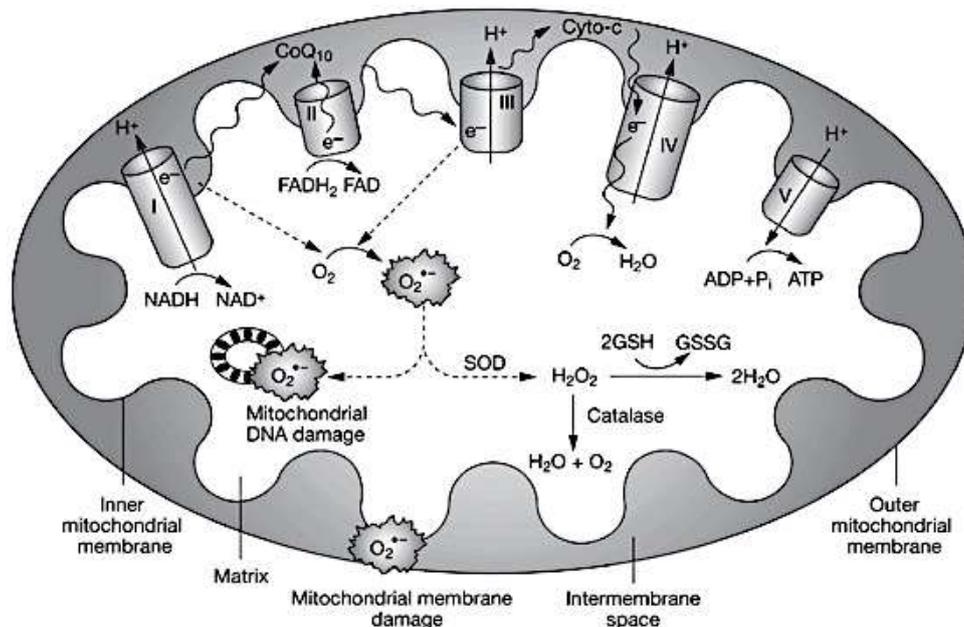


Figure 28: Production mitochondriale de ERO

La chaîne respiratoire est schématisée avec les cinq complexes la formant et le transport d'électron le long de cette chaîne permet la formation de l'anion superoxyde, une ERO qui peut entraîner alors la mort cellulaire si le taux est élevé (Leininger et al., 2006).

3. Protection de l'ADN mitochondrial

Le rôle de la mitochondrie dans la formation d'ERO est bien démontré. En effet, les ERO sont produites par la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces radicaux vont induire des mutations locales de l'ADNmt. Or l'ADNmt codant pour les sous-unités de la chaîne respiratoire, les mutations vont entraîner une amplification du dysfonctionnement de la mitochondrie et alors une production accrue d'ERO. Ainsi, les souris déficientes pour la manganèse superoxyde dismutase (MnSOD), enzyme antioxydante mitochondriale, présentaient un déclin prématuré des fonctions mitochondriales (Kokoszka et al., 2001). Nous avons donc un cercle vicieux entre production d'ERO et métabolisme mitochondrial.

Dans ce contexte, en 2003, Haendeler et son équipe ont montré que TERT pouvait être transporté dans la matrice mitochondriale et se lier de façon non spécifique aux régions codantes (ND1 et ND2 codant pour 2 sous unité de la NADH déshydrogénase de la chaîne respiratoire) de l'ADNmt (Haendeler et al., 2009). De cette façon, TERT jouerait un rôle protecteur pour l'ADNmt contre les ERO et entraînerait une amélioration du métabolisme

mitochondrial, comme par exemple une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire et une augmentation du potentiel de membrane de la mitochondrie. En effet, l'ADNmt code exclusivement pour les protéines mitochondriales, en protégeant l'ADNmt, TERT protège les composants mitochondriaux. Cependant cette action de protection de l'ADNmt n'a été démontré que lors d'études *in vitro* et n'a pas été confirmée *in vivo* depuis. La régulation de la transcription et de la réplication de l'ADNmt pourrait expliquer la modulation du potentiel de membrane mais aussi de la production de ERO dans la mitochondrie.

4. Régulation de la voie Wnt- β caténine

Différentes voies de signalisation permettent la programmation cellulaire des cellules souches, parmi lesquelles la voie Wnt - β caténine. Cette voie complexe repose sur l'action de différentes protéines : en l'absence de Wnt, des facteurs de transcription comme TCF (transcription factor) ou LEF (lymphoid enhancer-binding factor) occupent les sites de fixation au niveau des promoteurs de gènes contrôlés par Wnt, où ils recrutent des répresseurs de la transcription. Lorsque Wnt se fixe à son récepteur, causant la dissociation puis la stabilisation de la β -caténine ; celle-ci déplace ces répresseurs et recrute des activateurs aux sites de liaison de TCF. Les protéines recrutées par la β -caténine au niveau des promoteurs comprennent plusieurs complexes qui modifient les histones, comme BRG1. (Figure 29).

Dans ce contexte, il a été démontré *in vivo* que TERT se liait à la protéine BRG1 au niveau nucléaire. La sous-unité TERT de la télomérase serait donc un cofacteur qui agit probablement dans le contexte de cellules progénitrices pour faciliter un programme de renouvellement, de prolifération ou de survie de Wnt (Park et al., 2009).

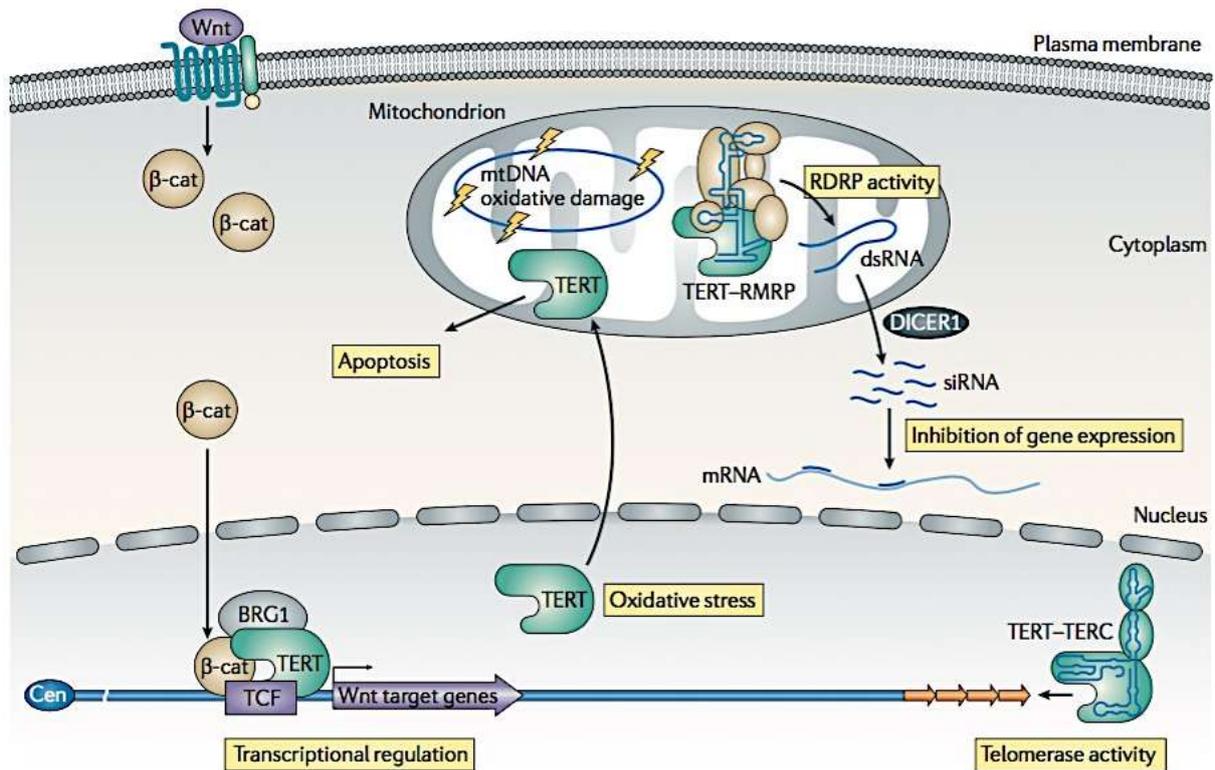


Figure 29: Fonctions extra-téломériques de TERT

TERT en se liant à BRG1 dans la région promotrice permet la régulation génique. TERT possède d'autres fonctions extra-téломérique telles que sa capacité à lier RMRP afin d'avoir une action de RDRP et réguler alors l'expression de gènes. Elle peut aussi grâce à sa localisation mitochondriale jouer un rôle de régulation sur l'apoptose (Martínez and Blasco, 2011).

5. Régulation de la voie NF-κB

De la même façon qu'avec la voie Wnt /β-caténine, la télomérase, via sa sous-unité TERT intervient sur la voie de signalisation NF-κB. En effet, en se liant à la sous unité p65 de NF-κB, TERT permet la modulation de l'expression de certains gènes dont la transcription dépend de NF-κB (Ghosh et al., 2012). Il a été démontré que sur l'ensemble des gènes cibles de NFκB seulement certains possèdent une transcription médiée par TERT, c'est le cas de l'interleukine-6 (IL-6) ou encore du TNF-α.

La voie NF-κB est impliquée dans 4 phénomènes cellulaires majeurs. Premièrement elle inhibe l'apoptose par la transcription de différentes molécules comme Bcl-xL, une molécule anti-apoptotique de la famille des Bcl-2 (Khoshnan et al., 2000). Elle stimule aussi la prolifération cellulaire avec la transcription de la cycline D1 ou de c-myc. Et enfin elle régule positivement l'immunité et l'inflammation avec la libération de chimiokines, de molécules d'adhésion ou de COX2 qui catalyse les réactions entraînant la formation de prostaglandines impliquées dans l'inflammation.

Le contrôle de la transcription des gènes dépendant de NF-κB confère à TERT un rôle anti-apoptotique, pro-prolifératif et pro-inflammatoire.

6. Rôle dans le phénomène d'ARN interférence

Nous venons donc de voir que la télomérase pouvait réguler la transcription de gènes en se liant sur des régions promotrices. Elle peut aussi réguler la stabilité/traduction d'ARNm au moyen de l'ARN interférence.

En effet, la sous unité catalytique de la télomérase possède l'activité de reverse transcriptase et se lie à l'ARN matrice TERC. En 2009, il a été montré que TERT peut aussi lier d'autres ARN non codant et notamment RMRP (RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease). Il s'agit d'un snoARN (small nucleolar RNA) aussi retrouvé dans la mitochondrie.

Cette liaison TERT-RMRP induit alors une activité RDRP (activité ARN polymérase dépendante d'ARN). TERT produit alors un ARN double brin avec pour matrice RMRP. Ces ARN double brin sont alors clivés en petits ARN double brins interférents endogènes (siRNA) grâce à la machinerie classique d'ARN interférence et en particulier à l'endoribonucléase DICER et au complexe RISC (RNA-induced silencing complex) (Figure 29) (Maida et al., 2009).

Ces siRNA ont plusieurs cibles, ils réguleraient entre autres la stabilité des transcrits produit à partir des séquences LINE-1s impliquée dans le phénomène de rétrotransposition dans le génome humain. Ceci éviterait le mécanisme de rétrotransposition entraînant le déplacement et la multiplication des séquences LINE qui peuvent être délétères pour les cellules (Yang and Kazazian, 2006). Les auteurs supposent également que le rôle dans l'interférence ARN de TERT - RMRP lui permettrait de moduler l'apoptose (Maida et al., 2009).

Ainsi, la télomérase via ses diverses actions agit sur de nombreuses voies de signalisation. Ces voies sont dérégulées dans diverses pathologies ce qui peut faire de la télomérase une cible thérapeutique intéressante.

VI. Télomères, télomérase et pathologies

1. Vieillesse cellulaire

Nous avons vu que la télomérase par sa sous unité TERT, contrôle divers mécanismes comme le raccourcissement des télomères et la production mitochondriale d'ERO. Ces deux mécanismes sont des acteurs majeurs du processus de vieillissement cellulaire.

a. Raccourcissement télomérique et vieillissement

Concernant le raccourcissement des télomères, il induit, nous l'avons vu, la sénescence répllicative. Cet arrêt définitif de division cellulaire est médié par la stabilisation de p53 qui active la transcription de p21. p21 va alors inhiber la cyclin-dépendant kinase 4/6 et bloquer la cellule en phase G0. Une seconde voie, contrôlée par pRb active p16 un second inhibiteur de cdk, concourant à l'arrêt de cycle. Les souris génétiquement modifiées, dont le promoteur de p16 active la transcription d'un gène tueur, éliminent les cellules atteignant le stade de la sénescence (Baker et al., 2011). Ces souris présentent une durée et une qualité de vie très prolongées, mettant en lumière le rôle essentiel de la sénescence dans le processus de vieillissement *in vivo* (Armanios and Blackburn, 2012).

Chez l'homme, des mutations des composants de la télomérase (TERT, TERC ou encore la Dyskerine) entraînent des syndromes de vieillissement accélérés bien connus comme la Dyskératose Congénitale. Il s'agit d'une insuffisance médullaire congénitale décrite pour la première fois dans les années 1900. On en parle souvent par le terme « Syndrome de raccourcissement des télomères ». Le tableau clinique de cette pathologie est varié et peut contenir des signes comme une hyperpigmentation, une leucodysplasie ou encore une dystrophie des ongles. L'insuffisance médullaire due à l'épuisement du pool de cellules souches hématopoïétiques est la principale cause de morbi-mortalité des patients. Plusieurs gènes peuvent être impliqués dans cette pathologie, parmi lesquels nous retrouvons DKC1 codant pour la Dyskerine ou encore TERC et TERT les deux composants de la télomérase et ACD codant pour la protéine télomérique TPP1 (Bisht et al., 2016). Pour cette raison, cette maladie n'est pas seulement liée au chromosome X (DKC1) mais des formes autosomiques ont aussi été décrites.

Un autre trouble qui peut être induit par des mutations de la télomérase est l'anémie aplasique qui est caractérisée par une perte des cellules progénitrices ou des cellules souches due à un épuisement de la réserve de cellules souches (Armanios and Blackburn, 2012). Dans cette pathologie, les gènes de TERT (Yamaguchi et al., 2005) et de TERC (Du et al., 2009) sont mutés dans 3 à 5% des cas mais des mutations des protéines du complexe Shelterin ou encore de la Dyskérine sont aussi impliquées (Vulliamy et al., 2011).

b. Rôle du stress oxydatif

Des études *in vivo* ont été réalisées sur des souris avec une version mutée de la sous unité catalytique de l'ADN polymérase mitochondriale (PolgA). Il était alors observable chez ces souris une augmentation des mutations de l'ADNmt, une perte d'ADNmt et une production accrue d'ERO (du fait des mutations des sous-unités de la chaîne respiratoire codées par l'ADNmt). Ceci s'accompagne de signes cliniques de vieillissement comme l'alopécie ou l'ostéoporose (Trifunovic et al., 2004). En croisant ces souris avec des souris transgéniques pour la catalase, l'enzyme de détoxification des ERO, les symptômes de vieillissement ont disparus (Dai et al., 2010). Ces deux équipes de recherche ont donc pu démontrer le lien entre le vieillissement cellulaire et la production mitochondrial d'ERO.

La télomérase possède donc une action via son rôle dans l'allongement des télomères mais aussi grâce à son rôle sur la production mitochondriale de ERO sur le vieillissement cellulaire.

c. ERO et raccourcissement télomérique

De plus, il est à noter qu'au niveau nucléaire, les ERO produisent des dommages de base, dont le plus fréquent est la 8-oxoguanine.

Cette lésion de l'ADN, peut si elle n'est pas réparée s'apparier au cycle suivant avec l'Adénine au lieu de la cytosine et entraîner la mutation d'une Cytosine en Adénine causant un changement dans l'information génétique. (Aguiar et al., 2013).

La 8-oxoguanine glycosylase (OGG1) permet de reconnaître et d'éliminer cette base grâce à ses deux fonctions: son action de glycosylase permet la reconnaissance et l'excision de 8-oxoGuanine et sa fonction de lyase entraîne une cassure de l'ADN, ce qui permet donc l'élimination de la mutations puis son remplacement (Gredilla et al., 2010).

Cependant, cette réparation fonctionne mal au niveau des tri-nucléotides GGG télomériques. Ceci résulte en cassure simple puis double brin et *in fine* en perte de séquence télomériques, accélérant le raccourcissement des télomères lié au vieillissement cellulaire.

Les ERO et la taille des télomères sont donc des acteurs communs et co-régulés du processus du vieillissement, entre autres par la télomérase.

2. Cancer

En 2011, Hanahan et Weinberg ont re-défini les 10 grandes caractéristiques des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011) (Figure 30). Celles-ci conduisent à une prolifération anarchique incontrôlée de cellules en l'absence de signalisation pro-proliférative et à une résistance aux signaux anti-prolifératifs, à la mort cellulaire et à l'arrêt en sénescence. Enfin, l'activation de la néo-angiogenèse et de capacités d'invasion et de transition épithélio-mésenchymateuse vont autoriser le processus métastatique par lequel les cellules se disséminent par le sang ou la lymphe afin de se localiser ailleurs dans le corps.

Quatre mécanismes supports promeuvent l'acquisition de ces potentialités : l'instabilité génomique, l'adaptation du métabolisme énergétique, l'inflammation et enfin l'échappement immunitaire.

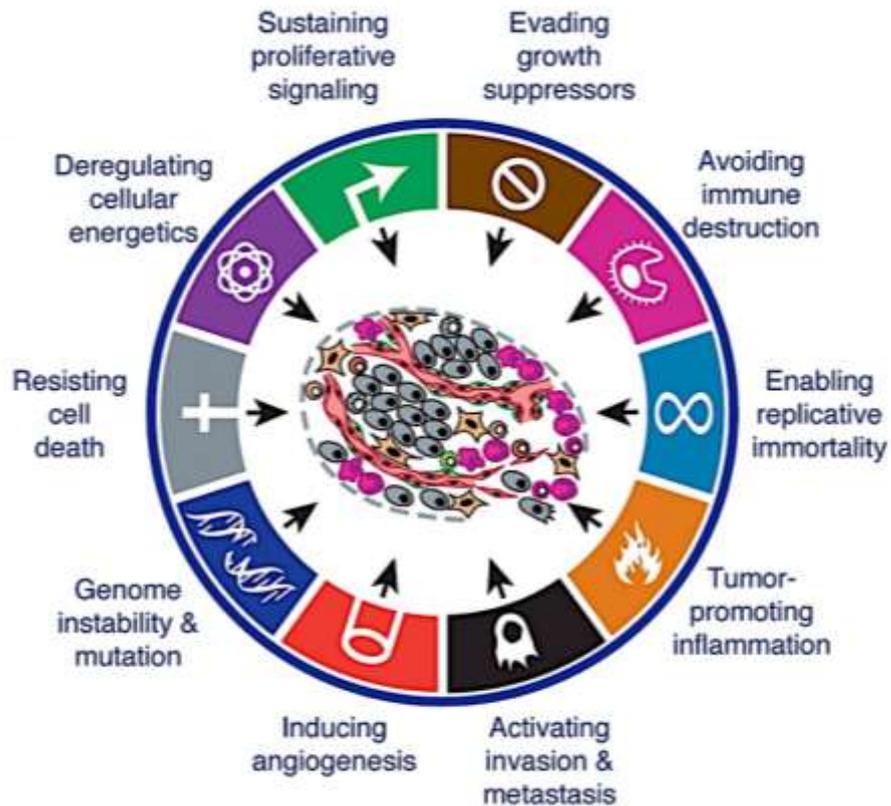


Figure 30: Les 10 caractéristiques du cancer

Pour se développer, une cellule acquiert différentes capacités en utilisant plusieurs mécanismes supports (Hanahan and Weinberg, 2011).

a. Rôles canoniques des télomères et de la télomérase dans le cancer

Les télomères sont impliqués dans au moins deux des phases de ce processus : la mise en place de l'instabilité chromosomique et la résistance à la sénescence.

Concernant la mise en place de l'instabilité chromosomique, elle peut être initiée par la déprotection des extrémités télomériques, succédant soit à la perte d'un composant du Shelterin soit à l'érosion massive des télomères.

De nombreuses publications montrent une dérégulation de l'expression des composants du Shelterin dans les cancers (Vulliamy et al., 2011), en particulier dans leucémie lymphoïde chronique (Augereau et al., 2011). *In vivo*, les modèles murins knock out pour POT1 ou TRF1 sont prédisposés au développement de tumeurs (He et al., 2009; Martínez et al., 2009).

Concernant le raccourcissement télomérique excessif, il se met en place en cas d'inhibition de l'entrée en sénescence, via des mutations touchant les voies p53/p21 et pRB/p16. La cellule continue alors de cycler malgré des télomères courts et atteint une seconde limite induisant une « catastrophe mitotique ». A ce stade, les extrémités télomériques perdent leur

conformation et tout comme dans le cas d'une perte du Shelterin sont reconnues comme des cassures doubles brins. Le processus de DDR est activé comme nous l'avons vu plus haut, mais dans le contexte du cancer, les gènes contrôlant l'arrêt de prolifération et la mort sont fréquemment mutés. Des réparations aberrantes de type fusions télomériques ou fusion télomères - CDB (Cassure double brin) se mettent alors en place (suture), générant des chromosomes dicentriques. Au cycle suivant, les centromères sont séparés, le chromosome dicentrique se trouve « écartelé » entre deux cellules filles, il se casse générant deux nouvelles CDB (qui pourront à nouveau être fusionnées à des télomères déprotégés). Ces cycles dits de fusion/ponts/cassure génèrent une instabilité chromosomique majeure, motrice du processus tumoral. La plupart des cellules qui en sont issues vont mourir dans un processus de « catastrophe mitotique » différent du processus classique d'apoptose, mais une partie infime survivra générant un clone encore plus agressif.

Afin de stabiliser ces clones, ou tout simplement pour éviter la catastrophe mitotique ou l'arrêt en sénescence, les cellules tumorales vont acquérir la capacité d'allonger leurs télomères. Pour cela elles ont deux possibilités : la réactivation de la télomérase (TA) dans 95% des cancers ou l'utilisation d'un mécanisme alternatif d'allongement des télomères (ALT) dans 5% des cancers.

Différents processus peuvent aboutir à la réactivation de la télomérase médiée par la ré-expression de TERT. Comme nous l'avons discuté plus haut, des dérégulations épigénétiques (déméthylation des îlots CpG), la surexpression de facteurs de transcription comme c-myc ou encore l'activation de voies de signalisation comme NF- κ B vont participer de cette ré-expression. Des réarrangements chromosomiques peuvent également intervenir (Akincilar et al., 2016) et plus récemment, des mutations du promoteur de TERT ont été très fréquemment rapportées (Liu et al., 2016). Ces mutations (C228T et C250T) entraînent la formation de nouvelles séquences consensus pour des régulateurs transcriptionnel comme ETS1 ou GABP, qui stimulent alors la transcription de TERT. Les mutations de TERT sont très fréquentes dans certains cancers comme les dans le glioblastomes où TERT est muté dans 80% des cas environ (Griewank et al., 2013), dans le cancer de la vessie (près de 63%), ou dans de plus faible occurrence comme le cancer des ovaires (15%) et les cancers de la tête et du cou (16%) (Liu et al., 2016; Vinagre et al., 2013).

Le phénomène alternatif d'allongement des télomères repose quant à lui sur un mécanisme proche de la recombinaison homologue dans lequel une séquence télomérique copie une autre séquence télomérique. La matrice copiée peut être la chromatide sœur, la chromatide d'un autre chromosome ou encore une séquence télomérique extra-chromosomique (Henson and Reddel, 2010). Ce phénomène est rendu possible grâce des modifications épigénétiques entraînant une décondensation de la chromatine et favorisant alors les croisements entre séquences nucléotidiques. Différents acteurs ont été identifiés *in vitro* et confirmés *in vivo* comme les mutations d'ATRX ou de DAXX, des protéines chaperonnes du variant d'histone H3.3 (Dyer et al., 2017). Ce variant d'histone est incorporé aux télomères et aux centromères, en dehors des phases de réplication de l'ADN. Il est donc particulièrement enrichi dans les

cellules post-mitotiques. DAXX est une chaperonne d'histone spécifique d'H3.3 et ATRX remodèle la chromatine afin d'y incorporer ce variant d'histone.

En effet, au niveau de la chromatine, la protéine DAXX est liée à l'histone H3.3 qui forme des tétramères notamment avec l'histone H4. ATRX quant à elle reconnaît une marque histone répressive enrichie aux télomères : H3K9me3. En se liant à ces histones, ATRX possède donc une action de remodelage de la chromatine. En liant DAXX, ATRX permet donc son recrutement au niveau des télomères et l'incorporation d'H3.3 (Figure 31).

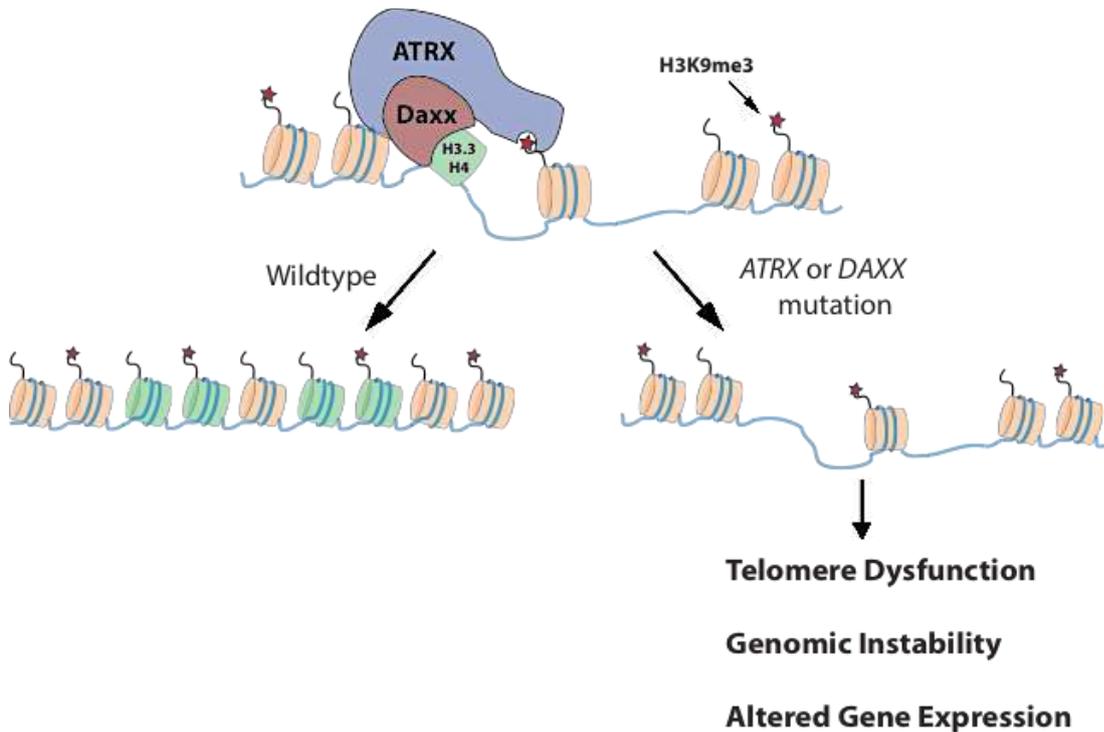


Figure 31: Action d'ATRX/DAXX aux télomères

Au niveau de la chromatine, la formation du complexe ATRX/DAXX avec le tétramère d'histones H3.3/ H4 permet le maintien de l'intégrité des télomères. Lors de mutations d'ATRX ou de DAXX, une instabilité génomique est observée, avec des dysfonctionnements des télomères et des altérations de l'expression de gènes (Wisconsin Institute for Discovery, 2013).

Ainsi avec des mutations des deux protéines chaperonnes ATRX et DAXX, la chromatine est décondensée et le croisement de séquences nucléotidiques est rendu possible. Ces mutations favorisent la mise en place d'une instabilité génomique, des dysfonctionnements télomériques mais aussi d'altérations dans l'expression des gènes.

b. Rôles non-canoniques de la télomérase dans le cancer

Outre cette action pour le maintien de la taille des télomères, le rôle de TERT sur les promoteurs des gènes cible des voie NF- κ B, des interleukines, de la voie Wnt / β – caténine ou encore du TNF- α confère à la télomérase un rôle dans la tumorigenèse. En effet, via toutes ces voies, la télomérase peut réguler quelques 300 gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la signalisation cellulaire, la prolifération cellulaire (Perrault et al., 2005) mais aussi l'inflammation (Ghosh et al., 2012).

c. **La télomérase : un biomarqueur et une cible pour la thérapie anti-cancéreuse**

Sachant que le niveau d'activité de la télomérase est corrélée avec l'agressivité tumorale dans différentes tumeurs (Qin et al., 2014), sont intérêt en tant que biomarqueur ou facteur prédictif de réponse au traitement a été étudié.

Sur le plan des traitements cancéreux, il est maintenant connu que le niveau d'activité télomérase et la taille des télomères sont positivement corrélés à la radiorésistance tumorale (Ferrandon et al., 2013). Ce qui pourrait être utilisé comme facteur prédictif de la réponse au traitement par radiothérapie (Zhong et al., 2008).

De façon inverse, il a été montré notamment sur des lymphoblastes humains qu'un traitement par radiothérapie peut induire la réactivation de la télomérase (Neuhof et al., 2001) .

Ainsi le lien entre la télomérase et les thérapies est concret et explique les nombreuses recherches et essais cliniques qui ont été effectuées à ce sujet.

VII. Ciblages thérapeutiques

Dans le cadre de traitement de pathologies et notamment dans les traitements anticancéreux, l'exploitation de la télomérase et de ses protéines associées fait l'objet de nombreuses investigations. Diverses modalités de ciblage existent dont certaines font l'objet d'essai clinique.

1. Dérivés naturels

Tout d'abord certains dérivés naturels ont montré leur efficacité dans l'inhibition de la télomérase.

a. Le thé vert

Le thé vert (*Camellia Senensis*) est un arbuste d'extrême Orient contenant dans l'équivalent d'une tasse pas moins de 500 composés. En particulier il contient des polyphénols dont l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG) qui en est le représentant principal (Figure 32).

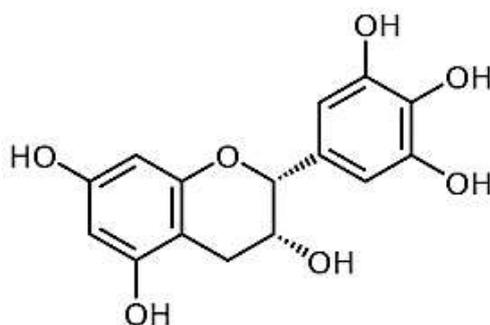


Figure 32: L'épigallocatechine-3-gallate présent dans le thé vert

L'EGCG présent dans le thé vert est un l'ester d'épigallocatechine et d'acide gallique. C'est le polyphénol principal du thé, connu pour sa propriété antioxydante.

Il est déjà connu que l'EGCG possède des propriétés anti-inflammatoire en inhibant la COX-2 mais sans jouer sur la COX-1 (Hussain et al., 2005). Cette action est observable au niveau protéique mais aussi au niveau de l'ARNm de COX-2. Lors du développement de certains cancers comme le carcinome de la prostate, la COX-2 est augmentée ce qui pourrait suggérer un rôle de l'EGCG dans la prise en charge de la maladie. Dans ce cadre Hussain et ses collaborateurs ont montré que l'EGCG avait une action sur la morphologie des cellules de carcinome prostatique et induisait la mort cellulaire par apoptose. Au niveau du cancer de la prostate l'EGCG a aussi montré des propriété de régulation du taux de PSA (Pezzato et al., 2004).

Dans le cadre des études sur cette molécule, des recherches sur son action régulatrice de la télomérase ont été réalisées. Dans le cas des carcinomes pulmonaires à petites cellules qui sont des cancers de mauvais pronostic du fait de leur importante résistance aux thérapies, il a été montré que l'EGCG pouvait diminuer l'activité de la télomérase jusqu'à 60 % de façon dose-dépendante. Cette démonstration a été réalisée *in vitro* sur des cellules humaines de

carcinomes multi-résistants ou non (Sadava et al., 2007). En parallèle de l'action de l'ECGC, une induction du processus d'apoptose est observée avec une diminution des taux des caspases 3 et 9 actives. En effet, dans le mécanisme de l'apoptose, un relargage de cytochrome C par la mitochondrie va stimuler la production de la caspase 9 qui permet l'activation de la pro-caspase 3 en caspase 3 et ce qui va induire l'apoptose.

Le mécanisme précis de l'inhibition de la télomérase n'est pas connu mais il a été démontré *in vivo* que l'ECGC était une prodrogue qui devenait active suite à la digestion chez les souris (Naasani et al., 2003). Du fait de son action sur les deux types de carcinomes pulmonaires à petites cellules, l'ECGC semble donc fonctionner de façon indépendante des divers mécanismes de résistances aux drogues que les cellules peuvent acquérir.

Ainsi l'ECGC pourrait en tant que traitement adjuvant permettre de jouer un rôle thérapeutique dans diverses pathologies inflammatoires ou dans les cancers.

b. Le curcuma

Le curcuma, ou *Curcuma Longa* est une plante en rhizome originaire d'Inde ou de Malaisie qui possède elle aussi des propriétés anti-télomérase.

Son action est liée à la présence de la curcumine, un composé polyphénolique (figure 33).

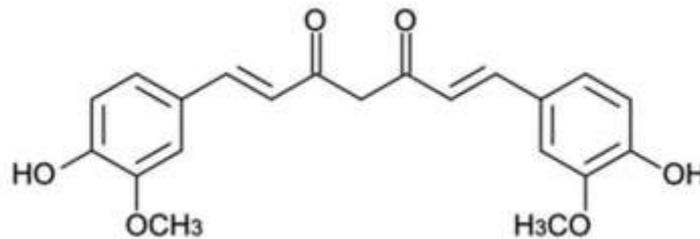


Figure 33: Curcumine isolée du rhizome du Curcuma

Le polyphénol du curcuma confère à cette plante son activité anti-télomérase

Le mode d'action *in vitro* de cette molécule a été mis en évidence en 2013 sur différentes lignées cellulaires humaines de cancers cérébrales. Tout d'abord, la curcumine se lie à la membrane cellulaire et s'infiltrer dans le cytoplasme pour initier l'apoptose mais elle inhibe aussi la télomérase en diminuant l'expression de l'ARNm hTERT (Khaw et al., 2013).

L'absence d'étude *in vivo* sur cette molécule ne nous permet pas de conclure quant à son réel impact sur l'activité enzymatique de la télomérase mais les données *in vitro* soulignent son potentiel en tant que traitement adjuvant dans les cancers.

2. Inhibiteurs pharmacologiques de télomérase : Oligonucléotides antisens

La stratégie des oligonucléotides antisens existe depuis une quinzaine d'année, leur mode d'action *in vitro* repose sur le blocage de la traduction des ARNm complémentaires par leur hybridation parfaitement complémentaire (Figure 34).

Les oligonucléotides utilisés comme « inhibiteur de la télomérase » ciblent TERC, la composante ARN de la télomérase.

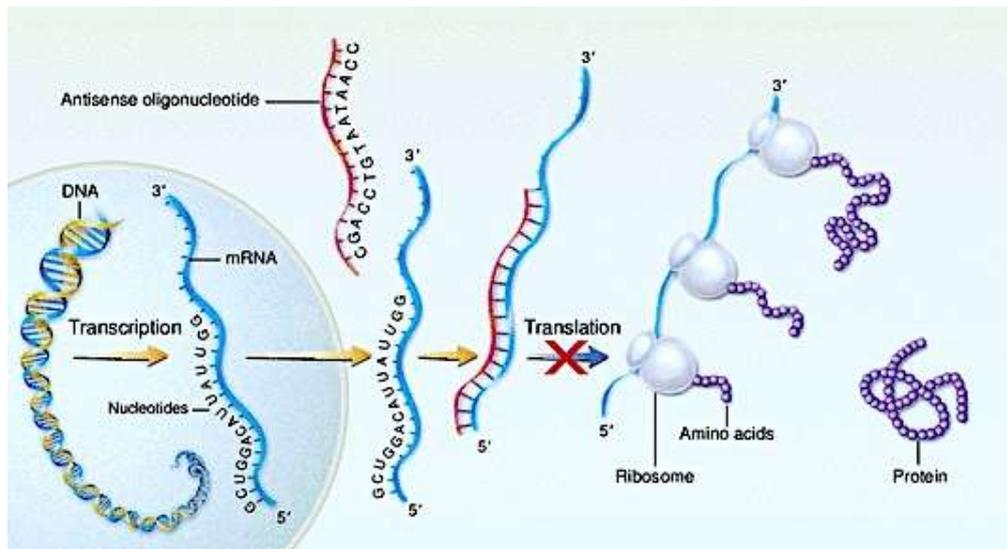


Figure 34: Mécanisme d'action des oligonucléotides antisens

Les sondes antisens viennent s'hybrider sur les ARNm cible bloquant alors leur traduction en protéine (Askari and McDonnell, 1996).

Cependant TERC contient un grand nombre de nucléotides, les oligonucléotides antisens ciblent la partie matrice nécessaire à la télomérase. Leurs actions ont été démontrées sur des cellules humaines (Herbert et al., 1999) et peut persister jusqu'à quelques jours. L'efficacité de ces oligonucléotides est variable, l'IC₅₀ est comprise entre le picomolaire et le nanomolaire (Norton et al., 1996). Cependant, du fait de leur grande taille, les oligonucléotides possèdent plusieurs limites : tout d'abord il est difficile de leur faire passer la membrane cellulaire lipidique ainsi que la barrière hémato-encéphalique (BHE). De plus, ils se dégradent très rapidement, induisant une faible biodisponibilité limitant leur utilisation par voie systémique.

Afin de stabiliser ces molécules, un ajout d'une fonction phosphorothioate a été réalisé, un lipide a aussi été associé afin d'augmenter la biodisponibilité des oligonucléotides en leur permettant d'être utilisés par voie systémique même si les quantités injectées restent importantes.

La plus avancée des molécules anti-sens ciblant la télomérase de ce type actuellement en essai est l'Imetelstat. Sa dénomination d'origine est GNR163 puis GNR163L après l'ajout du lipide, elle est développée par la société Geron Corp.

Il s'agit d'une séquence nucléotidique stabilisée par une fonction phosphorothioate et conjuguée en position 13 à un lipide.

La séquence nucléotidique est complémentaire de la séquence matrice TERC (Figure 35).

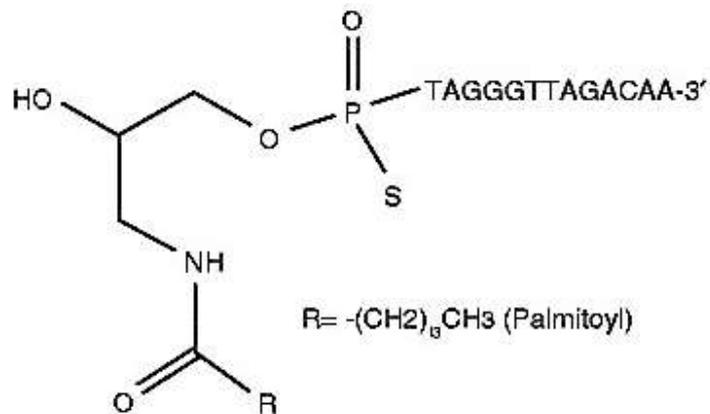


Figure 35: Imetelstat : inhibiteur de télomérase.

La structure de l'Imetelstat avec sa séquence complémentaire à TERC lui donne sa propriété inhibitrice de télomérase (Jafri et al., 2016).

Il s'agit donc d'un inhibiteur compétitif qui en se fixant sur la séquence de TERC vient empêcher l'action de TERT sur les brins de l'ADN et donc bloque l'allongement des télomères (Figure 36).

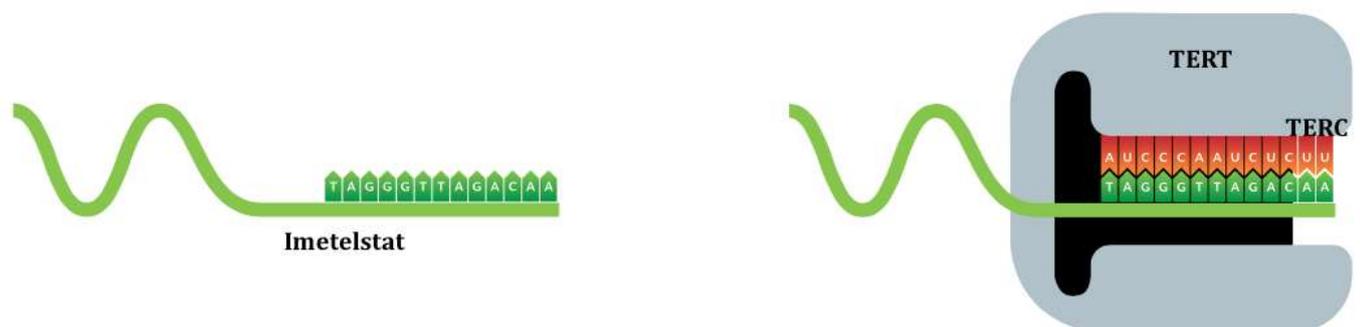


Figure 36: Mode d'action de l'Imetelstat

Par sa fixation sur TERC, Imetelstat (en vert) inhibe l'action de reverse transcriptase de la télomérase de façon compétitive. En effet, TERT (en gris) continue de lier TERC (en orange) mais celui-ci au lieu de lier l'ADN télomérique va se fixer à l'Imetelstat (d'après le laboratoire biopharmaceutique Géron).

Différentes études *in vivo* ont été réalisées sur cette molécule :

Premièrement, 8 essais de phase I ont été réalisés (d'après les données du site Clinial Trial) afin de s'assurer de la sécurité et de la tolérance de la molécule mais aussi de définir les données pharmacocinétique et pharmacodynamique. Ces études se sont réalisées sur différents types de cancers : syndrome lymphoprolifératif, myélome multiple, cancer solides récidivants ou résistants au traitement, cancer pulmonaire non à petites cellules ou encore cancers du sein. Les cohortes étaient constituées de patients malades, adultes ou enfant (pour

l'essai sur les syndromes lymphoprolifératif, les cancers du système nerveux central et cancers de l'intestin). Les études ont été réalisées sur la molécule seule dans 7 des essais et un dernier essai concerne l'association Imetelstat et trastuzumab dans le cadre des cancers du sein HER2+ résistant au traitement.

Les essais de phases II ont ensuite démontré l'intérêt thérapeutique de la molécule pour les cancers hématologiques d'origine myéloïde (Leucémie myéloïde aigue et syndromes myélodysplasiques) et les résultats sont en attentes pour les cancers du système nerveux central (gliomes, astrocytomes, gliosarcomes...)

Une étude de phases III est actuellement en cours afin de démontrer l'efficacité de la molécule dans les syndromes myélodysplasique.

Ainsi les oligonucléotides antisens sont prometteurs en tant que thérapie anti-téломérase. Cependant en tenant compte de leur grande taille mais aussi des biodisponibilité encore faible, une nouvelle stratégie visant l'ARNm se développe. Il s'agit de l'utilisation d'oligonucléotides stabilisés doubles brins de petite taille mimant l'effet des micro ARN (miARN) ou ARN mimiques. Ces ARN non codants, pourraient permettre de plus larges champs d'action comme l'utilisation en voie systémique. Cependant leur petite taille leur confèrent un inconvénients majeur : leur grand risque d'hybridation non spécifique sur les ARNm non ciblés.

3. Ciblage du G-Quadruplexe

Comme détaillé dans la première partie de ce travail, il est connu que la formation de G-quadruplexe au niveau des télomères empêche la fixation de TERT sur l'ADN télomérique et inhibe donc l'élongation (Mergny and Hélène, 1998) (Figure 37).

Mais au-delà de l'action contre le recrutement de TERT, les G-quadruplexe déstabilisent les extrémités télomériques en entraînant des troubles dans l'architecture des télomères et plus précisément provoquent la délocalisation de POT1 (Iachettini et al., 2013). L'absence de POT1 active alors les mécanismes de réponse aux dommages de l'ADN via la kinase ATR. La cellule va alors activer les voies de mort cellulaire ou de sénescence répllicative. Cette action indépendante de TERT, rend ces molécules très intéressantes pour les cellules tumorales utilisant le mécanisme ALT pour l'allongement de leur télomères.

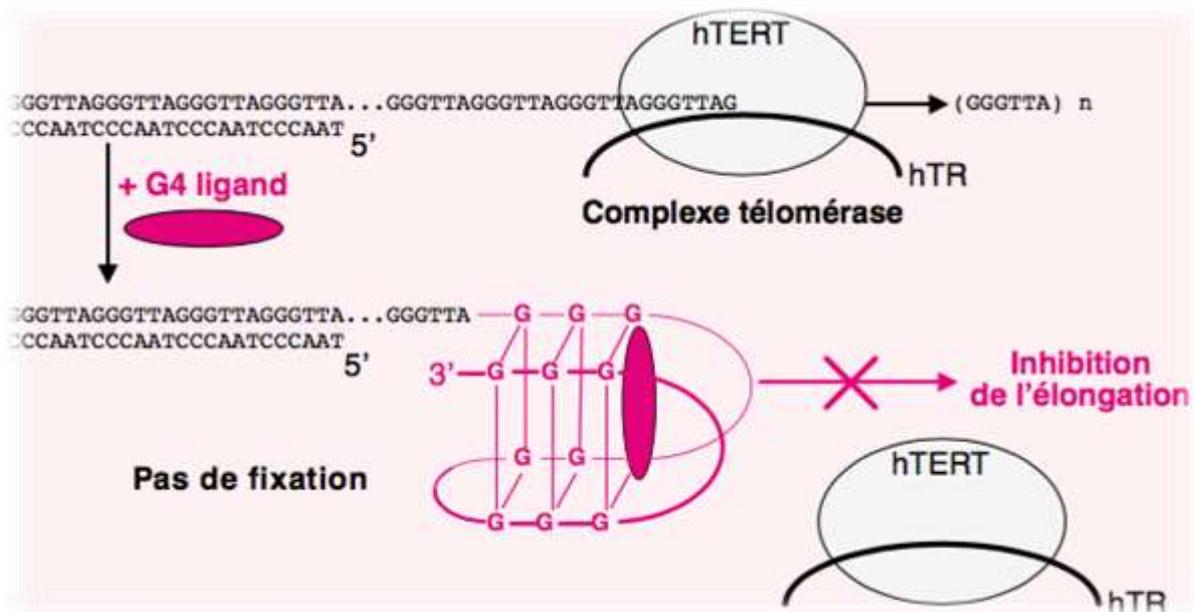


Figure 37: le G-quadruplexe cible pour l'inhibition de la télomérase

En empêchant la fixation de TERT sur l'ADN télomérique, la formation de G-quadruplexe devient une cible potentielle pour la recherche de thérapie anti télomérase (d'après Mergny and Hélène, 1998).

Dans ce contexte, de nombreuses équipes ont exploré la piste de la stabilisation du G-quadruplexe comme nouvelle stratégie thérapeutique anti-cancéreuse. Les premiers composés ont été décrits en 1997 mais possédaient malheureusement une faible efficacité sur l'activité anti-télomérase (Sun et al., 1997). Plus tard, l'identification de famille de ligands stabilisateurs des G-quadruplexe a été réalisée avec différents essais (Mergny et al., 2001). Parmi ces familles, nous trouvons les dérivés d'éthidium, de dibenzophénanthrones ou encore les dérivés de triazines. Les dérivés d'éthidium étant hautement toxique, leur utilisation en thérapeutique a été abandonnée.

Tous ces composé sont issus d'une structure de 2,4,6-triamino-1,3,5-triazine. On suppose que leur action est due à leur pouvoir intercalant sur les G-quadruplexe ce qui permet la stabilisation des liaisons hydrogènes des complexes. Afin de mieux comprendre leur mécanismes d'action, des études basées sur l'analyse en cristallographie et en RMN des structures des complexes ont permis d'établir les sites de fixations des ligands (Read and Neidle, 2000).

Tout d'abord plusieurs hypothèses avaient été formulées sur la localisations des ligands dans les complexes : à l'intérieur, à l'extérieur avec un seul ou deux ligands par complexe (Figure 38).

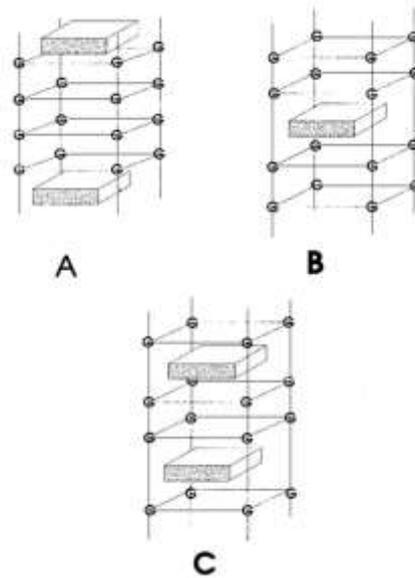


Figure 38: différentes localisations des ligands de G-quadruplexe

Les ligands (rectangle gris) peuvent être localisés aux extrémités des complexes (A), à l'intérieur, en un exemplaire (B) ou deux (C) (Read and Neidle, 2000)

L'équipe de chercheurs menée par M.A Read a montré par la suite que seule la forme possédant 2 ligands intercalant dans un G-quadruplexe était stable et a ainsi démontré leur mécanisme d'action de façon plus précise.

Plus tard, une autre équipe a montré que les ligands des G-quadruplexe pouvaient se fixer rapidement sur les séquences simples brins de l'ADN et induire rapidement leur dégradation. Au niveau des télomères cela se réalise par le biais de la déprotection des extrémités. Dans les cellules une mort cellulaire par apoptose est alors observable en 2 à 3 cycles de divisions cellulaires, cette mort est accompagnée d'une instabilité chromosomique (Gomez et al., 2003).

a. **BRACO-19**

Parmi les molécules stabilisant les G-quadruplexe le BRACO-19 a maintenant fait ses preuves d'efficacité. Il s'agit d'un composé d'acridine tri-substitué (Figure 39).

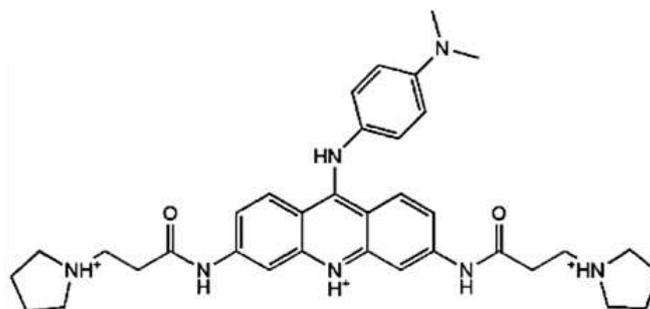


Figure 39: Structure de la molécule du BRACO-19

Le BRACO-19 ou « N-[9-[4-(diméthylamino)anilino]-6-(3-pyrrolidin-1-ylpropanoylamino)acridin-3-yl]-3-pyrrolidin-1-ylpropanamide » est un stabilisateur de G-Quadruplexe ayant prouvé son efficacité. (Burger et al., 2005).

Dans les cellules humaines, le BRACO-19 entraîne une inhibition de la croissance cellulaire et une induction de la sénescence.

Mais le BRACO-19 possède aussi un rôle télomérase indépendant, en effet, sur des cellules de gliomes, il a été montré que l'utilisation de cette molécule induit une augmentation de dommages à l'ADN liée à une diminution de l'affinité de TRF2 et POT1 aux télomères sans changer l'interaction de TRF1 au télomère (Zhou et al., 2016). De la même façon, la surexpression de POT1 entraînant la protection des télomères permet à la cellule d'acquies une résistance au BRACO-19.

Cependant, le pouvoir anti-télomérase et déstabilisateur des télomères n'a pas été étudié *in vivo*.

b. Télomestatine

En 2001, un nouveau ligand de G-quadruplexe a été isolé de *Streptomyces anulatus* (Shin-ya et al., 2001). Il s'agit d'un composé macrocyclique de structure proche de celle des tétrades de guanine des télomères (Figure 40). Ainsi elle stabilise la formation de G-quadruplexe et empêche la télomérase d'accéder aux télomères.

La télomestatine est le ligand de G-quadruplexe le plus puissant connu à ce jour (IC_{50} : 5nM). Cette molécule est hautement spécifique des G-quadruplexe et de la même façon que le BRACO-19, la télomestatine inhibe la fixation des protéines TRF2 et POT1 sur l'ADN télomérique (Gomez et al., 2006).

Mais une action supplémentaire sur les cellules utilisant le mécanisme ALT pour la maintenance de leurs télomères a aussi été démontrée. En effet, la télomestatine inhibe aussi la fixation de la topoisomérase III α à l'ADN télomérique (Temime-Smaali et al., 2009). Or la topoisomérase III α est un composant nécessaire à la mise en place des ALT-associated PML bodies (APBs), caractéristiques des cancers ALT.

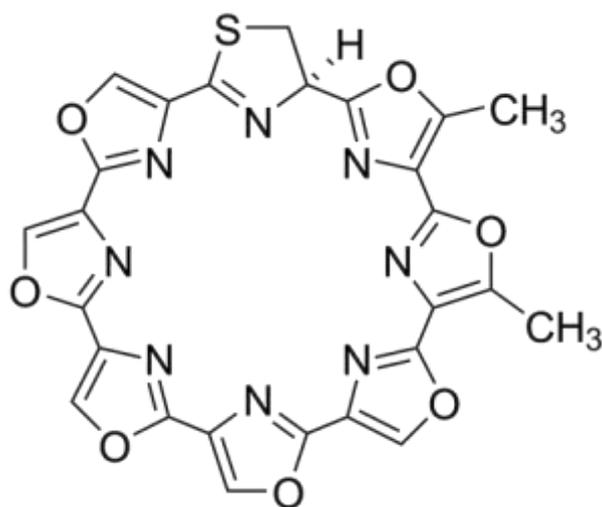


Figure 40: Structure de la Télomestatine

La structure de la télomestatine comportant de grande analogie avec les tétrades de guanine permet sa fixation sur les G-quadruplexe (Gomez et al., 2004)

Ainsi la télomestatine semble pouvoir être un traitement pour les cancers utilisant la réactivation de la télomérase mais aussi pour ceux utilisant le mécanisme ALT.

De la même façon que le BRACO-19, les essais *in vivo* de cette molécule n'ont pas été réalisés ce qui ne nous permet pas de conclure sur son véritable potentiel thérapeutique.

c. Quarfloxine

Plus récemment, une nouvelle molécule ciblant les G-quadruplexe a été découverte, il s'agit de la Quarfloxine (ou CX-3543 ou itarnafloxine) qui est basée sur une homologie de structure de la norfloxacine, une fluoroquinolone qui était connue pour inhiber la gyrase et la topoisomérase par une liaison au complexe enzyme-ADN (Figure 41). Ce complexe trimérique était alors susceptible d'interagir avec les G-quadruplexe, c'est donc dans ce cadre là que la Quarfloxine a été développée (Balasubramanian et al., 2011). Les modifications structurales ont permis la perte de la fonction inhibitrice enzymatique et une augmentation de l'affinité pour les G-quadruplexe de la molécule.

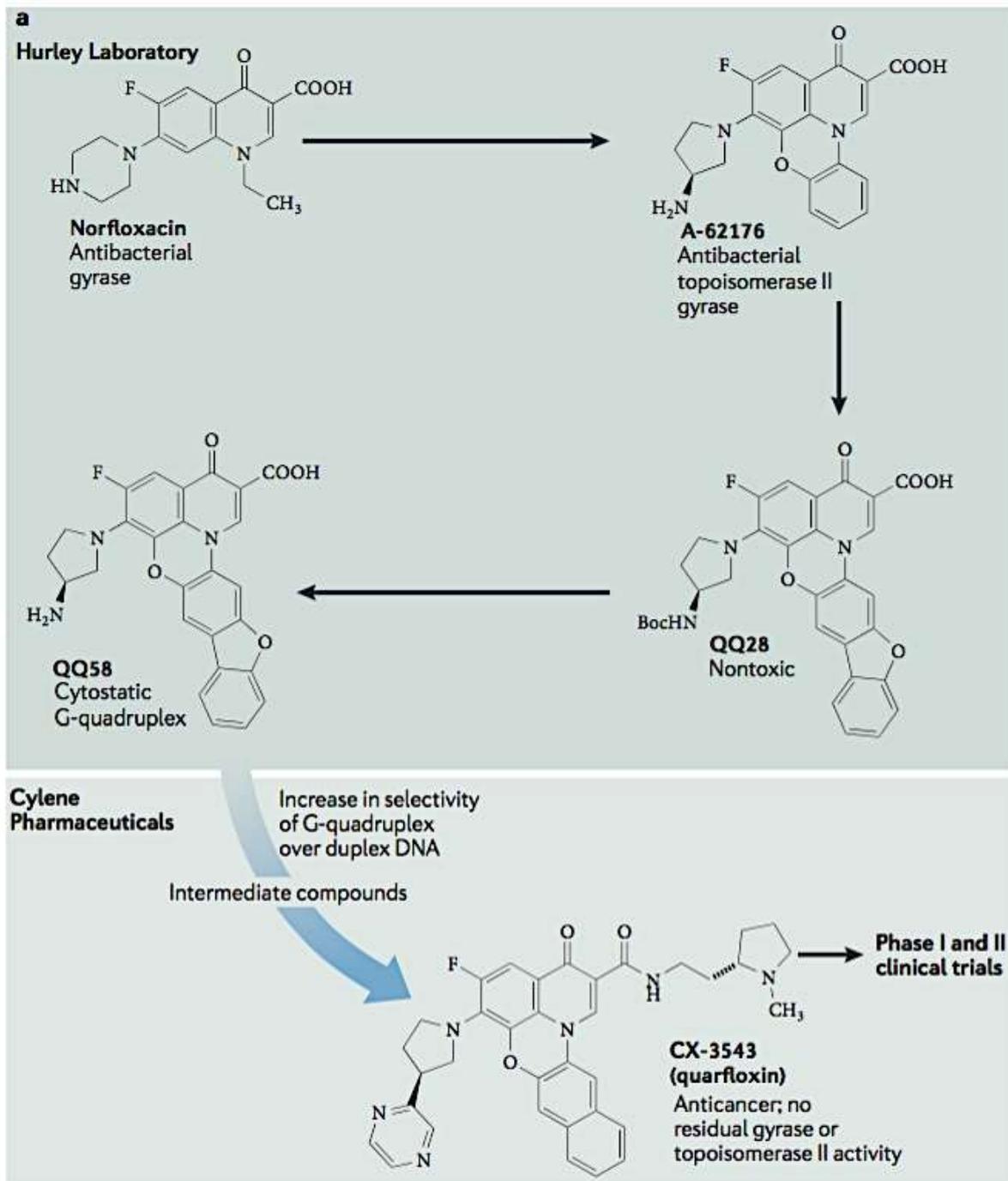


Figure 41: Processus de développement de la Quarfloquine

La fabrication de la Quarfloquine par le laboratoire Cyclene pharmaceuticals a débuté par une analogie de structure avec la norfloxacine, qui pouvait interagir avec les G-quadruplexe. Cette fonction a été augmentée par différentes modifications de structures (1-62176, GG28 et QQ58) pour in fine parvenir à la fabrication de la molécule CX-3543 ou Quarfloquine (Balasubramanian et al., 2011).

La Quarfloquine est la seule molécule ligand de G-quadruplexe dont les essais *in vivo* ont été réalisés. En effet, des essais de phase I pour l'utilisation de la molécule chez les patients atteints de

Tumeurs solides ou de lymphomes ont été réalisés. Seule l'utilisation de la Quarfloxine pour les tumeurs carcinoïdes ou endocrines a été évaluée puis confirmée dans des essais de phase II. Les essais de phase III n'ont cependant pas encore débutés.

4. Immunothérapie

La base du traitement par immunothérapie anti-téломérase est la sensibilisation des cellules immunitaires contre les cellules tumorales exposant un peptide dérivé de la téломérase au sein des molécules HLA de classe I (Antigène de surface). Une première étape de présentation dans les CMH (Complexe d'Immuno-Histocompatibilité) de classe II par les cellules présentatrices de l'antigène est nécessaire afin de sélectionner et de stimuler l'amplification des clones de lymphocytes spécifiques de l'antigène. Une réponse contre les cellules tumorales présentant le même épitope peut alors se mettre en place et perdurer (Vonderheide et al., 1999).

On recense plus de 26 peptides utilisés dans le but d'induire une réponse anti-téломérase (Buseman et al., 2012).

a. GV1001

Le peptide E616-626 (GV1001) composé d'une séquence de 16 acides aminés dérivés de hTERT a été utilisé afin d'entraîner la stimulation des lymphocytes T CD4+ mais aussi CD8+. Les lymphocytes vont alors attaquer les cellules présentant l'antigène qui sont alors les cellules tumorales. Cette molécule, permet d'ainsi induire une stimulation des lymphocytes T CD4+ dans une réponse immunitaire de type vaccin (Kyte, 2009).

Des essais des essais clinique de phase I et II ont été réalisés et il a été démontré la sécurité et la tolérance de cette molécule chez des patients atteints de cancer pulmonaire non à petites cellules (Brunsvig et al., 2006) mais aussi dans le cas d'hyperplasie bénigne de la prostate, du carcinome hépatocellulaire ou du mélanome.

L'essai clinique de phase III est en cours dans le cas du cancer pancréatique avec GV1001 seul, mais les études dans ce même type de cancer en association avec de la gemcitabine ou de la capecitabine sont terminées de la même façon que les essais pour les patients atteints de cancer pulmonaires non à petites cellules. Les résultats de ces études ne sont cependant pas encore disponibles.

b. GNRVAC1

Une autre stratégie visant à stimuler la réponse immune anti-tumorale, utilise le principe de la thérapie cellulaire, il s'agit de la molécule GNRVAC1. Des cellules dendritiques immatures sont prélevées chez le patient et transduites *ex vivo* avec des ARNm codant pour des peptides dérivés de hTERT. Une fois les cellules ayant incorporées le peptide dans les CMH de classe II, elles sont injectées chez le patient par voie sous-cutanée, intradermique ou intra lymphatique. Celui-ci développe alors une réponse immunitaire via les lymphocytes T (CD8+ mais aussi CD4+) contre les cellules tumorales présentant ce peptide (Su et al., 2005). Cette

stratégie a été testée chez des patients atteints de mélanome métastatique et les résultats des essais de phases I/II sont en attente de publications (ref : NCT00961844). Le Vaccin GRNVAC1 a été l'objet d'un autre essai clinique de phase II dans le cadre de la leucémie myéloïde aigue (ref : NCT00510133)

Ainsi les traitements par immunothérapie, de part leur faisabilité et leur large champs d'application semble être une stratégie prometteuse de traitement pour les patients atteints de cancers.

5. Thérapie anti-vieillessement

Dans le cadre des traitements anti-cancéreux, la stratégie est donc d'inhiber l'action de la télomérase

Cependant, nous avons pu voir précédemment que les télomères étaient impliqués dans le processus de vieillissement cellulaire, nous pouvons donc nous demander si la stimulation de l'activité de la télomérase ne pourrait pas permettre de développer des thérapies antiveillessement.

Tout d'abord afin de vérifier cette théorie une équipe a démontré *in vivo* que la surexpression de TERT (réalisée par transgénèse classique avec la forme murine de TERT) permettait une augmentation de la durée de vie des souris de 13% à 24% sans entraîner l'augmentation de l'incidence des cancers. Au niveau de l'apparition des signes du vieillissement, ces souris développaient moins d'ostéoporose, possédaient une meilleure coordination neuromusculaire et un meilleur état physique global. Ainsi, cette équipe a pu démontrer que grâce à des thérapies géniques pro-télomérase, il était possible de reporter l'apparition des signes cliniques du vieillissement cellulaire (Bernardes de Jesus et al., 2012).

La même équipe a tout de même démontré *in vivo*, sur des souris possédant de très long télomères qu'un vieillissement cellulaire ralenti était possible sans la réalisation de manipulation génétique telles que la surexpression de TERT via une utilisation de cellules souches possédant des télomères deux fois plus grand que la normale (cellules de la tige embryonnaire murine). (Varela et al., 2016).

Pour développer véritablement un stratégie thérapeutique anti-vieillessement, il a été montré qu'une petite molécule activatrice de la télomérase, le cycloastragenol ou TA-65 (Figure 42) purifié à partir de la racine d'*Astragalus membranaceus* et utilisé en supplémentation alimentaire (Harley et al., 2011) était capable d'augmenter la longueur moyenne des télomères, de diminuer le pourcentage de télomères de taille critiques et ainsi de diminuer aussi les dommages causés à l'ADN dans des fibroblastes embryonnaires de souris possédant de très petit télomères et une seule copie du gène codant pour la sous unité TERC (de Jesus et al., 2011).

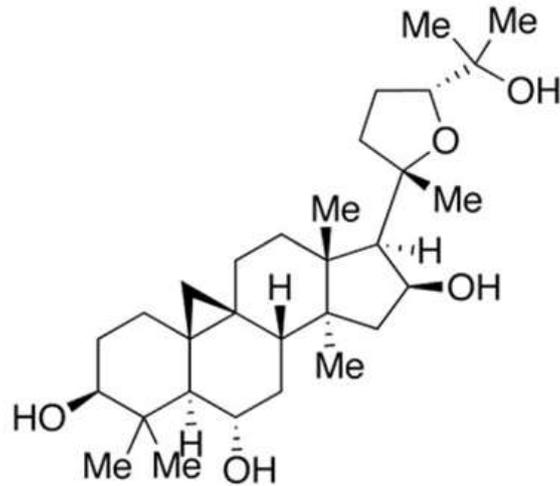


Figure 42: Structure du cycloastragenol ou TA-65

Dans cette publication, les auteurs mettent en évidence le fait que TA-65 ne provoque pas d'allongement des télomères ou ne réduit pas les dommages à l'ADN dans les cellules dépourvu de TERC. Ainsi l'action de la molécule TA-65 se réalise bien avec la voie de la télomérase (TERT/TERT/ protéines associées), ce qui est confirmé par l'augmentation de l'ARNm codant pour TERT dans les tissus. Le mécanisme précis de l'activation de la télomérase n'est par contre pas encore connu.

Pour confirmer l'intérêt de cette molécule dans le traitement du vieillissement, il a été observé que l'utilisation de TA-65 chez les souris améliorait clairement l'état physique global de ces dernières sans augmenter l'incidence de survenue de cancers (de Jesus et al., 2011).

Afin d'étudier l'influence de cette molécule chez l'homme, des essais cliniques ont été réalisés en phase I sur des patients atteints de syndromes métabolique et de résistances à l'insuline, symptômes qui peuvent être associés au phénomène du vieillissement et à un raccourcissement des télomères. Les résultats de ces essais n'ont pas encore été publiés et les essais de phase II n'ont pour le moment pas débuté.

Ainsi les molécules pharmacologiques stimulant l'expression ou l'activité de TERT, pourraient moduler l'apparition de signes cliniques liés au vieillissement et donne à la thérapie télomérique un nouveau champ d'application en thérapeutique.

VIII. Conclusion et perspectives

Avec ce travail nous avons pu montrer que la télomérase est une enzyme possédant un rôle crucial dans le maintien de la taille des télomères. Cette enzyme interagit avec de nombreux partenaires comme la Dyskerine lui permettant d'exercer diverses actions sur de nombreuses voies de signalisation cellulaire. Ces différentes voies peuvent être modulées lors de phénomènes physiologiques comme le vieillissement cellulaire ou encore dans des phénomènes pathologiques comme le développement d'un cancer. En effet, par la réactivation de sa sous unité TERT, dans les cellules cancéreuses, la télomérase permet aux cellules d'acquies un mécanisme de maintenance des télomères leur permettant soit d'éviter le processus de sénescence répliative, soit de stabiliser leur génome pour continuer de proliférer. Les activités non canoniques de la télomérase contribuent également à son rôle d'oncogène. Globalement, ses activités expliquent que près de 95% des tumeurs sont dépendantes de cette enzyme et en font un oncogène majeur. Dans ce cadre, de nombreuses recherches ont été réalisées et différents modes de ciblage de la télomérase ont été développés. Des molécules naturelles peuvent tout d'abord au travers de leurs composés moduler l'expression de la télomérase comme le thé vert ou le curcuma. Un ciblage de la sous-unité ARNm de la télomérase (TERC) peut être réalisé au moyen d'oligonucléotides antisens modulant l'expression de l'ARNm cible. Le ciblage de la télomérase peut aussi se réaliser via la stabilisation des structures G-Quadruplexe, des zones riches en guanine des télomères. Cette stabilisation peut ainsi empêcher la fixation de la sous-unité catalytique (TERT) à l'ADN télomérique rendant impossible son élongation. Ces ligands avec une action indépendante de TERT démontrent leur intérêt dans les traitement des tumeurs ne ré-exprimant pas TERT pour l'allongement des télomères. Plus récemment, des immunothérapies anti TERT ont pu être développées chez les patients et leur efficacité commence à être démontrée. Globalement ces résultats sont prometteurs, et ouvre un nouveau champ thérapeutique, qui va très certainement continuer son développement à l'avenir, du fait de la très large indication possible pour ce type de traitement. L'amélioration des stratégies d'immunothérapie ou le couplage avec des immuno-modulateur comme les anti-PDL1, pourra améliorer le volet immunothérapie. De nouvelles stratégies mimant les micro-ARN pourront aussi être détournées afin de cibler TERC ou directement TERT de façon plus efficace que les oligonucléotides possédant une biodisponibilité moyenne.

Les applications du ciblage de la télomérase ne se limite pas seulement au champ de la cancérologie, en effet l'implication de cette enzyme dans le vieillissement cellulaire a permis de faire apparaître la première molécule naturelle stimulant l'activité de TERT et réduisant alors les signes cliniques du vieillissement. La télomérase étant régulée par de nombreuses protéines comme le complexe Shelterin, le ciblage de celles-ci pourrait peut-être, lui aussi, permettre l'avancée de la thérapeutique.

En conclusion, le champ d'investigation des thérapies anti-télomérase est extrêmement vaste et prometteur en cancérologie mais aussi dans le cadre des thérapies anti-vieillessement souvent associées aux pathologies métaboliques.

Bibliographie

Abreu, E., Aritonovska, E., Reichenbach, P., Cristofari, G., Culp, B., Terns, R.M., Lingner, J., and Terns, M.P. (2010). TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 2971–2982.

Agarwal, S.K., Guru, S.C., Heppner, C., Erdos, M.R., Collins, R.M., Park, S.Y., Saggari, S., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Spiegel, A.M., et al. (1999). Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. *Cell* *96*, 143–152.

Aguiar, P.H.N., Furtado, C., Repolês, B.M., Ribeiro, G.A., Mendes, I.C., Peloso, E.F., Gadelha, F.R., Macedo, A.M., Franco, G.R., Pena, S.D.J., et al. (2013). Oxidative stress and DNA lesions: the role of 8-oxoguanine lesions in *Trypanosoma cruzi* cell viability. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *7*, e2279.

Akincilar, S.C., Unal, B., and Tergaonkar, V. (2016). Reactivation of telomerase in cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 1659–1670.

Armanios, M. (2009). Syndromes of Telomere Shortening. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* *10*, 45.

Armanios, M., and Blackburn, E.H. (2012). The telomere syndromes. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 693–704.

Askari, F.K., and McDonnell, W.M. (1996). Antisense-Oligonucleotide Therapy. *N. Engl. J. Med.* *334*, 316–318.

Augereau, A., T'kint de Roodenbeke, C., Simonet, T., Bauwens, S., Horard, B., Callanan, M., Leroux, D., Jallades, L., Salles, G., Gilson, E., et al. (2011). Telomeric damage in early stage of chronic lymphocytic leukemia correlates with shelterin dysregulation. *Blood* *118*, 1316–1322.

Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonja, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L., and van Deursen, J.M. (2011). Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* *479*, 232–236.

Balasubramanian, S., Hurley, L.H., and Neidle, S. (2011). Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? *Nat. Rev. Drug Discov.* *10*, 261–275.

Bernardes de Jesus, B., Vera, E., Schneeberger, K., Tejera, A.M., Ayuso, E., Bosch, F., and Blasco, M.A. (2012). Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol. Med.* *4*, 691–704.

Bisht, K., Smith, E.M., Tesmer, V.M., and Nandakumar, J. (2016). Structural and functional consequences of a disease mutation in the telomere protein TPP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 13021–13026.

Brunsvig, P.F., Aamdal, S., Gjertsen, M.K., Kvalheim, G., Markowski-Grimsrud, C.J., Sve, I., Dyrhaug, M., Trachsel, S., Møller, M., Eriksen, J.A., et al. (2006). Telomerase peptide vaccination: a phase I/II study in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* *CII* *55*, 1553–1564.

- Burger, A.M., Dai, F., Schultes, C.M., Reszka, A.P., Moore, M.J., Double, J.A., and Neidle, S. (2005). The G-Quadruplex-Interactive Molecule BRACO-19 Inhibits Tumor Growth, Consistent with Telomere Targeting and Interference with Telomerase Function. *Cancer Res.* 65, 1489–1496.
- Buseman, C.M., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2012). Is telomerase a viable target in cancer? *Mutat. Res.* 730, 90–97.
- Butt, A.J., McNeil, C.M., Musgrove, E.A., and Sutherland, R.L. (2005). Downstream targets of growth factor and oestrogen signalling and endocrine resistance: the potential roles of c-Myc, cyclin D1 and cyclin E. *Endocr. Relat. Cancer* 12 Suppl 1, S47-59.
- Caldon, C.E., Sergio, C.M., Schütte, J., Boersma, M.N., Sutherland, R.L., Carroll, J.S., and Musgrove, E.A. (2009). Estrogen Regulation of Cyclin E2 Requires Cyclin D1 but Not c-Myc. *Mol. Cell. Biol.* 29, 4623–4639.
- Chung, J., Khadka, P., and Chung, I.K. (2012). Nuclear import of hTERT requires a bipartite nuclear localization signal and Akt-mediated phosphorylation. *J Cell Sci* 125, 2684–2697.
- Cimprich, K.A., and Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 616–627.
- Colgin, L.M., Wilkinson, C., Englezou, A., Kilian, A., Robinson, M.O., and Reddel, R.R. (2000). The hTERT α splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia* N. Y. N 2, 426–432.
- Collins, K., Kobayashi, R., and Greider, C.W. (1995). Purification of tetrahymena telomerase and cloning of genes encoding the two protein components of the enzyme. *Cell* 81, 677–686.
- Dai, D.-F., Chen, T., Wanagat, J., Laflamme, M., Marcinek, D.J., Emond, M.J., Ngo, C.P., Prolla, T.A., and Rabinovitch, P.S. (2010). Age-Dependent Cardiomyopathy in Mitochondrial Mutator Mice is Attenuated by Overexpression of Catalase Targeted to Mitochondria. *Aging Cell* 9, 536–544.
- De Lange, T. (2004). T-loops and the origin of telomeres. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 323–329.
- De Lange, T. (2009). How Telomeres Solve the End-Protection Problem. *Science* 326, 948.
- Deng, W.-G., Jayachandran, G., Wu, G., Xu, K., Roth, J.A., and Ji, L. (2007). Tumor-specific activation of human telomerase reverses transcriptase promoter activity by activating enhancer-binding protein-2 β in human lung cancer cells. *J. Biol. Chem.* 282, 26460–26470.
- Devereux, T.R., Horikawa, I., Anna, C.H., Annab, L.A., Afshari, C.A., and Barrett, J.C. (1999). DNA Methylation Analysis of the Promoter Region of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Gene. *Cancer Res.* 59, 6087–6090.
- Du, H.-Y., Pumbo, E., Ivanovich, J., An, P., Maziarz, R.T., Reiss, U.M., Chirnomas, D., Shimamura, A., Vlachos, A., Lipton, J.M., et al. (2009). TERC and TERT gene mutations in patients with bone marrow failure and the significance of telomere length measurements. *Blood* 113, 309–316.

- Dyer, M.A., Qadeer, Z.A., Valle-Garcia, D., and Bernstein, E. (2017). ATRX and DAXX: Mechanisms and Mutations. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 7.
- Etheridge, K.T., Banik, S.S.R., Armbruster, B.N., Zhu, Y., Terns, R.M., Terns, M.P., and Counter, C.M. (2002). The nucleolar localization domain of the catalytic subunit of human telomerase. *J. Biol. Chem.* 277, 24764–24770.
- Ferrandon, S., Saultier, P., Carras, J., Battiston-Montagne, P., Alphonse, G., Beuve, M., Malleval, C., Honnorat, J., Slatter, T., Hung, N., et al. (2013). Telomere Profiling: Toward Glioblastoma Personalized Medicine. *Mol. Neurobiol.* 47, 64–76.
- Freund, A., Zhong, F.L., Venteicher, A.S., Meng, Z., Veenstra, T.D., Frydman, J., and Artandi, S.E. (2014). Proteostatic control of telomerase function through TRiC-mediated folding of TCAB1. *Cell* 159, 1389–1403.
- Garavís, M., González, C., and Villasante, A. (2013). On the Origin of the Eukaryotic Chromosome: The Role of Noncanonical DNA Structures in Telomere Evolution. *Genome Biol. Evol.* 5, 1142–1150.
- Ghosh, A., Saginc, G., Leow, S.C., Khattar, E., Shin, E.M., Yan, T.D., Wong, M., Zhang, Z., Li, G., Sung, W.-K., et al. (2012). Telomerase directly regulates NF- κ B-dependent transcription. *Nat. Cell Biol.* 14, 1270–1281.
- Gomez, D., Aouali, N., Londoño-Vallejo, A., Lacroix, L., Mégnin-Chanet, F., Lemarteleur, T., Douarre, C., Shin-ya, K., Mailliet, P., Trentesaux, C., et al. (2003). Resistance to the Short Term Antiproliferative Activity of the G-quadruplexe Ligand 12459 Is Associated with Telomerase Overexpression and Telomere Capping Alteration. *J. Biol. Chem.* 278, 50554–50562.
- Gomez, D., Paterski, R., Lemarteleur, T., Shin-ya, K., Mergny, J.-L., and Riou, J.-F. (2004). Interaction of Telomestatin with the Telomeric Single-strand Overhang. *J. Biol. Chem.*
- Gomez, D., Wenner, T., Brassart, B., Douarre, C., O'Donohue, M.-F., El Khoury, V., Shin-Ya, K., Morjani, H., Trentesaux, C., and Riou, J.-F. (2006). Telomestatin-induced telomere uncapping is modulated by POT1 through G-overhang extension in HT1080 human tumor cells. *J. Biol. Chem.* 281, 38721–38729.
- Gredilla, R., Bohr, V.A., and Stevnsner, T. (2010). Mitochondrial DNA repair and association with aging - an update. *Exp. Gerontol.* 45, 478–488.
- Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* 43, 405–413.
- Griewank, K.G., Murali, R., Schilling, B., Schimming, T., Möller, I., Moll, I., Schwamborn, M., Sucker, A., Zimmer, L., Schadendorf, D., et al. (2013). TERT Promoter Mutations Are Frequent in Cutaneous Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 8.
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian Telomeres End in a Large Duplex Loop. *Cell* 97, 503–514.
- Günes, Ç., Lichtsteiner, S., Vasserot, A.P., and Englert, C. (2000). Expression of the hTERT Gene Is Regulated at the Level of Transcriptional Initiation and Repressed by Mad1. *Cancer Res.* 60, 2116–2121.

- Haendeler, J., Hoffmann, J., Brandes, R.P., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2003a). Hydrogen Peroxide Triggers Nuclear Export of Telomerase Reverse Transcriptase via Src Kinase Family-Dependent Phosphorylation of Tyrosine 707. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4598–4610.
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Rahman, S., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2003b). Regulation of telomerase activity and anti-apoptotic function by protein–protein interaction and phosphorylation. *FEBS Lett.* 536, 180–186.
- Haendeler, J., Dröse, S., Büchner, N., Jakob, S., Altschmied, J., Goy, C., Spyridopoulos, I., Zeiher, A.M., Brandt, U., and Dimmeler, S. (2009). Mitochondrial Telomerase Reverse Transcriptase Binds to and Protects Mitochondrial DNA and Function From Damage. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 929–935.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Haneline, L.S. (2009). TERTric hormones promote hematopoiesis. *Blood* 114, 2207–2208.
- Hänsel-Hertsch, R., Antonio, M.D., and Balasubramanian, S. (2017). DNA G-quadruplexes in the human genome: detection, functions and therapeutic potential. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *advance online publication*.
- Harley, C.B., Liu, W., Blasco, M., Vera, E., Andrews, W.H., Briggs, L.A., and Raffaele, J.M. (2011). A Natural Product Telomerase Activator As Part of a Health Maintenance Program. *Rejuvenation Res.* 14, 45–56.
- Harrington, L., Hull, C., Crittenden, J., and Greider, C. (1995). Gel Shift and UV Cross-linking Analysis of Tetrahymena Telomerase. *J. Biol. Chem.* 270, 8893–8901.
- Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M.B., Arruda, I., and Robinson, M.O. (1997). A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275, 973–977.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 37, 614–636.
- He, H., Multani, A.S., Cosme-Blanco, W., Tahara, H., Ma, J., Pathak, S., Deng, Y., and Chang, S. (2006). POT1b protects telomeres from end-to-end chromosomal fusions and aberrant homologous recombination. *EMBO J.* 25, 5180–5190.
- He, H., Wang, Y., Guo, X., Ramchandani, S., Ma, J., Shen, M.-F., Garcia, D.A., Deng, Y., Multani, A.S., You, M.J., et al. (2009). Pot1b Deletion and Telomerase Haploinsufficiency in Mice Initiate an ATR-Dependent DNA Damage Response and Elicit Phenotypes Resembling Dyskeratosis Congenita. *Mol. Cell. Biol.* 29, 229–240.
- Henson, J.D., and Reddel, R.R. (2010). Assaying and investigating Alternative Lengthening of Telomeres activity in human cells and cancers. *FEBS Lett.* 584, 3800–3811.
- Heppner, C., Bilimoria, K.Y., Agarwal, S.K., Kester, M., Whitty, L.J., Guru, S.C., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Spiegel, A.M., Marx, S.J., et al. (2001). The tumor suppressor protein menin interacts with NF-kappaB proteins and inhibits NF-kappaB-mediated transactivation. *Oncogene* 20, 4917–4925.

- Herbert, B.-S., Pitts, A.E., Baker, S.I., Hamilton, S.E., Wright, W.E., Shay, J.W., and Corey, D.R. (1999). Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14276–14281.
- Holt, S.E., Aisner, D.L., Baur, J., Tesmer, V.M., Dy, M., Ouellette, M., Trager, J.B., Morin, G.B., Toft, D.O., Shay, J.W., et al. (1999). Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes Dev.* *13*, 817.
- Hrdlicková, R., Nehyba, J., and Bose, H.R. (2012). Alternatively spliced telomerase reverse transcriptase variants lacking telomerase activity stimulate cell proliferation. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 4283–4296.
- Hussain, T., Gupta, S., Adhami, V.M., and Mukhtar, H. (2005). Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. *Int. J. Cancer* *113*, 660–669.
- Hwang, H., Kreig, A., Calvert, J., Lormand, J., Kwon, Y., Daley, J.M., Sung, P., Opresko, P.L., and Myong, S. (2014). Telomeric overhang length determines structural dynamics and accessibility to telomerase and ALT associated proteins. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *22*, 842–853.
- Iachettini, S., Stevens, M.F., Frigerio, M., Hummersone, M.G., Hutchinson, I., Garner, T.P., Searle, M.S., Wilson, D.W., Munde, M., Nanjunda, R., et al. (2013). On and off-target effects of telomere uncapping G-quadruplex selective ligands based on pentacyclic acridinium salts. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* *32*, 68.
- Jafri, M.A., Ansari, S.A., Alqahtani, M.H., and Shay, J.W. (2016). Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med.* *8*.
- de Jesus, B.B., Schneeberger, K., Vera, E., Tejera, A., Harley, C.B., and Blasco, M.A. (2011). The telomerase activator TA-65 elongates short telomeres and increases health span of adult/old mice without increasing cancer incidence. *Aging Cell* *10*, 604–621.
- Johnstone, R.W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* *1*, 287–299.
- Jones, P.A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 484–492.
- Kang, S.S., Kwon, T., Kwon, D.Y., and Do, S.I. (1999). Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J. Biol. Chem.* *274*, 13085–13090.
- Karijolic, J., Yi, C., and Yu, Y.-T. (2015). Transcriptome-wide dynamics of RNA pseudouridylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *16*, 581–585.
- Khaw, A.K., Hande, M.P., Kalthur, G., and Hande, M.P. (2013). Curcumin inhibits telomerase and induces telomere shortening and apoptosis in brain tumour cells. *J. Cell. Biochem.* *114*, 1257–1270.
- Khoshnan, A., Tindell, C., Laux, I., Bae, D., Bennett, B., and Nel, A.E. (2000). The NF-kappa B cascade is important in Bcl-xL expression and for the anti-apoptotic effects of the CD28 receptor in primary human CD4+ lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *165*, 1743–1754.

- Kibe, T., Osawa, G.A., Keegan, C.E., and Lange, T. de (2010). Telomere Protection by TPP1 Is Mediated by POT1a and POT1b. *Mol. Cell. Biol.* 30, 1059–1066.
- Kilian, A., Bowtell, D.D., Abud, H.E., Hime, G.R., Venter, D.J., Keese, P.K., Duncan, E.L., Reddel, R.R., and Jefferson, R.A. (1997). Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum. Mol. Genet.* 6, 2011–2019.
- Kokoszka, J.E., Coskun, P., Esposito, L.A., and Wallace, D.C. (2001). Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 2278–2283.
- Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E.A., Horikawa, I., Barrett, J.C., and Huang, L.E. (2004). HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J.* 23, 1949–1956.
- Kyo, S., Takakura, M., Taira, T., Kanaya, T., Itoh, H., Yutsudo, M., Ariga, H., and Inoue, M. (2000). Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res.* 28, 669–677.
- Kyte, J.A. (2009). Cancer vaccination with telomerase peptide GV1001. *Expert Opin. Investig. Drugs* 18, 687–694.
- Legassie, J.D., and Jarstfer, M.B. (2006). The unmasking of telomerase. *Struct. Lond. Engl.* 1993 14, 1603–1609.
- Leininger, G.M., Edwards, J.L., Lipshaw, M.J., and Feldman, E.L. (2006). Mechanisms of Disease: mitochondria as new therapeutic targets in diabetic neuropathy. *Nat. Rev. Neurol.* 2, 620–628.
- Lin, S.Y., and Elledge, S.J. (2003). Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell* 113, 881–889.
- Listerman, I., Sun, J., Gazzaniga, F.S., Lukas, J.L., and Blackburn, E.H. (2013). The major reverse-transcriptase-incompetent splice variant of the human telomerase protein inhibits telomerase activity but protects from apoptosis. *Cancer Res.* 73, 2817–2828.
- Liu, C., Fang, X., Ge, Z., Jalink, M., Kyo, S., Björkholm, M., Gruber, A., Sjöberg, J., and Xu, D. (2007). The telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene is a direct target of the histone methyltransferase SMYD3. *Cancer Res.* 67, 2626–2631.
- Liu, T., Yuan, X., and Xu, D. (2016). Cancer-Specific Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Promoter Mutations: Biological and Clinical Implications. *Genes* 7.
- Maida, Y., Kyo, S., Kanaya, T., Wang, Z., Yatabe, N., Tanaka, M., Nakamura, M., Ohmichi, M., Gotoh, N., Murakami, S., et al. (2002). Direct activation of telomerase by EGF through Ets-mediated transactivation of TERT via MAP kinase signaling pathway. *Oncogene* 21, 4071–4079.
- Maida, Y., Yasukawa, M., Furuuchi, M., Lassmann, T., Possemato, R., Okamoto, N., Kasim, V., Hayashizaki, Y., Hahn, W.C., and Masutomi, K. (2009). An RNA dependent RNA polymerase formed by hTERT and the RNase MRP RNA. *Nature* 461, 230–235.

- Martínez, P., and Blasco, M.A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nat. Rev. Cancer* 11, 161–176.
- Martínez, P., Thanasoula, M., Muñoz, P., Liao, C., Tejera, A., McNees, C., Flores, J.M., Fernández-Capetillo, O., Tarsounas, M., and Blasco, M.A. (2009). Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. *Genes Dev.* 23, 2060–2075.
- Mergny, J.-L., and Hélène, C. (1998). G-quadruplex DNA: A target for drug design. *Nat. Med.* 4, 1366–1367.
- Mergny, J.-L., Lacroix, L., Teulade-Fichou, M.-P., Hounsou, C., Guittat, L., Hoarau, M., Arimondo, P.B., Vigneron, J.-P., Lehn, J.-M., Riou, J.-F., et al. (2001). Telomerase inhibitors based on quadruplex ligands selected by a fluorescence assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 3062–3067.
- Mitchell, J.R., Wood, E., and Collins, K. (1999). A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402, 551–555.
- Morin, G.B. (1989). The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59, 521–529.
- Naasani, I., Oh-hashii, F., Oh-hara, T., Feng, W.Y., Johnston, J., Chan, K., and Tsuruo, T. (2003). Blocking Telomerase by Dietary Polyphenols Is a Major Mechanism for Limiting the Growth of Human Cancer Cells *in Vitro* and *in Vivo*. *Cancer Res.* 63, 824–830.
- Nakayama, J., Saito, M., Nakamura, H., Matsuura, A., and Ishikawa, F. (1997). TLP1: a gene encoding a protein component of mammalian telomerase is a novel member of WD repeats family. *Cell* 88, 875–884.
- Nandakumar, J., and Cech, T.R. (2013). Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 69–82.
- Neuhof, D., Ruess, A., Wenz, F., and Weber, K.J. (2001). Induction of telomerase activity by irradiation in human lymphoblasts. *Radiat. Res.* 155, 693–697.
- Norton, J.C., Piatyszek, M.A., Wright, W.E., Shay, J.W., and Corey, D.R. (1996). Inhibition of human telomerase activity by peptide nucleic acids. *Nat. Biotechnol.* 14, 615–619.
- Oganesian, L., and Karlseder, J. (2009). Telomeric armor: the layers of end protection. *J. Cell Sci.* 122, 4013–4025.
- O’Sullivan, R.J., and Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 171–181.
- Park, J.-I., Venteicher, A.S., Hong, J.Y., Choi, J., Jun, S., Shkreli, M., Chang, W., Meng, Z., Cheung, P., Ji, H., et al. (2009). Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature* 460, 66–72.
- Perrault, S.D., Hornsby, P.J., and Betts, D.H. (2005). Global gene expression response to telomerase in bovine adrenocortical cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 925–936.
- Pestana, A., Vinagre, J., Sobrinho-Simões, M., and Soares, P. (2017). TERT biology and function in cancer: beyond immortalization. *J. Mol. Endocrinol.* JME-16-0195.

- Pezzato, E., Sartor, L., Dell'Aica, I., Dittadi, R., Gion, M., Belluco, C., Lise, M., and Garbisa, S. (2004). Prostate carcinoma and green tea: PSA-triggered basement membrane degradation and MMP-2 activation are inhibited by (-)epigallocatechin-3-gallate. *Int. J. Cancer* 112, 787–792.
- Qin, Y., Guo, H., Tang, B., and Yang, S.-M. (2014). The non-reverse transcriptase activity of the human telomerase reverse transcriptase promotes tumor progression (review). *Int. J. Oncol.* 45, 525–531.
- Read, M.A., and Neidle, S. (2000). Structural characterization of a guanine-quadruplexe ligand complex. *Biochemistry (Mosc.)* 39, 13422–13432.
- Rhodes, D., and Lipps, H.J. (2015). G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res.* 43, 8627–8637.
- Robart, A.R., and Collins, K. (2011). Networked Human Telomerase Domain Interactions Capture the Template-paired Substrate and Single-stranded Product for Processive Elongation. *Mol. Cell* 42, 308.
- Sadava, D., Whitlock, E., and Kane, S.E. (2007). The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate inhibits telomerase and induces apoptosis in drug-resistant lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360, 233–237.
- Sæbøe-Larssen, S., Fossberg, E., and Gaudernack, G. (2006). Characterization of novel alternative splicing sites in human telomerase reverse transcriptase (hTERT): analysis of expression and mutual correlation in mRNA isoforms from normal and tumour tissues. *BMC Mol. Biol.* 7, 26.
- Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Müller, F.L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A.J., Walkey, C., et al. (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 470, 359–365.
- Saito, Y., Fujimoto, H., and Kobayashi, J. (2013). Role of NBS1 in DNA damage response and its relationship with cancer development. *Transl. Cancer Res.* 2, 178–189.
- Santos, J.H., Meyer, J.N., Skorvaga, M., Annab, L.A., and Van Houten, B. (2004). Mitochondrial hTERT exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage. *Aging Cell* 3, 399–411.
- Schmidt, J.C., Dalby, A.B., and Cech, T.R. Identification of human TERT elements necessary for telomerase recruitment to telomeres. *eLife* 3.
- Seimiya, H., Sawada, H., Muramatsu, Y., Shimizu, M., Ohko, K., Yamane, K., and Tsuruo, T. (2000). Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO J.* 19, 2652.
- Sfeir, A., Kosiyatrakul, S.T., Hockemeyer, D., MacRae, S.L., Karlseder, J., Schildkraut, C.L., and Lange, T. de (2009). Mammalian telomeres resemble fragile sites and require TRF1 for efficient replication. *Cell* 138, 90.
- Sharma, N.K., Reyes, A., Green, P., Caron, M.J., Bonini, M.G., Gordon, D.M., Holt, I.J., and Santos, J.H. (2012). Human telomerase acts as a hTR-independent reverse transcriptase in mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 40, 712–725.
- Shin, K.-H., Kang, M.K., Dicterow, E., and Park, N.-H. (2003). Hypermethylation of the hTERT promoter inhibits the expression of telomerase activity in normal oral fibroblasts and senescent normal oral keratinocytes. *Br. J. Cancer* 89, 1473–1478.

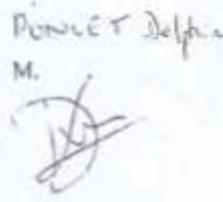
- Shin-ya, K., Wierzba, K., Matsuo, K., Ohtani, T., Yamada, Y., Furihata, K., Hayakawa, Y., and Seto, H. (2001). Telomestatin, a Novel Telomerase Inhibitor from *Streptomyces anulatus*. *J. Am. Chem. Soc.* *123*, 1262–1263.
- Souiden, Y., Bouraoui, A., Chaieb, K., and Mahdouani, K. (2010). Télomères et télomérase comme cibles thérapeutiques dans le traitement du cancer. *Bull. Cancer (Paris)* *97*, 1087–1104.
- Stansel, R.M., de Lange, T., and Griffith, J.D. (2001). T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J.* *20*, 5532–5540.
- Su, Z., Dannull, J., Yang, B.K., Dahm, P., Coleman, D., Yancey, D., Sichi, S., Niedzwiecki, D., Boczkowski, D., Gilboa, E., et al. (2005). Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 3798–3807.
- Sun, D., Thompson, B., Cathers, B.E., Salazar, M., Kerwin, S.M., Trent, J.O., Jenkins, T.C., Neidle, S., and Hurley, L.H. (1997). Inhibition of Human Telomerase by a G-Quadruplexe-Interactive Compound. *J. Med. Chem.* *40*, 2113–2116.
- Takai, K.K., Hooper, S., Blackwood, S., Gandhi, R., and de Lange, T. (2010). In Vivo Stoichiometry of Shelterin Components. *J. Biol. Chem.* *285*, 1457–1467.
- Takakura, M., Kyo, S., Sowa, Y., Wang, Z., Yatabe, N., Maida, Y., Tanaka, M., and Inoue, M. (2001). Telomerase activation by histone deacetylase inhibitor in normal cells. *Nucleic Acids Res.* *29*, 3006–3011.
- Tejera, A.M., d'Alcontres, M.S., Thanasoula, M., Marion, R.M., Martinez, P., Liao, C., Flores, J.M., Tarsounas, M., and Blasco, M.A. (2010). TPP1 Is Required for TERT Recruitment, Telomere Elongation during Nuclear Reprogramming, and Normal Skin Development in Mice. *Dev. Cell* *18*, 775.
- Temime-Smaali, N., Guittat, L., Sidibe, A., Shin-ya, K., Trentesaux, C., and Riou, J.-F. (2009). The G-quadruplexe ligand telomestatin impairs binding of topoisomerase IIIalpha to G-quadruplexe-forming oligonucleotides and uncaps telomeres in ALT cells. *PLoS One* *4*, e6919.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., et al. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* *429*, 417–423.
- Varela, E., Muñoz-Lorente, M.A., Tejera, A.M., Ortega, S., and Blasco, M.A. (2016). Generation of mice with longer and better preserved telomeres in the absence of genetic manipulations. *Nat. Commun.* *7*.
- Venteicher, A.S., Abreu, E.B., Meng, Z., McCann, K.E., Terns, R.M., Veenstra, T.D., Terns, M.P., and Artandi, S.E. (2009). A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* *323*, 644–648.
- Vinagre, J., Almeida, A., Pópulo, H., Batista, R., Lyra, J., Pinto, V., Coelho, R., Celestino, R., Prazeres, H., Lima, L., et al. (2013). Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat. Commun.* *4*, 2185.
- Vonderheide, R.H., Hahn, W.C., Schultze, J.L., and Nadler, L.M. (1999). The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* *10*, 673–679.

- Vulliamy, T.J., Kirwan, M.J., Beswick, R., Hossain, U., Baqai, C., Ratcliffe, A., Marsh, J., Walne, A., and Dokal, I. (2011). Differences in Disease Severity but Similar Telomere Lengths in Genetic Subgroups of Patients with Telomerase and Shelterin Mutations. *PLoS ONE* 6.
- Wang, F., Podell, E.R., Zaug, A.J., Yang, Y., Baciu, P., Cech, T.R., and Lei, M. (2007a). The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* 445, 506–510.
- Wang, F., Podell, E.R., Zaug, A.J., Yang, Y., Baciu, P., Cech, T.R., and Lei, M. (2007b). The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* 445, 506–510.
- Wick, M., Zubov, D., and Hagen, G. (1999). Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene* 232, 97–106.
- Wisconsin Institute for Discovery (2013). The Lewis Lab.
- Won, J., Yim, J., and Kim, T.K. (2002). Sp1 and Sp3 Recruit Histone Deacetylase to Repress Transcription of Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Promoter in Normal Human Somatic Cells. *J. Biol. Chem.* 277, 38230–38238.
- Wong, M.S., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2014a). Alternative Splicing Regulation of Telomerase: A New Paradigm. *Trends Genet. TIG* 30, 430–438.
- Wong, M.S., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2014b). Regulation of human telomerase splicing by RNA:RNA pairing. *Nat. Commun.* 5.
- Wu, K.-J., Grandori, C., Amacker, M., Simon-Vermot, N., Polack, A., Lingner, J., and Dalla-Favera, R. (1999). Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat. Genet.* 21, 220–224.
- Wu, R.A., Upton, H.E., Vogan, J.M., and Collins, K. (2017). Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 86, null.
- Xu, Y., Sato, H., Shinohara, K., Komiyama, M., and Sugiyama, H. (2007). T-loop formation by human telomeric G-quadruplexe. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 51, 243–244.
- Yamada, O., Ozaki, K., Akiyama, M., and Kawauchi, K. (2012). JAK–STAT and JAK–PI3K–mTORC1 Pathways Regulate Telomerase Transcriptionally and Posttranslationally in ATL Cells. *Mol. Cancer Ther.* 11, 1112–1121.
- Yamaguchi, H., Calado, R.T., Ly, H., Kajigaya, S., Baerlocher, G.M., Chanock, S.J., Lansdorp, P.M., and Young, N.S. (2005). Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N. Engl. J. Med.* 352, 1413–1424.
- Yang, N., and Kazazian, H.H. (2006). L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 763–771.
- Yang, H., Kyo, S., Takatura, M., and Sun, L. (2001). Autocrine transforming growth factor beta suppresses telomerase activity and transcription of human telomerase reverse transcriptase in human cancer cells. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 119–127.

- Yao, Y., Bellon, M., Shelton, S.N., and Nicot, C. (2012). Tumor Suppressors p53, p63TA α , p63TA γ , p73 α , and p73 β Use Distinct Pathways to Repress Telomerase Expression. *J. Biol. Chem.* 287, 20737.
- Yatabe, N., Kyo, S., Maida, Y., Nishi, H., Nakamura, M., Kanaya, T., Tanaka, M., Isaka, K., Ogawa, S., and Inoue, M. (2004). HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. *Oncogene* 23, 3708–3715.
- Yi, X., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2001). Quantitation of telomerase components and hTERT mRNA splicing patterns in immortal human cells. *Nucleic Acids Res.* 29, 4818–4825.
- Yin, L., Hubbard, A.K., and Giardina, C. (2000). NF- κ B Regulates Transcription of the Mouse Telomerase Catalytic Subunit. *J. Biol. Chem.* 275, 36671–36675.
- Zaug, A.J., Podell, E.R., Nandakumar, J., and Cech, T.R. (2010). Functional interaction between telomere protein TPP1 and telomerase. *Genes Dev.* 613–622.
- Zhang, Y., Chen, L.-Y., Han, X., Xie, W., Kim, H., Yang, D., Liu, D., and Songyang, Z. (2013). Phosphorylation of TPP1 regulates cell cycle-dependent telomerase recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 5457–5462.
- Zhong, F.L., Batista, L.F.Z., Freund, A., Pech, M.F., Venteicher, A.S., and Artandi, S.E. (2012). TPP1 OB-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. *Cell* 150, 481–494.
- Zhong, Y.-H., Liao, Z.-K., Zhou, F.-X., Xie, C.-H., Xiao, C.-Y., Pan, D.-F., Luo, Z.-G., Liu, S.-Q., and Zhou, Y.-F. (2008). Telomere length inversely correlates with radiosensitivity in human carcinoma cells with the same tissue background. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 84–89.
- Zhou, G., Liu, X., Li, Y., Xu, S., Ma, C., Wu, X., Cheng, Y., Yu, Z., Zhao, G., and Chen, Y. (2016). Telomere targeting with a novel G-quadruplexe-interactive ligand BRACO-19 induces T-loop disassembly and telomerase displacement in human glioblastoma cells. *Oncotarget* 7, 14925–14939.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 11 Septembre 2017

<p align="center">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Pauline BILLARD</p> <p><u>Sujets</u> : La télomérase, fonctions biologiques et ciblage thérapeutique</p> <p>Jury :</p> <p>Président : M Jean Louis MERLIN, PU-PH Et Co-directeur</p> <p>Directeur : Mme Delphine PONCET ; MCU-PH Juges : M Alexandre HARLE ; MCU-PH M Emmanuel RANFAING, Pharmacien</p>	<p align="right">Vu, 12/06/2017</p> <p align="right">Nancy, le</p> <p align="center">Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p>Pr Jean-Louis MERLIN <i>Biologie cellulaire oncologique</i> Faculté de Pharmacie 5 rue Albert Lebrun 54001 NANCY CEDEX FRANCE</p> <p align="right">PONCET Delphine M. </p>
<p align="center">Vu et approuvé,</p> <p align="center">Nancy, le 24 08.2017</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center"> Francine PAULUS</p> <p align="center"></p>	<p align="center">Vu,</p> <p align="center">Nancy, le 31 AOUT 2017</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p align="center"> Pierre MÜTZENHARDT</p> <p align="center"></p> <p align="right">N° d'enregistrement : 9963</p>

N° d'identification :

TITRE

La télomérase : fonctions biologiques et ciblage thérapeutique

Thèse soutenue le 11 Septembre 2017

Par Pauline BILLARD

RESUME :

La télomérase, composée de différentes sous unités catalytique (TERT), ribonucléique (TERC) et protéique (Dyskérine). Il s'agit d'une enzyme vitale pour maintien de la taille des extrémités des chromosomes ou télomères. En effet, elle permet la synthèse de nouvelles répétitions télomériques lors du processus de réplication de l'ADN. Cette capacité d'allongement des télomères est détournée dans des phénomènes pathologiques comme le cancer et en physiologie, une taille trop faible (limite d'Hayflick) de télomères entraîne l'arrêt du cycle cellulaire c'est ce que l'on appelle la sénescence répllicative. Pour échapper à ce processus, les cellules tumorales ré-exprime sa sous unité catalytique TERT et acquièrent ainsi une immortalité répllicative. Il est important de noter que physiologiquement un raccourcissement des télomères est associé à un vieillissement cellulaire.

Dans cette thèse, nous explorons aussi les autres fonctions biologiques de la télomères et démontrons les raisons pour lesquelles le domaine de la thérapeutique est en expansion concernant les thérapies anti-télomérase.

Nous recenserons les différentes stratégies ciblant cette enzyme avec les dérivés naturels, les inhibiteurs pharmacologiques de la télomérase (les oligonucléotides anti-sens), mais aussi les ligands des G-quadruplexe

composants les télomères ou encore l'essors de thérapie immunologique anti-TERT.

Ainsi nous mettons en lumière le fort intérêt de cette enzyme tant pour la prise en charge des patients atteints de

cancer mais aussi ceux atteints de maladies métaboliques que l'on peut mettre en lien avec le processus de vieillissement cellulaire.

MOTS CLES : TELOMERE / TERT / TERC / DYSKERINE / THERAPIE

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
<u>Delphine PONCET</u> <u>MCU-PH</u>	<u>UMR INSERM 1052 –CNRS 5286 –</u> <u>Equipe R.RIMOKH / G.GILLET</u> <u>CENTRE LEON BERARD -LYON</u>	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème 1

Thèmes	① - Sciences fondamentales 3 – Médicament 5 - Biologie	2 – Hygiène/Environnement 4 – Alimentation – Nutrition 6 – Pratique professionnelle
--------	---	--